

Génétique

Kit PCR Express Principe réplication de l'ADN

Réf :
117 119

Kit PCR EXPRESS Principe réplication de l'ADN - 18 PCR

Français – p 1

2 annexes

Fiche de paillasse

Version : 3211

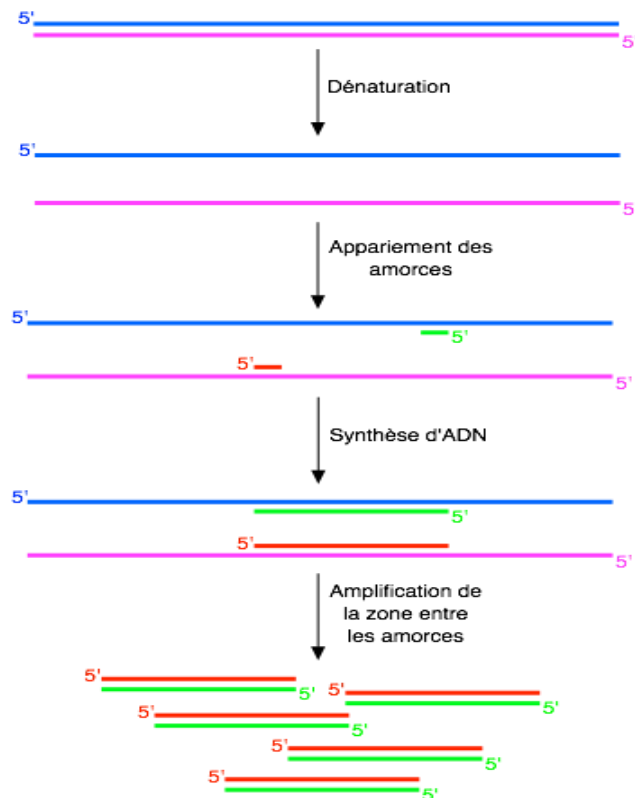
1. Principe général d'une réaction PCR (Polymerase Chain Réaction)

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 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.

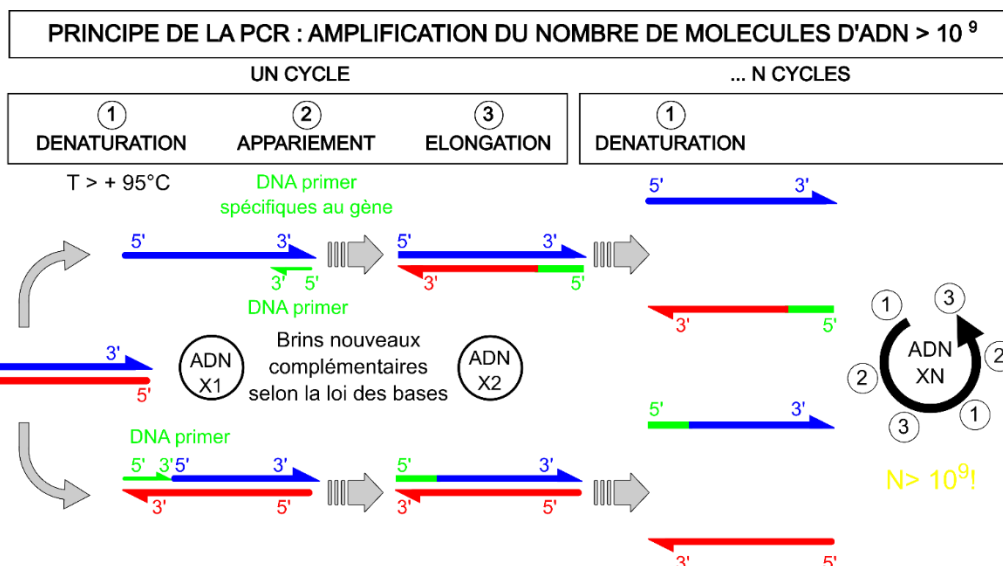
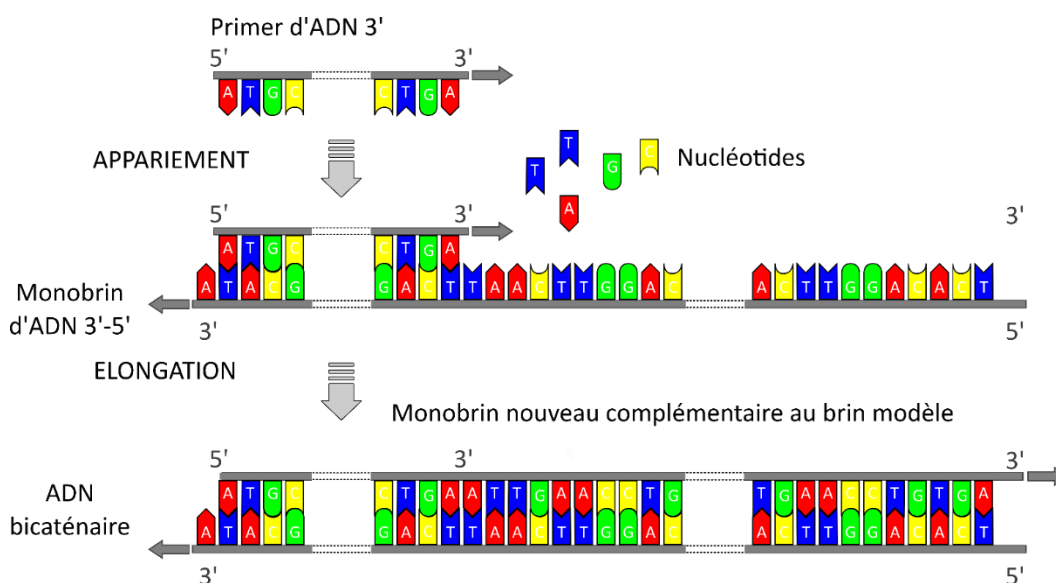


