



Génétique

Kit PCR génotypage variation du gène de l'amélogénine – 18 PCR

Réf : 117 137

Kit PCR génotypage Variation du gène de l'amélogénine – 18 PCR

Français – p 1

2 Annexes

Fiche de paillasse

Version : 1203

Amplification par PCR des allèles de l'amélogénine

1.1 Principe général d'une réaction PCR (Polymerase Chain Réaction)

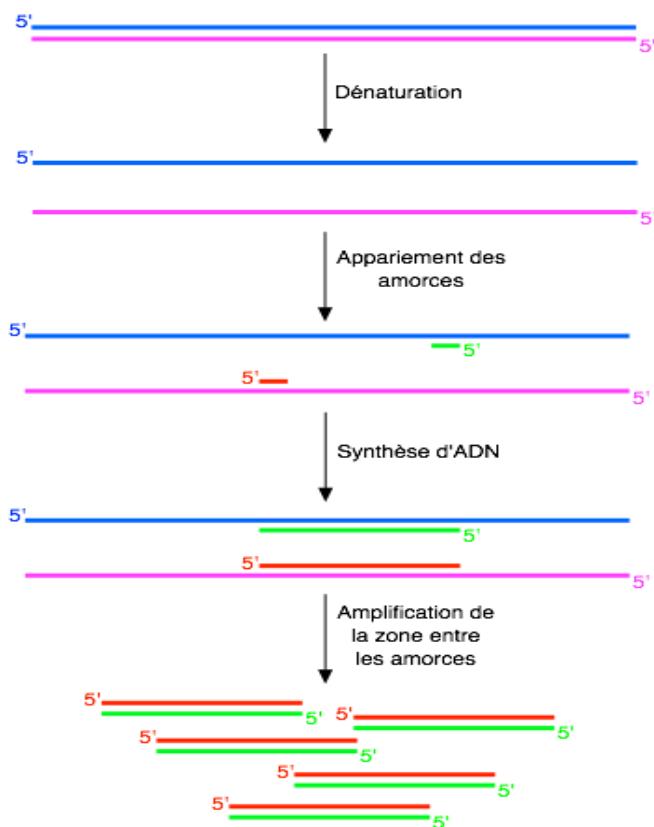
L'ADN est synthétisé dans la nature grâce à un type d'enzyme appelé ADN polymérase. Pour fonctionner, cette enzyme a besoin d'une matrice d'ADN simple brin à répliquer, d'une amorce ADN complémentaire à l'ADN à répliquer et de désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). La découverte d'organismes thermophiles a permis de trouver des ADN polymérasées ayant deux caractéristiques essentielles à savoir une température de fonctionnement élevée (typiquement vers 72°C) et surtout la capacité à ne pas être dénaturées définitivement par des températures supérieures à 90°C. Ces caractéristiques ont permis d'inventer la réaction PCR ou réaction de polymérisation en chaîne qui consiste à synthétiser *in vitro* de l'ADN de façon exponentielle.

La première étape de cette réaction (Figure 1) consiste en la dénaturation de l'ADN double brin qui sert de matrice. Pour se faire, la solution d'ADN est chauffée à une température proche de l'ébullition ce qui permet de séparer les deux brins d'ADN par fusion thermique.

La seconde étape consiste à appariер, de part et d'autre de la zone à amplifier, des amorces d'ADN simple brin synthétique. Cette opération est simplement réalisée en abaissant suffisamment la température pour que cet appariement puisse être stable.

La troisième et dernière étape consiste à se placer à la température optimale pour la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase (typiquement 72°C) pendant le temps nécessaire pour que cette dernière ait le temps de synthétiser la longueur d'ADN souhaitée.

Figure 1



Ces trois étapes vont être répétées autant de fois que nécessaire pour amplifier de façon exponentielle l'ADN recherché ou amplicon (Figure 2 et 3). Typiquement, la molécule d'origine va pouvoir ainsi être multipliée par des facteurs de 10^6 à 10^9 la rendant détectable par électrophorèse sur un gel d'agarose.

