



Génétique

Génétique et évolution

Réf : 117 141

Kit PCR Mise en évidence du gène AMEL chez les oiseaux – 18 PCR

Français – p 1

2 annexes

Fiche de paillasse

Version : 1208

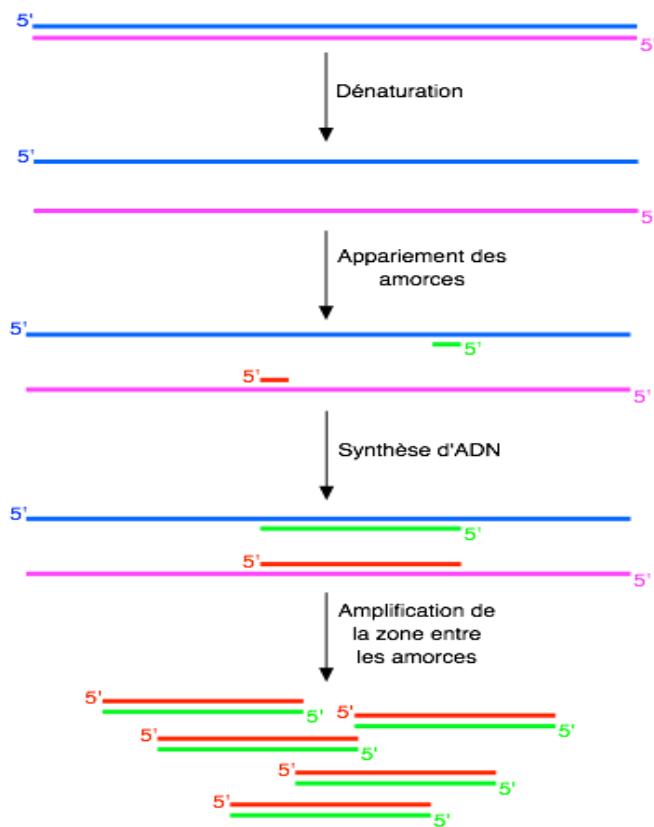
1. Amplification par PCR

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

L'ADN est synthétisé dans la nature grâce à un type d'enzyme appelé ADN polymérase. Pour fonctionner, cette enzyme a besoin d'une matrice d'ADN simple brin à répliquer, d'une amorce ADN complémentaire à l'ADN à répliquer et de désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). La découverte d'organismes thermophiles a permis de trouver des ADN 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 ce faire, la solution d'ADN est chauffée à une température proche de l'ébullition ce qui permet de séparer les deux brins d'ADN par fusion thermique. La seconde étape consiste à appariер, de part et d'autre de la zone à amplifier, des amores d'ADN simple brin synthétiques. Cette opération est simplement réalisée en abaissant suffisamment la température pour que cet appariement puisse être stable. La troisième et dernière étape consiste à se placer à la température optimale pour la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase (typiquement 72°C) pendant le temps nécessaire pour que cette dernière ait le temps de synthétiser la longueur d'ADN souhaitée.