Figure 2



Primer = amorces

2. Mise en œuvre d'une amplification par PCR

2.1 Objectif du kit

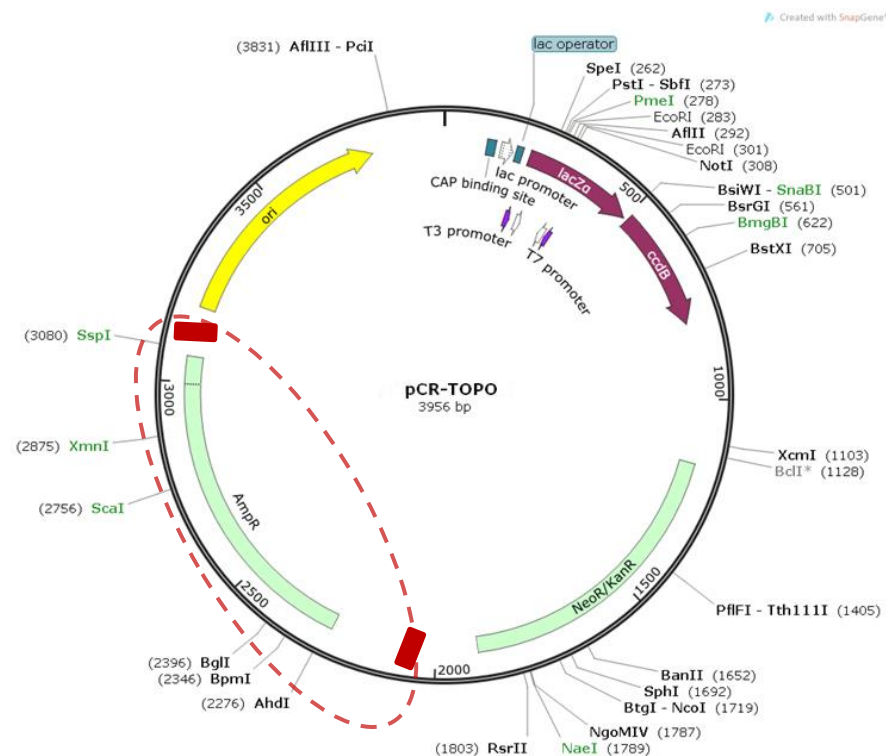
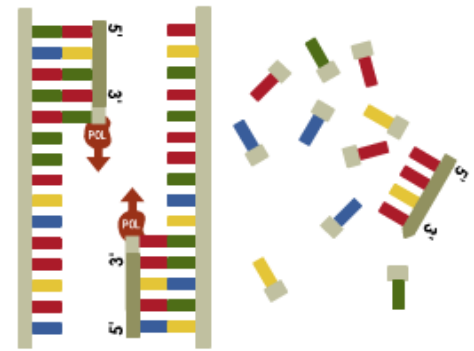
L'ensemble du kit permet de mettre en œuvre une amplification par PCR, pour découvrir et comprendre le principe de l'amplification d'un fragment d'ADN.

Pourquoi étudier la technique de polymérisation en chaîne de l'ADN ?

En premier, cette manipulation permet de découvrir et de s'initier à l'utilisation d'une technique majeure de la biologie actuelle.

En second, cette technique permet d'illustrer 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.



Carte d'un plasmide de type vecteur TOPO®, similaire à celui utilisé dans ce TP.

La cible des amorces (■) est une portion de 980 pb du plasmide bactérien TOPO® portant le gène de résistance à l'ampicilline (AMP^r). Ce plasmide est fourni en solution. Si la réplication *in vitro* a bien lieu, l'électrophorèse permettra de mettre en évidence une bande d'ADN se situant à proximité du repère 1 kpb correspondant à la portion amplifiée du gène recherché AMP^r.

