

# Kit PCR sensibilité PTC - élève



## Le matériel :

- 1 Tube d'amorces PTC (tube à pastille bleue )
- 1 Tube PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte )
- 1 Tube enzyme de restriction BsU RI (HaeIII), (tube à pastille rose )
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune  pour l'électrophorèse)
- 1 Tube ADN PTC sensible (tube à pastille rouge )
- 1 Tube ADN PTC non sensible (tube à pastille blanche )
- 2 microtubes PCR 0,2 mL
- Système électrophorèse compact (phorEasy ou MiniOne)
- 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 de 40 cycles

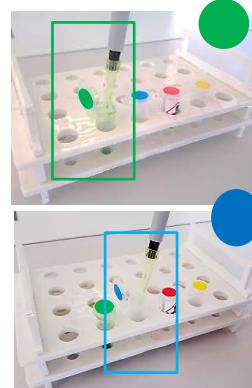
Correspond au modèle 3 du thermocycleur Jeulin à adapter (voir notice 3.3.1)



### Préparation des tubes réactionnels et lancement de la PCR

Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier l'ADN choisi

1. Prélever 20 µL du "PCR Master Mix" () et les placer dans le microtube PCR
2. Changer de pointe de micropipette
3. Prélever 20 µL du "Primer Mix" () et les placer dans le microtube PCR  
Mélanger par pipetage doux
4. Changer de pointe de micropipette
5. Prélever 2 µL d'ADN ( ou blanche) et les placer dans le microtube PCR  
Mélanger par pipetage doux.
6. Fermer le microtube PCR. On utilisera plutôt une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.
7. Placer les tubes dans le thermocycleur, fermer le couvercle et lancer le programme
8. Sélectionner le programme Modèle 3. Placer le curseur sur  puis appuyer OK



→  = cycle en cours (1h10 environ)

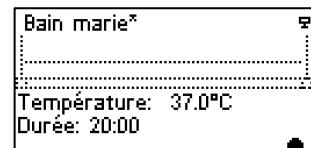
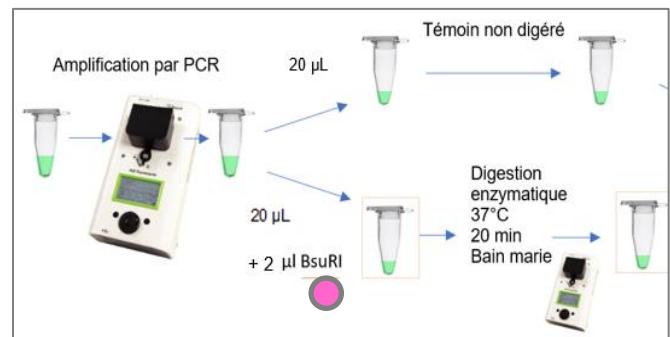


## PHASE 2 : DIGESTION



### Digestion enzymatique

- Après l'amplification, chaque tube est séparé en 2
- Prélever 20 µl et déposer dans un nouveau microtube PCR 0.2 ml, (le microtube est identifié)
  - 1 tube va recevoir l'enzyme de restriction
  - 1 tube est mis au réfrigérateur le temps de la digestion, il servira de témoin
- Prélever 2 µl d'**enzyme** BsuRI (HaeIII) déposer dans le microtube PCR, mélanger par pipetage doux
- Placer le tube dans le thermocycleur
- Sélectionner le programme « Bain marie » du thermocycleur
- Régler une plage de 20 min à 37°C



## PHASE 3 : REVELATION

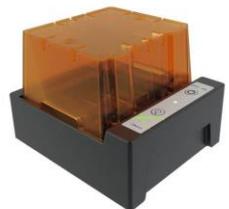


### Electrophorèse



### 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
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



### Dépôts et migration

- Déposer 8 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » – )
- ADN amplifié : Déposer 8 µl d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)
- Pour chaque individu, nous avons 2 microtubes PCR (le témoin, le tube « digéré »)
- Poser le couvercle sur la cuve
- Allumer et attendre la migration **pendant 20 min.**



### Lecture

- Avec le système d'électrophorèse compact phorEasy ou MiniOne la révélation se fait en temps réel