



Génétique

Kit PCR amplification d'un gène ancestral du cytosquelette (GIP) - 18 PCR

Réf : 117 140

Kit PCR Amplification d'un gène ancestral du cytosquelette (GIP) – 18 PCR

Français – p 1

2 annexes

Fiche de paillasse

Version : 1203

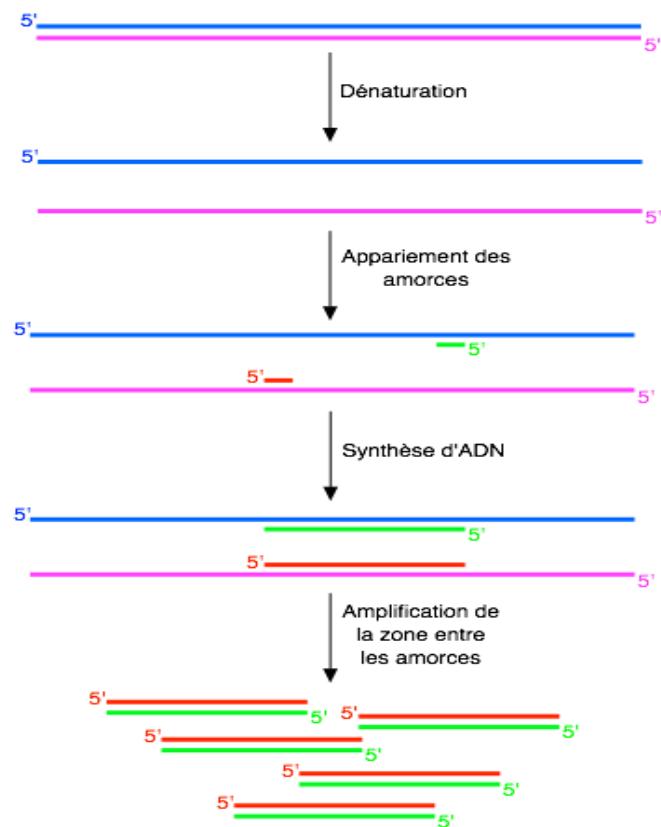
1. Amplification par PCR du gène GIP

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

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 dénaturnées 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 apparié, 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

