

Génétique

Kit PCR sensibilité au PTC – 18 PCR

Réf :117 139

Kit PCR sensibilité au PTC – 18 PCR

Français – p 1

2 annexes

Fiche de paillasse

Version : 1203

1. Amplification par PCR des allèles de l'amélogénine

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

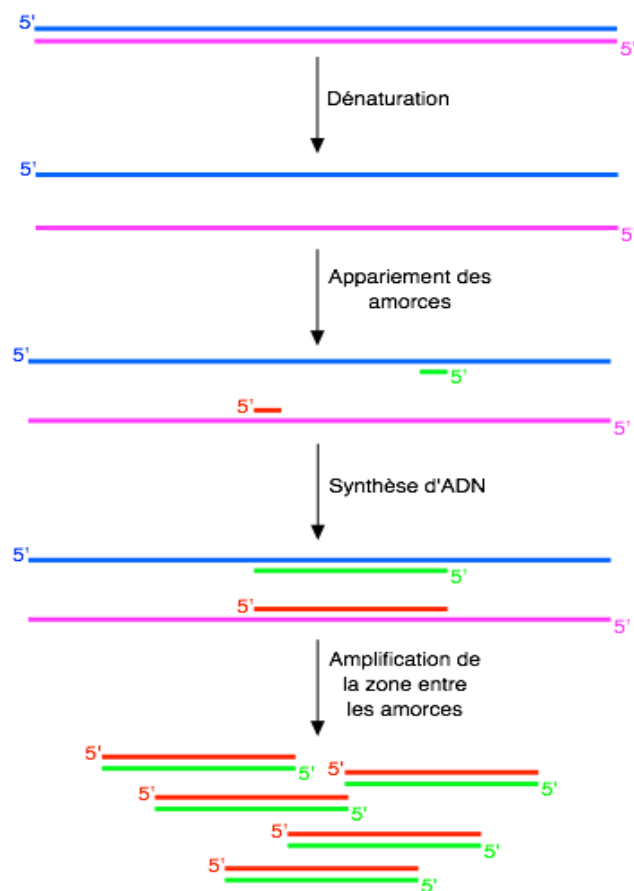
L'ADN est synthétisé dans la nature grâce à un type d'enzyme appelé ADN polymérase. Pour fonctionner, cette enzyme a besoin d'une matrice d'ADN simple brin à répliquer, d'une amorce ADN complémentaire à l'ADN à répliquer et de désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). La découverte d'organismes 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 appairer, 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

