

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

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

Préparation avant utilisation du kit (effectuée au laboratoire)

Les tubes de MIX et de Taq polymérase sont prêts à l'emploi
Le tube d'ADN doit être dilué avec 90 µL d'eau stérile pour obtenir un volume final de 120 µL
Le Tampon TAE doit être dilué dix fois (100 mL de tampon dans 900 mL d'eau distillée)
Centrifuger les tubes pour récupérer le maximum de produit

La PCR en deux étapes

-- Programmation du thermocycleur

Ouvrir l'application miniPCR à partir d'un ordinateur , d'une tablette ou d'un smartphone (application à télécharger pour android ou iOS) rester dans l'onglet « protocol library » cliquer sur le bouton « nouveau protocole » puis « protocole type » et PCR pour les réactions de cyclage thermique – entrer un nom de protocole définir les paramètres pour une amplification rapide de 5 cycles en 8 minutes et 30 secondes

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	30 sec	1
Dénaturation	95°C	1 sec	5 ou 10
Hybridation	55°C	1 sec	
Elongation	72°C	1 sec	
Terminaison	72°C	30 sec	1

-- Préparation des 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**

Tubes	A	B	C
MIX (bouchon bleu)	20µL	20µL	20µL
Taq polymérase (bouchon vert)	1µL	1µL	0
ADN génomique de phage lambda (bouchon incolore)	4µL	0	4µL

Faire 3 tubes A et 2 tubes B et C

Refermer les tubes et centrifuger pour homogénéiser

Garder un tube A qui ne sera pas placé dans le thermocycleur que l'on appellera T

et placer les autres dans le thermocycleur

Lancer le **programme 5 cycles** du thermocycleur à la fin des 5 cycles sortir la première série de tubes -- pour les tubes 10 cycles relancer le programme

L'électrophorèse

Préparation du gel d'agarose pour cuve BLUEGEL (effectuée au laboratoire)

Dans un récipient en verre borosilicaté , verser 250 mL de la solution de TAE X1 , peser 2g d'agarose – chauffer le mélange en l'agitant doucement jusqu'à ce qu'il devienne complètement translucide (on peut le chauffer au micro-ondes)– laisser refroidir à 50 – 60 °C – placer le peigne à sa place sur le support de gel
Couler le gel dans le moule jusqu'à mi-hauteur du peigne –et attendre le refroidissement total du gel – le gel peut ensuite être utilisé ou conservé quelques heure au réfrigérateur ou un à deux jours dans du tampon TAE

Préparation de la cuve à électrophorèse

Placer le gel avec son support dans la cuve

Retirer le peigne de manière à créer les puits, ils sont situés côté cathode (borne -) grâce au détrompeur il n'y a pas la possibilité d'inverser les bornes

Verser la solution tampon TAE dans la cuve de manière à recouvrir le gel (environ 2 mm)

Préparer les produits non amplifiés et amplifiés en ajoutant à chaque tube 2 µL de SAFEGREEN centrifuger puis homogénéiser la solution par pipetage doux

Dépôt des solutions

Déposer dans chaque puits 15 µL (pour le peigne à 9 dents) ou 8µL (pour le peigne à 13 dents) de chaque solution en veillant bien à ne pas perforer le fond du puits et en changeant la pointe de pipette pour chaque produit

Refermer le couvercle de la cuve, et mettre la cuve sous tension bouton marche /arrêt

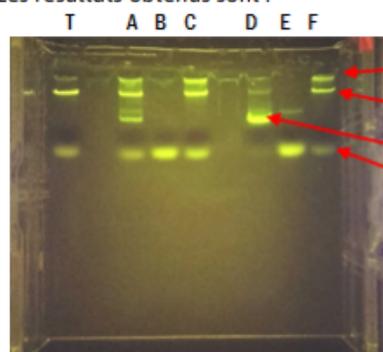
Arrêter la migration au bout de 25 minutes

En utilisant l'éclairage en lumière bleue de la cuve BLUEGEL on distingue les bandes d'ADN qui apparaissent en jaune/vert , chaque bande correspond à des fragments d'ADN

Résultats visibles au bout d'un quart d'heure

RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

Les résultats obtenus sont :



Il reste du SAFEGREEN en excès dans le puits (ne migrera pas)
ADN génomique non amplifié
ADN amplifié (plus petit)
Amorces

T= témoin : tout les réactifs, mais pas de cycle dans le thermocycleur : ADN génomique et amorces

A : tout, cycle 8min30 : Il reste de l'ADN génomique + ADN amplifié+ trace d'amorces

B : tout sauf ADN : on ne voit que des amorces

C : tout sauf TAQ : ADN génomique + amorces

D : Tout, 2 cycles 8min30 : ADN amplifié seul

E : tout sauf ADN : on ne voit que les amorces.

F : tout sauf TAQ : ADN génomique qui a fait une 'trainée', il a été dégradé + amorces.