Figure 1



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

Figure 2

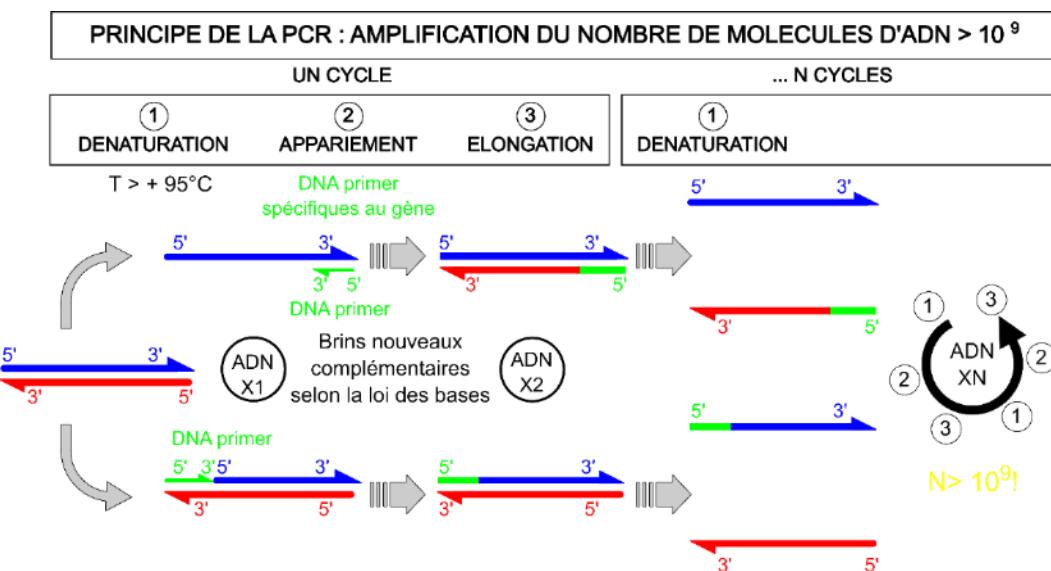
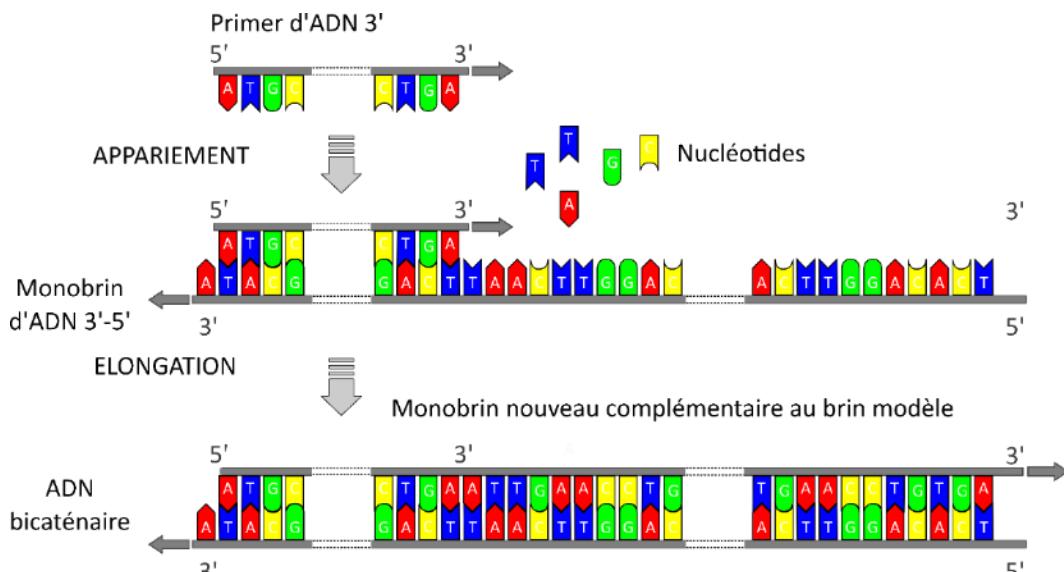


Figure 3



1.2 Contexte pédagogique

Les oiseaux sont des dinosaures, descendants des dinosaures qui ont survécu à la crise Crétacé-Paléogène il y a 65 millions d'années. Il existe une étroite parenté entre les dinosaures du Crétacé et les oiseaux actuels.



La perte des dents est une innovation évolutive apparue chez les oiseaux il y a 116 millions d'années.

Les gènes permettant la fabrication des dents ont-ils disparus du génome des oiseaux ou sont-ils encore présents mais non exprimés chez les oiseaux et le Chickenosaurus ?

Le gène AMEL code l'amélogénine, une protéine indispensable à la fabrication de l'émail dentaire. On retrouve ce gène dans le génome de nombreux Vertébrés. Dans l'espèce humaine AMEL est présent sur les chromosomes sexuels X et Y. On peut, par PCR et électrophorèse d'ADN, révéler la présence de ce gène dans le génome humain. Avec la même méthode on peut rechercher sa présence dans le génome du poulet.

Si AMEL n'est pas retrouvé dans le génome du poulet, nous pourrons penser que les gènes dentaires ont disparu partiellement ou totalement du génome des oiseaux. Par contre

si AMEL est révélé par l'amplification et l'électrophorèse, cela signifiera qu'il est encore présent dans le génome des oiseaux mais probablement non exprimé et qu'il en va peut-être de même pour l'ensemble des gènes intervenant dans la formation des dents.

1.3 Principe

On se propose de rechercher par la technique d'amplification par PCR, la présence du gène AMEL chez le poulet et parallèlement chez l'humain.

