

Génétique

Réplication de l'ADN par PCR

Réf :
117 136

Kit PCR Détection d'une résistance à un antibiotique - 18 PCR

Français – p 1

Fiche de paillasse

Version : 1209

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

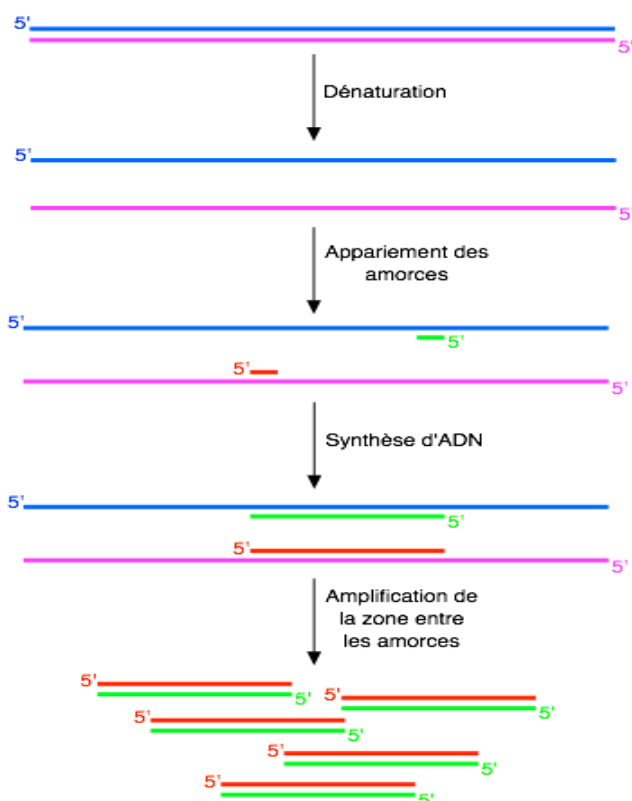
L'ADN est synthétisé dans la nature grâce à un type d'enzyme appelé ADN polymérase. Pour fonctionner, cette enzyme a besoin d'une matrice d'ADN simple brin à répliquer, d'une amorce ADN complémentaire à l'ADN à répliquer et de désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). La découverte d'organismes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