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

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

2.2 Réalisation d'une réaction de PCR

2 expériences possibles :

Version « Express » (voir chapitre 3) : 30 minutes env. 12 cycles de 45 secondes suffisent pour obtenir une quantité détectable par électrophorèse. La réplication *in vitro* par PCR est ainsi mise en évidence. Un fragment d'ADN non décelable dans l'échantillon initial devient visible par électrophorèse après avoir été recopié en un nombre exponentiel d'exemplaires.





Variante, « relation nombre de cycles et quantité d'ADN visualisable » : Cette variation expérimentale (voir chapitre 7), permet d'explorer le lien entre le nombre de cycles réalisés avec le thermocycleur et la quantité d'ADN observable en électrophorèse. On peut ainsi déterminer pourquoi la plupart des protocoles de PCR préconisent de 35 et 45 cycles.

Une manipulation en 4 étapes sur une séance d'une heure environ

- 1 - Préparation des tubes réactionnels
- 2 - Réalisation de la PCR dans le thermocycleur (30 min)
- 3 - Séparation par électrophorèse (20 min en TAE)
- 4 - Révélation par coloration par fluorescence et lumière bleue

2.2.1 Le matériel pour 18 amplifications (2x9)*:

Le contenu du kit

- 1 Tube échantillon d'ADN à amplifier (tube à pastille rose )
- 2 Tubes d'amorces AMP (tube à pastille bleue )
- 2 Tubes PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte )
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ) **40 µl** pour 4 électrophorèses
- 20 microtubes PCR 0,2 mL



L'agarose et le tampon TAE ne pas fourni dans ce kit

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

*(2 x 9) : 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 stériles
Gants
Feutre à pointe fine
Blouse



Consommables complémentaires

		Référence
Agarose	25 g	107 032
Gelgreen	33 µl	107 455
Tampon TAE x10 pour reconstituer 1 litre (x1)	100ml	107 525
Kit gel PCR: Agarose (4g) + Tampon TAE x10 ((pour reconstituer 1 litre x1) + colorant Gelgreen 33 µl	1	107 646
Gel Cup prêt à l'emploi agarose 1 % + Gel Green	10	117 150
Echelle de Poids Moléculaire	100 µl	117 145

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 base 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.

2.3 Paramétrage du thermocycleur

Allumer et programmer le thermocycleur

Principe une amplification rapide de 12 cycles en 30 minutes

Thermocycleur didactique **Jeulin**,

- Sélectionner le programme **Modèle 2**
- Placer le curseur sur  puis appuyer OK
→  =cycle en cours (0h30 environ)



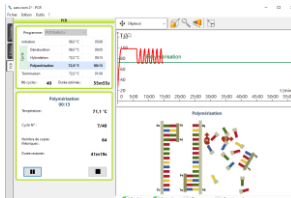
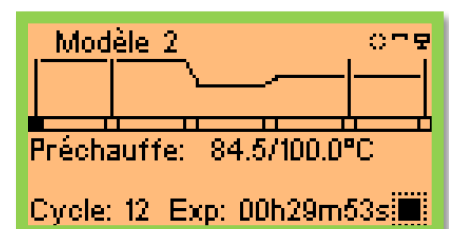
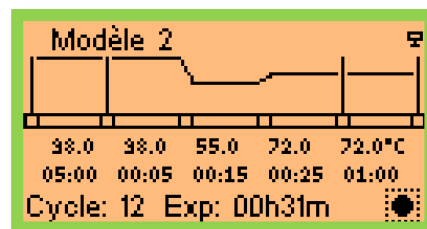
Paramétrage

Exécuter le programme : **Modèle 2**

Phase		Température	Durée
Dénaturation		95°C	5 min
Cycle x 12	Dénaturation	95°C	5 sec
	Hybridation (1)	55°C	15 sec
	Polymérisation	72°C	25 sec
Terminaison		72°C	1 min

* Sur les modèles 6 et 9 puits, dans le modèle 2, la dénaturation est à 98°C

- (1) La température d'appariement (72°C) des oligonucléotides a été choisie pour être proche de la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase. Ceci permet de simplifier les cycles et d'accélérer ainsi le processus. Hybridation et polymérisation sont donc confondues, une phase à 56°C n'étant pas nécessaire.



Ou utiliser le logiciel de pilotage PCR sur PC ou tablette



Astuce : créer et enregistrer un programme nommé **PCR express**

Ce programme (à partir du modèle 2) est plus facile à retrouver pour les élèves.

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.



