

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- ⚠ **Stocker les articles du colis dans les bonnes conditions :**
 - ⚠ Placer le **sachet AE** à **-20°C** ⚠
 - ⚠ Placer le tube de SAFEGREEN à **bouchon marron** (60µL) à **4°C** ⚠
 - ⚠ Placer le reste à **température ambiante** ⚠

Attention : Ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit de 3 mois.

- Avant toute manipulation**, étudier les conseils de **sécurité**

COMPOSITION (pour 12 réactions de PCR et 10 gels)

- Un sachet AE contenant :
 - Un tube de TAQ polymérase à **bouchon vert** : 10µL
 - Un tube de MIX à **bouchon bleu** (prêt à l'emploi): 240µL
 - Un tube d'ADN génomique de phage lambda à **bouchon incolore** : 10µL
- Un tube de SAFEGREEN à **bouchon marron** : 25µL
- Un sachet d'agarose
- 100 ml deTBE
- Un sachet de 12 microtubes avec leurs bouchons
- 1 tube d'eau

MATERIEL NECESSAIRE

- Thermocycleur pédagogique miniature MINIPCR
- Cuve à électrophorèse d'ADN avec transilluminateur BLUEGEL
- Micro-onde ou bain-marie
- Gant anti-chaleur ou moufle de préhension
- Gants, Micropipettes et cônes
- Eau distillée, Flacons d'un litre

OBJECTIFS COGNITIFS

Ce kit propose de réaliser une PCR électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose afin de comparer l'ADN avant répllication par PCR et l'ADN obtenu suite à la PCR.

RAPPELS

L'expérience à réaliser dans ce kit est techniquement simple et correspond à une électrophorèse d'ADN classique.

Les échantillons d'ADN fournis correspondent à l'ensemble des réactifs nécessaires et produits de PCR présents lors d'une vraie expérience de PCR.

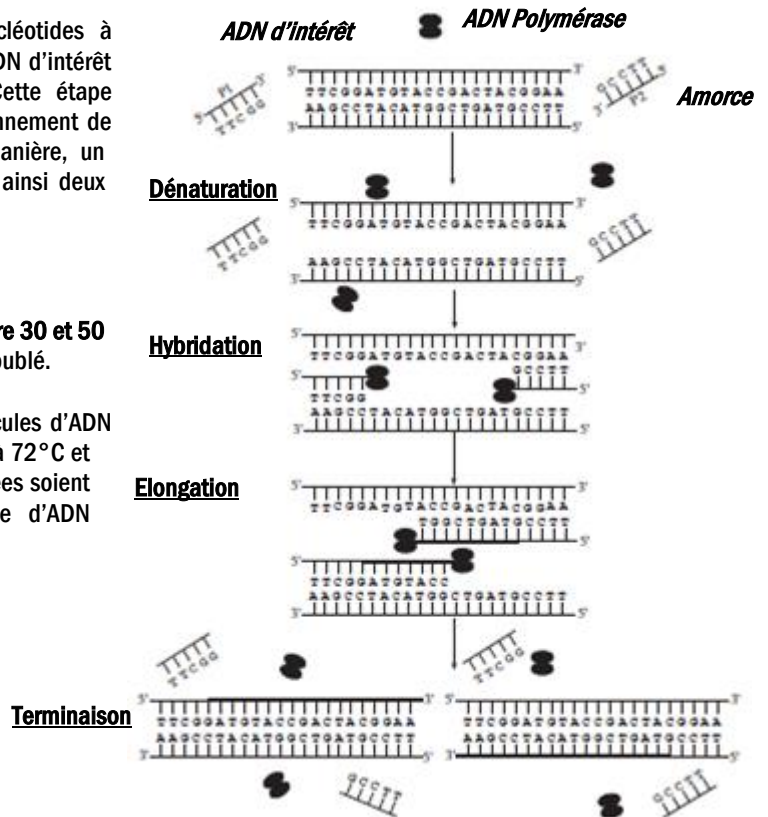
La réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

La réaction en chaîne par polymérase est utilisée pour obtenir une quantité importante de copies d'un fragment d'ADN défini, à partir d'une quantité infime de celui-ci.

La réaction de PCR consiste en une réplication d'ADN in vitro. Celle-ci est possible grâce à l'ajout d'une enzyme de réplication ; l'ADN polymérase, des quatre desoxyribonucléotides triphosphates nécessaire à la synthèse de molécule d'ADN (adénine, cytosine, guanine, thymine), et d'amorces de réplication consistant en de courtes séquences d'ADN simple brin spécifiques de l'ADN d'intérêt. En effet, les amorces sont synthétisées artificiellement de façon à avoir une séquence strictement complémentaire aux extrémités de l'ADN d'intérêt. Pour la réaction de PCR, on ajout un couple d'amorces constitué d'une amorce complémentaire à la région 3' de l'ADN d'intérêt et d'une amorce complémentaire à sa région 5'. La séquence desoxyribonucléotidique du segment d'ADN d'intérêt doit donc être connue.