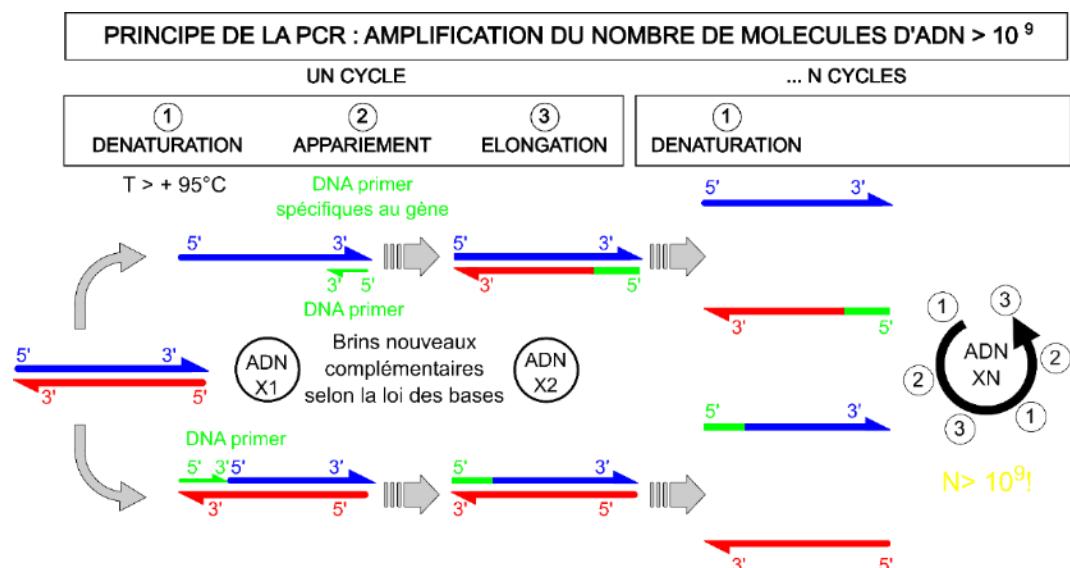
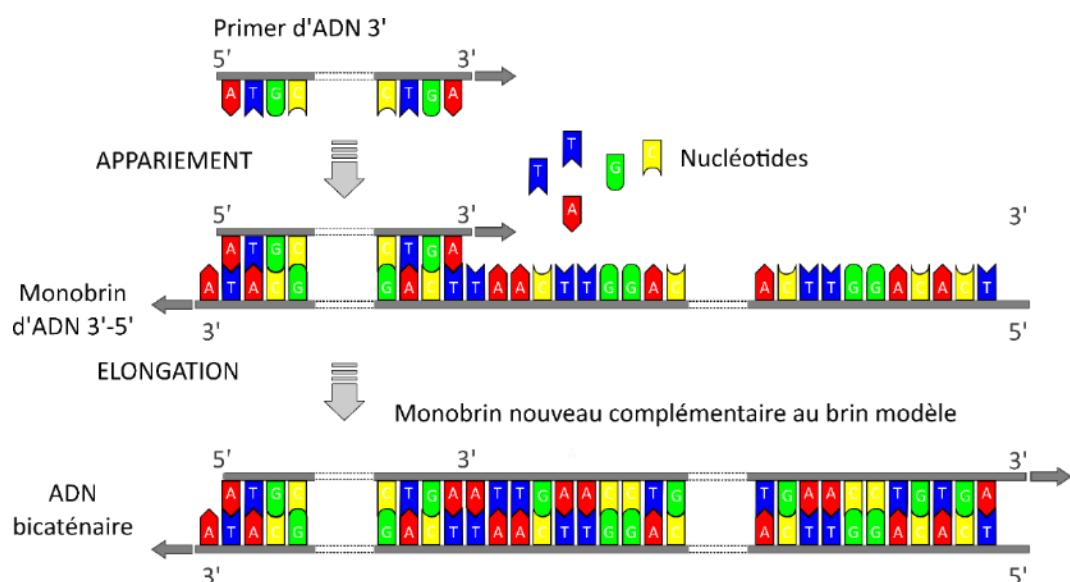


Figure 3



Primer = amorce

1.2 Principe

Les protéines appelées **GIP** (pour GCP3-Interacting Protein) interviennent dans la stabilité du centromère des chromosomes et leur absence conduit à une séparation prématuée des chromatides et à leur répartition déséquilibrée lors de la mitose.

Apparues probablement très tôt chez les Eucaryotes, les protéines GIP ont été très conservées au cours de l'évolution et on les trouve dans de nombreux groupes. Les GIP de l'Arabette partagent ainsi plus de 50% de similarité avec leurs homologues chez l'Homme et la Levure (des protéines appelées également MOZART1 ou MZT1). La découverte de leur rôle dans le déroulement des mitoses ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes régulateurs de la division cellulaire chez les Eucaryotes et l'Homme en particulier.

Cette protéine GIP étant essentielle à la réalisation de ce processus clé du cycle cellulaire qu'est la mitose, on peut se demander avec les élèves si elle constitue une particularité de l'Arabette ou si on la retrouve chez d'autres espèces.

Si la première hypothèse s'avère exacte cela signifiera que la protéine GIP est une innovation évolutive propre à *Arabidopsis*. En revanche, si on la retrouve chez plusieurs organismes, les élèves pourront conclure que cette protéine était présente chez l'ancêtre commun aux êtres vivants testés et qu'elle a été transmise au cours de l'évolution.

Cette expérimentation propose de rechercher par la technique de PCR la présence du gène codant la protéine GIP chez l'Arabette et d'autres organismes appartenant à des espèces différentes, dont l'Homme. Les amplicons seront ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose.

Le protocole utilise un seul couple d'amorces, qui a pour objectif d'amplifier les gènes GIP ou leurs homologues chez différents organismes par PCR

Pouvoir amplifier une portion du génome chez différentes espèces avec un même couple d'amorces signifie donc que la séquence du génome qu'on étudie possède suffisamment d'homologie pour permettre la liaison des amorces chez ces différents êtres vivants. Si l'amplification a lieu à partir de cellules d'organismes très différents alors cette séquence est probablement héritée d'un ancêtre commun et a été conservée au cours de l'évolution.