3. Préparation du gel d'électrophorèse

Un **gel d'agarose à 1,2%** en tampon TAE est nécessaire pour la migration des échantillons 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 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 :

- 20 µl de PCR mix + 20 µl d'amorces AMP + 2µl d'ADN à amplifier

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier l'expérimentateur.
2. Prélever 20 µL du "PCR Master Mix" (**vert**) et les placer dans le microtube PCR.
3. Changer de pointe de micropipette.
4. Prélever 20 µL du "Primer Mix" (**bleu**) et les placer dans le microtube PCR.
Mélanger par pipetage doux.
5. Changer de pointe de micropipette
6. Prélever 2 µl d'ADN à amplifier tube (**rose**)
7. Refermer rapidement et déposer le tube dans le thermocycleur

Protocole Eco → Gagner 25 % de réactif en plus

Pour réaliser 24 amplifications au lieu de 18 ou avoir un volume de sécurité supplémentaire

Dans un microtube PCR 0.2 mL, on prépare :

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

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL
2. Prélever 15 µL du "PCR Master Mix" (**vert**) et les placer dans le microtube PCR
3. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever 15 µL du "Primer Mix" (**bleu**) et les placer dans le microtube PCR
Mélanger par pipetage doux
5. Changer de pointe de micropipette
6. Prélever 2 µl d'ADN à amplifier tube (**rose**)
7. Refermer rapidement le tube

Thermocycleur : Protocole 2 → 15 Cycles minimum (au lieu de 12)





4.2 Préparation du tube témoin T

Préparation du tube témoin T « ADN avant amplification », celui-ci est dilué au 1/10 comme l'ADN des tubes mélangés avec mixPCR + amorces

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier le tube T.
2. Prélever 40 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)

4.3 Lancement de la PCR

Thermocycleur didactique **Jeulin**,

- Sélectionner le programme **Modèle 2**
- Placer le curseur sur  puis appuyer OK
→  = cycle en cours (0h30 environ)

4.4.2 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

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

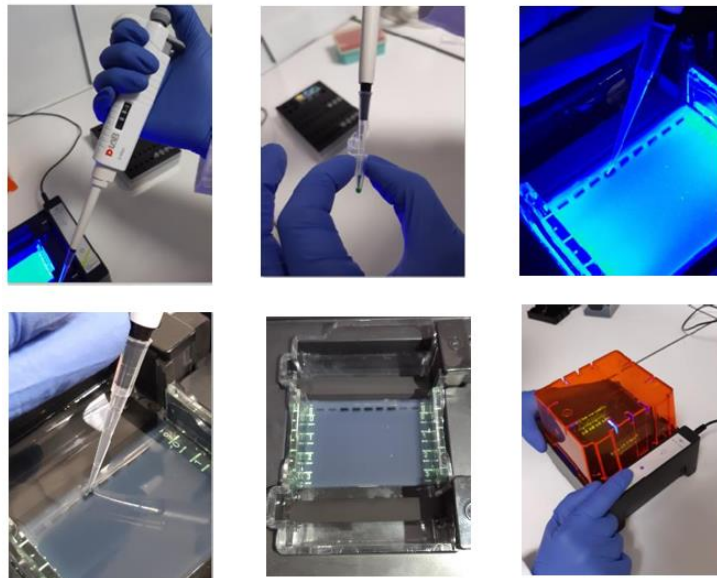
→ Voir **Annexe 2**

4.4.3 Dépôts et migration

⇒ Electrophorèse avec colorant à fluorescen ce : système phorEasy Jeulin



8 µl par puits



⇒ **protocole complet**, consulter notre dossier d'expériences : PCR Express sur plateformenum.jeulin.fr

4.4.4 Révélation

→ Transilluminateur intégré = révélation en temps réel

⇒ **protocole: cuve standard ADN /protéine** → Voir **Annexe 2**

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 moléculaire (Pm).

On constate que l'électrophorèse de la solution initiale ADN (P), montre une bande d'ADN se situant entre 5000 et 3000pb correspondant au plasmide TOPO (3,9 kpb).

Pour le témoin T « ADN avant amplification », aucune bande d'ADN n'est décelable (ADN trop dilué).

2 µl de cette solution d'ADN a été mélangée avec un mix PCR contenant une taqpolymérase, des désoxynucléotides et des amorces ciblant le gène de l'ampicilline.

Les puits 1 /2 /3 /4 montrent qu'après 12 cycles d'amplification, un fragment d'ADN devient observable par électrophorèse dont la taille peut être estimée à un peu moins de 1000 pb.

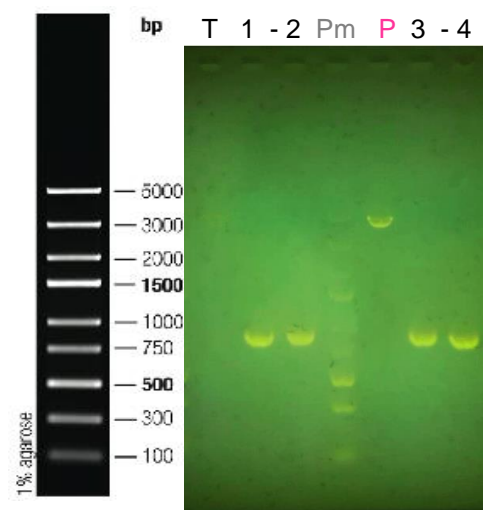
On peut en déduire que l'apparition de cette bande d'ADN ne peut qu'être le résultat de l'action de l'enzyme (Taq polymérase) et du mix nucléotide / amorces. Ces fragments correspondent à des copies du gène de l'ampicilline (1000 pb). La réplication *in vitro* de l'ADN a donc été mise en évidence.

