Kit PCR Express : Principe et réalisation d'une PCR

Objectifs

- Comprendre le principe de l'amplification d'un fragment d'ADN par PCR
- Réaliser une amplification PCR du gène de résistance à l'ampicilline du plasmide TOPO®

Notions liées

- Expression du patrimoine génétique
- Réplication semi-conservative de l'ADN
- Rôle de l'enzyme polymérase

Avantages

- Expérience courte
- Technique PCR facile à prendre en main et à comprendre

Matériel principal

- Kit PCR Express (réf. 117119)
- Thermocycleur (réf. 591110)
- Électrophorèse phorEasy (Réf. 708150)

Protocole

Étape 1 *- Préparation des échantillons à amplifier*
Dans un microtube, mélanger à l'aide d'une micropipette, l'ensemble des éléments nécessaire à l'amplification
ADN + Master Mix (les nucléotides + la polymérase) + les amorces spécifiques à la séquence à amplifier

Étape 2 *- Programmer le thermocycleur & réaliser l'amplification*
1 phase de dénaturation à 95°C pendant 5 min + 12 cycles de 3 phases (dénaturation à 95°C pendant 5 sec, hybridation à 55°C pendant 15 sec, polymérisation à 72°C pendant 25 sec) + 1 phase de terminaison à 72°C pendant 1 min
Durée totale de l'amplification = environ 30 minutes

Étape 3 *- Séparation des fragments par électrophorèse*
Déposer 8µl de chaque échantillon (un puit par échantillon + 1 puit pour l'échelle moléculaire) et lancer la migration
Durée de la migration = 10 à 15 minutes

Étape 4 *- Révélation par coloration par fluorescence et lumière bleue (excitation 470 nm / émission 525 nm)*
Allumer le transilluminateur pour visualiser les bandes d'ADN (même pendant la migration)

Résultats

Analyse des résultats avec l'applicatif phorEasy (plateforme numérique Jeulin)

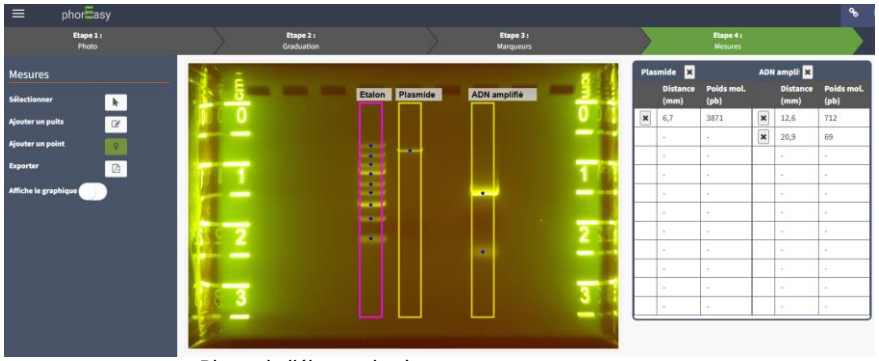

Photo de l'électrophorèse

L'échantillon de plasmide concentré présente un poids moléculaire de 3 871 pb.

Quant à l'échantillon d'ADN amplifié, son poids moléculaire est de 712 pb. Ces fragments correspondent aux copies du gène de l'ampicilline obtenues après l'action de la Taq polymérase en présence du mélange de nucléotides et d'amorces.

De plus, une bande supplémentaire de moindre intensité à 69 pb est observée dans l'échantillon d'ADN amplifié, correspondant aux amorces non consommées.

Pour aller plus loin

- Relation nombre de cycles et quantité d'ADN visualisable
- Introduction d'un contexte de diagnostic médical avec la réf. 117 136

Détails et contenu du kit

- Pour 18 amplifications
- 1 tube d'ADN + 2 tubes d'amorces + 2 tubes Master Mix
- Temps total de la manip = 1h
- Stockage -18°C