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

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 (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 (tube à pastille jaune ) pour l'électrophorèse
- 1 microtube 0,2 mL contenant 100 µl de poudre d'arabidopsis thaliana lyophilisé
- 2x10 microtubes PCR 0,2 mL
- 2x10 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 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

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.
- Être 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. Mode opératoire

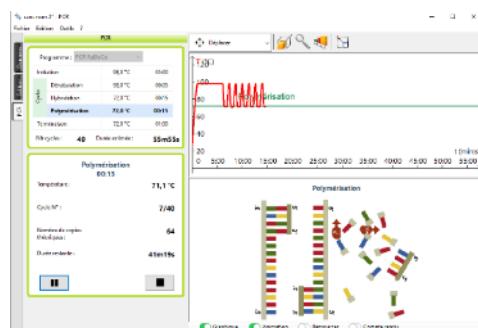
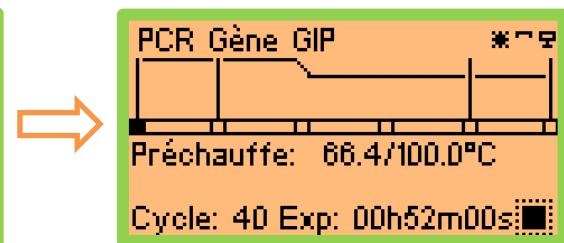
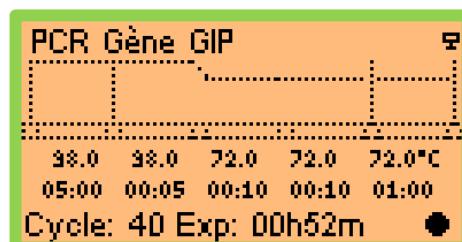
3.1 Paramétrage du thermocycleur

Allumer et programmer le thermocycleur

Principe : une amplification de 40 cycles sur 1 heure environ.

Thermocycleur didactique Jeulin appuyer sur

❖ ● → ■ (=cycle en cours)



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 suivant :



Etape	Action	Température	Temps
Initiation	Dénaturation	98°C	300 secondes
Cycle de base x 40	Dénaturation	98°C	5 secondes
	Hybridation (1)	72°C	10 secondes
	Polymérisation	72°C	10 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

3.2 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 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

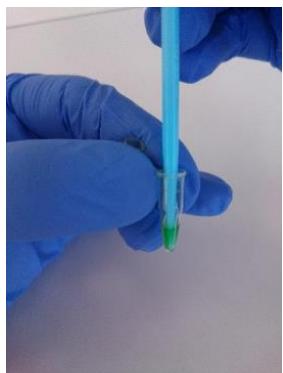


Figure 3

- 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

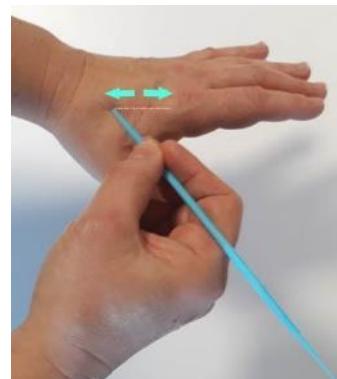


Figure 2

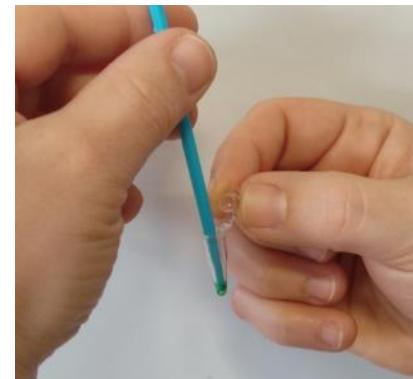


Figure 3

- 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 échantillons

Les étapes :

1. Repérer les microtubes PCR pour identifier les échantillons et/ou l'expérimentateur.
2. Préparer les échantillons biologiques pour obtenir un extrait cellulaire suivant les indications ci-après.
3. Dès que les extraits sont prêts, préparer les mélanges PCR Mix polymérase + amorces pour chaque tube :
 - 3.1 Prélever 20 µL du "PCR Mix polymérase" (green box) et les placer dans le microtube PCR. Changer de pointe de micropipette.
 - 3.2 Prélever 20 µL du "Mix Amorces" (blue box) et les placer dans le microtube PCR. Mélanger par pipetage doux. Changer de pointe de micropipette
4. Puis mélanger sans attendre les extraits biologiques au mix PCR /amorces.
5. Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme (§ paramétrage).