Figure 2

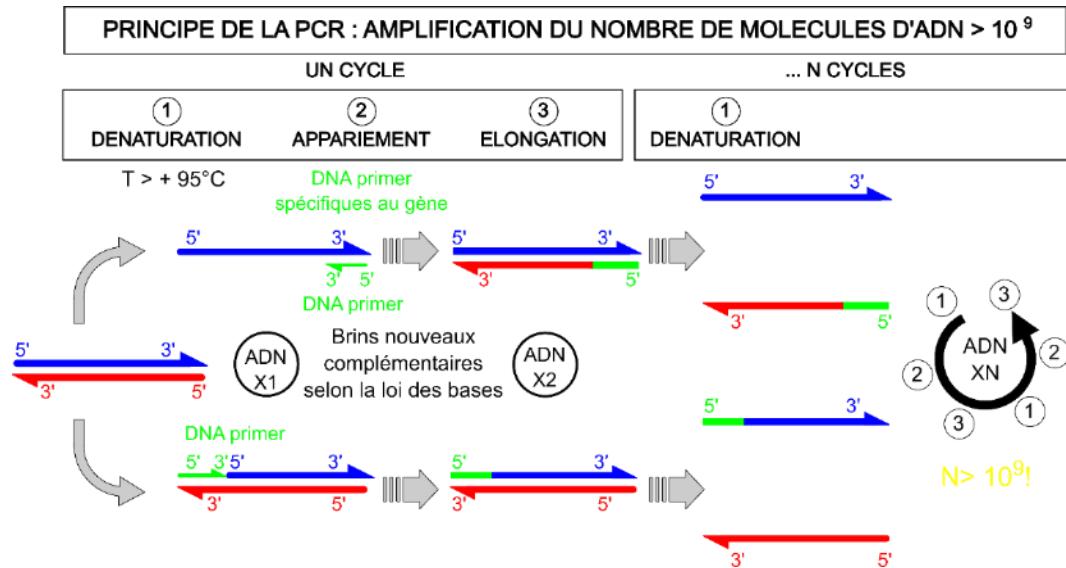
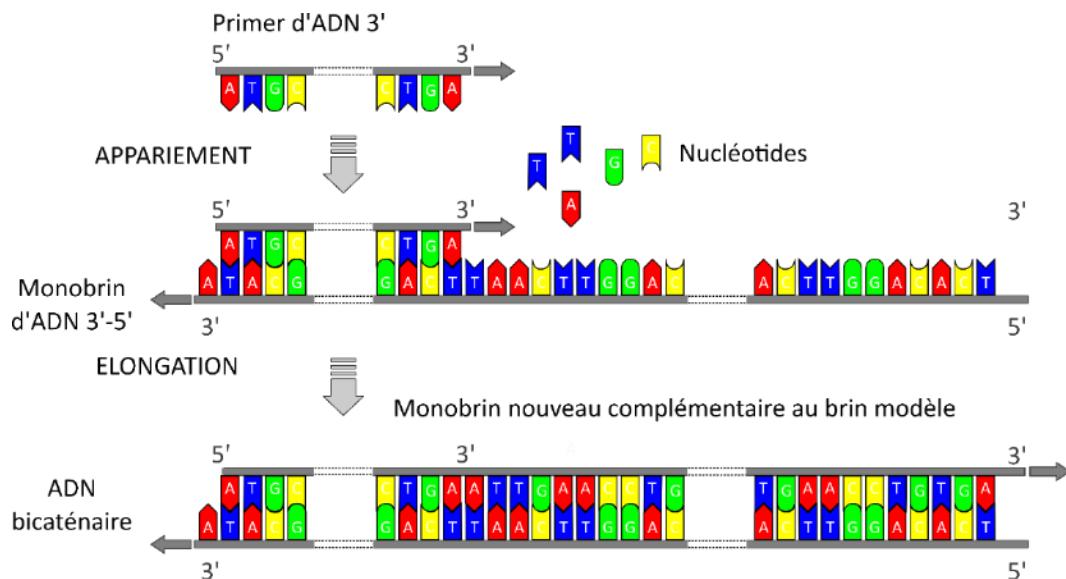


Figure 3



1.2 Amélogénine : un gène, deux allèles AMEL X et AMEL Y

Le gène de l'amélogénine est un gène qui code pour une protéine présente dans la composition de l'émail des dents.

La protéine amélogénine est le composant majeur du développement de l'émail des mammifères, dans lequel elle représente environ 90% de la teneur en protéines (Termine et al., 1980, Fincham et al., 1983, Sasaki et Shimokawa, 1995 in Delgado et al, 2004). En tant que protéine prédominante, l'amélogénine joue un rôle essentiel dans le développement de l'émail.

Le gène AMEL présente chez l'humain deux allèles localisés respectivement sur les chromosomes X (AMELX = 7348 pb) et Y (AMELY = 8109 pb).

Les deux gènes sont exprimés, cependant chez un homme AMELX représente 90% du taux de transcription. Le chromosome X assurant l'essentiel de la production des protéines fonctionnelles, le chromosome Y est donc moins soumis aux pressions de sélections. C'est probablement la raison pour laquelle on retrouve une accumulation de mutations plus importantes sur AMELY que sur AMELX.

L'amplification proposée par ce kit va permettre de mettre en évidence, à partir d'un jeu d'amorces commun, deux fragments d'ADN de tailles différentes résultant d'une délétion présente sur le chromosome Y et absente sur le chromosome X.

Ainsi, on va obtenir :

- Un fragment d'ADN de 1265 pb issu de AMELX
- Un fragment d'ADN de 1087 pb issu de AMELY

Cette expérience reprend le principe du génotypage mis au point en 1995 par Sasaki et Shimokawa qui utilise le gène de l'amélogénine comme marqueur de typage sexuel. Depuis ce test a intégré l'arsenal des analyses médico-légales pour les applications judiciaires, il est présent dans la plupart des tests d'empreintes génétiques en association avec d'autres *loci* de séquences répétées en tandem (STR).

Au-delà des applications policières, AMEL est un gène relativement bien conservé au cours de l'évolution, on a ainsi pu déterminer sa probable présence chez un ancêtre commun aux vertébrés il y a plus de 450 millions d'années.

Pour les mammifères AMELX et AMELY sont des gènes témoins de l'évolution différenciée des chromosomes X et Y.