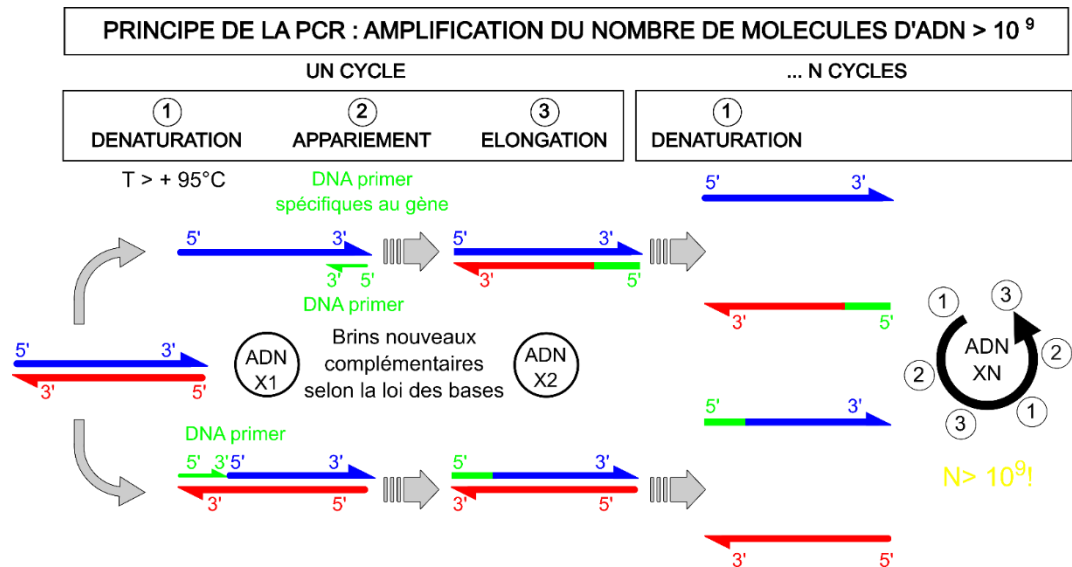
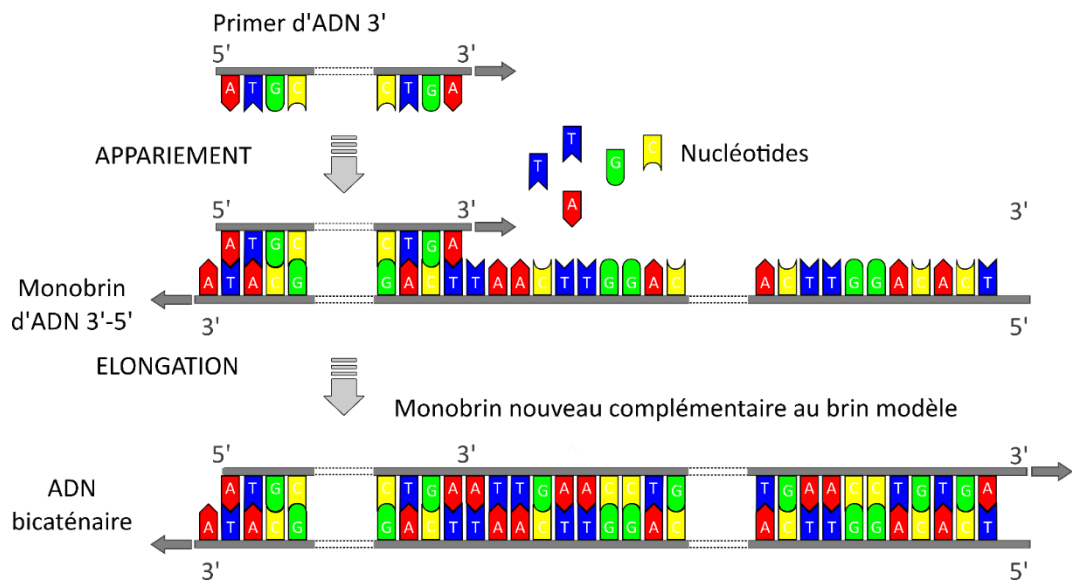


Figure 3



Primer = amorces

2. Sensibilité à l'amertume du PhénylThioCarbamide (PTC)

2.1 Historique

En 1931, le chimiste Arthur Fox travaille sur le PhénylThioCarbamide (PTC), il constate que ce composé pour certaines personnes est très amer alors que lui-même ne sent rien.

Il est ainsi le premier à mettre en évidence la différence de sensibilité au PTC au sein de la population. Quelques années plus tard, une étude menée par Albert Blakeslee (PNAS, 1935) a montré que l'incapacité à sentir le PTC est un trait génétique récessif.

Il est ainsi établi que la sensibilité au PTC dépend d'un gène à 2 allèles : un allèle dominant qui confère la sensibilité et un allèle récessif correspond au phénotype insensible.

On estime que 75 % de la population est sensible à l'amertume du PTC, ce composé organique amer est présent dans certains végétaux comme le chou de Bruxelles ou le brocoli.

2.2 Objectif de l'expérience

L'objectif de ce TP est de proposer aux élèves d'établir la relation entre phénotype et génotype, à partir de leur propre patrimoine génétique.

Le phénotype est caractérisé facilement à l'aide des bandelettes tests, le génotype est déterminé par amplification génique d'une portion du gène TAS2R38 à partir d'un simple prélèvement buccal. Le gène TAS2R38, localisé sur le chromosome 7, code pour le récepteur membranaire qui peut être sensible au PTC.

TAS2R38 est constitué d'un exon unique de 1002 paires de bases, la variation allélique entre individu repose sur la mutation de 3 nucléotides (SNP = Single Nucleotide Polymorphisme). L'amplification va permettre d'identifier un des 3 SNP, car ce polymorphisme correspond à un site de restriction.

