



Génétique

Kit PCR génotypage séquence ALU locus PV92 – 20 PCR

Réf :117 138

Kit PCR génotypage **Séquence ALU locus PV92 – 20 PCR**

Français – p 1

2 annexes

Fiche de paillasse

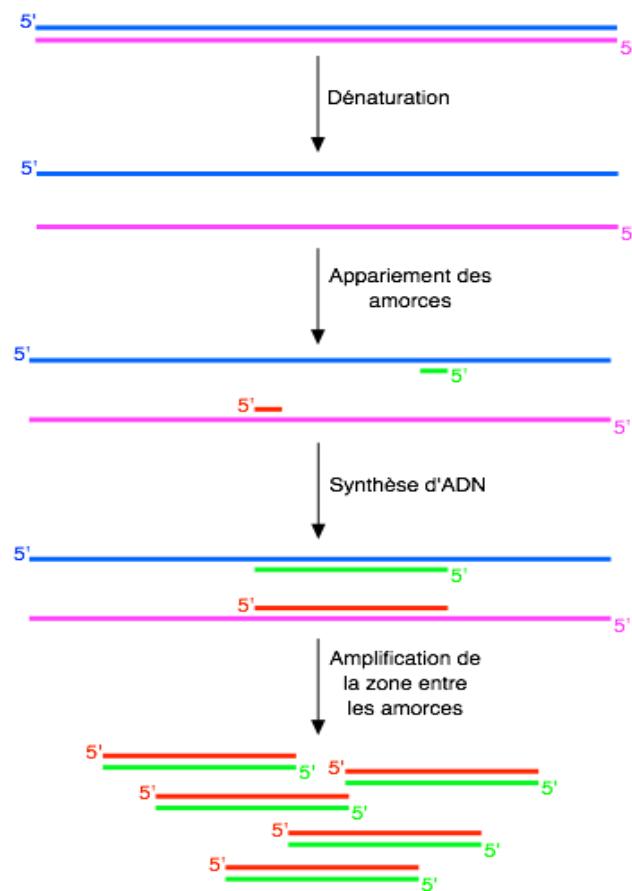
Version : 1203

1.1 Principe générale 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 polymérases 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 appariier, 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

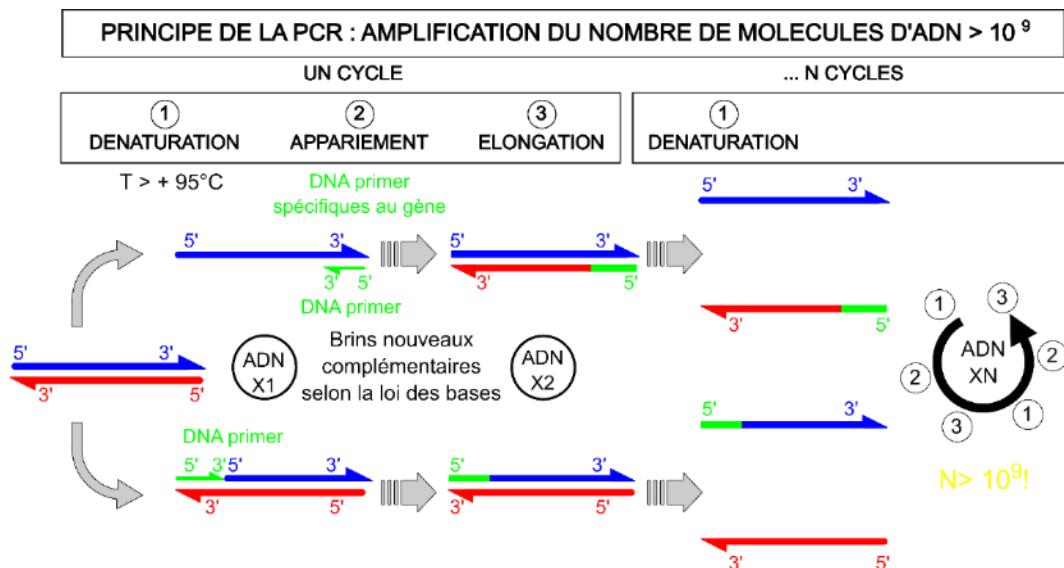
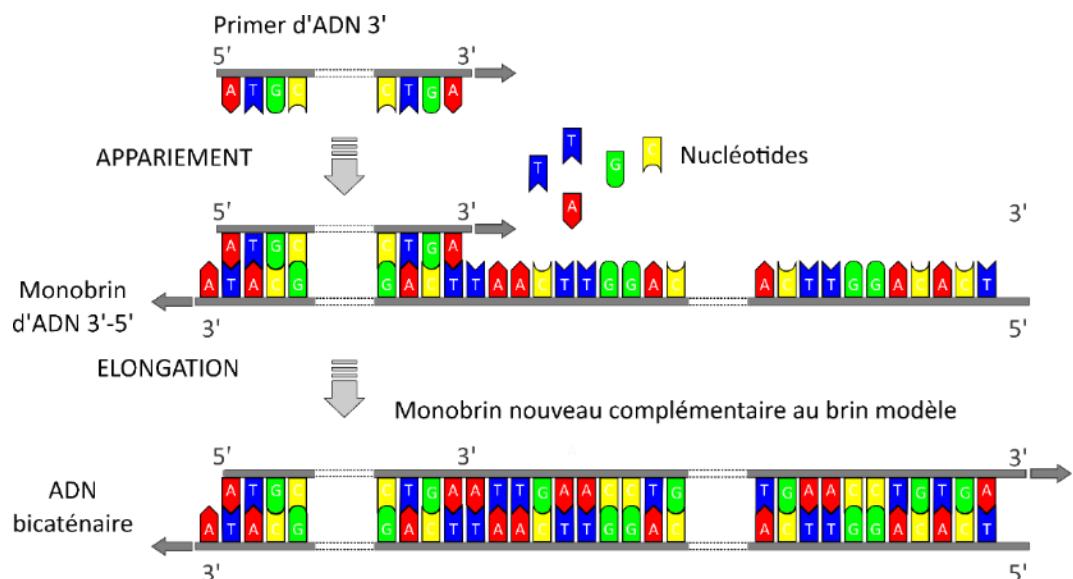