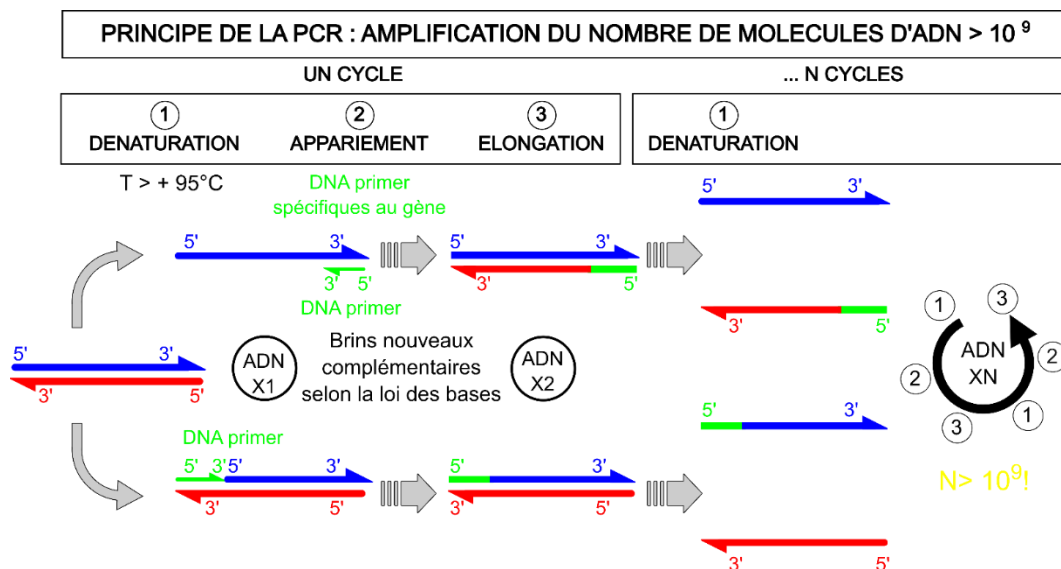
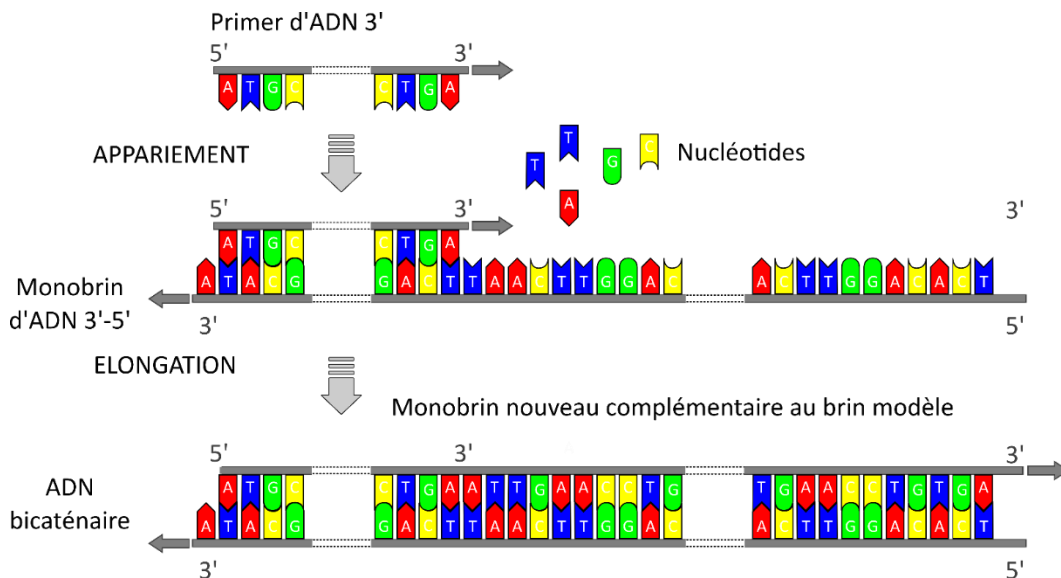


Figure 3



Primer = amorces

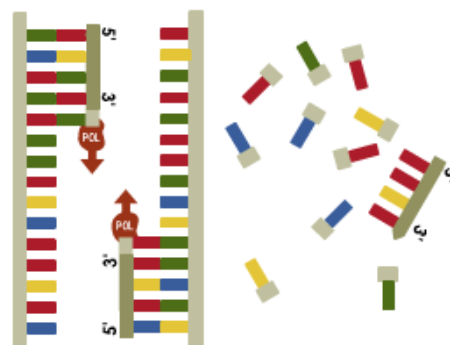
2. Mise en œuvre d'une amplification par PCR

2.1 Objectif du kit

Cette expérience se déroule sans préparation d'échantillon car l'ADN à amplifier est fourni dans le kit, son objectif est double :

En premier, elle permet d'aborder la réplication de l'ADN par une manipulation de PCR simple et rapide, elle illustre expérimentalement les mécanismes de la réplication de l'ADN. Ainsi le processus de Polymérisation par Réaction en Chaîne *in vitro* présente des similitudes avec le processus *in vivo*.

Tout comme dans la cellule, en PCR la synthèse du brin complémentaire est initiée par de courtes séquences amorce, puis une enzyme polymérase apparie les désoxynucléotides complémentaires.