3 SNPs en position :	Changement de nucléotide	Modification du codon	Acide aminé	Acide aminé
145	C par G	CCA -> GCA	P roline	A lanine
785	G par T	GCT -> GTT	A lanine	V aline
886	G par A	GTC -> ATC	V aline	I soleucine
			PAV	AVI
			Combinaison d'un récepteur membranaire sensible à la PTC	Combinaison d'un récepteur membranaire insensible à PTC

PAV / AVI sont les 2 allèles les plus communs et les majoritaires dans la population (75% / 25 %)

La PCR est suivie d'une digestion enzymatique par BsuRI*, après séparation par électrophorèse les résultats attendus sont :

- l'individu sensible PAV/ PAV aura une bande correspondant au fragment de 177 pb
- l'individu sensible PAV/ AVI aura deux bandes correspondant aux fragments 177 pb/ 221 pb
- l'individu insensible AVI/AVI un seul fragment de taille 221 pb

* Digestion enzymatique par BsuRI :

Une des amorces a été conçue pour apporter le site de restriction pour BsuRI en amont du nucléotide 145. Le site de restriction enzymatique est donc créé par la réaction PCR. Pour un individu sensible, la séquence 5'GGCC 3' va apparaître.

	143	144	145	146
Gène TASR38	A	G	C ou G	C

Modification apportée par l'amorce

Sensible PTC (PAV)	G	G	C	C	Reconnu par BsuRI
Non sensible PTC (AVI)	G	G	G	C	Non reconnu

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

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

3. Mise en œuvre d'une amplification

3.1 Principe général de l'expérience



ou



1 - Détermination du phénotype à l'aide de bandelettes tests PTC

2 - Prélèvement de cellules de l'épiderme (cellules buccales ou du dessus de la main)

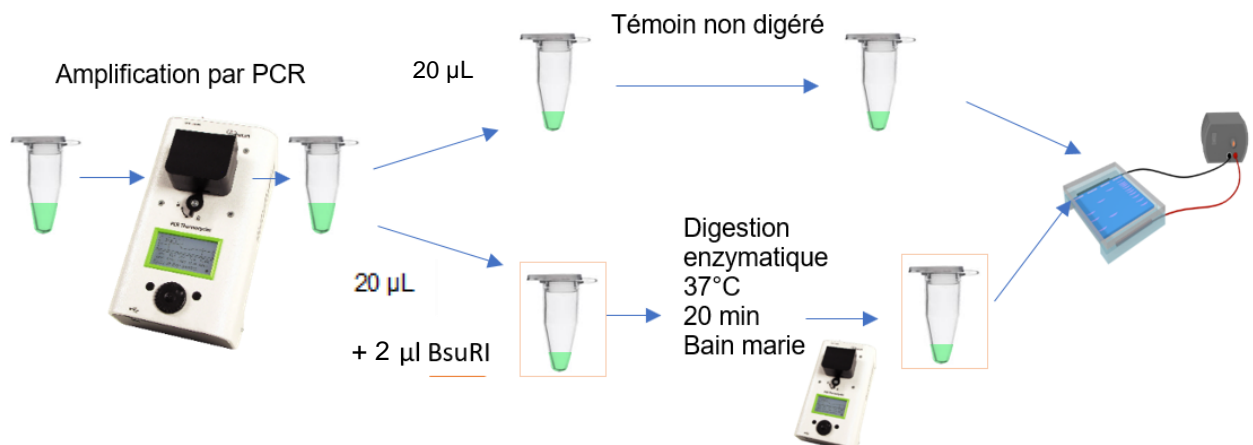
3 - Amplification par PCR direct

4 - Séparation de l'échantillon en 2 moitiés dans 2 tubes :

1 tube témoin

1 tube où l'on ajoute 2 µl l'enzyme BsuRI pour digestion par l'enzyme de restriction

L'enzyme de restriction agira uniquement sur les séquences ADN (GGCC) issues des individus sensibles à l'amertume de la PTC.



5 - L'électrophorèse permet de comparer avant et après la digestion.

Les sujets non sensibles (AVI) les deux migrations (avant et après digestion) présentent le même profil soit une bande unique 221pb.