Puits Pm = Marqueur de poids moléculaire

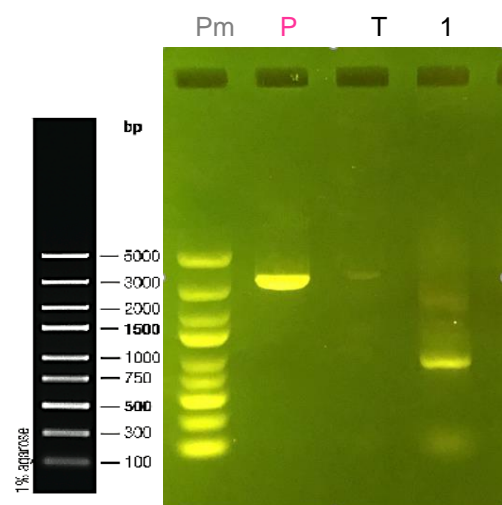
Puits T = « ADN avant amplification »

Puits **P** = plasmide concentré (tube **rose**)

Puits 1 /2 /3 /4 = amplifications réalisées



Système électrophorèse polyvalente
ADN/protéine Jeulin – 30 min 140 V
Puits 1 /2 /3 /4 = amplifications réalisées



Système électrophorèse ADN
PhorEasy – 10 min
Puits 1 = amplification réalisée

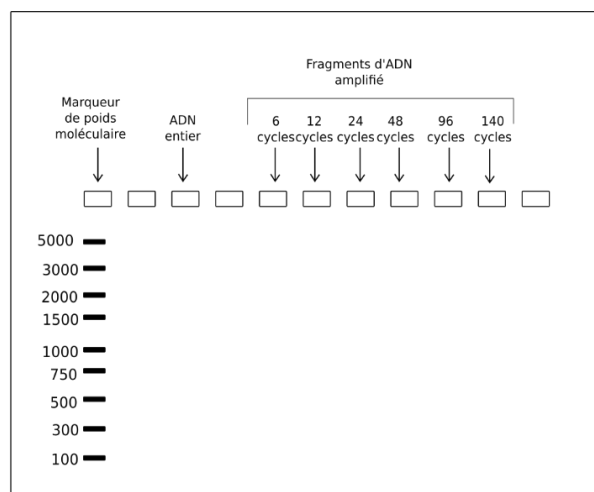
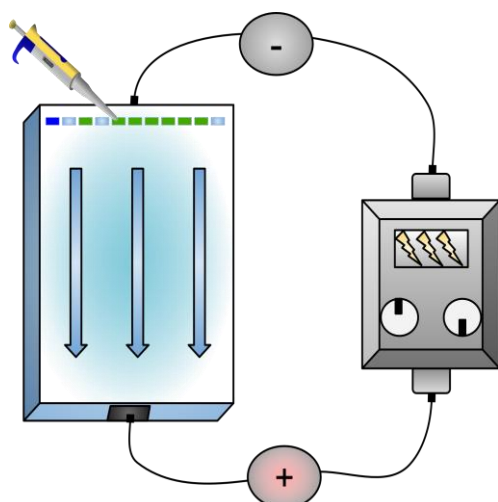
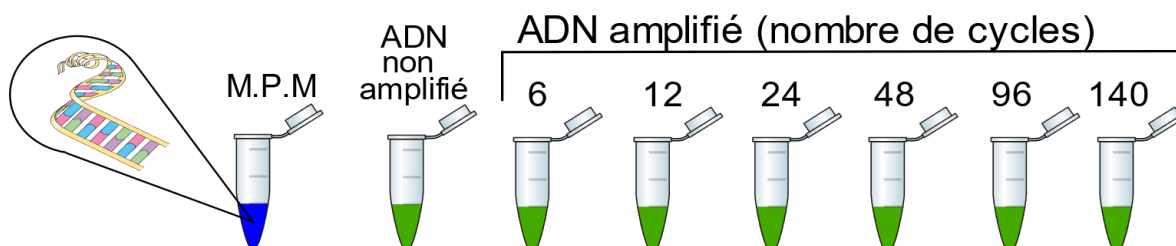
7. Investigation complémentaire (TP alternatif) : Relation nombre de cycles et quantité d'ADN visualisable

Principe : On réalise différentes amplifications en augmentant le nombre de cycles tout en conservant le même cycle de base. On réalise ensuite une électrophorèse pour comparer les différents produits d'amplification.