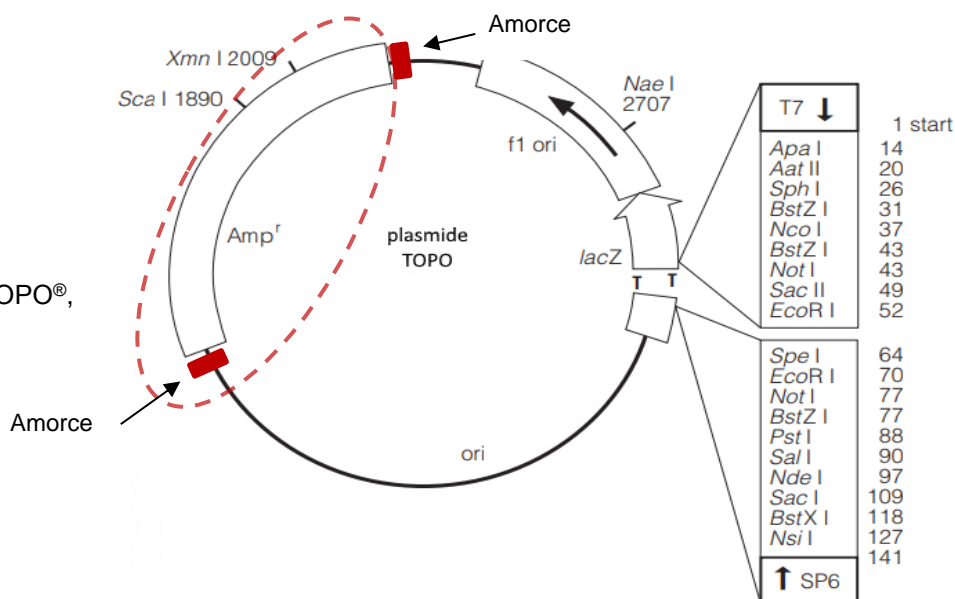
En second, cette expérience introduit un contexte de diagnostic médical. Le protocole s'inspire des techniques de détection des résistances aux antibiotiques par génotypage utilisés en milieu hospitalier. Les élèves vont utiliser une technique majeure de la biologie actuelle (prix Nobel en 1993), cette technique est très largement utilisée en routine dans de très nombreux domaines de la biologie. Cette application en microbiologie en est l'exemple concret.

Principe de l'expérience :

A partir d'ADN extrait de 2 souches bactériennes différentes, on cherche à déterminer la présence d'un gène exprimant une résistance à un antibiotique : l'ampicilline.

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaire double brin que l'on retrouve chez les bactéries et les levures. Cette molécule d'ADN est distincte de l'ADN chromosomique et capable de réplication autonome. Présents en nombre variable dans les cellules, ils sont porteurs d'informations génétiques ainsi, les plasmides participent aux transferts horizontaux de gènes entre différentes populations et espèces microbiennes

Exemple de carte d'un plasmide TOPO®, type de vecteur utilisé pour ce TP

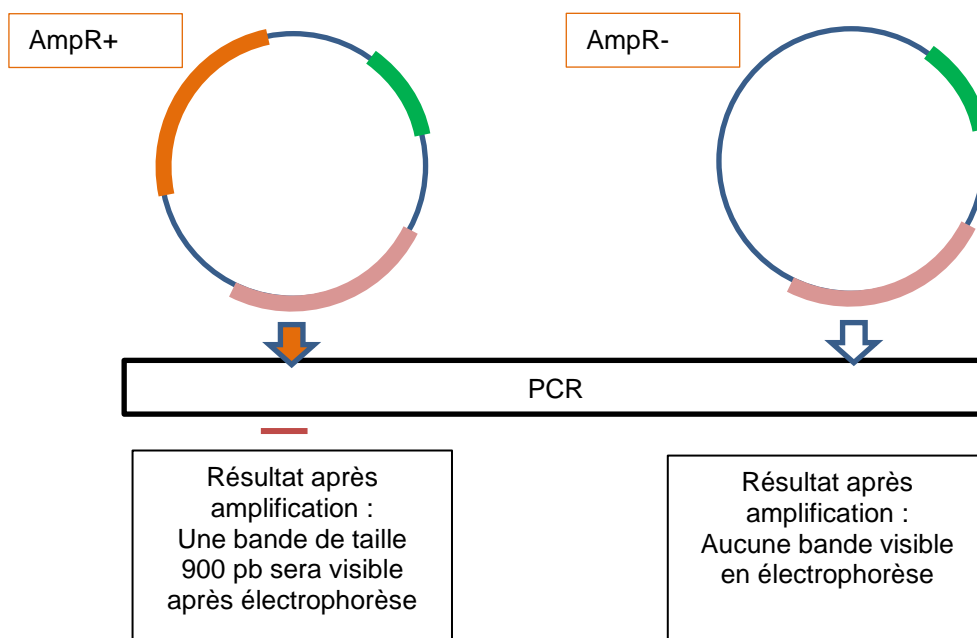


Parmi les gènes portés par les plasmides, on retrouve souvent des gènes de résistances aux antibiotiques, les plasmides sont donc des acteurs majeurs de la transmission des résistances aux antibiotiques entre souches bactériennes.