Figure 3

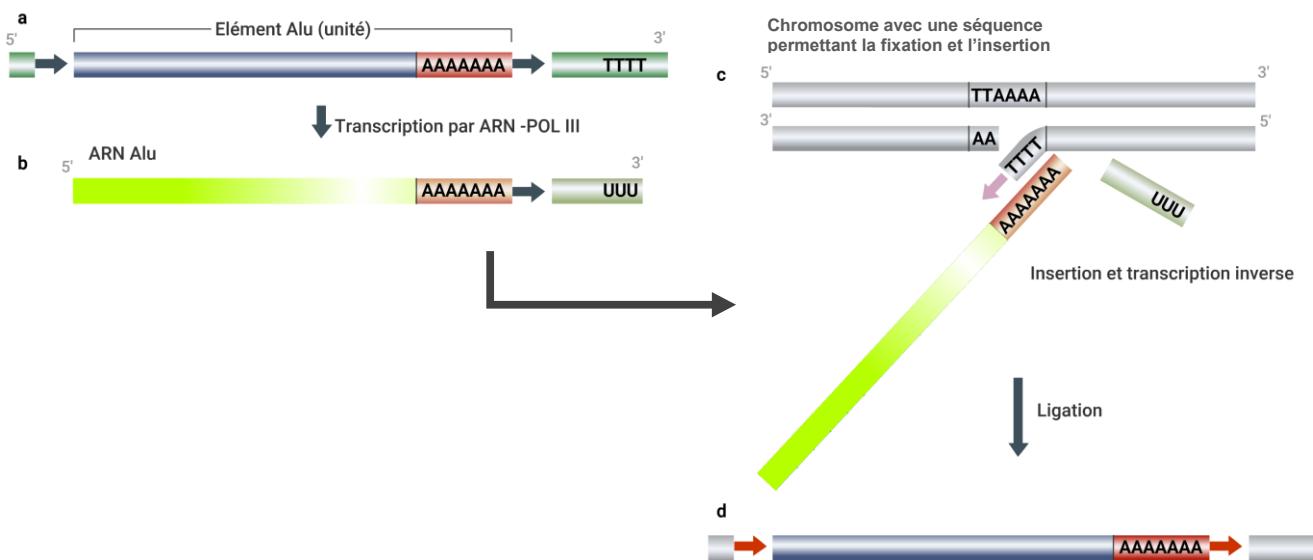


Primer = amorces

1.2 Les séquences répétées Alu

Les séquences Alu sont des éléments répétés de 300 paires de bases (bp) spécifiques des primates, intercalées et dispersées en de nombreuses copies sur tout le génome. Elles appartiennent à la famille des SINEs (short interspersed nuclear elements) et doivent leur dénomination Alu par la présence d'un site de restriction de l'enzyme AluI (5'-AGCT-3').