Les sujets sensibles (PAV) les deux migrations (avant et après digestion) présentent deux profils différents. Dépôt avant digestion est le profil de référence il présente une bande unique bien visible (221pb), le dépôt de l'ADN digéré présente soit 2 bandes 221 bp et 177 pb, ou une seule vers 177 pb. Les bandes étant très proche la distinction est parfois délicate, d'où l'intérêt de l'approche comparative avec le fragment non digéré qui permet de confirmer facilement l'interprétation.

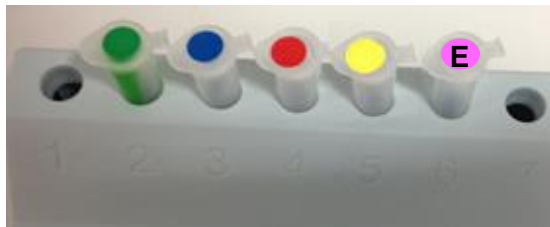
6 - Révélation par coloration, pour cette expérience la post coloration (fluorescence est préconisée).

3.2 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 2x 9 amplifications.

Le contenu du kit :

- 2 Tubes d'amorces PTC (tube à pastille bleue )
- 2 Tubes PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte )
- 1 Tube DNA release [bloqueur de réaction] (tube à pastille rouge )
- 1 Tube enzyme de restriction BsuRI (HaeIII), (tube à pastille rose )
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ) pour l'électrophorèse
- 2x 20 microtubes PCR 0,2 mL
- 2x 10 anses stériles : 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 pour les tubes d'amorces (pastille bleue) et pour les tubes de mix PCR (pastille verte) le risque de contamination (par DNase) est très important, si ces tubes sont restés ouverts longtemps, et/ou ont subi plusieurs prélèvements par pipetage.

Matériel complémentaire nécessaire :

Thermocycleur

Micropipette 2 – 20µl + cônes stériles

Gants

Feutre à pointe fine

Blouse

Centrifugeuse de paillasse, peut être utile pour la récupération des petits volumes au fond des tubes d'enzyme ou DNA release faible volume.





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.

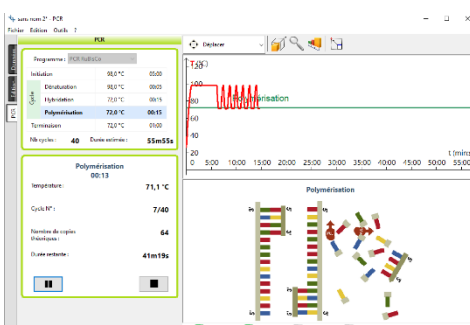
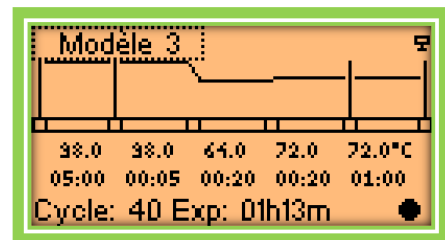
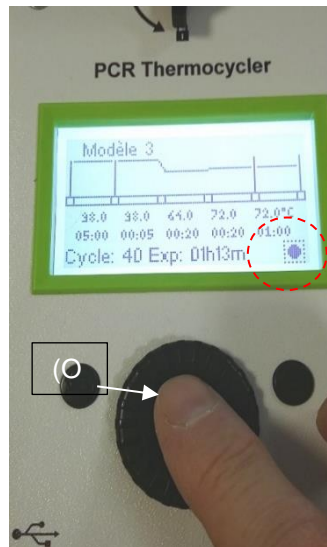
3.3 Paramétrage du thermocycleur

Allumer et programmer le thermocycleur

Principe : une amplification de 40 cycles.

Thermocycleur didactique **Jeulin**,

- Sélectionner le programme **Modèle 3**
 - 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.

Etape	Action	Température	Temps
Initiation	Dénaturation	98°C	5 minutes
Cycle de base x 40	Dénaturation	98°C	5 secondes
	Hybridation (1)	64°C	20 secondes
	Polymérisation	72°C	20 secondes
Terminaison		72°C	1 minute
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

3.4 Préparation du gel d'électrophorèse

Un **gel d'agarose à 1,8%** 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).