Dans les protocoles de dépistage de résistances par PCR, on réalise des génotypages qui ont pour but de rechercher un gène impliqué dans une résistance. La PCR offre un résultat rapide et sans ambiguïté. Les laboratoires de diagnostic utilisent des cocktails d'amorces pour cibler plusieurs locus à la fois pour détecter plusieurs résistances simultanément (PCR multiplex).

Ce kit offre une approche simplifiée avec un seul couple d'amorces conçu pour cibler le gène de résistance à l'ampicilline (AmpR). Lorsque celui-ci est présent, il y a une amplification d'un fragment du gène de 980pb.

On propose que chaque binôme teste deux plasmides bactériens,
un est porteur de gène de résistance à l'ampicilline (R_Amp+) l'autre pas (R_Amp-).








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

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

2.1.1 Le matériel pour 36 amplifications (2x18)*:

Le contenu du kit

- 1 Tube d'ADN d'un plasmide bactérien, « bactérie 1 » porteur du gène (AmpR+ tube à pastille rose )
- 1 Tube d'ADN d'un plasmide bactérien, « bactérie 2 » non porteur du gène (AmpR- tube à pastille blanche )
- 2 Tubes d'amorces AMP (« Primer Mix » tube à pastille bleue )
- 3 Tubes Taq polymérase + Nucléotides [« PCR master Mix » prêt à l'emploi] (tube à pastille verte )
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ) pour l'électrophorèse = 25 µl
- 40 microtubes PCR 0,2 mL



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



*(2 x 18) : 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 pipetage, plus le risque de contamination par des Dnase augmente.

Matériel complémentaire nécessaire :

Thermocycleur
Micropipette 2 - 20 µl + cônes
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.
- Utilisation de cônes propres, idéalement en PCR on utilisera des cônes stériles. Cependant en l'absence de matériel stérile, on manipulera avec précaution les cônes «ne jamais toucher la pointe avec les doigts », l'utilisation de gants pour remplir les racks est obligatoire.
- Pour réaliser la manipulation, l'usage de gants est préconisé 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

Plan de la manipulation sur une séance 1 h 20 environ

- 1 - Paramétrage du thermocycleur
- 2 - Préparation des tubes réactionnels
- 3 - Amplification dans le thermocycleur (40 min)
- 4 - Séparation par électrophorèse (25 min en TAE)
- 5 - Révélation par coloration par fluorescence et lumière bleue

3.1 Paramétrage du thermocycleur

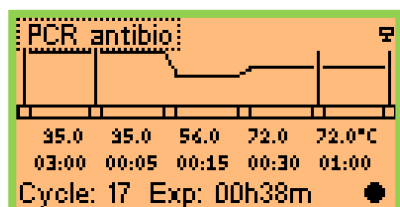
Le **Modèle 4** du thermocycleur Jeulin [→ depuis 2021] correspond au programme PCR du kit Détection d'une résistance à un antibiotique

A partir du modèle 4, créer et enregistrer un programme dénommé **PCR Antibio**, ce programme sera facile à retrouver pour les élèves.

(2 possibilités : modification à partir du thermocycleur ou via l'application PC ou tablette)

Notice du thermocycleur, réf 591 110, disponible sur notre site www.jeulin.fr

Nom du programme : PCR Antibio



Phase		Température	Durée
Dénaturation		95°C	3 min
Cycle x 17	Dénaturation	95°C	5 sec
	Hybridation	56°C	15 sec
	Polymérisation	72°C	30 sec
Terminaison		72°C	1 min

3.2 Préparation des tubes réactionnels

La manipulation est très simple, elle nécessite uniquement l'utilisation de micropipettes

Dans **un premier** microtube PCR 0.2mL, on prépare :

15 µl de PCR mix + 10 µl d'amorces AMP + 2 µl d'ADN à amplifier

1. Faire un repère pour identifier le tube B1.
2. Prélever **15 µL** de Taq polymérase + nucléotide "PCR Master Mix" (**vert**)
3. Changer de pointe de micropipette.
4. Prélever **10 µL** d'amorces "Primer Mix" (**bleu**), mélanger par pipetage doux.
5. Changer de pointe de micropipette
6. Prélever **2 µl** d'ADN à amplifier de la « bactérie 1 » le tube (**rose**)
Fermer le microtube PCR



Prendre **un second** microtube PCR 0.2 ml, identifier le tube B2, refaire les étapes 2 à 5, y ajouter le point 7.