Les séquences Alu font parties des éléments génétiques les plus mobiles, ainsi on dénombre plus d'un million de copies au sein du génome humain, résultat de 65 millions d'années d'évolution d'un génome primate ancestral. Les séquences Alu dérivent de la rétrotransposition d'un ARN 7SL.



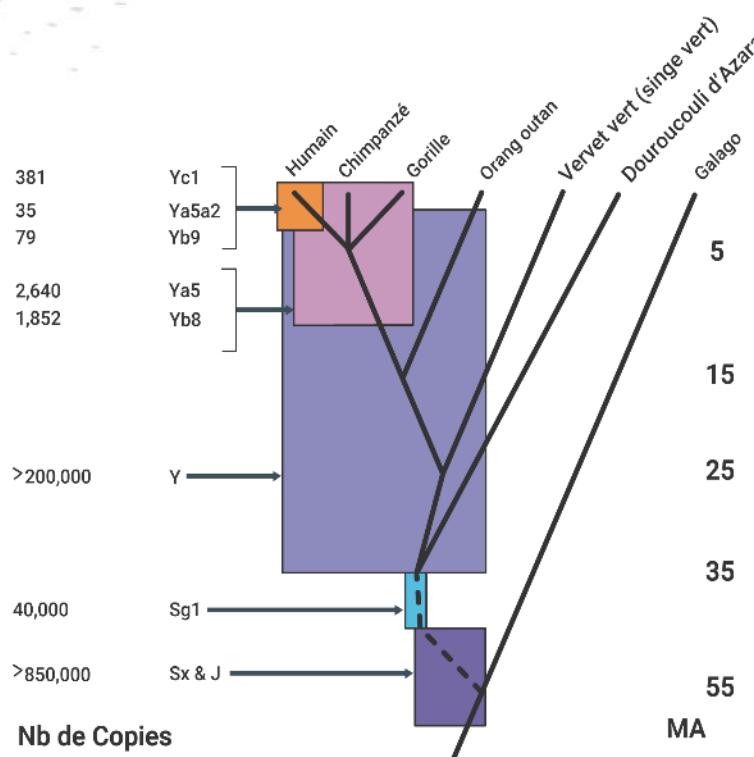
Mécanisme d'insertion par rétroposition d'un élément Alu humain
D'après « Alu repeats and human genomic diversity »
MA Batzer, PL Deininger - Nature reviews genetics, 2002 - nature.com

Aucune fonction évidente n'est encore attribuée à ces insertions, cependant l'étude de ces insertions présente des caractéristiques très utiles pour suivre l'évolution du génome des primates car :

- Les insertions Alu sont spécifiques de l'évolution des primates.
- Une insertion d'un élément Alu à un site donné est un événement unique et non réversible à l'échelle des génomes.

L'état initial étant l'absence d'insertion, toute insertion dans un locus devient un marqueur temporel. À partir de l'analyse des relations phylogénétiques, il devient possible de dresser une cartographie des relations entre espèces et populations, d'améliorer la taxonomie des primates, de suivre le déplacement des populations ancestrales.

Les insertions sont rassemblées en groupe définissant des sous-familles, en fonction de leur localisation et du nombre d'insertions, caractérisant ainsi les étapes de l'évolution des primates.



L'expansion des séquences Alu chez les primates.

L'expansion des sous-familles (Ya5a2, Yb9, Yb8, Y, Sg1, Sx and J) est superposée à l'arbre des primates. L'expansion des différentes sous familles Alu est identifiée par les carrés de couleurs, ce qui permet de visualiser la durée de chaque pic d'amplification. Le nombre approximatif de copies de chaque sous famille Alu est également indiqué.

D'après « Alu repeats and human genomic diversity »
MA Batzer, PL Deininger - Nature reviews genetics, 2002 - nature.com

Séquences Alu : marqueurs de

l'évolution du génome humain

Un certain nombre de *loci* spécifiques du génome humain, sont devenus des outils utilisés pour la phylogéographie des populations humaines.