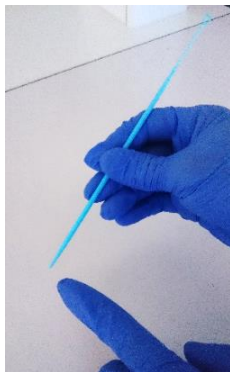


Figure 1



Figure 2

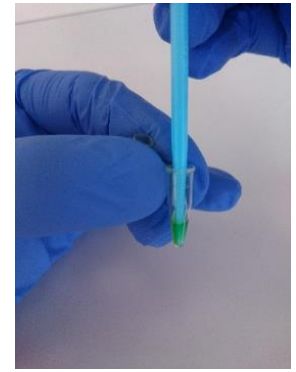


Figure 3

- 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).

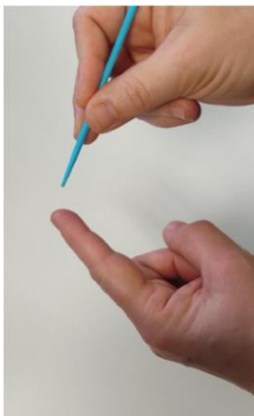


Figure 1

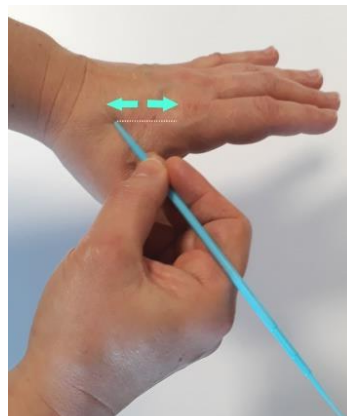


Figure 2

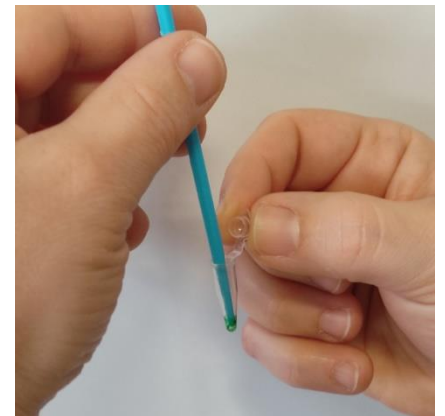


Figure 3

- 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 micropipette et de cônes stériles.

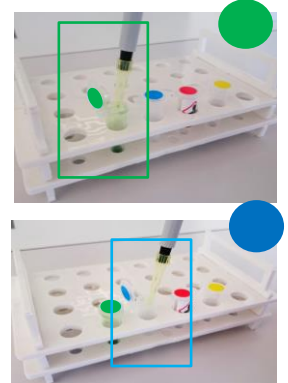
Dans un microtube PCR 0.2mL, on prépare :

20µl de PCR mix + 20µl d'amorces PTC + 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 3
 - Placer le curseur sur  puis appuyer OK
-  =cycle en cours (1h10 environ)

4.4 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

Astuce pour faciliter le pipetage de l'enzyme : le volume présent dans le tube est très faible, il est préférable de centrifuger au préalable ce tube à l'aide d'une petite centrifugeuse de paillasse.



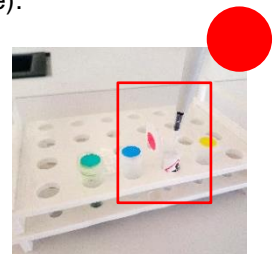
Après digestion sortir les tubes et réaliser la préparation de l'électrophorèse ou si besoin l'électrophorèse peut donc se dérouler ultérieurement lors d'une autre séance. Les tubes peuvent être stockés à – 18 °C plusieurs semaines.

4.5 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

4.5.1 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 **rouge**). Mélanger par pipetage doux.

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



4.5.2 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un gel d'agarose à 1,8 % en tampon TAE.