Le processus de PCR fonctionne selon quatre étapes:

- Le mélange est d'abord chauffé à une température proche de 100°C afin de dénaturer les molécules d'ADN. En effet, les molécules d'ADN d'intérêt sont des doubles brins qui doivent être séparés préalablement à la réplication. De plus, **la dénaturation** assure aussi que l'ADN d'intérêt et les amorces soient dans une configuration linéaire pour faciliter l'étape d'hybridation qui suit.
- Le mélange est ensuite refroidi vers une température de 45 à 60°C selon les couples d'amorces pour permettre leur appariement avec l'ADN d'intérêt ; c'est l'**hybridation**.
- L'ADN polymérase va alors ajouter les desoxyribonucléotides à l'extrémité 3' de chaque amorce en utilisant le brin d'ADN d'intérêt comme matrice de réplication ; c'est l'**élongation**. Cette étape s'effectue à 72°C ; la température optimum de fonctionnement de l'enzyme de réplication ADN polymérase. De cette manière, un nouveau brin complémentaire est formé et on obtient ainsi deux molécules d'ADN double brin identique à l'ADN d'intérêt.
- **Le cycle formé par ces 3 premières étapes est répété entre 30 et 50 fois.** A chaque cycle, le nombre de molécule d'ADN est doublé.
- La dernière étape consiste en **la terminaison** des molécules d'ADN nouvellement synthétisées. Cette étape s'effectue aussi à 72°C et assure que les molécules d'ADN nouvellement synthétisées soient entières et correspondent strictement à la molécule d'ADN d'intérêt.



MANIPULATION

PREPARATION du TP :

Ce protocole s'adapte à l'utilisation des cuves d'électrophorèse et alimentations Sordalab. Pour tout autre matériel, ajuster les quantités de gel d'agarose à préparer et le procédé de mise en œuvre de l'électrophorèse aux recommandations du constructeur.

1) Préparation du/des gels d'agarose 0,8% :

- Mélanger les 2g d'agarose avec 250ml de TBE préparé précédemment.
- Faire chauffer pendant 2-3 minutes au micro-onde jusqu'à ce que la solution soit complètement homogène et transparente (ne pas couvrir la solution).
- Utiliser des gants anti-chaueur ou des maniques de préhension pour saisir et manipuler le flacon chaud.
- Laisser refroidir jusqu'à une température d'environ 60°C.
- Placer le support de gel dans le moule à gel et placer le peigne 9 ou 13 puits. Vous pouvez placer 2 peignes si vous souhaitez que tous les élèves fassent leurs dépôt sur le même gel.
- A l'aide de gants anti-chaueur ou de moufle de préhension, couler l'agarose dans les moules jusqu'à une hauteur correspondant environ à la moitié de la hauteur des dents du peigne.
- Laisser durcir à température ambiante sur une surface plane et horizontale (le gel doit devenir trouble). Ce gel se conserve une heure à sec ou 24 heures au réfrigérateur dans du TBE.

2) Préparation des réactifs contenus dans le sachet AE :

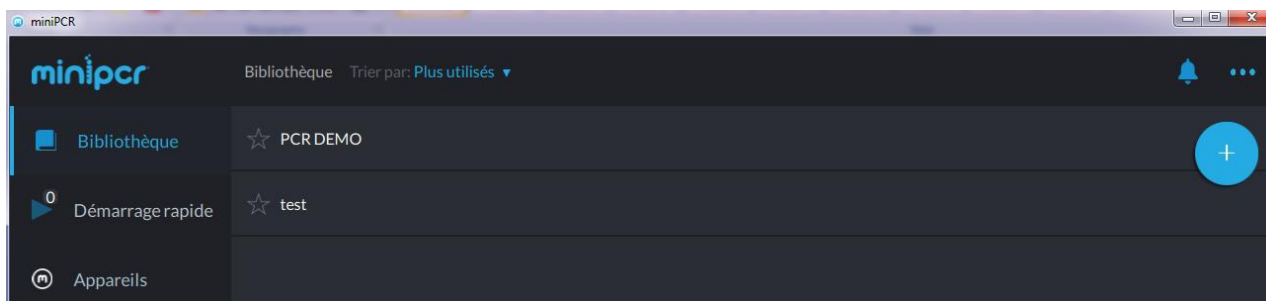
- Centrifuger rapidement les tubes afin de faire retomber tout le liquide dans le fond du tube.
- Le mix est déjà prêt à l'emploi, il contient le tampon de réaction, les amorces et les nucléotides
- Préparer les réactifs de PCR en diluant avec de l'eau stérile selon le tableau suivant :