Dans cette expérience, la poudre lyophilisée *d'Arabidopsis thaliana* va servir à obtenir un témoin positif. Les amores ayant été conçues spécifiquement pour le gène GIP de cette plante, quelques microgrammes de cette poudre permettent d'amplifier une portion du gène GIP. Lors de l'électrophorèse, cette amplification servira de référence, elle sera à comparer aux résultats obtenus à partir des autres organismes.

Matériel biologique :

6 tissus d'organismes eucaryotes ont été testés, pour lesquels des modes opératoires de préparation des échantillons sont proposés.

<ul style="list-style-type: none"> - Chou-fleur - Radis rose - Brocoli 	Ces 3 plantes appartiennent à la famille des brassicacées tout comme <i>Arabidopsis thaliana</i> ou arabette des dames.
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Physarum polycephalum</i> 	Surnommé le blob, c'est un eucaryote unicellulaire de la classe de myxomycètes
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 	Levure de boulanger
<ul style="list-style-type: none"> - Cellules humaines 	Prélèvement des cellules de l'épiderme

Quelques recommandations :

- Attention, il faut éviter les contaminations, en particulier lors de la préparation des extraits cellulaires donc le port des gants et de la blouse est indispensable.
- Si travail sur échantillons congelés : faire dégeler rapidement à couvert près d'une source de chaleur
- Peser les différents échantillons dans une coupelle de pesée différente pour chaque échantillon.
- Les extractions cellulaires sont réalisées en même temps que la préparation des tubes à PCR.
- Pour fermer les microtubes PCR, on privilégiera une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.

ECHANTILLON	EXTRACTION D'ADN	PREPARATION DES TUBES A PCR	QUANTITE D'ECHANTILLON A INTRODUIRE
Arabidopsis thaliana	Pas de préparation spécifique	20µL MixPCR + 20µL amorces	Quelques traces de poudre
Chou-fleur frais ou surgelé	1g de fleurs broyées au mortier et pilon dans 1 mL d'eau distillée stérile	20µL MixPCR + 20µL amorces	1µL de liquide d'extraction préparé (colonne 2)
Brocoli surgelé	1g de fleurs broyées au mortier et pilon dans 1 mL d'eau distillée stérile	20µL MixPCR + 20µL amorces	1µL de liquide d'extraction préparé (colonne 2)
Radis rose	1g (prélevé dans le bas de la racine, lieu des divisions cellulaires) broyé au mortier et pilon dans 1 mL d'eau distillée stérile	20µL MixPCR + 20µL amorces	1µL de liquide d'extraction préparé (colonne 2)
BLob (<i>Physarum polycephalum</i>)	Pas de préparation spécifique	20µL MixPCR + 20µL amorces	Prélever sur les expansions de croissance du blob le contenu du petit anneau de l'anse de prélèvement (ose)
Levure de boulanger	Mettre 20µL de la suspension de levure réalisée avant la séance 5min au bain thermostaté à 98°C couvercle ouvert (utiliser la fonction bain-marie du thermocycleur)	20µL MixPCR + 20µL amorces	1µL de liquide d'extraction préparé (colonne 2)
Humain	Prélèvement des cellules de l'épiderme (prélèvement buccal ou du dessus de la main)	20µL MixPCR + 20µL amorces	Réaliser un prélèvement de cellules buccales avec la pointe d'une anse stérile (3 passages à la perpendiculaire de l'intérieur de la joue) ou Prélèvement des cellules du dessus de la main, avec la pointe d'une anse stérile, 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)

4.3 Modes opératoires détaillés de l'extraction cellulaire des échantillons biologiques

Arabidopsis Thaliana



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

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

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

Chou-fleur frais ou surgelé et Brocoli



Pesée 1g de fleurs



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



Introduire, 1µl de liquide d'extraction préparé

Radis rose



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



Introduire, 1µl de liquide d'extraction préparé

Blob (*Physarum polycephalum*)



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

Levure de boulanger

- Avant la séance mettre la levure lyophilisée en suspension dans de l'eau.
- Lors de la séance prendre 20µL de la suspension de levure,
- Placer le microtube **5 minutes au bain thermostaté à 98°C** couvercle ouvert, utiliser la fonction bain-marie du thermocycleur.