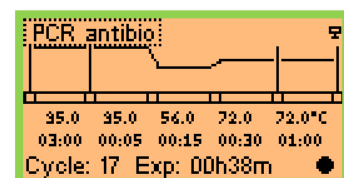
7. Prélever **2 µl** d'ADN à amplifier de la « bactérie 2 » le tube **blanc**
Fermer le microtube PCR

8. Placer les tubes dans le thermocycleur.



3.3 Amplification

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



En fin de cycle, les échantillons peuvent être maintenus plusieurs heures à une température < 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.

Préparation du tube témoin T

« ADN avant amplification », il s'agit d'un tube avec l'ADN plasmidique mais sans Taq polymérase ni amorces.

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier le tube T.
2. Prélever **25 µL** d'eau distillée, les placer dans le microtube PCR.
3. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever **2 µl** d'ADN à amplifier tube (**rose**)

3.4 Séparation et observation de l'ADN amplifié

3.4.1 Principe de l'électrophorèse

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

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

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

3.4.2 Préparation du gel d'électrophorèse (A préparer avant l'expérimentation)

Gel d'agarose à 1,2 % en tampon TAE avec une révélation par fluorescence gel green.

[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	10 min	Solution rapide
Solution 1 : pré coloration du gel (3µl/ 40 ml de gel)		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
<ul style="list-style-type: none"> - Balance à 0,01g - Cuve à électrophorèse + alimentation - Système de chauffage - Thermomètre 	<ul style="list-style-type: none"> - Éprouvette 100 ml - Éprouvette de 500 ml - Fiole de 250 ml - Erlenmeyer 250 ml - Cristalliseur (ou récipient équivalent) - Ruban adhésif pour peintre 	<ul style="list-style-type: none"> - TAE 10X (25 ml) - Agarose (0,6 g) - Gelgreen - Marqueur de poids moléculaire (Microtube à pastille jaune) - Produits de PCR

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

* Dans une fiole de 250 ml :

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

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

Préparation :

- * Dans un erlenmeyer de 100 ml, verser :
 - 40 ml de TAE 1X (mesurés à l'aide d'une éprouvette de 100 ml)
 - 0,48 g d'agarose (pesés sur une balance à 0,01g)
- * Chauffer la solution en agitant régulièrement, idéalement avec un agitateur magnétique.

Révélation par pré coloration du gel :

Le gel est prêt lorsque l'agarose est totalement dissoute, le liquide doit être parfaitement translucide. En fin de dissolution ajouter 2,5 µl de Gelgreen (le colorant est rouge !), continuer l'agitation et le chauffage jusqu'à ce que le liquide translucide soit coloré de façon homogène.

- * 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 cm environ.

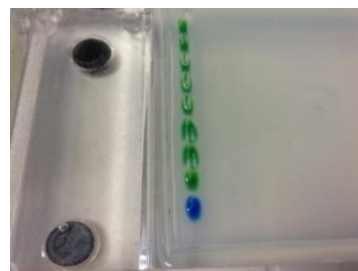
Astuce : Si des bulles apparaissent, vous pouvez les faire éclater à l'aide d'un cône pour micropipette avant la solidification du gel.

- * 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 2 à 3 jours avant l'électrophorèse. Dans les mêmes conditions, un gel sans colorant peut être stocké 5 à 7 jours dans du tampon de migration TAE 1X (une fois ôté du support).

3.4.3 Méthodes

Dépôt de l'ADN et migration :



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

Révélation utilisant un colorant fluorescence Gelgreen : déposer 10 µl de solution amplifiée d'ADN par puits.