Aujourd'hui, le gène de l'amélogénine est donc le centre d'intérêt de nombreuses recherches en santé, génomique, paléogénétique.

Ce génotypage est donc le point de départ à de nombreux scénarios pédagogiques :

- Police scientifique, empreintes génétiques.
- Identification sexuelle dans les vestiges archéologiques humains
- Amélogénèse imparfaite (approche généalogique, inactivation du ch X ...)
- Evolution des mammifères et des primates
- Epissage alternatif, exon, intron.

Dossier d'expériences à retrouver sur plateformenum.jeulin.fr

Ce dossier de 50 pages comprend :

- **un TP pas à pas** : Détermination du sexe génétique d'un individu
- **4 investigations** :
 - Diversité génétique
 - Mutation et maladie génétique
 - Recherche de parenté chez les mammifères
 - L'épissage différencié

Un test qui a trouvé une application directe pour la police scientifique

En 1995, a été décrite une méthode simple et rapide, de marqueur ADN sexuel basée sur une amplification par PCR utilisant des amores similaires pour X et Y puis suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose. [The amelogenin gene – S. Sasaki, H. Shimokawa. The International Journal of Developmental Biology 39: 127- 133.]

Cette méthode pour spécifier le caractère homme ou femme d'un individu à identifier, a depuis, été améliorée et fiabiliser par l'association d'autres marqueurs génétiques. L'analyse de fragments d'AMEL X et AMEL Y demeure encore des zones de références pour identification judiciaire.

En médecine légale :

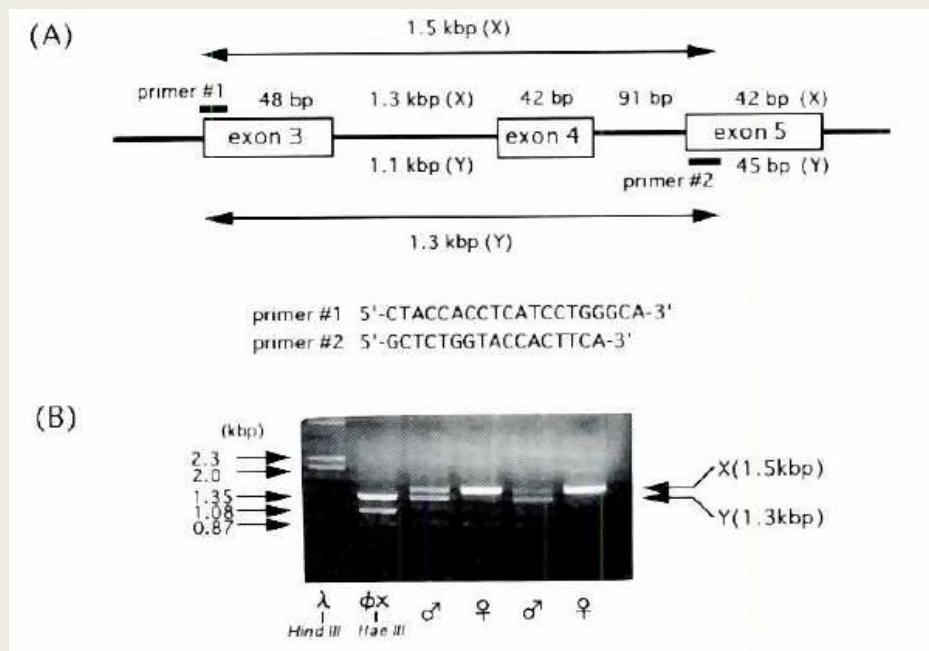
Pour le chromosome Y : pour les individus masculins, l'analyse du chromosome Y, (correspond à l'héritage paternel) débute par le gène de l'amélogénine complété de 17 loci de séquences répétées.

Pour le chromosome X : pour les individus féminins, l'analyse du chromosome X, débute par le gène de l'amélogénine complété de 12 loci de séquences répétées.

Pour l'ADN autosomal : 15 loci différents de séquences VNTR réparties sur 14 chromosomes différents

[The amelogenin gene – S. Sasaki, H. Shimokawa. The International Journal of Developmental Biology 39: 127- 133.]

Résultat de l'analyse par PCR des gènes de l'amélogénine sur les chromosomes X et Y.



(A) ADN génomique extrait de sang d'un homme et d'une femme. Les échantillons sont analysés par PCR et utilisent 2 amores (primers) communes aux deux chromosomes X et Y. Les séquences nucléotidiques des primers #1 and #2 sont localisées respectivement sur l'exon 3 et l'exon 5.

(B) Après amplification, les fragments ont été séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2 %. Il apparaît deux fragments, un fragment de 1,5 kbp amplifié à partir du chromosome X et un fragment de 1,3 kbp amplifié à partir du chromosome Y.

A gauche, les marqueurs moléculaires (fragments ADN de phage λ par HindIII et fragments d'ADN du phage ϕ X par HaeIII).

1.3 Objectif du kit amplification

Ce kit complet contient le matériel et les réactifs pour prélever et amplifier l'ADN à partir d'un prélèvement de cellules buccales d'individus.