Ex : 6 cycles, 12 cycles, 24 cycles, 48 cycles, 96 cycles, 140 cycles

Phase		Température	Durée
Dénaturation		98°C	5 min
Cycle x ? <i>A définir</i>	Dénaturation	98°C	5 sec
	Hybridation	55°C	15 sec
	Polymérisation	72°C	25 sec
Terminaison		72°C	1 min

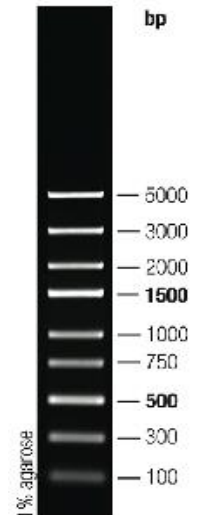
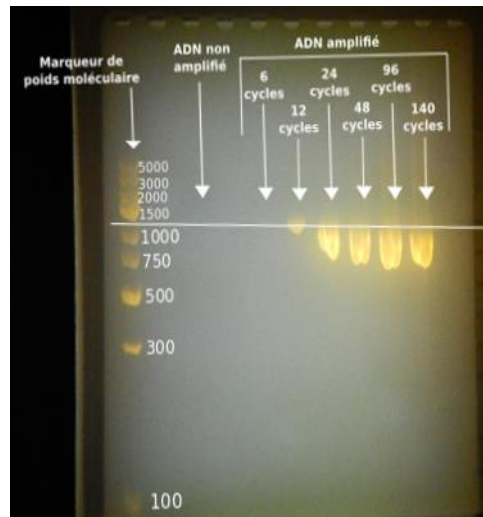
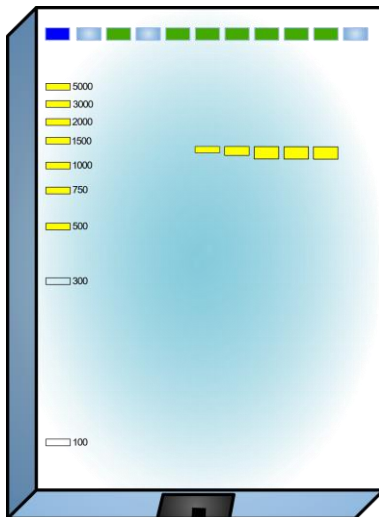
Après amplification, déposer 8 µl d'ADN amplifié correspondant aux différents temps d'amplification, un puits = un test (6 cycles, 12 cycles, 24 cycles, 48 cycles, 96 cycles ...)



Ci-dessous exemple de révélation de l'ADN par pré-coloration du gel d'agarose par gel green.

Résultats de la migration sur gel d'agarose :

Echelle de poids moléculaire (Thermo Fisher Scientific)



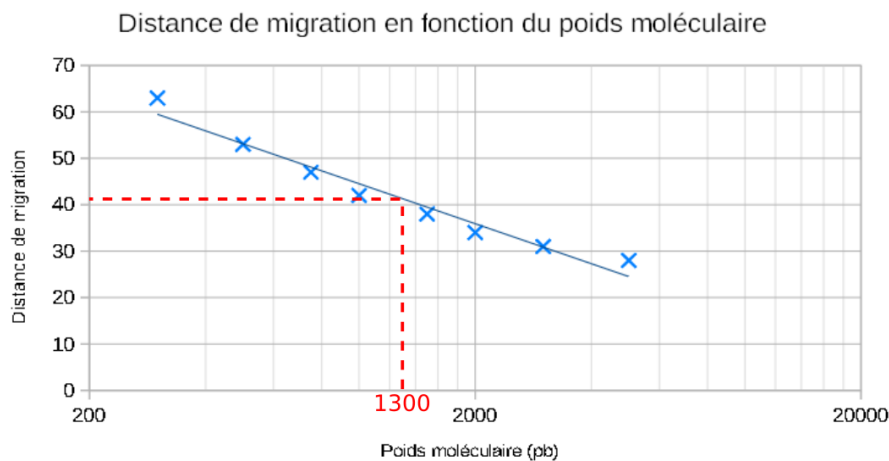
Résultat

Détermination de la taille du fragment d'ADN :

A partir de l'étude du gel, on peut mesurer les distances de migrations des marqueurs de taille mais aussi du fragment d'ADN

On obtient ainsi un graphique représentant la distance de migration en fonction du poids moléculaire du fragment.

Ainsi, à partir de ce graphique, on peut créer une courbe de tendance linéaire puis déterminer la taille du fragment d'ADN amplifié.



Conclusions de l'expérience

Lorsque le cycle est inférieur à 12 (6 cycles), la quantité d'ADN n'est pas suffisante pour être observée.

Au-delà de 12 cycles, plus le nombre de cycle est important et plus la quantité d'ADN observée est importante.

Par contre, on note qu'à partir de 48 cycles, la quantité d'ADN n'augmente plus. On peut donc en déduire qu'il existe un facteur limitant. On peut émettre l'hypothèse que la quantité d'amorces ou de nucléotides n'est pas suffisante et qu'à partir de 48 cycles tout a été consommé pour amplifier l'ADN.