Insertion Alu	Localisation chromosomique
D1	3
APO A1	11
FxIIIB	1
TPA-25	8
ACE	17
PV92	16
B65	22

Exemple d'étude réalisée à partir des variations des insertions alu au niveau de différentes populations.



Fig. 1. Geographical map of sampled human population groups. A map of the world with the locations of all the populations sampled in this study denoted by circles with numbers. The populations were (1) Alaska Natives; (2) Greenland Natives; (3) European-Americans; (4) Hispanics; (5) African-Americans; (6) French Acadians; (7) British Afro-Caribbeans; (8) French Bretons; (9) Swiss; (10) French; (11) Greek-Cypriots; (12) Turkish-Cypriots; (13) Nigerians; (14) Central African Republic and Zaire Pygmies.

Table 2. Distribution of polymorphic Alu insertions

Population	<i>n</i>	TPA 25			PV 92			APO		
		Frequency of Alu	Het	SE	Frequency of Alu	Het	SE	Frequency of Alu	Het	SE
European-Americans	45	0.556	0.499	0.014	0.178	0.296	0.052	0.944	0.106	0.043
African-Americans	43	0.302	0.427	0.040	0.209	0.335	0.051	0.570	0.496	0.017
Hispanics	44	0.625	0.474	0.027	0.523	0.505	0.009	0.920	0.148	0.049
Afro-Caribbeans	42	0.286	0.413	0.043	0.143	0.248	0.055	0.500	0.506	0.008
Swiss	43	0.453	0.502	0.013	0.198	0.321	0.052	0.942	0.111	0.045
Bretons	45	0.556	0.499	0.014	0.267	0.396	0.044	0.900	0.182	0.05
French Acadians	45	0.433	0.497	0.016	0.178	0.296	0.052	0.922	0.145	0.048
Greek Cypriots	50	0.530	0.503	0.009	0.250	0.379	0.044	0.950	0.096	0.039
Turkish Cypriots	33	0.576	0.496	0.021	0.333	0.451	0.040	0.985	0.030	0.029
Nigerians	11	0.409	0.506	0.050	0.091	0.173	0.101	0.500	0.524	0.033
Pygmies	34	0.221	0.349	0.057	0.309	0.433	0.044	0.794	0.332	0.058
French	44	0.557	0.499	0.014	0.227	0.355	0.049	0.989	0.023	0.022
Alaska Natives	42	0.298	0.423	0.041	0.619	0.477	0.026	0.917	0.155	0.050
Greenland Natives	42	0.333	0.450	0.035	0.607	0.483	0.024	0.940	0.113	0.046
Average heterozygosity (Het)			0.494			0.423			0.239	
Standard error (SE)			0.003			0.011			0.015	
G_{st}			0.055			0.132			0.113	

Genetic Variation of Recent Alu Insertions in Human Populations

MA Batzer, SS Arcot, JW Phinney, M Alegria-Hartman, DH Kass, SM Milligan, C Kimpton, P Gill, M Hochmeister, PA Ioannou, RJ Herrera, DA Boudreau, W Douglas Scheer, J. B. eats, PL Deininger, M Stoneking.

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

Dossier complet : scientifique et technique avec un TP pas à pas.

2. Mise en œuvre d'une amplification du gène Alu locus PV 92

2.1 Objectif du kit

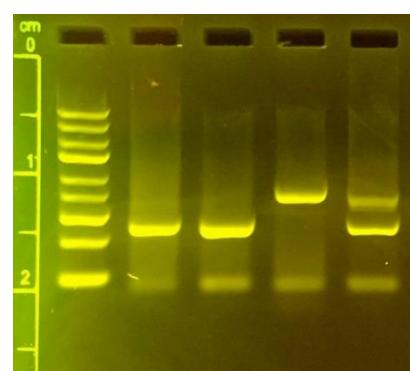
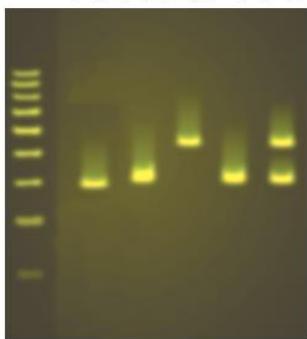
Cette manipulation a pour objet d'étudier la mutation située au locus PV92 du chromosome 16 du génome humain provoquée par l'insertion d'un rétrotransposon de type Alu.