Révélation par coloration Azure A ou autre colorant : 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.

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

Pour la classe

- Vous disposez dans le kit, de 25 µl de marqueur Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - **jaune**), qui permet de faire soit 2 électrophorèses (10 µl/puits) ou 3 électrophorèses (8 µl/puits).
- Déposer 10 µl d'ADN fourni (tube **rose**) → permet de visualiser le plasmide et de déterminer sa taille.
- Déposer 10 µl du tube témoin **T** « ADN avant amplification », → ce témoin correspond à la concentration d'ADN présente avant l'amplification.

Chaque binôme :

- Dépose 10 µl d'ADN amplifié « bactérie 1 »
- Dépose 10 µl d'ADN amplifié « bactérie 2 »

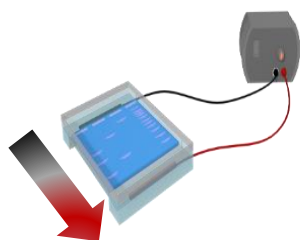
Astuce : Pour éviter les fuites de produits hors des puits et les bulles d'air dans lors des dépôts, déposer très lentement à mi-hauteur dans les puits et arrêter avant que le cône ne soit entièrement vide (ne pas dépasser la 1^e butée du piston de la micropipette).

PCR



- Poser le couvercle, ce qui ferme le circuit, régler l'alimentation en fonction du tampon utiliser (ex TAE 100 à 150 V maxi).

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.



3.5 Révélation

3.5.1 Pré-coloration du gel

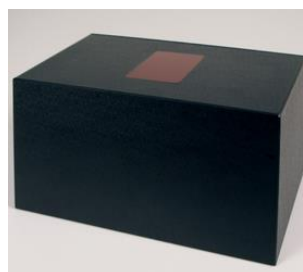
Le Gelgreen intégré à l'agarose va révéler par fluorescence les bandes d'ADN en l'éclairant à l'aide du transilluminateur.

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

- Placer celui-ci 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.

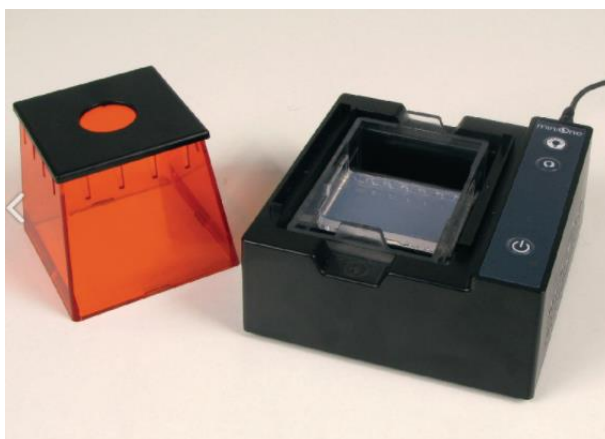


Transilluminateur
réf. 527004



Chambre noire
réf. 527010

Visualisation et des prises de vues
en toutes conditions de luminosité



Electrophorèse tout en un
Minione réf. 707900

Générateur et transilluminateur
intégrés avec la cuve
électrophorèse

Visualisation de la migration en
temps réel

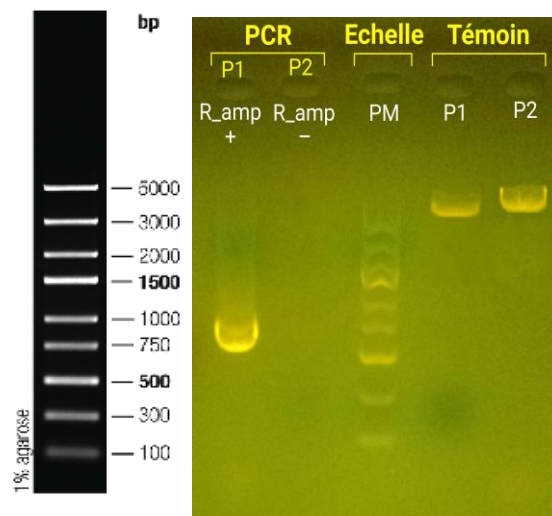
3.6 Résultats

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

Témoins Plasmide 1 et 2

P1 → un fragment de gène a été amplifié → présence du gène de résistance à l'ampicilline sur ce plasmide

P2 → pas d'amplification donc pas de gène de résistance à l'ampicilline pour ce plasmide.