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

4.4 Lancement de la PCR

Thermocycleur didactique **Jeulin**,

- Sélectionner le programme GIP précédemment enregistré.
- Placer le curseur sur puis appuyer OK
 →  =cycle en cours (1h environ)

4.5 Séparation par électrophorèse

4.5.1 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 2 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.

4.5.2 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

→ Voir Annexe 2

4.5.3 Dépôts et migration

→ Voir Annexe 2

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

4.5.4 Révélation

→ Voir Annexe 2

5. Résultats

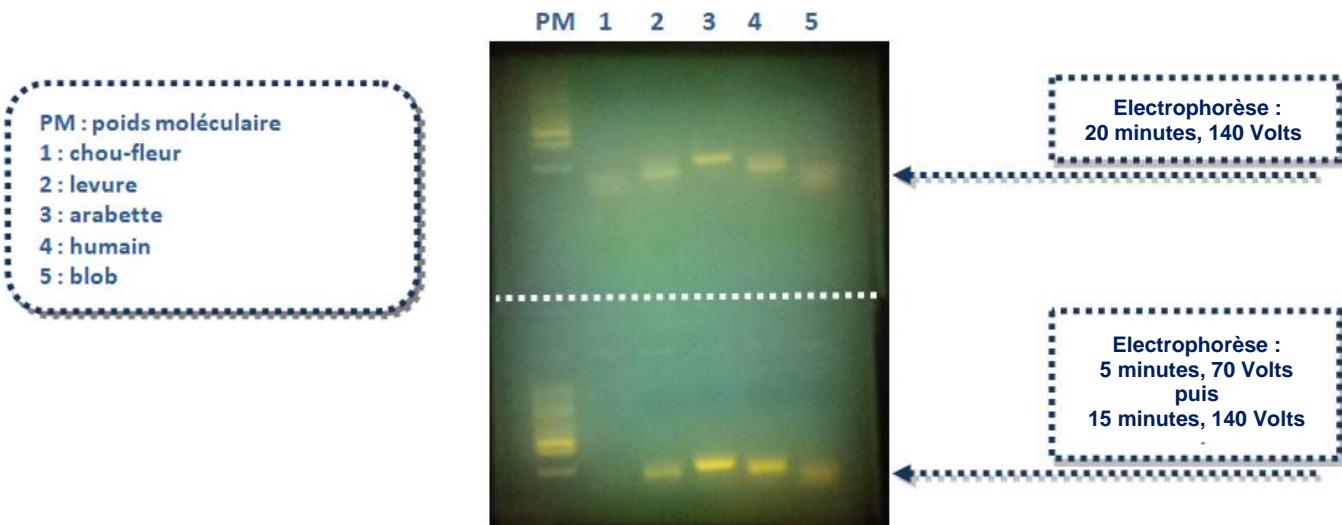
La mise en évidence du gène GIP (ou MOZART1 ou MZT1) chez ces différents organismes à la suite d'une amplification par PCR avec un même couple d'amorces permet de conclure que le gène est présent chez ces différentes espèces avec des séquences similaires. Il s'agit donc d'un gène hérité d'un ancêtre commun. Sa séquence très conservée au cours de l'évolution témoigne de son importance dans le fonctionnement cellulaire.

On pourra faire remarquer que la présence chez l'arabette de deux GIP très proches -mais non identiques- témoigne d'un processus de duplication génique suivi de mutations qui constituent donc une innovation évolutive propre à cette plante.

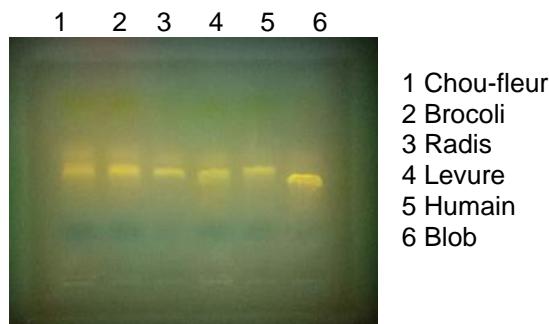
L'activité peut être complétée par une comparaison des séquences en acides aminés des protéines GIP de différentes espèces.