Le tube d'amorces contient **deux jeux d'amorces** :

- Un qui encadre le gène AMEL du Poulet (*Gallus gallus*)
- Un qui encadre le gène AMEL Humain (*Homo sapiens*).

L'amplification chez le Poulet sera réalisée à partir du sang de l'animal. Contrairement aux hématies des Mammifères, le sang des oiseaux possède des erythrocytes « des cellules rouges », nucléées, et qui contiennent donc l'ADN de l'animal.

Pour l'humain, **un prélèvement de cellules de l'épiderme (prélèvement buccal ou du dessus de la main)** permettra de récupérer l'ADN d'élèves volontaires (dans l'idéal appartenant aux deux sexes). Ces amplifications serviront ici de témoins pour contrôler que l'amplification PCR et l'électrophorèse d'ADN se sont déroulées correctement.

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

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

Pourquoi le gène AMEL ?

Des centaines de gènes sont associés à la formation des dents. Les gènes AMTN, AMBN, ENAM, AMEL et MMP20 interviennent dans la formation de l'émail. Parmi eux AMEL code l'amélogénine.

L'amélogénine est quantitativement la protéine majoritaire de l'émail dentaire en formation des mammifères, dans laquelle elle représente approximativement 90% du contenu organique (Termine et al., 1980). L'amélogénine joue donc un rôle très important dans la formation de ce tissu protecteur de la dent.

Le gène de l'amélogénine n'est pas présent que chez les mammifères, il a été retrouvé chez de nombreux autres vertébrés : crocodiliens, lézards, grenouilles, tritons, coelacanthe, etc... chez lesquels le gène sert aussi à mettre en place l'émail dentaire.

L'amélogénine est indispensable à la formation d'un émail dentaire bien minéralisé qui protégera la dent contre les agressions extérieures, les abrasions, tout ce qui risque d'abîmer la dent au cours de la vie d'un animal.

On pourrait donc supposer que toutes les mutations qui rendent inefficace l'amélogénine sont éliminées par la sélection naturelle car les animaux atteints ne peuvent plus se nourrir et mourront avant l'âge de la reproduction. Or l'absence de dents (ou édentulisme) est une innovation évolutive apparue plusieurs fois dans l'arbre phylogénétique des Vertébrés.

On la trouve chez les Oiseaux, les Tortues et quelques groupes de Mammifères (ornithorynque, fourmiliers, baleines à fanons et pangolins). Il existe aussi des Mammifères avec des dents sans émail (les paresseux et les tatous par exemple). Chez l'ensemble de ces Vertébrés édentés, l'amélogénine n'est plus synthétisée, mais on retrouve des traces du gène AMEL dans leur génomes



Chez l'ensemble de ces Vertébrés édentés, l'amélogénine n'est plus synthétisée. Il en résulte que le gène AMEL est un marqueur que l'on peut suivre tout au long de l'évolution des vertébrés. En focalisant notre attention sur le devenir du gène AMEL dans le génome de ces organismes lorsque celui-ci n'est plus exprimé, on aborde concrètement des notions de l'évolution de génomes mutations, régulation de l'expression des gènes, de pression de sélection...

Le scénario pédagogique a été imaginé et rédigé par Pierre Breton professeur de SVT au lycée Henri Wallon de Valenciennes.

La démarche scientifique a été élaborée en partenariat avec le **Muséum National d'Histoire naturelle** et plus spécifiquement avec la collaboration de **Sidney Delgado** Maître de Conférences pour Sorbonne Université. Il est un expert de l'évolution du gène AMEL.

Au sein de l'**Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité**, Sidney Delgado travaille pour l'équipe Homologie dirigée par **Guillaume Lecointre**. Ce laboratoire, de renommée mondiale, nous propose par cette thématique de découvrir les questions qui traversent la phylogénie.

« Suivre l'histoire de l'amélogénine, c'est porter un regard sur plus de 600 millions d'années d'évolution des vertébrés. Amplification par PCR, comparaisons de séquences, les élèves ont l'occasion avec le gène AMEL de manipuler des outils de la biologie de l'évolution comme nous pouvons le faire à l'Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité. »
Sidney Delgado



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 (mélange du couple d'amorces sens et anti sens) AMEL H. *Sapiens + AMEL G. Gallus* (tube à pastille bleue 
- 2 tubes PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte 
- 1 Tube échantillon de sang de poulet en solution (tube à pastille rose 
- 1 tube Marqueur de poids moléculaire (tube à pastille jaune ) , pour l'électrophorèse
- 1 tube DNA release [bloqueur de réaction] (tube à pastille rouge 
- 2x9 microtubes PCR 0,2 mL
- 10 anses stériles



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



Les réactifs sensibles aux contaminations (amorces et Mix PCR) sont conditionnés par demi-groupe, un tube = une séance. Les tubes entamés de réactifs peuvent être cependant remis à - 20°C, mais plus un tube reste ouvert à l'air libre, plus il subit de pipetages plus le risque de contamination par des Dnase augmente.