→ Voir Annexe 2

4.5.3 Dépôts et migration

→ Voir Annexe 2

4.5.4 Révélation

→ Voir Annexe 2



5. Résultats

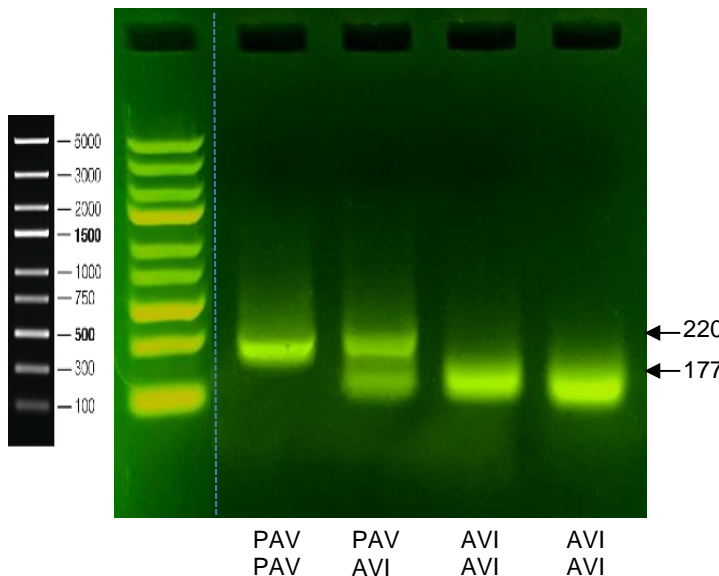
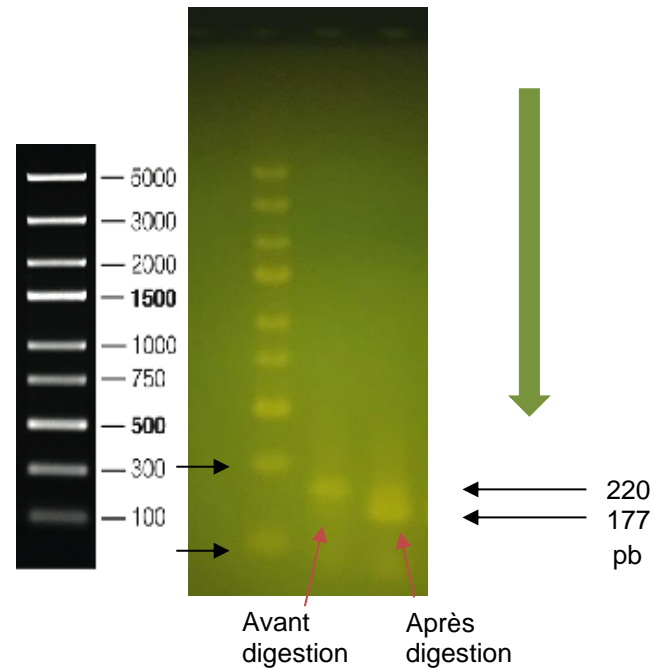
Nous utilisons le colorant Gelgreen, qui en présence d'acide nucléique (ADN) et sous l'excitation du lumière bleue (470nm) réémet une lumière fluorescente jaune/verte (525 nm). Toutes les bandes fluorescentes correspondent à des fragments d'ADN de même taille, comme nous le montre le marqueur de poids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

Exemples de résultats :

Individu PAV sensible à la PTC
Etude comparative : partir d'un échantillon d'un même individu, avant et après digestion enzymatique.

Avant digestion enzymatique = 1 seul fragment d'ADN de 220 pb
Après digestion enzymatique = 2 fragments un 220 pb et un 177 pb
il s'agit d'un génotype hétérozygote PAV/AVI

L'électrophorèse est réalisée en gel d'agarose 1,8 % avec une cuve polyvalente (ADN / protéine) en 30 min à 140V.
Coloration : Gelgreen en post-coloration



4 individus différents

Les amplifications ont été suivies d'une digestion enzymatique par BsuRI 1

2 sont sensibles à la PTC PAV/PAV et PAV/ AVI
2 sont non sensibles AVI/AVI

Electrophorèse est réalisée en gel d'agarose 1,8 % avec une cuve ADN intégrée (Minione), 20 min de migration.

Coloration : Gelgreen pré-coloration

ANNEXE 1 : Préparation du gel d'électrophorèse (§ 3.4)

(A préparer avant l'expérimentation)

La méthode retenue ici est une électrophorèse en gel d'agarose à **1,8 %** en tampon TAE avec une révélation par fluorescence gel green en l'éclairant à l'aide du transilluminateur. Pour cette expérience la post coloration est préconisée.