Nous vous proposons de télécharger sur notre site le fichier.edi contenant les séquences en acides aminés des GIP1 et GIP2 de l'arabette (*Arabidopsis thaliana*), et des GIP de l'homme (*Homo sapiens*), du macaque (*Macaca fascicularis*), de la souris (*Mus musculus*), de la drosophile (*Drosophila willistoni*), de la levure (*Schizosaccharomyces pombe*), du penicillium (*Penicillium digitatum*) et de l'aspergillus (*Aspergillus nidulans*).

Ces séquences sont extraites de la banque NCBI.

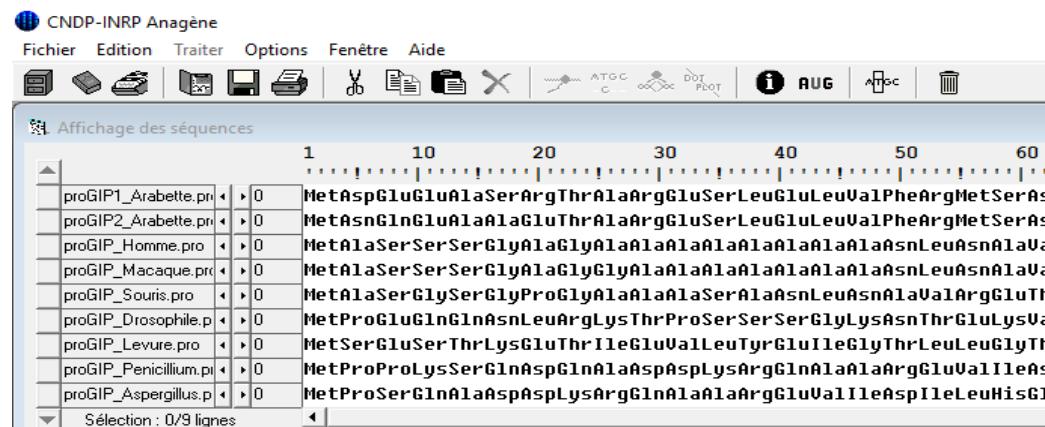


Autre résultat :



Les expérimentations sont réalisées à partir d'un échantillonnage de matériel biologique en conditions réelles, on peut donc observer parfois des variations dans l'intensité des signaux ou des bandes peuvent apparaître dupliquées. Ces troubles sont provoqués le plus souvent par la présence d'impuretés lors de la préparation des échantillons.

Capture d'écran à partir du logiciel Anagène



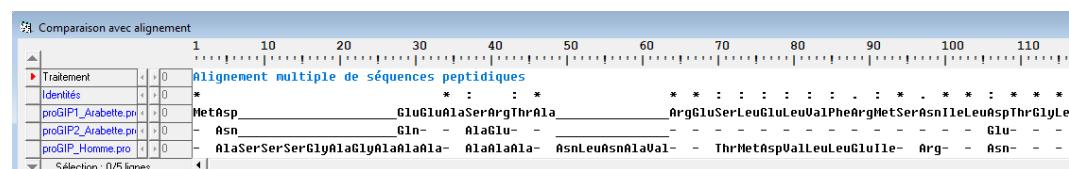
The screenshot shows the 'Affichage des séquences' (Sequence Display) window of the CNDP-INRP Anagène software. The window has a toolbar with various icons for file operations and sequence analysis. Below the toolbar is a header with sequence identifiers and their lengths. The main area displays the amino acid sequences for each protein, with a vertical scale from 1 to 60. The sequences are as follows:

