

Kit PCR Express_Principe réPLICATION de l'ADN



Le matériel :

- 1 tube échantillon d'ADN à amplifier (tube à pastille rose 
- 1 tube d'amorces AMP (tube à pastille bleue 
- 1 tube PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte 
- 1 tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune 
- 1 microtube PCR 0,2 mL
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse

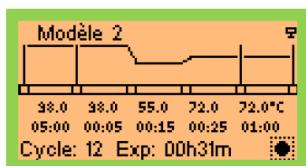


PHASE 1 : L'AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

- Allumer et programmer le thermocycleur
 - Principe : une amplification rapide de 12 cycles en 30 minutes.
- Correspond au **modèle 2** du thermocycleur Jeulin

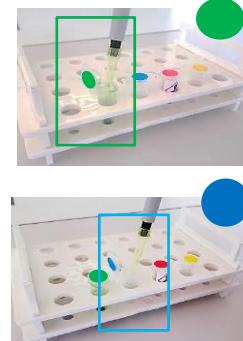


Préparation du tube réactionnel (1 par binôme)

Dans un microtube PCR 0.2mL, on prépare :

20 µl de PCR mix + 20 µl d'amorces AMP + 2 µl d'ADN à amplifier

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL
2. Prélever 20 µL du "PCR Master Mix" () et les placer dans le microtube PCR
3. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever 20 µL du "Primer Mix" () et les placer dans le microtube PCR
Mélanger par pipetage doux
5. Changer de pointe de micropipette
6. Prélever 2 µl d'ADN à amplifier tube ()
7. Refermer rapidement le tube



Repérer le tube à l'aide d'une marque.

Placer les tubes dans le thermocycleur. **S'assurer** que le tube témoin T est présent.

Fermer le couvercle et **lancer** le programme.

Sélectionner le programme **Modèle 2**.

Placer le curseur sur  puis **appuyer** OK → =cycle en cours (30 minutes environ)



Préparation du tube témoin T (une seule pour toute la classe)

«ADN avant amplification», il est dilué au 1/10 comme l'ADN des tubes mélangés avec MixPCR + amorces

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier le tube T
2. Prélever 40 µL d'eau distillée les placer dans le microtube PCR
3. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever 2 µl d'ADN à amplifier tube ()

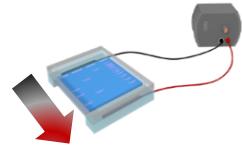
PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse

Préparation du dispositif pour électrophorèse

- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



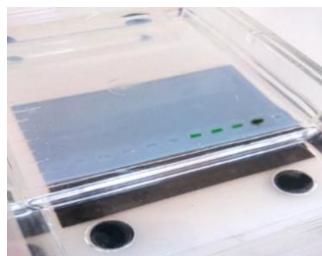
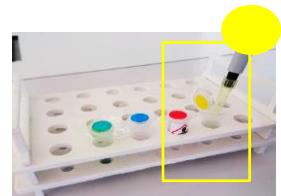
Dépôts et migration

Les puits sont situés du côté du pôle négatif (noir) de la cuve à électrophorèse

- Déposer 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel – )
- Déposer 10 µl d'ADN fourni (tube  : permet de visualiser le plasmide et de déterminer sa taille
- Déposer 10 µl du tube témoin T « ADN avant amplification », ce témoin correspond à la concentration d'ADN présente avant l'amplification.
- Les micro-tubes ADN amplifié : déposer 10 µl d'ADN amplifié par PCR
- Poser le couvercle sur la cuve, ce qui ferme le circuit, régler l'alimentation en fonction du tampon utiliser (ex TAE 100 à 150 V maxi)



Allumer et attendre la migration **pendant 30 min** en 140 V.



Dépôt ADN
Un revêtement noir
glissé sous la cuve,
permet de mieux voir la
position des puits

Lecture

- Utiliser le transilluminateur pour révéler les bandes d'ADN