[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	30 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 - Cristalliseur (ou récipient équivalent) - Ruban adhésif pour peintre	- TAE 10X (25 ml) - Agarose (0,9 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 1,8 % : (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)
- 0,72 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'erlenmeyer 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 - 0.6 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 conservé 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 (§ 4.5)

Principe de l'électrophorèse

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un **gel d'agarose à 1,8%**.

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.

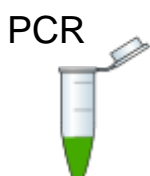
Dépôts et migration (§ 4.5.3)

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

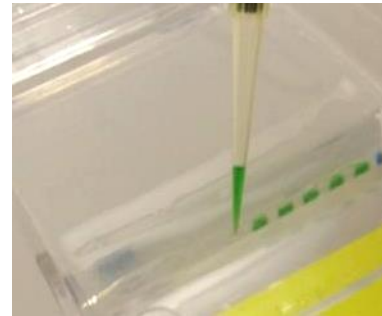
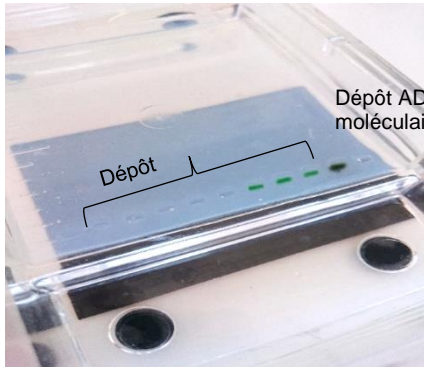
Astuce : Pour rendre les puits plus visibles et faciliter les dépôts, il est utile de glisser un morceau de papier noir sous la cuve.

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)
- Pour chaque individu, nous avons 2 microtubes PCR (le témoin, le tube « digéré »).



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 1ère butée du piston de la micropipette).



- Poser le couvercle sur la cuve.
- Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité.

Pour une meilleure résolution, les bandes recherchées sont de tailles très proches, nous conseillons de faire l'électrophorèse en deux temps

1. Régler l'alimentation d'abord sur 70 V, puis faire fonctionner 5 minutes, cette étape permet d'éliminer tous les sels, et autres ions qui peuvent polluer l'ADN.
2. Puis régler sur 140 V et réaliser 30 minutes de migration (pour une tension de 110V, la migration est plus lente (40 minutes) mais les bandes seront mieux séparées).



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 30 min à 140V), mettre le circuit hors tension pour stopper la migration et sortir le gel de la cuve pour le colorer.

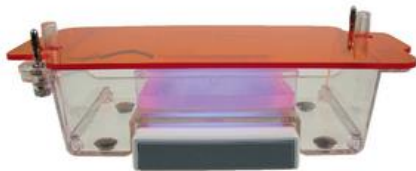
Révélation (§ 4.5.4)

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

Pour cette expérimentation, nous vous conseillons de privilégier une post coloration pour une meilleure résolution.

Préparer la solution du bain :

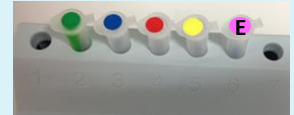
- 4,5 µl de Gelgreen pour 25 ml d'eau distillée.
- Une fois préparé, protéger votre bécher de la lumière à l'aide d'un aluminium.
- Dans une petite cuve pour limiter au maximum les volumes morts, faire tremper le gel 30 minutes, en couvrant d'un aluminium ou protéger de la lumière sous la chambre noire.
- 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.