Le but de ces travaux pratiques est de révéler par réaction PCR les variations alléliques du gène de l'amélogénine entre individus féminin et masculin. Deux copies de ce gène existent chez l'Homme, l'une sur le chromosome X et l'autre sur le chromosome Y alors que pour la femme les deux chromosomes X portent le même allèle.

Ce kit est conçu afin d'obtenir des amplicons spécifiques avec un seul couple d'amorces soit une seule réaction PCR. Le segment d'ADN amplifié ou amplicon du gène porté par X sera de 1265 paires de bases, alors que celui porté par Y sera de 1087 paires de bases. Dès lors, deux amplicons distincts seront retrouvés chez l'homme (XY) alors qu'un seul amplicon sera généré pour une femme (XX). Ces amplicons seront séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose.

Mise en œuvre d'une amplification

2.1 Le matériel pour 2 x 9 amplifications

Le format du kit est adapté pour 2 demi-classes. Les 18 réactions du kit sont réparties en 2 lots, soit 2 x 9 amplifications.

Le contenu du kit :

- 2 Tubes d'amorces AME (tube à pastille bleue 
 - 2 Tubes PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte 
 - 1 Tube DNA release (tube à pastille rouge 
 - 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ) pour l'électrophorèse
 - 2x 9 microtubes PCR 0,2 mL
 - 2x 9 anses stériles pour le prélèvement des cellules de l'épiderme



Stockage : plusieurs mois à - 20°C (> 1an pour un kit neuf)

Les réactifs entamés peuvent également être remis à – 20°C, cependant le risque de contamination (par dnase) est très important si le tube a été ouvert longtemps, et/ou a subi plusieurs prélèvements par pipetage.

Matériel complémentaire nécessaire :

Thermocycleur

Micropipette 2 – 20µl + cônes stériles

Gants

Gants
Feutre à pointe fine

Feature Blouse





Conseils de manipulation

Il est généralement recommandé de placer les tubes sur la glace pendant les manipulations. Toutefois, ceci n'est pas absolument indispensable, surtout si les consommables sont utilisés dans leur intégralité et les réactions préparées dans un temps raisonnablement court.

Les produits obtenus par PCR (ADN) sont sans danger et s'éliminent avec les déchets normaux.

Quelques règles de bases pour éviter les contaminations des tubes :

- La paillasse est propre et dégagée
- L'utilisation de gants est préconisée mais n'est pas obligatoire. Toutefois, on veillera à bien se laver les mains au savon avant les manipulations des différents composants du kit.
- Etre vigilant lors de la manipulation des tubes de réactifs et du tube PCR, limiter le temps d'ouverture, éviter les mouvements brusques et les brassages d'air au-dessus des tubes ouverts.

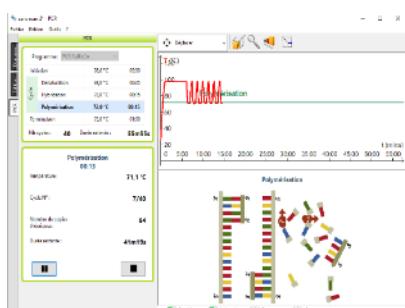
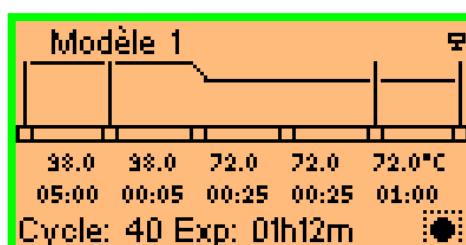
2.2 Paramétrage du thermocycleur

Allumer et programmer le thermocycleur

Principe : une amplification de 40 cycles.

Thermocycleur didactique Jeulin,

- Sélectionner le programme **Modèle 1**
- Placer le curseur sur puis appuyer OK
→ = cycle en cours (1h10 environ)



Ou utiliser le logiciel de pilotage PCR sur PC

ou tablette





En fin de cycle, les échantillons peuvent être maintenus plusieurs heures à une température de conservation < 8°C. Ainsi, l'électrophorèse peut avoir lieu juste après l'amplification ou ultérieurement.

Les microtubes peuvent être entreposés directement au congélateur -18 °C, ils se conserveront alors plusieurs semaines.

Paramétrage

Correspond au **modèle 1** du thermocycleur Jeulin.

Etape	Action	Température	Temps
Initiation	Dénaturation	98°C	300 secondes
Cycle de base x 40	Dénaturation	98°C	5 secondes
	Hybridation (1)	72°C	25 secondes
	Polymérisation	72°C	25 secondes
Terminaison		72°C	60 secondes
Attente (2)		<8°C	

(1) La température d'appariement (72°C) des oligonucléotides a été choisie pour être proche de la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase. Ceci permet de simplifier les cycles et d'accélérer ainsi le processus. Hybridation et polymérisation sont donc confondues, la phase à 56°C n'étant pas nécessaire.

(2) Non nécessaire si l'analyse sur gel est menée immédiatement

3. Préparation du gel d'électrophorèse

Un **gel d'agarose à 1,2%** en tampon TAE est nécessaire pour la migration des échantillon ADN amplifié par PCR.

