

Kit PCR Amplification d'un gène ancestral du cytosquelette (GIP)

PHASE 1 : Prélèvement des extraits cellulaires des échantillons biologiques

Arabidopsis Thaliana

150 µl de lyophilisat d'*Arabidopsis thaliana* sont fournis dans le kit (microtube : 0,2 mL).

Quelques µg de poudre sont seulement nécessaires pour une bonne amplification. Au contraire un excès de poudre n'est pas gage d'un résultat plus visible, au contraire cela peut provoquer un effet inhibiteur de la réaction.

A l'aide de l'embout pointu de l'anse stérile ou de l'embout d'un cône de micropipette prélever quelques poussières de poudre verte. Mélanger directement la préparation dans le mixPCR /amorces.



Chou-fleur frais ou surgelé et Brocoli



Pesée 1g de fleurs



Broyage du chou au pilon dans 1 mL d'eau stérile



Introduire, 1µl de liquide d'extraction préparé

Radis rose



Bien laver le radis, prélever 1 g dans le bas de la racine, lieu des divisions cellulaires, broyer au mortier et pilonner dans 1 mL d'eau distillée stérile



Introduire, 1µl de liquide d'extraction préparé



Blob (*Physarum polycephalum*)

Prélever sur les expansions de croissance du blob le contenu du petit anneau de l'anse de prélèvement (ose)



Levure de boulanger

Avant la séance mettre la levure lyophilisée en suspension dans de l'eau.

Lors de la séance prendre 20µL de la suspension de levure,

Placer le microtube **5 minutes au bain thermostaté à 98°C** couvercle ouvert, utiliser la fonction bain-marie du thermocycleur.



Quantité d'échantillon à introduire : 1µl de liquide d'extraction préparé

Kit PCR Amplification d'un gène ancestral du cytosquelette (GIP)



Le matériel :

- 1 tube d'amorces (tube à pastille bleue ■)
- 1 tube PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte ■)
- 1 tube DNA release [bloqueur de réaction] (tube à pastille rouge ■)
- 1 tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ■) pour l'électrophorèse
- 1 microtube 0,2 mL contenant 100 µl de poudre d'arabidopsis thaliana lyophilisé
- 1 anse stérile : prélèvement de cellules de l'épiderme
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse

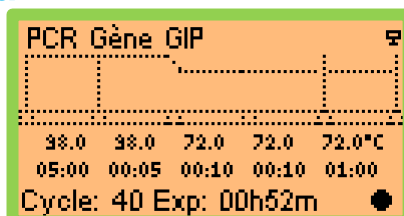


PHASE 2 : L'AMPLIFICATION



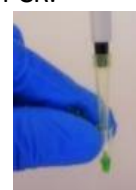
Paramétrage du thermocycleur

- Allumer et programmer le thermocycleur
- Principe : une amplification de 40 cycles



Préparation des tubes réactionnels

1. Repérer les microtubes PCR pour identifier les échantillons et/ou l'expérimentateur.
2. Dès que les extraits sont prêts, préparer les mélanges PCR Mix polymérase + amorces pour chaque tube :
 - **Prélever 20 µL** du "PCR Mix polymérase" (■) et les placer dans le microtube PCR. Changer de pointe de micropipette.
 - **Prélever 20 µL** du "Mix Amorces" (■) et les placer dans le microtube PCR. Mélanger par pipetage doux. Changer de pointe de micropipette
3. Puis mélanger sans attendre les extraits biologiques au mix PCR /amorces.
4. Faire le prélèvement des cellules de l'épiderme comme indiqué ci - dessous et déposer les cellules prélevées dans le tube.



Prélèvement des cellules de l'épiderme

Prélèvement buccal : à l'aide de l'embout pointu de l'anse stérile (fig.1),

- Effectuer un prélèvement intérieur de la joue en balayant cette dernière doucement de haut en bas 3 à 4 fois. Anse perpendiculaire (fig.2)
- Placer l'anse dans le microtube PCR et la faire tourner comme un mélangeur 3 à 4 fois puis la sortir en prenant soin de ne pas emporter trop de volume réactionnel (fig.3)

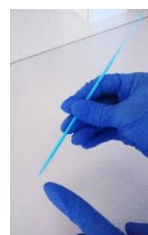


Figure 1



Figure 2

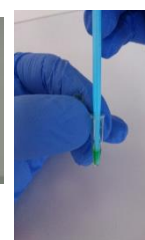


Figure 3

Ou

Prélèvement du dessus de la main : les mains doivent être propres et sèches.

- A l'aide de l'embout pointu de l'anse stérile, effectuer un prélèvement en appuyant et en frottant la peau du dessus de la main en balayant doucement de gauche à droite 3 fois sur une distance de 4 centimètres environ.

- Placer l'anse dans le microtube PCR et la faire tourner comme un mélangeur 3 à 4 fois puis la sortir en prenant soin de ne pas emporter trop de volume réactionnel (fig.3)



Figure 1



Figure 2

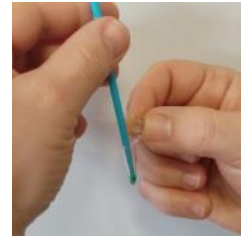




Figure 3

Fermer le microtube PCR.

Placer les tubes dans le thermocycleur

Sélectionner le programme GIP précédemment enregistré.

Placer le curseur sur  puis **appuyer** OK →  = cycle en cours (1h00 environ)




PHASE 3 : REVELATION



Electrophorèse

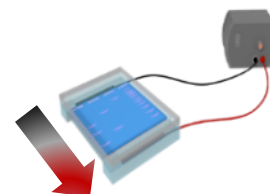
Préparation de l'ADN amplifié

- A faire pour chaque microtube : ouvrir délicatement le microtube et y ajouter 2 µL de la solution "DNA-Release" (tube à pastille )
Mélanger par pipetage doux




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



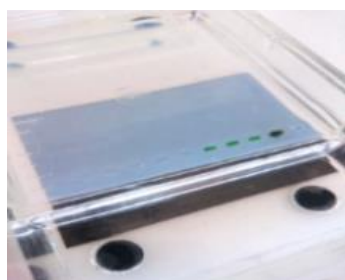
Dépôts et migration

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

- Déposer 8 µl du marqueur de Poids Moléculaire
(« échelle moléculaire » du gel – )
- ADN amplifié : Déposer 10 µl d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)
- Poser le couvercle sur la cuve
- Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité.
Allumer et régler.



Astuce : Si votre alimentation dispose d'un sélecteur de tensions, vous pouvez améliorer le rendu en fractionnant l'électrophorèse en 2 étapes. D'abord **5 minutes** à basse tension (**70** à **110 V** suivant les modèles) puis **15 minutes** entre **140** et **160 V** (au-delà de **160 V**, l'ADN est endommagé). A base tension, les sels et autres impuretés chargées électriquement sont rapidement éliminés.



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