Matériel complémentaire nécessaire :

Microtubes 1,5 mL
Micropipette 0,5 – 10 µl + cônes stériles
Micropipette 2 – 20 µl + cônes stériles
Sang de poulet frais (optionnel)
Anses de prélèvement
Gants
Feutre à pointe fine, indélébiles
Blouse
Une poubelle de table
Thermocycleur



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.
- Porter une blouse et attacher les cheveux
- 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.

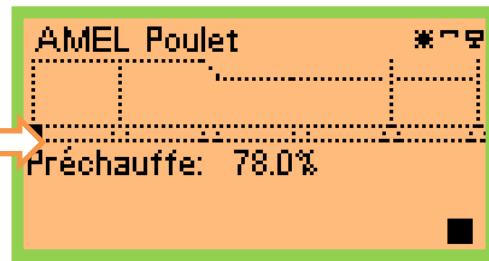
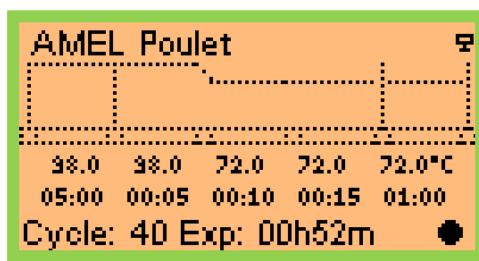
3. Mode opératoire

3.1 Paramétrage du thermocycleur

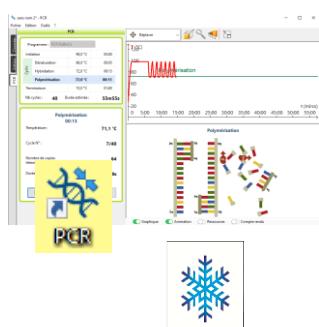
Allumer et programmer le thermocycleur (voir § paramétrage), identifier ce nouveau programme en le nommant AMEL poulet.

Principe : une amplification de 40 cycles sur 52 minutes environ.

Thermocycleur didactique Jeulin appuyer sur → (=cycle en cours)



Le thermocycleur peut aussi être piloté par logiciel sur PC ou par tablette.
(Logiciels gratuits à télécharger)



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

Programme AMEL Poulet

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	15 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 % 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

4.1.1 Matériel biologique

Cellules de poulet Tube	<p>Le sang des oiseaux est nucléé (contrairement aux mammifères), il s'est révélé être le meilleur support pour extraire de l'ADN. La viande, la peau de poulet que l'on trouve dans le commerce alimentaire ne conviennent pas.</p> <p>Le kit propose un échantillon de sang de poulet prêt à amplifier, ce réactif d'origine pharmaceutique, il a été préparé pour faciliter la réaction et sa conservation.</p> <p>On peut également réaliser la manipulation à partir de sang frais de poulet, il faudra au préalable le diluer de 5% à 10 % dans une solution composée de 50 % d'eau physiologique / 50 % glycerol.</p>
Cellules humaines	2 possibilités : Cellules buccales ou du dessus de la main

Identifier les tubes PCR destinés à recevoir les échantillons *Homo sapiens* homme, *Homo sapiens* femme, sang de poulet *Gallus gallus*

4.1.2 Prélèvement de cellules de l'épiderme

2 possibilités : Cellules buccales ou du dessus de la main

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 (mélange réactionnel voir § 4.2) 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).