Les gels peuvent être préparés plusieurs heures avant ou la veille de la manipulation. Les gels se conservent 24 h au réfrigérateur dans un sachet plastique hermétique, pour la préparation voir l'**annexe 1**

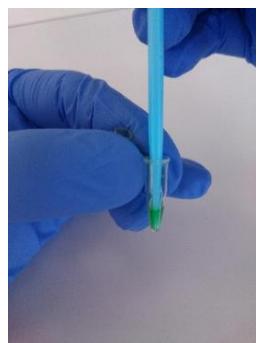
4. Déroulement de l'expérience

4.1 Prélèvement de cellules de l'épiderme

2 possibilités : Cellules buccales ou du dessus de la main

4.1.1 Prélèvement de cellules buccales

1. A l'aide de l'embout pointu de l'anse stérile (fig.1), effectuer un prélèvement à l'intérieur de la joue en balayant cette dernière doucement de haut en bas 3 à 4 fois. On tiendra l'anse de telle sorte qu'elle soit perpendiculaire à la joue pendant le prélèvement (fig.2).
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*
Fermer le microtube PCR. On utilisera plutôt une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.
- **Important :** bien repérer le propriétaire de chaque microtube à l'aide d'une inscription au feutre fin sur la languette du bouchon ou sur la charnière.
- Placer les tubes dans le thermocycleur

4.1.2 Prélèvement de cellules du dessus de la main

1. Les mains doivent être propres et sèches
2. A l'aide de l'embout pointu de l'anse stérile (fig.1), 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 (fig.2).
3. 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

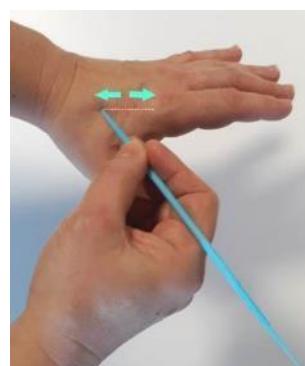


Figure 2

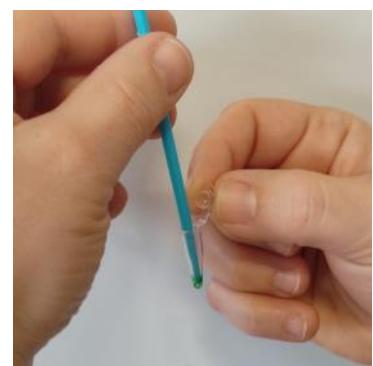


Figure 3

- Fermer le microtube PCR. On utilisera plutôt une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.
- **Important :** bien repérer le propriétaire de chaque microtube à l'aide d'une inscription au feutre fin sur la languette du bouchon ou sur la charnière.
- Placer les tubes dans le thermocycleur

Le prélèvement des cellules du dessus de la main peut se révéler dans de rares cas un peu moins fiable que le prélèvement buccal.

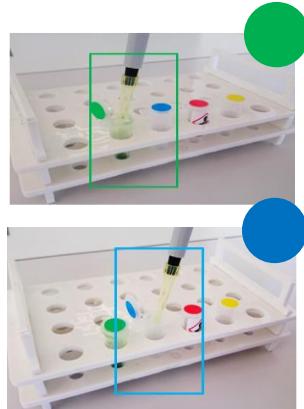
4.2 Préparation des tubes réactionnels

La manipulation est très simple, elle nécessite uniquement l'utilisation de micropipettes et de cônes stériles.

Dans un microtube PCR 0.2mL, on prépare :

20µl de PCR mix + 20µl d'amorces AME + prélèvement des cellules de l'épiderme.

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier l'expérimentateur.
2. Prélever 20 µL du "PCR Master Mix" (vert) et les placer dans le microtube PCR.
3. Changer de pointe de micropipette.
4. Prélever 20 µL du "Primer Mix" (bleu) et les placer dans le microtube PCR.
Mélanger par pipetage doux.
5. Changer de pointe de micropipette



4.3 Lancement de la PCR

Thermocycleur didactique Jeulin,

- Sélectionner le programme **Modèle 1**
- Placer le curseur sur puis appuyer OK
→ =cycle en cours (1h10 environ)

4.4 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

4.4.1 Préparation de l'ADN amplifié

- Retirer le microtube du thermocycleur après la fin complète de l'amplification.
- A ce stade, les tubes peuvent être stockés à 4 °C pendant 48 H.
- Ouvrir délicatement le microtube et y ajouter 2 µL de la solution "DNA-Release" (tube à pastille rouge). Mélanger par pipetage doux.



Le mélange réactionnel ne nécessite pas d'ajout de tampon de charge avant dépôt.

4.4.2 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un **gel d'agarose à 1,2 % en tampon TAE**.