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.

L'exploitation des résultats va permettre d'aborder la distribution géographique de la fréquence d'allèle, on pourra ainsi en déduire des migrations ancestrales des populations d'*Homo sapiens*.

Ce locus témoigne de l'histoire récente de l'évolution du genre *Homo* et ne se retrouve pas chez tous les individus. Le site PV92 présente deux allèles + (présence de l'insertion) et - (absence de l'insertion) qui génèrent des fragments d'ADN de tailles différentes, identifiables par électrophorèse après une amplification par PCR. Il en résulte trois génotypes possibles PV92 (+++, + -, ou --).

[-] [- -] [++] [- -] [- +]



Taille de la séquence amplifiée :

Sans insertion : 500 pb

Avec insertion : 860 pb (Alu = 310pb)

Génotypes possibles

Un élément Alu sur leurs 2 chromosomes 16 (+/+),

Un élément Alu sur l'un des 2 (+/-),

Aucun élément Alu à ce locus (-/-).

2.2 Le matériel pour 2 x 10 amplifications

Le format du kit est adapté pour 2 demi-classes. Les 20 réactions du kit sont réparties en 2 lots, soit 2 x 10 amplifications.

Le contenu du kit

- 2 Tubes d'amorces PV92 (tube à pastille bleue )
- 2 TubesPCR 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
- 2x10 microtubes PCR 0,2 mL
- 2x10 anses stériles : prélèvement des cellules buccales ou des cellules du dessus de la main)



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



Les réactifs entamés peuvent également être remis à - 20°C, cependant pour les tubes d'amorces (pastille bleue) et pour les tubes de mix PCR (pastille verte) le risque de contamination (par DNAnase) est très important, si ces tubessont restés ouverts longtemps, et/ou ont subi plusieurs prélèvements par pipetage.

Matériel complémentaire nécessaire :

Thermocycleur
Micropipette 2 - 20 µl + cônes stériles
Gants
Feutre à pointe fine
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.

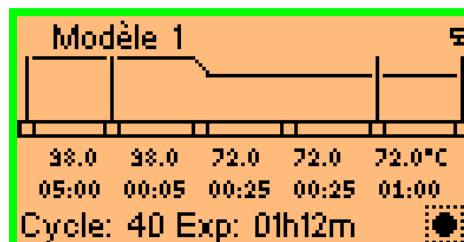
3. Paramétrage du thermocycleur

Allumer et programmer le thermocycleur

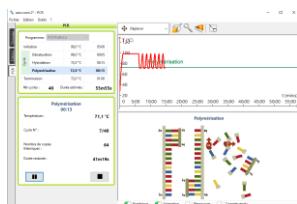
Principe : une amplification de 40 cycles

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

Exécuter le programme : **Modèle 1**

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, une phase à 56°C n'étant pas nécessaire.

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

4. 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**.

5. Déroulement de l'expérience

5.1 Prélèvement de cellules de l'épiderme

2 possibilités : Cellules buccales ou du dessus de la main

5.1.1 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

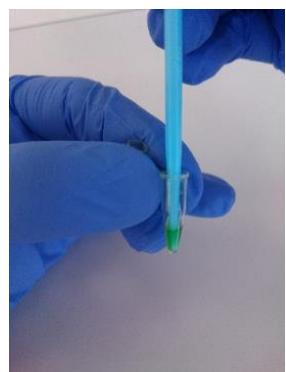


Figure 3

- 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

5.1.2 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

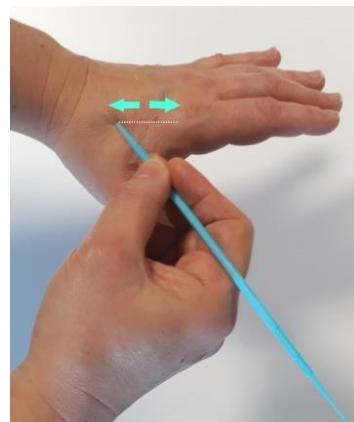


Figure 2

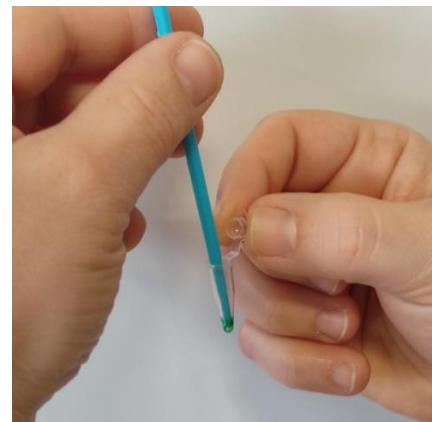


Figure 3

- 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.