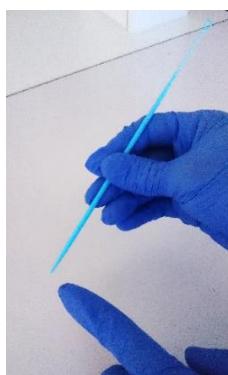


Figure 1



Figure 2

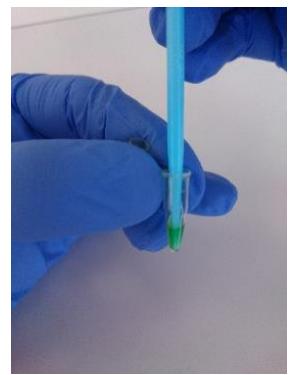


Figure 3

- 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 frottis buccal est un milieu complexe qui en terme de biologie moléculaire est très défavorable aux amorces et aux nucléotides de Mix PCR. Il faut donc veiller à ce que le temps entre la mise du prélèvement dans le tube PCR (froid) et le départ de la PCR soit court : 1 à 3 minutes max.

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 (mélange réactionnel voir§ 4.2) 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

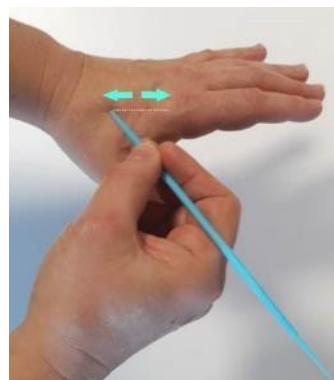


Figure 2

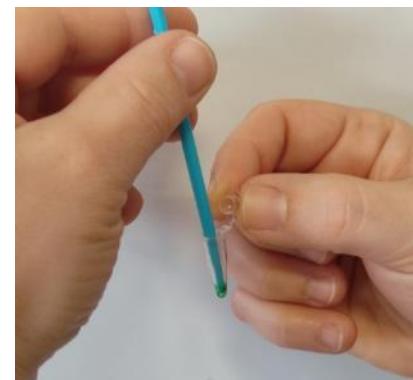


Figure 3

- 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.

4.1.3 Echantillon de cellules sanguines de poulet

- ⇒ Prêt à l'emploi
- ⇒ Maintenir le tube dans le portoir réfrigéré jusqu'à l'amplification

Tube ()

- Agiter le tube pour remettre les cellules en suspension
- On préleva 1 µL de sang par microtube PCR

4.2 Préparation des tubes réactionnels

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

Dans un microtube PCR 0.2mL, on prépare :

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.



+ 20µl de PCR mix
+ 20µl d'amorces
+ cellules humaines
(Anses de prélèvement)



+ 20µl de PCR mix
+ 20µl d'amorces
+ 1 µl de sang (dilué)

5. Placer l'anse dans le microtube PCR (mélange réactionnel voir§ 4.2) 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

5. Changer de pointe de micropipette
6. Ajouter 1 µl de sang (dilué)
Mélanger par pipetage doux

Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le plus rapidement possible l'amplification.

4.3 Lancement de la PCR

- Sélectionner le programme **AMEL poulet** que vous avez créé (§ 3.1)
- Lancer l'amplification 1 heure environ.

Le thermocycleur didactique **Jeulin**, est pilotable selon 3 possibilités :

- Mode autonome (écran),
- Logiciel sur PC (logiciels à télécharger gratuitement www.jeulin.fr)
- Logiciel pour tablette (logiciels à télécharger gratuitement)



4. Séparation par électrophorèse

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 **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.



4.2 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un gel d'agarose à 0.8% en tampon TAE.