Dans les faits, la synthèse d'ADN est accompagnée de la libération de pyrophosphate qui, en concentration élevée, inhibent l'activité de la Taq polymérase. A partir de 30 cycles, les conditions deviennent de plus en plus défavorables pour une bonne activité enzymatique. Ce qui explique, que la plupart des programmes d'amplification par PCR ne dépasse pas 40 cycles.

Utilisation d'une échelle de poids moléculaire

A partir du marqueur de poids moléculaire, nous avons pu déterminer que le fragment d'ADN migré fait à peu près 1300 paires de bases. Afin d'améliorer cette mesure, il est possible de faire migrer l'ADN plus longtemps.

ANNEXE 1 : Préparation du gel d'électrophorèse (§ 3)

(A préparer avant l'expérimentation)

La méthode retenue ici est une électrophorèse en gel d'agarose à 1,2 % en tampon TAE avec une révélation par fluorescence gel green.

[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 - Cristalliseur (ou récipient équivalent) - Ruban adhésif pour peintre	- TAE 10X (25 ml) - Agarose (0,6 g) - Gelgreen - Marqueur de poids moléculaire (Microtube à pastille jaune) - Produits de PCR

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

* Dans une fiole de 250 ml :

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

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

Préparation :

* Dans un erlenmeyer de 100 ml, verser :

- 40 ml de TAE 1X (mesurés à l'aide d'une éprouvette de 100 ml)
- 0,48 g d'agarose (pesés sur une balance à 0,01g)

* Chauffer la solution en agitant régulièrement, idéalement avec un agitateur magnétique.

2 possibilités pré coloration (rapide et moins résolu) ou post coloration (plus long mais plus résolu)

- 1- **Pré coloration** : Le gel est prêt lorsque l'agarose est totalement dissoute, le liquide doit être parfaitement translucide. En fin de dissolution ajouter 2,5 µl de Gelgreen (le colorant est rouge !), continuer l'agitation et le chauffage jusqu'à ce que le liquide translucide soit coloré de façon homogène.
- 2- **Post coloration** : Aucune intégration de gel green dans le gel à ce stade.

* Laisser refroidir le gel dans l'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.

Le 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).

ANNEXE 2 : Electrophorèse des fragments ADN amplifiés (§ 4.4)

Principe de l'électrophorèse

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

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

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

Dépôt et migration (§ 4.4.3)



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.

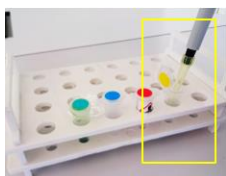
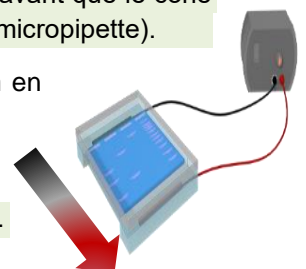
Les puits sont situés du côté du pôle négatif (noir) de la cuve à électrophorèse

- Déposer 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - **jaune**)
- 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.
- Les microtubes ADN amplifié : déposer 10 µl d'ADN amplifié (12 cycles)

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).

- 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.



PCR



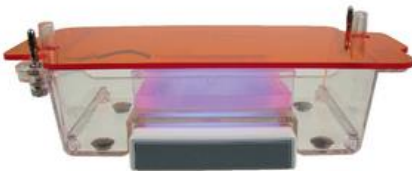
Révélation (§ 4.4.4)

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

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



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 Express_Principe réplication de l'ADN



Le matériel :

- 1 tube échantillon d'ADN à amplifier (tube à pastille rose)
- 1 tube d'amorces AMP (tube à pastille bleue)
- 1 tube PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte)
- 1 tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune) pour l'électrophorèse
- 1 microtube PCR 0,2 mL
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse

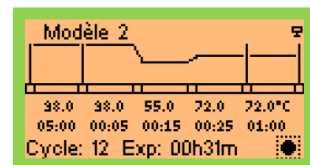


PHASE 1 : L'AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

- Allumer et programmer le thermocycleur
- Principe : une amplification rapide de 12 cycles en 30 minutes.



Correspond au **modèle 2** du thermocycleur Jeulin



Préparation du tube réactionnel (1 par binôme)

Dans un microtube PCR 0.2mL, on prépare :

20 µl de PCR mix + 20 µl d'amorces AMP + 2µl d'ADN à amplifier

8. Préparer un microtube PCR 0,2 mL
9. Prélever 20 µL du "PCR Master Mix" (verte) et les placer dans le microtube PCR
10. Changer de pointe de micropipette
11. Prélever 20 µL du "Primer Mix" (bleue) et les placer dans le microtube PCR
- Mélanger par pipetage doux
12. Changer de pointe de micropipette
13. Prélever 2 µl d'ADN à amplifier tube (rose)
14. Refermer rapidement le tube



Repérer le tube à l'aide d'une marque.

Placer les tubes dans le thermocycleur. **S'assurer** que le tube témoin T est présent.

Fermer le couvercle et **lancer** le programme.



Sélectionner le programme **Modèle 2**.