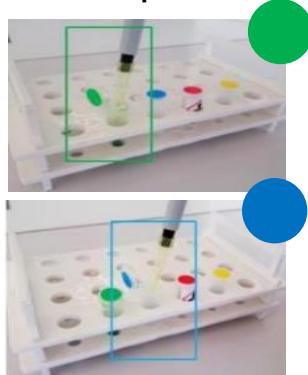
5.2 Préparation des tubes réactionnels

La manipulation est très simple, elle nécessite uniquement l'utilisation de micropipette (25µl) et de cônes stériles.

Dans un microtube PCR 0.2mL, on prépare :

18µl de PCR mix + 18µl d'amorcesPV92 + prélèvement des cellules de l'épiderme

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier l'expérimentateur.
2. Prélever 18 µL du "PCR Master Mix" (vert) et les placer dans le microtube PCR.
3. Changer de pointe de micropipette.
4. Prélever 18 µL du "Primer Mix" (bleu) et les placer dans le microtube PCR.
Mélanger par pipetage doux.
5. Changer de pointe de micropipette



5.3 Lancement de la PCR

Thermocycleur didactique Jeulin,

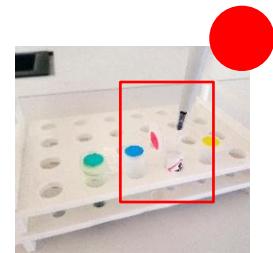
- Sélectionner le programme **Modèle 1**
- Placer le curseur sur puis appuyer OK
→  =cycle en cours (1h10 environ)

5.4 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

5.4.1 Préparation de l'ADN amplifié

- Retirer les microtubes 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 chaque microtube et y ajouter 1,8 µL de la solution "DNA-Release" (tube à pastille ). Mélanger par pipetage doux.

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



5.4.2 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**.

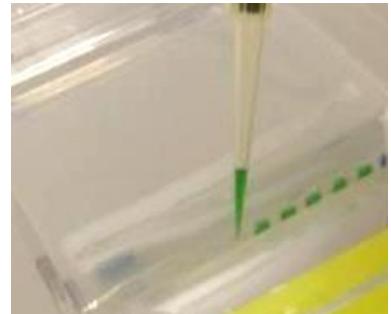
→ Voir Annexe 2

5.4.3 Dépôts et migration

→ Voir Annexe 2

5.4.4 Révélation

→ Voir Annexe 2

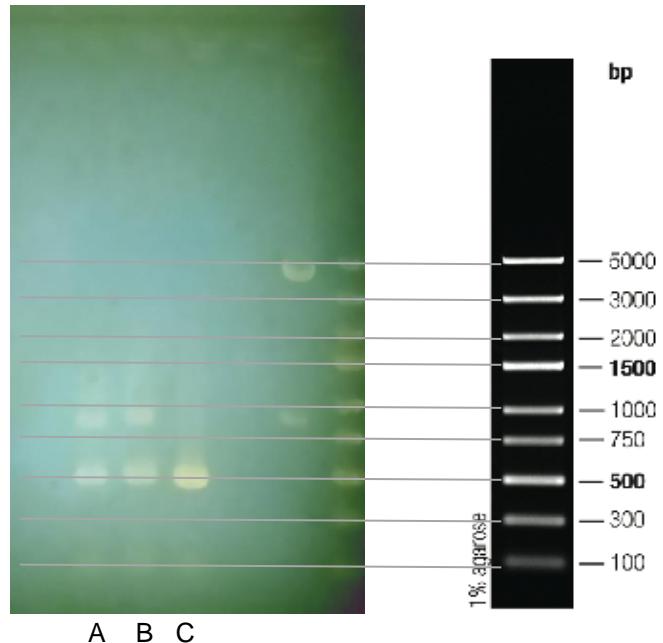


6. Résultats

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 :

2 individus (A et B) hétérozygotes [+ -]
1 individu (C) sans insertion [- -]



ANNEXE 1 : Préparation du gel d'électrophorèse (§ 4)

(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 : précoloration du gel (3µl / 40 ml de gel)	10 min	Solution rapide Les bandes d'ADNs sont moins résolues
Solution 2 : postcoloration 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 peintre	- 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.