→ Voir Annexe 2



4.4.3 Dépôts et migration

→ Voir Annexe 2

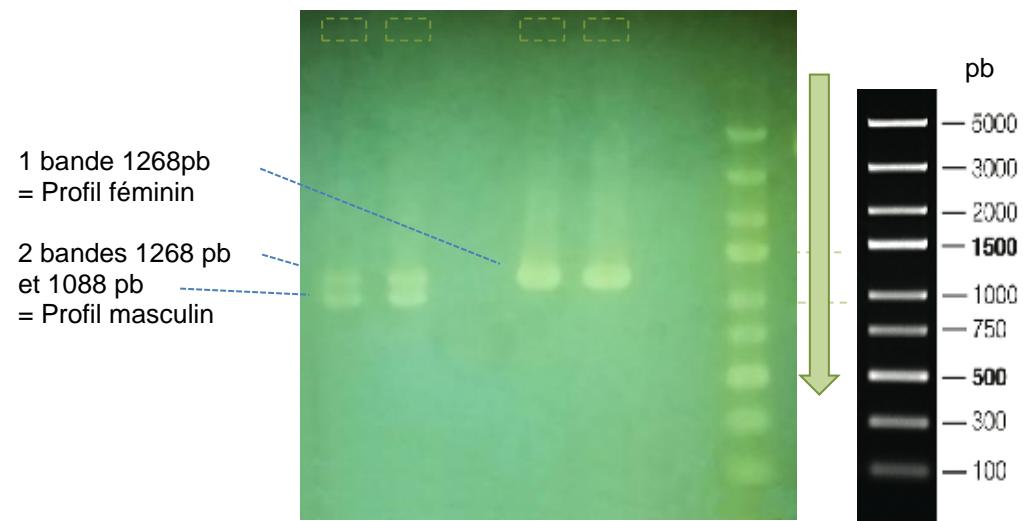
4.4.4 Révélation

→ Voir Annexe 2

5. Résultats

Nous utilisons un colorant, qui en présence d'acide nucléique (ADN) et sous l'excitation du lumière bleue (470nm) réémet une lumière jaune/verte (525 nm). Toutes les bandes fluorescentes correspondent à des fragments d'ADN de même taille, comme nous le montre le marqueur de poids moléculaires (PM).

Exemple de résultat en post coloration :



ANNEXE 1 : Préparation du gel d'électrophorèse (§ 3)

(A préparer avant l'expérimentation)

La méthode retenue ici est une électrophorèse en **gel d'agarose à 1,2 %** en tampon TAE avec une révélation par fluorescence gel green en l'éclairant à l'aide du transilluminateur.

[Il est tout aussi possible d'utiliser un autre tampon (TBE) ou d'autres colorants standard type Azure A.]

Durées :

	Temps	Remarques
Préparation du gel, coulage	30 min	
Migration	25 min	140 V en TAE
Révélation Solution 1 : pré coloration du gel (3µl/ 40 ml de gel)	10 min	Solution rapide Les bandes d'ADN sont moins résolues
Solution 2 (alternative) : post coloration 30 minutes de trempage	40 min	Les bandes d'ADN ont une résolution plus fine

Appareillage	Verrerie et petit matériel	Produits
- Balance à 0,01g - Cuve à électrophorèse + alimentation - Système de chauffage - Thermomètre	- Éprouvette 100 ml - Éprouvette de 500 ml - Fiole de 250 ml - Erlenmeyer 250 ml - Cristallisoir (ou récipient équivalent) - Ruban adhésif pour peindre	- TAE 10X (25 ml) - Agarose (0,6 g) - Gelgreen - Marqueur de poids moléculaire (Microtube à pastille jaune) - Produits de PCR

Préparation du tampon TAE 1X : (se conserve quelques jours au réfrigérateur)

- * Dans une fiole de 250 ml :
 - Verser 25 ml de TAE 10X dans la fiole
 - Rincer 3x le flacon à l'eau distillée, verser cette eau de rinçage directement dans la fiole
 - Compléter la fiole en eau distillée jusqu'au trait de jauge (250 ml)

Préparation et coulage du gel d'agarose à 1,2 % : peut être réalisé pendant, ou 1 ou 2 jours avant, la PCR. Le cas échéant, conserver au réfrigérateur dans un sachet hermétique

Préparation :

- * Dans un erlenmeyer de 100 ml, verser :
 - 40 ml de TAE 1X (mesurés à l'aide d'une éprouvette de 100 ml)
 - 0,48 g d'agarose (pesés sur une balance à 0,01g)

* Chauffer la solution en agitant régulièrement, idéalement avec un agitateur magnétique.

2 possibilités pré coloration (rapide et moins résolu) ou post coloration (plus long mais plus résolu)

- 1- **Pré coloration** : Le gel est prêt lorsque l'agarose est totalement dissoute, le liquide doit être parfaitement translucide. En fin de dissolution ajouter 3 µl de Gelgreen (le colorant est rouge !), continuer l'agitation et le chauffage jusqu'à ce que le liquide translucide soit coloré de façon homogène.
- 2- **Post coloration** : aucune intégration de gel green dans le gel à ce stade.

* Laisser refroidir le gel dans l'rlenmeyer jusqu'à ce qu'il atteigne une température de 50°C – 60°C environ.

Astuce, utiliser le Colorant Gelgreen jusqu'au dernier µg : Des dépôts solides dans le bouchon, indiquent un début de déshydratation du colorant. Ceux-ci peuvent être repris facilement dans quelques microlitres d'eau distillée puis intégrés de suite dans le gel.

Coulage :

* Préparer le support du gel en bouchant ses extrémités à l'aide de ruban adhésif pour peintre (ou tout autre système adéquat). Posez-le sur une surface parfaitement horizontale.

