

Protocole technique simplifié d'une PCR et d'une électrophorèse avec le matériel JEULIN

Conseils techniques avant toute manipulation

Travailler sur une paillasse propre et désinfectée

Travailler avec du matériel stérile (pointes de pipettes et tubes)

Mettre des gants pour éviter les contaminations (même si ceux-ci ne sont pas obligatoires)

Eviter les mouvements brusques et refermer les tubes le plus rapidement possible

Si la température de la salle est élevée prévoir un bac avec de la glace pour maintenir les tubes au frais

Les quantités de produits doivent être scrupuleusement respectées

La PCR en deux étapes

-- Paramétrage du thermocycleur

Le principe d'amplification rapide de 12 cycles en 30 minutes correspond au **modèle 2** du thermocycleur

Phase		Température	Durée
Dénaturation		98°C	5 min
Cycle x 12	Dénaturation	98°C	5 sec
	Hybridation	55°C	15 sec
	Polymérisation	72°C	25 sec
Terminaison		72°C	1 min

En mode autonome – sans ordinateur :

Sélectionner le **modèle 2** avec la molette en appuyant sur le bouton OK, puis lancer le thermocycleur en sélectionnant le rond en bas à droite de l'écran et en appuyant sur le bouton OK.

En mode monitoring avec un ordinateur :

Relier le thermocycleur à l'ordinateur avec le câble USB fourni.

Lancer le logiciel Jeulin PCR.

Sélectionner le modèle 2 dans l'onglet PCR en cliquant sur la flèche et en faisant défiler les différents programmes.

Lancer le thermocycleur en cliquant sur Démarrer

-- Préparation du tube pour effectuer la PCR

Dans un microtube à PCR stérile de 0,2 mL préparer le mélange suivant **en changeant de pointe de pipette pour chaque produit**

25 µL de « PCR master mix » taqpolymérase+ nucleotides **tube vert**

25µL de « Primer mix » amorces **tube bleu** mélanger par pipetage doux

4µL d'ADN à amplifier **tube rose**

Refermer le tube et le placer dans le thermocycleur

Lancer le **modèle 2** du thermocycleur

En fin de cycle le thermocycleur redescend à 8°C ce qui permet de maintenir les tubes à basse température avant d'effectuer l'électrophorèse

Les tubes ainsi obtenus peuvent aussi être congelés à – 18°C pour une utilisation ultérieure

L'électrophorèse

Préparation du gel d'agarose (effectuée au laboratoire)

Préparer tout d'abord le moule à gel en fermant les extrémités avec du ruban adhésif

Préparer une solution de tampon TAE à partir de la solution concentrée 10 fois (verser 25 mL de la solution mèreX10 dans une fiole jaugée de 250 mL et compléter à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge)

Deux possibilités de gel

1- avec Gelgreen

dans un récipient en verre borosilicaté , verser 40 mL de la solution de TAE X1 , peser 0,48g d'agarose – chauffer le mélange en l'agitant doucement jusqu'à ce qu'il devienne complètement translucide –ajouter 3

μL de Gelgreen (colorant rouge) et continuer à agiter jusqu'à ce que le liquide soit uniformément coloré – laisser refroidir à 50 – 60 °C

Couler le gel dans le moule enlever les éventuelles bulles qui peuvent se former en les piquant avec la pointe d'un cône stérile – poser le peigne à sa place et attendre le refroidissement total du gel – le gel peut ensuite être utilisé ou conservé quelques jours au réfrigérateur dans un sachet hermétique

2- sans Gelgreen

procéder de la même manière sans ajouter le Gelgreen (la coloration se fait après migration par trempage dans du gelgreen)

Si on utilise l'azure A il vaut mieux faire le gel et la migration avec du tampon TBE

Préparation de la cuve à électrophorèse

Verser la solution tampon TAE dans la cuve de manière à ce que le pont central soit recouvert de 5 mm de tampon (attention pour les anciennes alimentation EVOLUTION 100/160 le pont central ne doit être recouvert que par 1 à 2 mm de tampon pour éviter que l'alimentation ne disjoncte)

Placer le gel avec son support en ayant au préalable enlevé l'adhésif de chaque côté

Retirer le peigne de manière à créer les puits (placer une feuille de papier noir sous la cuve pour mieux voir les puits et faciliter le dépôt) les puits doivent être situés côté cathode (borne noire)

Préparation des produits

Préparer les produits amplifiés en ajoutant à chaque tube 1,5 μL de DNA release (tube rouge)

1 tube d'ADN amplifié (12 cycles) microtube

1 tube d'ADN non amplifié (tube rose)

1 tube de marqueur de poids moléculaire (tube jaune)

Dépôt des solutions

Déposer dans chaque puits 8 à 10 μL de chaque solution en changeant la pointe de pipette pour chaque produit

Refermer le couvercle de la cuve, régler l'alimentation entre 100 et 150 V maxi et mettre la cuve sous tension Arrêter la migration au bout de 25 minutes

En éclairant la cuve par-dessous avec la lumière bleue d'un transilluminateur et en mettant un plastique orangé sur la cuve on distingue les bandes d'ADN qui apparaissent en jaune/vert , chaque bande correspond à des fragments d'ADN de même taille que l'on peut évaluer grâce au marqueur de poids moléculaire

Résultats attendus

Puits PM = Marqueur de poids moléculaire

Puits témoin Tm = plasmide avant amplification (tube rose)

Puits 1 /2 /3 /4 = amplifications réalisées