Placer le curseur sur [] puis **appuyer** OK → [] = cycle en cours (30 minutes environ)



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

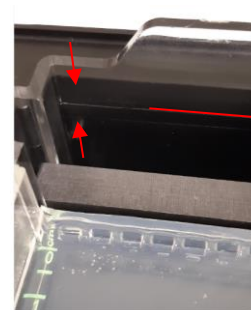
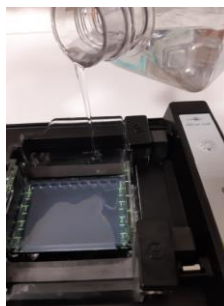
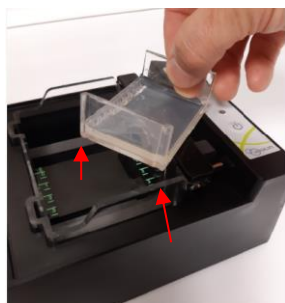
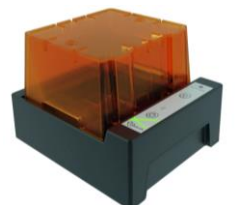
«ADN avant amplification», il est dilué au 1/10 comme l'ADN des tubes mélangés avec MixPCR + amorces

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier le tube T
2. Prélever 40 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)

PHASE 2 : REVELATION

Electrophorèse

Préparation du dispositif pour électrophorèse



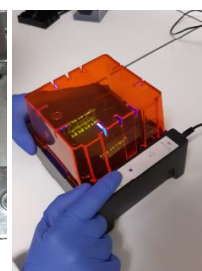
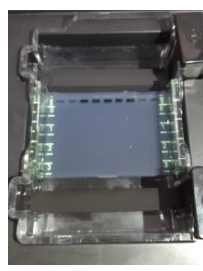
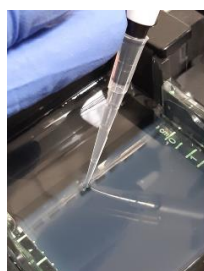
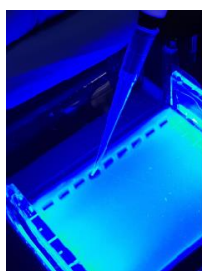
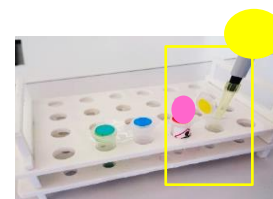
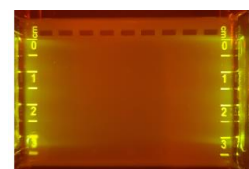
- Placer le gel dans la cuve, en se guidant à l'aide des détrompeurs
- Remplir la cuve de TAE 1X jusqu'aux 2 traits de niveau placés sur les parois avant et arrière de la cuve transparente. Il s'agit du niveau optimum, les puits du gel d'agarose sont alors normalement recouverts de 1 à 2 millimètres de tampon.

Dépôts et migration

Les puits sont situés du côté de l'électrode négative (coté 0 cm du repère)



- Régler la micropipette sur 8 μ l
- Déposer 8 μ l du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel –)
- Déposer 8 μ l d'ADN fourni (tube) : permet de visualiser le plasmide
- Déposer 8 μ l du tube témoin T « ADN avant amplification », l'ADN est la concentration avant l'amplification.
- Déposer 8 μ l d'ADN amplifié par PCR (micro-tube du thermocycleur)



- Poser le couvercle sur la cuve, ce qui ferme le circuit, Allumer et attendre la migration **pendant 10 à 15 min.**

Lecture



- Utiliser le transilluminateur pour révéler les bandes d'ADN au cours de la migration

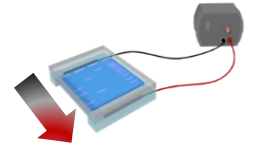
PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse



Préparation du dispositif pour électrophorèse

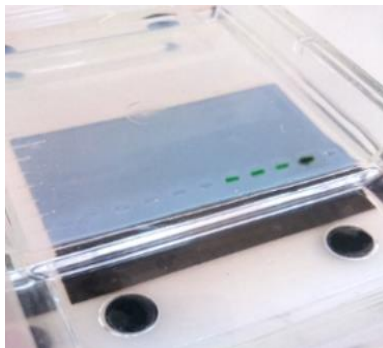
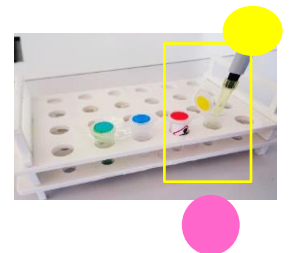
- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



Dépôts et migration

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

- Déposer 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« 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.
- Les micro-tubes ADN amplifié : déposer 10 µl d'ADN amplifié par PCR
- 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 30 min** en 140 V.



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

Lecture

- Utiliser le transilluminateur pour révéler les bandes d'ADN