* Couler le gel à 50°C dans le support sur une épaisseur de 0,5 cm environ.

Astuce : Si des bulles apparaissent, vous pouvez les faire éclater à l'aide d'un cône pour micropipette avant la solidification du gel.

* Poser le peigne à sa place, pour former les puits lors du refroidissement du gel.
* Laisser le gel refroidir (15 – 20 min), en le mettant au réfrigérateur si nécessaire (ne transporter le support avec le gel que si celui-ci est déjà bien figé).

* Une fois le gel complètement solidifié :

- Retirer le ruban adhésif et retirer doucement le peigne dans un mouvement vertical, pour ne pas percer ou fêler les puits.

Astuce : Il est plus facile de retirer le peigne si le gel est immergé dans du tampon (mise en place dans la cuve avant de retirer le peigne).

Le gel peut être utilisé immédiatement ou conservé quelques jours au réfrigérateur.
Gel pré-coloré au Gelgreen peut être conserver au réfrigérateur dans un sachet hermétique ou 1 ou 2 jours avant l'électrophorèse.
Un gel sans colorant peut être stocké plusieurs jours dans du tampon de migration TAE 1X (une fois ôté du support).

ANNEXE 2 : Electrophorèse des fragments ADN amplifiés (§ 4.4.2)

Principe de l'électrophorèse

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un **gel d'agarose à 1,2%**.

L'ADN est chargé négativement par les groupements phosphates. Dans une cuve à électrophorèse, on place un gel d'agarose, les solutions d'ADN amplifié sont déposées du côté de la cathode (pôle négatif – noir).

L'ADN migre en fonction de son poids moléculaire : plus le fragment d'ADN est long plus il va migrer lentement vers l'anode (pôle positif + rouge), à l'inverse un fragment plus court se déplacera plus rapidement.

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

Quel volume d'ADN amplifié déposer dans les puits à l'aide de la micropipette ?

Révélation utilisant un colorant fluorescence Gelgreen : déposer 8 µl de solution amplifiée d'ADN par puits

Révélation par coloration Azure A ou autre colorant : 10 à 12 µl de solution amplifiée d'ADN par puits

Pour le choix du colorant, tampon et la mise en œuvre de la technique de coloration (pré-coloration, post coloration) se référer aux différents protocoles.

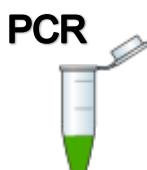
Dépôts et migration (§ 4.4.3)

Avant tout, s'assurer que le DNA release a bien été ajouté aux produits de PCR dans les tubes.

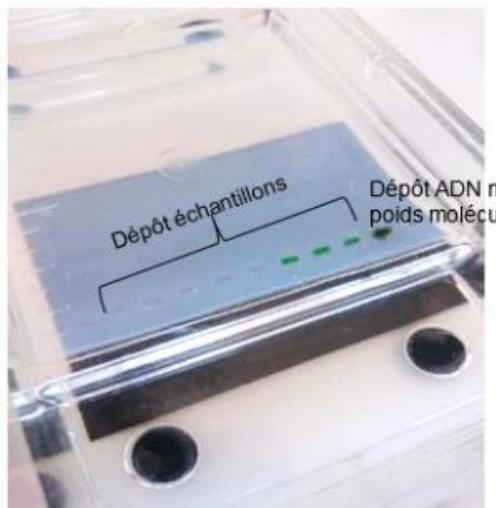
Astuce : Pour rendre les puits plus visibles et faciliter les dépôts, il est utile de glisser un morceau de papier noir sous la cuve.

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

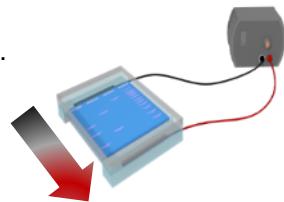
- Déposer 8 à 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - **jaune**)
- ADN amplifié : Déposer 8 µl d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)



Astuce : Pour éviter les fuites de produits hors des puits et les bulles d'air dans lors des dépôts, déposer très lentement à mi-hauteur dans les puits et arrêter avant que le cône ne soit entièrement vide (ne pas dépasser la 1e butée du piston de la micropipette).



- Poser le couvercle sur la cuve.
- Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité.
- Poser le couvercle, ce qui ferme le circuit, régler l'alimentation en fonction du tampon utiliser (ex TAE 100 à 150 V maxi)
- Lancer la migration en mettant l'alimentation sous tension.



Astuce : Surveiller l'apparition de petites bulles sur les électrodes de la cuve, si elles n'apparaissent pas, c'est que le courant ne circule pas.

Surveiller le départ du colorant témoin de migration. S'il part dans le mauvais sens (vers l'arrière du gel, au risque de sortir de celui-ci) mettre immédiatement hors tension et inverser les branchements sur l'alimentation avant de relancer la migration.

- Une fois le front de migration (visible grâce au colorant) arrivé aux 2/3 ou 3/4 du gel (environ 20 à 30 min à 150V), mettre le circuit hors tension pour stopper la migration et sortir le gel de la cuve pour le colorer.