→ Voir Annexe 2



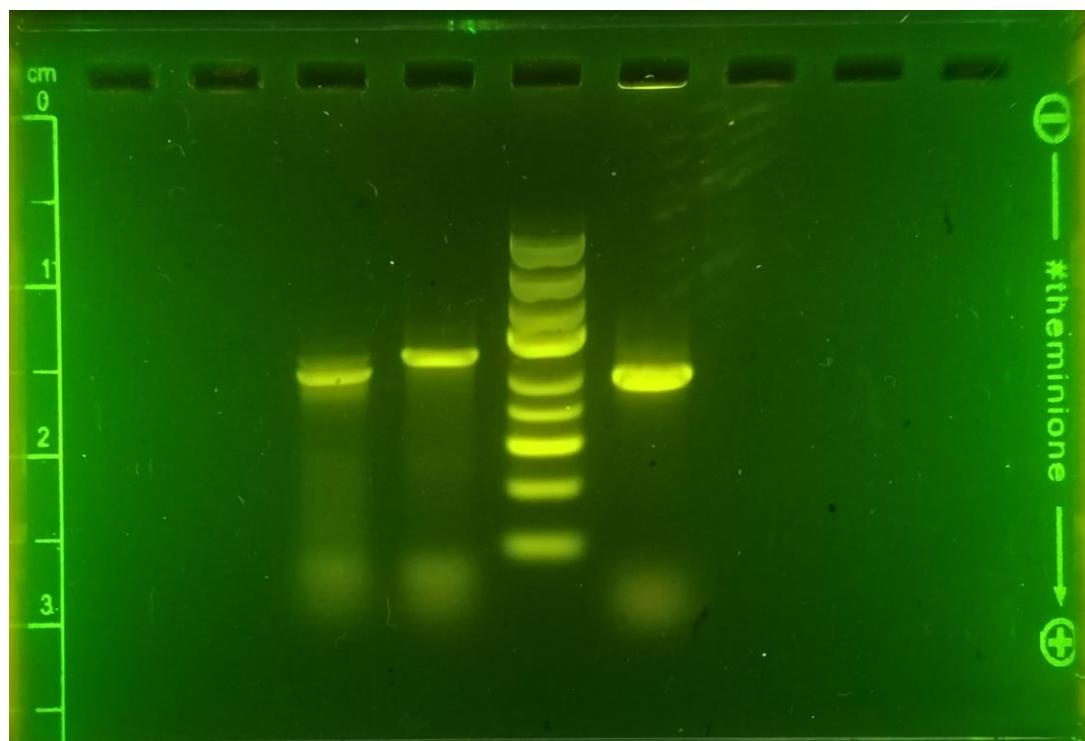
4.3 Dépôts et migration

→ Voir Annexe 2

4.4 Révélation

→ Voir Annexe 2

5. Résultats



Résultat de l'électrophorèse d'ADN après amplification du gène AMEL
1 : humain XY ; 2 : humain XX ; 3 : poulet ; PM = poids moléculaire

L'électrophorèse révèle deux bandes pour l'humain XY, l'une de 1268 paires de bases (pb) correspondant à AMELX, l'autre de 1088pb correspondant à AMEL Y. Une seule bande à 1268 pb apparaît chez l'humain XX. Une bande à 974pb apparaît chez l'oiseau. Il s'agit du gène AMEL du poulet qui est donc bien présent dans le génome de cet animal.

Une exploitation complète des résultats et des données scientifiques est disponible dans **Dossier d'expériences** sur plateformenum.jeulin.fr

Le dossier met à disposition gratuitement de très nombreuses ressources : Scénario « chickenosaurus », arbres phylogénétiques, comparaison des séquences (fichiers anagène) etc..

Référents scientifiques

Dr Sidney Delgado, Maitre de conférences Sorbonne Université, équipe Homologie dirigée par Guillaume Lecointre.

Dr Jean-Luc Evrard, Ingénieur de Recherche, Responsable du système d'information, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg.

L'expérience scientifique que nous vous proposons est une aventure originale qui a vu le jour grâce à l'enthousiasme et la passion de Pierre, Guillaume, Sydney et Jean-Luc.

Un grand merci à eux

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

(A préparer avant l'expérimentation)

La méthode retenue ici est une électrophorèse en **gel d'agarose à 1 %** 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 % : 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)
- 0,40 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 (voir 4.2)

Principe de l'électrophorèse

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

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 trous 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 trous à l'aide de la micropipette ?

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

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

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 (voir 4.3)

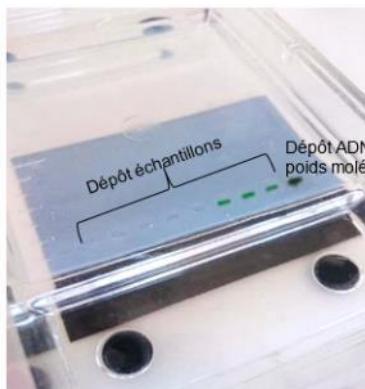
Avant tout, s'assurer que le DNA release a bien été ajouté aux produits de PCR dans les tubes.

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

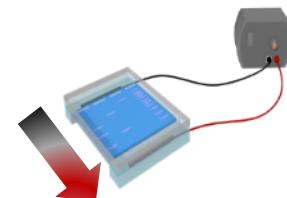
Les trous sont situés du côté du pôle négatif (noir) de la cuve à électrophorèse

- Déposer **8 µl du marqueur de Poids Moléculaire** (« échelle moléculaire » du gel - 
- ADN amplifié : Déposer **6 µl d'ADN amplifié** par PCR (1 trou par tube)

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



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



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.

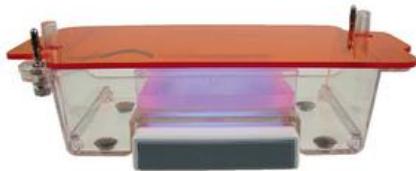
Révélation (voir 4.4)

A - Pré-coloration du gel

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

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

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



Cuve électrophorèse et Transilluminateur



Transilluminateur
réf. 527004



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

B - Post coloration

Préparer la solution du bain :

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

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

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

Kit PCR A la recherche du gène AMEL chez les oiseaux



Le matériel

- 1 tube échantillon de sang de poulet en solution (tube à pastille rose
- 1 tube d'amorces (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 marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune pour l'électrophorèse
- 2 microtubes type Eppendorf 1,5 mL
- 2 microtubes PCR 0,2 mL
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Feutre à pointe fine
- Gants et blouse

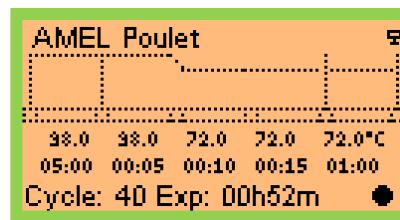


PHASE 1 : EXTRACTION et AMPLIFICATION



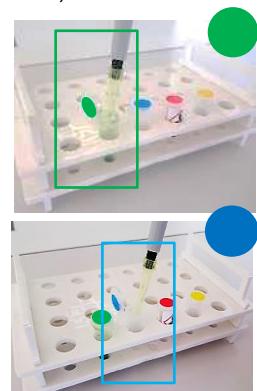
Paramétrage du thermocycleur

- Allumer et programmer le thermocycleur
- Principe : une amplification PCR de 40 cycles
[ou utiliser le logiciel pour PC ou tablette]



Préparation des tubes PCR

Identifier les tubes PCR destinés à recevoir les échantillons *Homo sapiens* homme, *Homo sapiens* femme, poulet *Gallus gallus*



Préparation des mélanges réactionnels

- Dans chaque microtube PCR 0.2 ml,
- **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
- **Rajouter** un seul échantillon cellulaire (Humain ou poulet) suivant les protocoles proposés ci-après :



Prélèvement des cellules de l'épiderme (2 possibilités : Cellules buccales ou du dessus de la main)

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

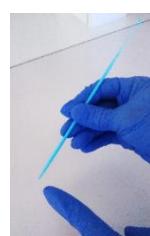


Figure 1



Figure 2

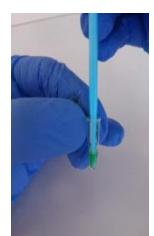


Figure 3

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)

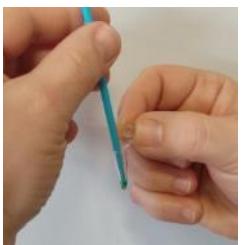


Figure 1

Figure 2

Figure 3

Echantillon chez le poulet

- Agiter le tube pour remettre les cellules en suspension
 - Prélever **1 µL** de sang dilué () et l'introduire dans le microtube PCR
 - Mélanger par pipetage doux au mélange réactionnel PCR
 - Refermer les tubes
- ⇒ maintenir les tubes dans le portoir réfrigéré jusqu'à l'amplification



Amplification PCR



- Placer les dans le thermocycleur.
- Sélectionner le programme AMEL Poulet précédemment enregistré.
- Placer le curseur sur puis appuyer OK → =cycle en cours (0h55 environ)

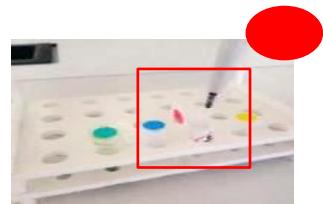
PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse

Préparation de l'ADN amplifié

- A faire pour chaque microtube : ouvrir délicatement le microtube et y ajouter **2 µL** de la solution "DNA-Release" (tube à pastille)
Mélanger par pipetage doux



Préparation du dispositif pour électrophorèse

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



Dépôts et migration

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

- Déposer **10 µl** du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel –)
- ADN amplifié : Déposer 10 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 régler.



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