Le matériel :

- 1 tube d'amorce PTC (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 enzyme de restriction BsuRI (HaeIII), (tube à pastille rose ■)
- 1 tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ■) pour l'électrophorèse
- 2 microtubes PCR 0,2 mL
- 1 anse stérile : prélèvement des cellules de l'épiderme
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse

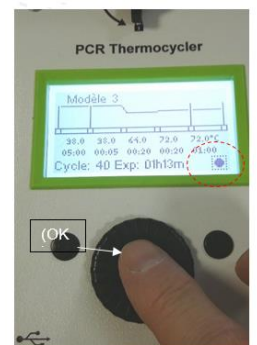
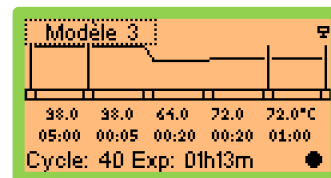


PHASE 1 : L'AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

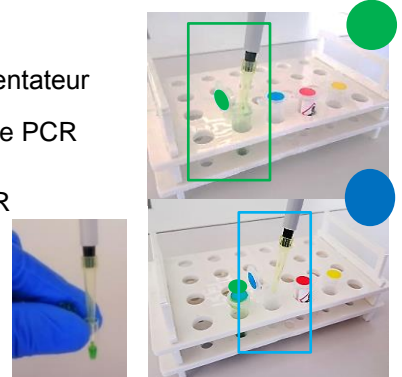
- Allumer et programmer le thermocycleur
 - Principe : une amplification de 40 cycles
- Correspond au **modèle 3** du thermocycleur Jeulin



Préparation des tubes réactionnels

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

1. Prélever 20 μ L du "PCR Master Mix" (■) et les placer dans le microtube PCR
2. Changer de pointe de micropipette
3. Prélever 20 μ L 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

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

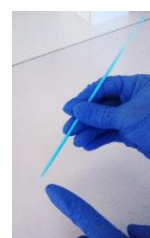


Figure 1



Figure 2

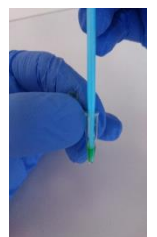


Figure 3



Figure 1



Figure 2

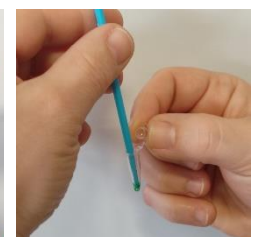


Figure 3

Fermer le microtube PCR.

Placer les tubes dans le thermocycleur



Sélectionner le programme **Modèle 3** et le lancer (**1h10 environ**)



Ecran thermocycleur : **Placer** le curseur sur puis **appuyer** OK

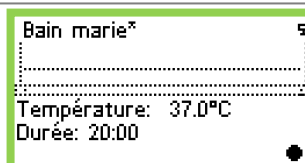
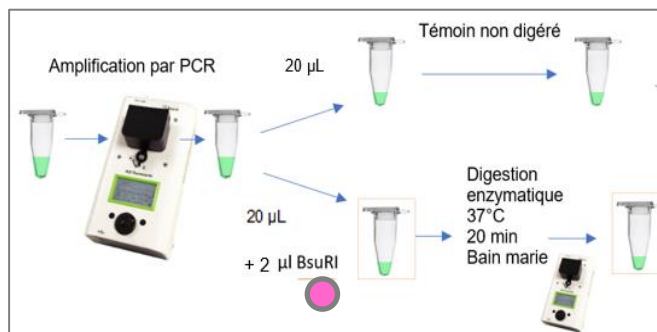
→ = cycle en cours

PHASE 2 : DIGESTION



Digestion enzymatique

- Après l'amplification, chaque tube est séparé en 2
- Prélever 20 μ l 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 μ l 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



Electrophorèse

PHASE 3 : REVELATION

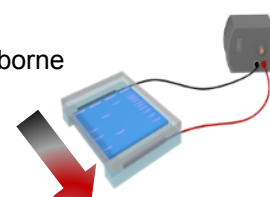
Préparation de l'ADN amplifié

- 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 μ L de la solution "DNA-Release" (tube à pastille)
- Mélanger par pipetage doux



Préparation du dispositif pour électrophorèse

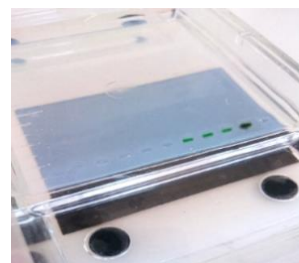
- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
- Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



Dépôts et migration

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

- Déposer 8 à 10 μ l du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel -)
- ADN amplifié : Déposer 8 μ l 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 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



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
immediatly 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