Conclusion : La bactérie 1 sera résistante au traitement par ampicilline alors que la bactérie 2 y sera sensible.



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

Kit PCR_Détection d'une résistance à un antibiotique



Le matériel :

- 1 Tube d'ADN d'un plasmide bactérien, « bactérie 1 » (tube à pastille rose )
- 1 Tube d'ADN d'un plasmide bactérien, « bactérie 2 » (tube à pastille blanc )
- 2 Tubes d'amorces AMP [Primer Mix] (tube à pastille bleue )
- 3 Tubes Taq polymérase + Nucléotides [PCR master Mix, prêt à l'emploi] (tube à pastille verte )
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ) pour l'électrophorèse
- 40 microtubes PCR 0,2 mL
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse

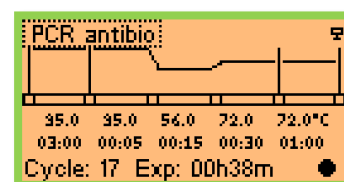


PHASE 1 : L'AMPLIFICATION




Paramétrage du thermocycleur

- Créer et enregistrer un programme « PCR Antibio » reprenant les caractéristiques ci-contre



Préparation du tube témoin T (une seule pour toute la classe)




1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier le tube T
2. Prélever **25 µL** d'eau distillée les placer dans le microtube PCR
3. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever **2 µL** d'ADN à amplifier tube ()



Préparation des tubes réactionnels (2 par binôme)

Dans un **premier microtube** PCR 0.2mL :

15 µl de PCR mix + 10 µl d'amorces AMP + 2 µl d'ADN à amplifier

1. Faire un repère pour identifier le tube B1
2. Prélever **15 µL** de Taq polymérase + nucléotide "PCR Master Mix" ()
3. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever **10 µL** d'amorces "Primer Mix" () et mélanger par pipetage doux
5. Changer de pointe de micropipette
6. Prélever **2 µl** d'ADN à amplifier « bactérie 1 », le tube ()
Fermer le microtube PRC.



Prendre un **second microtube** PCR 0.2 ml, identifier le tube B2, refaire les étapes 2 à 5, y ajouter le point 7.

7. Prélever **2 µl** d'ADN à amplifier « bactérie 2 », le tube (blanc)
Fermer le microtube PCR.

Placer les tubes dans le thermocycleur.

S'assurer que le tube témoin T est présent.

Fermer le couvercle.

Sélectionner le programme « PCR Antibio ».

Placer le curseur sur puis **appuyer** OK → =cycle en cours (38 minutes environ)



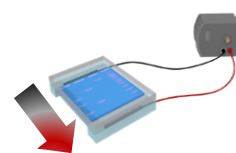
PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse

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

Pour la classe :

- Déposer 8 à 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire suivant le nombre d'électrophorèses (« échelle moléculaire » du gel –)
- Déposer 10 µl d'ADN fourni (tube) : permet de visualiser le plasmide et de déterminer sa taille
- Déposer 10 µl du tube témoin T « ADN avant amplification », ce témoin correspond à la concentration d'ADN présente avant l'amplification.

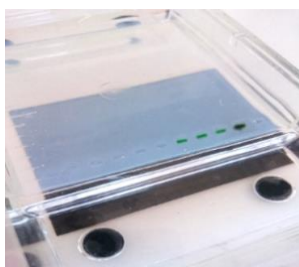


Chaque binôme :

- Dépose 10 µl d'ADN amplifié « bactérie 1 »
- Dépose 10 µl d'ADN amplifié « bactérie 2 »
- Poser le couvercle sur la cuve, ce qui ferme le circuit, régler l'alimentation en fonction du tampon utiliser (ex TAE 100 à 150 V maxi)



Allumer et attendre la migration **pendant 25 min** en 140 V.



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

Lecture

- Utiliser le transilluminateur pour révéler les bandes d'ADN