	Volume initial	Volume d'eau à ajouter	Volume final
Taq polymérase (bouchon vert)	10 µl	20 µl	30 µl
ADN génomique de phage lambda (bouchon incolore)	10 µl	30 µl	40 µl

Attention : vérifier que le volume final est exact après ajout. Il est possible que de l'eau se soit évaporée dans le transport sans modifier la quantité de matériel dans l'échantillon. Si le volume contenu dans le tube est inférieur au volume attendu, compléter à nouveau avec de l'eau stérile pour ajuster ce volume.

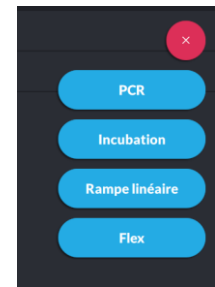
3) Préparation du matériel

- a. Avec Windows : Ouvrez l'application miniPCR™ sur votre ordinateur et restez dans l'onglet « Bibliothèque » (avec Apple, smartphone ou autre : se référer à la notice du MINIPCR)



- b. Cliquez sur le bouton « + » à droite.
- c. Sélectionnez le « Protocole Type » dans le menu déroulant situé en haut du volet de droite.

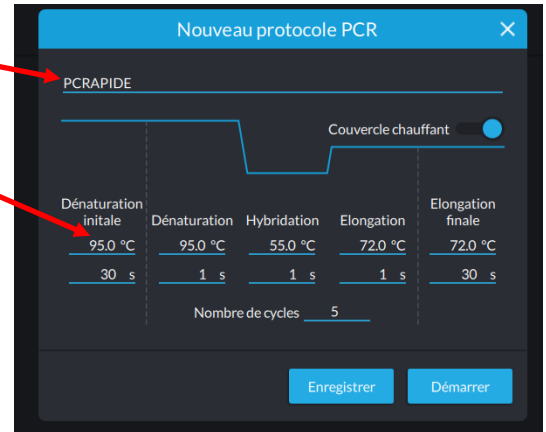
- PCR: pour les réactions de cyclage thermique
- Incubation: pour les incubations enzymatiques
- Rampe linéaire: pour les réactions de chauffage ou de refroidissement à un rythme constant



- d. Entrez un nom de protocole; par exemple "PCRAPIDE"
- e. Définissez les paramètres du protocole:

- PCR: étapes températures et durées, nombre de cycles
- Incubation: température d'incubation, durée
- Rampe linéaire: températures de début et de fin, durée

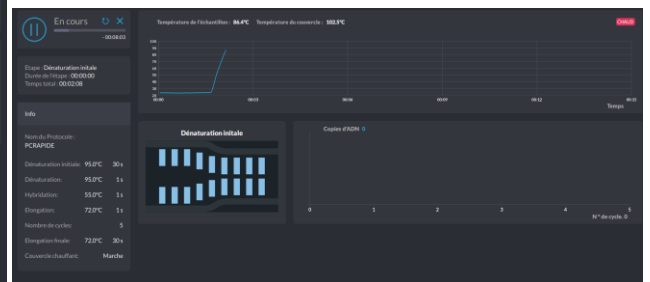
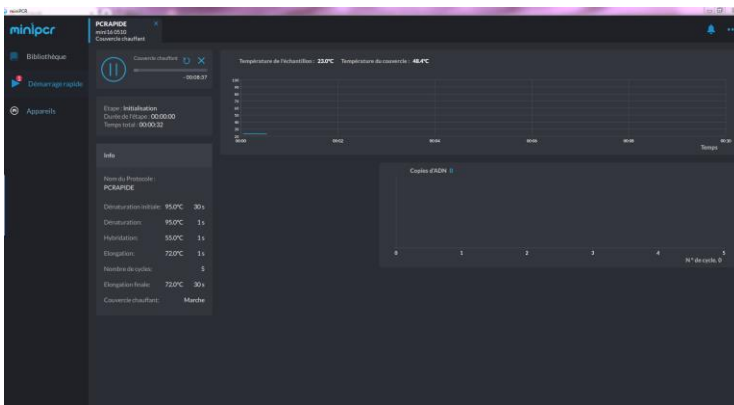
Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95 °C	30 sec	1
Dénaturation	95 °C	1 sec	5 ou 2x5
Hybridation	55 °C	1 sec	
Elongation	72 °C	1 sec	
Terminaison	72 °C	30 sec	1



- f. Cliquez sur « Enregistrer » pour stocker votre nouveau protocole
- Votre protocole est maintenant prêt à être utilisé et disponible dans la bibliothèque de protocoles
- Astuce: en cliquant sur "Démarrer" sauvegarde et exécute automatiquement le protocole.