Protein	Length	Amino Acid Sequence
proGIP1_Arabette.pr	0	MetAspGluGluAlaSerArgThrAlaArgGluSerLeuGluLeuValPheArgMetSerAsp
proGIP2_Arabette.pr	0	MetAsnGlnGluAlaAlaGluThrAlaArgGluSerLeuGluLeuValPheArgMetSerAsp
proGIP_Homme.pro	0	MetAlaSerSerSerGlyAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaAsnLeuAsnAlaUa
proGIP_Macaque.pr	0	MetAlaSerSerSerGlyAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaAlaAsnLeuAsnAlaUa
proGIP_Souris.pr	0	MetAlaSerGlySerGlyProGlyAlaAlaAlaSerAlaAsnLeuAsnAlaValArgGluTh
proGIP_Drosophile.p	0	MetProGluGlnGlnAsnLeuArgLysThrProSerSerSerGlyLysAsnThrGluLysUa
proGIP_Levure.pro	0	MetSerGluSerThrLysGluThrIleLeuValLeuTyrGluIleGlyThrLeuLeuGlyTh
proGIP_Penicillium.pi	0	MetProProLysSerGlnAspGlnAlaAspAspLysArgGlnAlaAlaArgGluValIleAs
proGIP_Aspergillus.p	0	MetProSerGlnAlaAspAspLysArgGlnAlaAlaArgGluValIleAspIleLeuHisG1

Sélection : 0/9 lignes

Ces protéines ayant des tailles différentes selon l'espèce étudiée, une comparaison avec alignement des discontinuités est nécessaire.

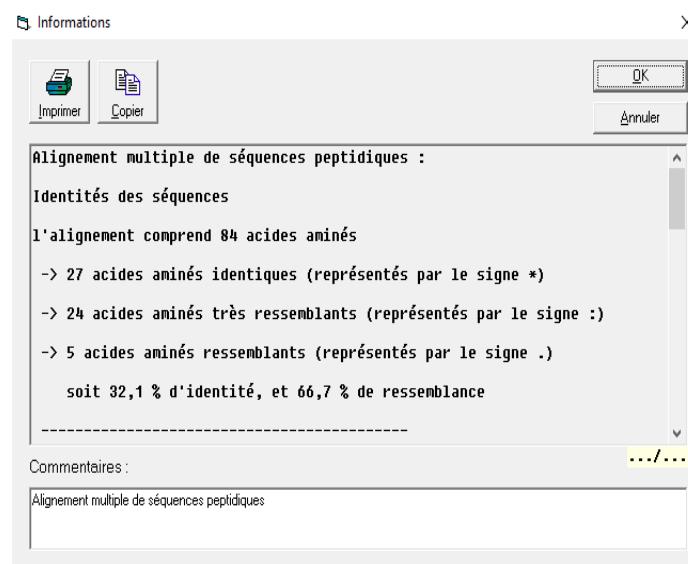
Capture d'écran à partir du logiciel Anagène lors d'une comparaison avec alignement des GIP1 et GIP2 de l'arabette et GIP de l'homme.



The screenshot shows the 'Comparaison avec alignement' (Comparison with alignment) window of the Anagène software. The window displays a multiple sequence alignment with a vertical scale from 1 to 110. The sequences are:

Sequence	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
proGIP1_Arabette.pr	MetAsp		GluGluAlaSerArgThrAla			ArgGluSerLeuGluLeuValPheArgMetSerAsnAlaLeuAspThrGlyLe						
proGIP2_Arabette.pr	Asn		Gln-	AlaGlu-								
proGIP_Homme.pro	AlaSerSerSerGlyAlaGlyAlaAlaAla		AlaAlaAla-	AsnLeuAsnAlaVal-		ThrMetAspValLeuLeuGlyIle-	Arg-					

Sélection : 0/5 lignes



The screenshot shows the 'Informations' (Information) dialog box. The dialog box contains the following text:

Alignement multiple de séquences peptidiques :

Identités des séquences

l'alignement comprend 84 acides aminés

- > 27 acides aminés identiques (représentés par le signe *)
- > 24 acides aminés très ressemblants (représentés par le signe :)
- > 5 acides aminés ressemblants (représentés par le signe .)

soit 32,1 % d'identité, et 66,7 % de ressemblance

Commentaires :

Alignement multiple de séquences peptidiques

> Bibliographie - Sitographie

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4825726/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507256/>

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00029/full>

<http://lifemap.univ-lyon1.fr/>

Classification phylogénétique du vivant, Lecointre – Le Guyader, éditions Belin

ANNEXE 1 : Préparation du gel d'électrophorèse (§ 3.2)

(*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.

[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 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 1,8 % : 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'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 peindre (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 (§ 4.5.2)

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.