Remarque : pour éviter l'évaporation, poser un verre de montre sur le col de l'rlenmeyer.

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 2.5 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.

*Poser le peigne à sa place, pour former les puits lors du refroidissement du gel.

*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.

*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 conservé au réfrigérateur dans un sachet hermétique 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 (§ 5.4)

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 fluorescent 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.

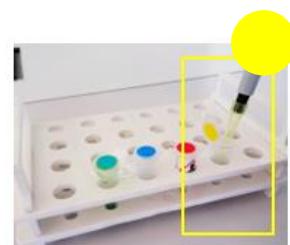
Dépôts et migration (§ 5.4.3)

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

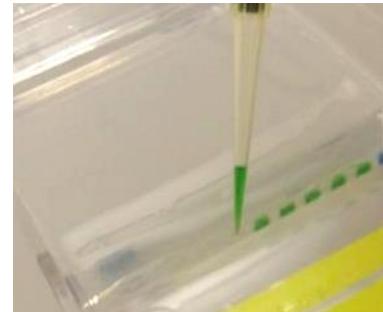
- Déposer 8 à 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - **jaune**)
- ADN amplifié : Déposer 8 µl d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)



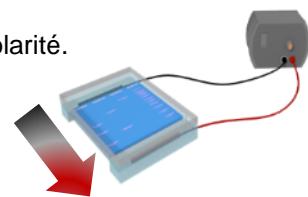
PCR



Astuce : Pour éviter les fuites de produits hors des puits et les bulles d'air lors des dépôts, déposer très lentement en se positionnant à mi-hauteur du 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.
- Régler l'alimentation entre 100 et 150 V (à faible voltage, la migration sera plus nette, mais plus longue, 40 min à 100V et 25 min à 150 V).
- 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 (§ 5.4.4)

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 visible. 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 séquence ALU locus PV 92



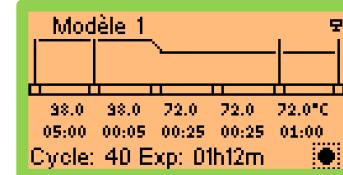
Le matériel :

- 1 tube d'amorce 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

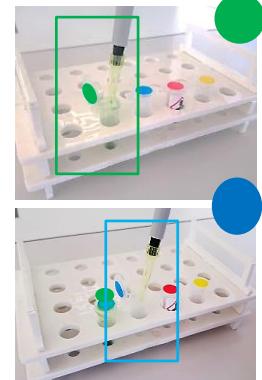
- Allumer et programmer le thermocycleur
 - Principe : une amplification de 40 cycles
- Correspond au **modèle 1** du thermocycleur Jeulin



Préparation des tubes réactionnels

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

1. Prélever 18 µL du "PCR Master Mix" et les placer dans le microtube PCR
2. Changer de pointe de micropipette
3. Prélever 18 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

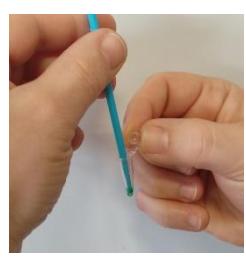


Figure 3

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

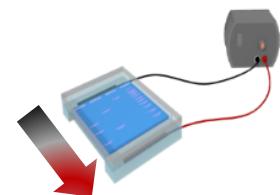
Préparation de l'ADN amplifié

- A faire pour chaque microtube : ouvrir délicatement le microtube et y ajouter 1,8 µL de la solution “DNA-Release” (tube à pastille)
- Mélanger par pipetage doux



Préparation du dispositif pour électrophorèse

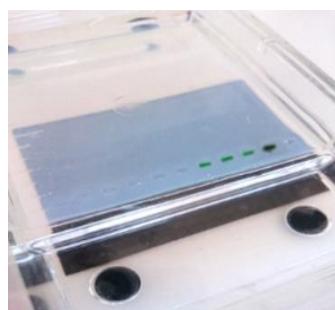
- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
 - Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
- Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



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)
 - 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