I. Suivi du déroulement du programme

- Nom du protocole
- Vous pouvez mettre votre cycle sur Pause ou Stop à tout moment



MANIPULATION PAR LES ELEVES :

1) Mise en œuvre de la réaction de PCR :

- Laisser les réactifs décongeler à température ambiante et les passer rapidement à la centrifugeuse (15 sec).
- Pour chaque binôme, préparer 1 µtube,
- 8 binomes feront le tube A
- 2 binomes feront le tube B
- 2 binomes feront le tube C

Nombre de tubes à préparer et noms des tubes		1 tubes A	1 tubes B	1 tubes C
MIX (bouchon bleu)	20 µl	x	x	x
Taq polymérase (bouchon vert)	3 µl	x	x	
ADN génomique de phage lambda (bouchon incolore)	4 µl	x		x
	27 µl	27 µl	23 µl	24 µl

- **Homogénéiser le contenu des tubes en aspirant et refoulant très délicatement à l'aide d'une micropipette.**
- Donner un rapide tour de centrifugeuse pour faire retomber tout le liquide au fond du tube et éliminer les éventuelles bulles.
- Bien fermer les tubes
- A l'échelle de la classe, conserver un tube contenant TOUT (A) qui ne sera pas placé dans le thermocycleur (témoin négatif).
- Placer les autres tubes dans le thermocycleur.
- Lancer le programme 5 cycles préalablement programmé.
- A l'échelle de la classe, désigner des binômes qui feront 2 fois le cycle de PCR (soit 2 x 5 cycles).

1) Mise en œuvre de l'électrophorèse :

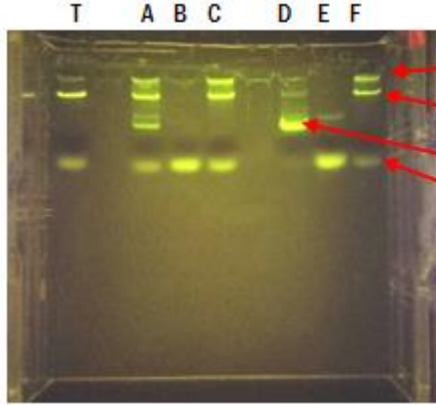
- Enlever délicatement les peignes.
- Placer le moule à gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Le détrompeur garantit que le gel sera bien positionné dans la cuve.
- Verser le tampon TBE sur le gel pour remplir les puits, puis de part et d'autres du gel jusqu'à l'affleurement (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- Pulvériser une dose de produit anti-condensation dans le couvercle orange de la cuve, puis l'essuyer avec le petit chiffon bleu prévu. A refaire entre chaque migration.

2) Dépôt et migration des ADN :

- Dans chaque tube de réaction de PCR et dans le témoin négatif, ajouter :
 - o 2 µl de SAFEGREEN et homogénéiser à l'aide de la micropipette.
- Déposer 15 µl si vous avez utilisé le peigne à 9 dents (ou 8 µl si vous avez utilisé le peigne à 13 dents) de chaque échantillon à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. Faire doucement et éviter les bulles (attention à bien noter l'ordre des dépôts).
- **A l'échelle de la classe, sur un gel, il faut déposer en plus le témoin négatif.**
- Fermer la cuve à électrophorèse et la brancher sur l'alimentation.
- Mettre en marche la cuve en appuyant sur le bouton
- Allumer la lumière. En quelques minutes, vous voyez déjà l'ADN qui fluoresce en vert (attention le safegreen seul fluoresce aussi, mais reste dans le puits si il n'est pas fixé à l'ADN).
- Pour augmenter le contraste, filmer ou prendre des photos de la migration en temps réel, placer la chambre noire délicatement sur la cuve.

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.

FICHE SECURITE (guide non exhaustif)

- Ne pas inhaler ni ingérer les produits contenus dans ce kit. Eviter les projections dans les yeux. En cas de projection dans les yeux, rincer à grande eau.
 Cependant, aucun des produits contenus dans ce kit ne requièrent de précaution particulière.
- Le gel d'agarose chaud peut provoquer des brûlures. Manipuler avec des gants anti-chaueur.
En cas de brûlures, passer la zone atteinte sous l'eau froide pendant 15 minutes.
- Nous vous conseillons de manipuler les colorants avec des gants.

FICHE CONSERVATION

Attention : ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit pendant 3 mois. Les échantillons d'ADN sont stockés à -20°C pendant 3 mois.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les ADN, et le TBE peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau.
 Les tubes de plastiques, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon).
 L'agarose peut être jeté à la poubelle.