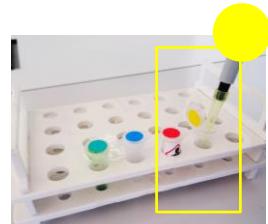
Dépôts et migration (§ 4.5.3)

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

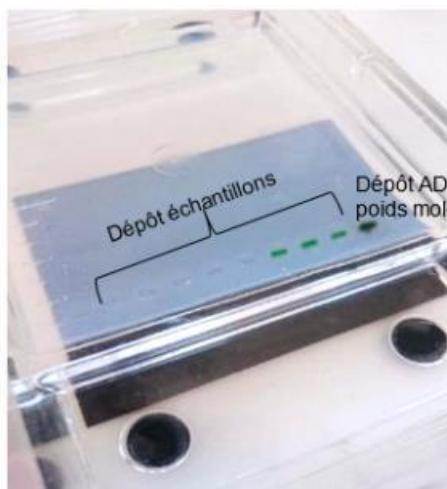
- Déposer 8 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - )
- ADN amplifié : Déposer 10 µl d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)



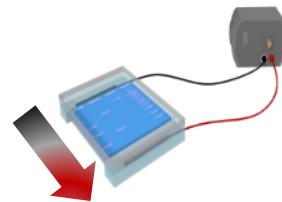
PCR



Astuce : Pour éviter les fuites de produits hors des puits et les bulles d'air 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



- 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)



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

- 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 (§ 4.5.4)

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 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 Amplification d'un gène ancestral du cytosquelette (GIP)

PHASE 1 : Prélèvement des extraits cellulaires des échantillons biologiques

Arabidopsis Thaliana

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

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

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



Chou-fleur frais ou surgelé et Brocoli



Pesée 1g de fleurs



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



Introduire, 1 μ L de liquide d'extraction préparé

Radis rose



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



Introduire, 1 μ L de liquide d'extraction préparé



Blob (*Physarum polycephalum*)

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



Levure de boulanger

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

Lors de la séance prendre 20 μ L de la suspension de levure,

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



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

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



Le matériel :

- 1 tube d'amorces (tube à pastille bleue 
- 1 tube PCR Mix [Nucléotides + 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 
- 1 microtube 0,2 mL contenant 100 µl de poudre d'arabidopsis thaliana lyophilisé
- 1 anse stérile : prélèvement de cellules de l'épiderme
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse

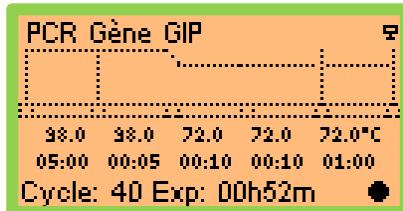


PHASE 2 : L'AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

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



Préparation des tubes réactionnels

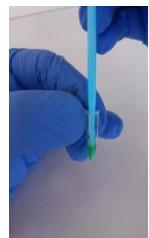
1. Repérer les microtubes PCR pour identifier les échantillons et/ou l'expérimentateur.
2. Dès que les extraits sont prêts, préparer les mélanges PCR Mix polymérase + amorces pour chaque tube :
 - Prélever 20 µL du "PCR Mix polymérase" () et les placer dans le microtube PCR. Changer de pointe de micropipette.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



Prélèvement des cellules de l'épiderme

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

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



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 (fig.3)



Figure 1



Figure 2



Figure 3

Fermer le microtube PCR.

Placer les tubes dans le thermocycleur

Sélectionner le programme GIP précédemment enregistré.

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



PHASE 3 : REVELATION

Electrophorèse

Préparation de l'ADN amplifié

- A faire pour chaque microtube : ouvrir délicatement le microtube et y ajouter 2 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



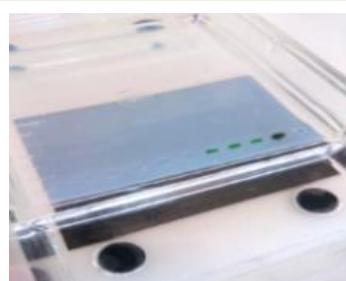
Dépôts et migration

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

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



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



Dépôt ADN
Un revêtement noir glissé sous la cuve, permet de mieux voir la position des puits

Lecture

- Utiliser le transilluminateur pour révéler les bandes d'ADN

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 EEE,
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