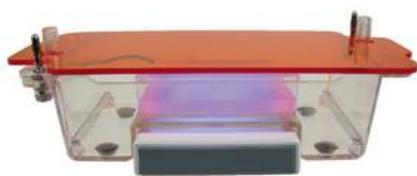
Révélation (§ 4.4.4)

A - Pré-coloration du gel

Le Gelgreen intégré à l'agarose va révéler par fluorescence les bandes d'ADN en l'éclairant à l'aide du transilluminateur.

Attendre 5 minutes avant de manipuler le support du gel, le gel étant encore chaud il n'est pas très stable.

- Placer le transilluminateur directement sous le support du gel (ou sous la cuve si celle-ci est refroidie afin d'éviter les phénomènes de buée) ou transporter délicatement le support de gel sur le transilluminateur.
- Placer le filtre orange dessus
- Mettre sous tension le transilluminateur, il faut patienter environ 10 minutes pour que l'excitation soit maximale. La révélation est améliorée en se plaçant à l'obscurité ou en utilisant la chambre noire.



Cuve électrophorèse et Transilluminateur



Transilluminateur réf. 527004



Chambre noire réf. 527010.
Visualisation et des prises de vues en toutes conditions de luminosité

B - Post coloration

Préparer la solution du bain :

- 4,5 µl de Gelgreen pour 25 ml d'eau distillée.
- Une fois préparé, protéger votre bêcher de la lumière à l'aide d'un aluminium.
- Dans une petite cuve pour limiter au maximum les volumes morts, faire tremper le gel 30 minutes, en couvrant d'un aluminium ou protéger de la lumière sous la chambre noire.
- On peut réutiliser le même bain au moins 2 fois au cours de la même journée (protéger la solution de la lumière)
- La lecture s'effectue sur le transilluminateur

Astuce : pour économiser du colorant ou si on ne dispose pas de petit récipient adapté au gel, après l'électrophorèse il suffit d'entourer le gel et son support d'un film étirable type parafilm pour l'étanchéifier les côtés ouverts puis on dépose 10 ml de solution additionnée de 2 µl gelgreen pendant 30 à 45 minutes à l'obscurité.

Kit PCR Génotypage variation du gène de l'amélogénine



Le matériel :

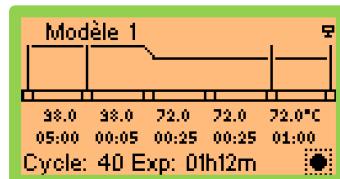
- 1 Tube d'amorces AME (tube à pastille bleue)
- 1 Tube PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymerase] (tube à pastille verte)
- 1 Tube DNA release [bloqueur de réaction] (tube à pastille rouge)
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune) pour l'électrophorèse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



Paramétrage du thermocycleur

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

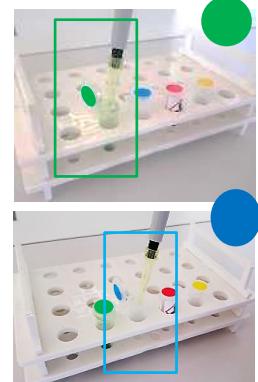
Correspond au **modèle 1** du thermocycleur Jeulin



Préparation des tubes réactionnels

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

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. 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)

Ou



Figure 1



Figure 2

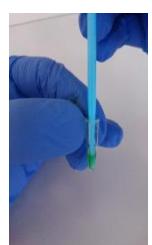


Figure 3

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.



Figure 1

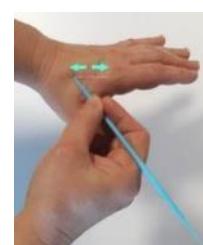


Figure 2

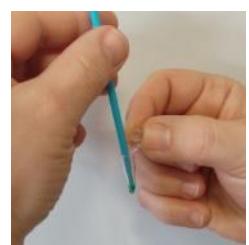


Figure 3

Fermer le microtube PCR.

Placer les tubes dans le thermocycleur.



Sélectionner le programme **Modèle 1** et le lancer (**1h10 environ**)



Ecran thermocycleur : Placer le curseur sur puis appuyer OK → =cycle en cours



PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse

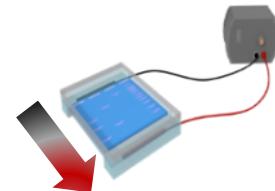
Préparation de l'ADN amplifié

- Pour chaque individu, nous avons 2 tubes (le témoin, le tube enzyme)
 - 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

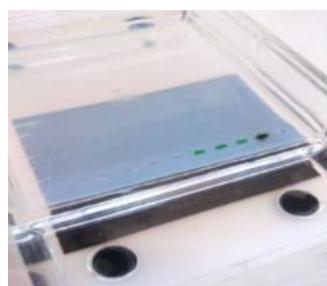
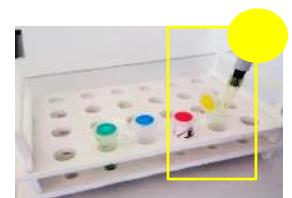
- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



Dépôts et migration

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

- Déposer 8 à 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel –
- 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
- Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité.
Allumer et attendre la migration **pendant 25 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

Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel, 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE, composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr

Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediately to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France
Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr
International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr
SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux