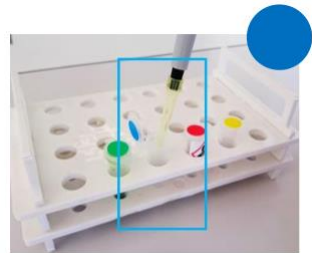
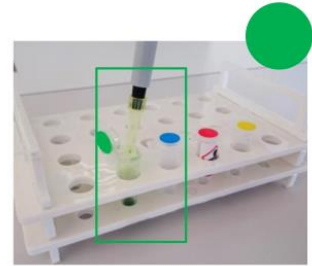


Protocole de réalisation de la PCR du gène « AMEL »

Sur le portoir de chaque groupe, vous devez avoir 4 microtubes munis d'une étiquette de couleur sur le capuchon (vert, bleu, rouge, jaune) et un microtube sans étiquette.

1° - Préparation des tubes réactionnels

- ✓ Préparez un microtube PCR (celui qui n'a pas de couleur) et faire un **repère pour identifier l'expérimentateur** (initiale par exemple) à l'aide du marqueur.
- ✓ Prélevez 20 µL du "PCR Master Mix" (**vert**) (Nucléotides + Taqpolymérase) avec la micropipette et les placer dans le microtube PCR aux initiales de l'expérimentateur.
- ✓ Changez le cône de la micropipette.
- ✓ Prélevez 20 µL du "Primer Mix" (**bleu**) (= amorces) et les placer dans le microtube PCR aux initiales de l'expérimentateur. Mélanger par pipetage doux.



2° - Réalisation du prélèvement buccal

A l'aide de l'embout pointu (= manche) de l'anse stérile (fig.1), effectuer un prélèvement à l'intérieur de la joue en balayant cette dernière doucement de haut en bas 3 à 4 fois. On tiendra l'anse de telle sorte qu'elle soit perpendiculaire à la joue pendant le prélèvement (fig.2).



Figure 1



Figure 2

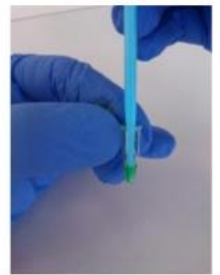


Figure 3

3° - Récupération du prélèvement buccal

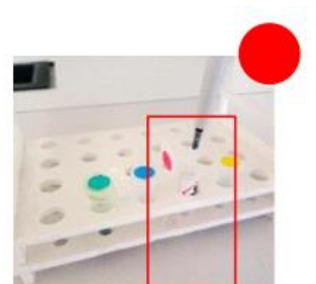
- ✓ Placez l'anse dans le microtube PCR aux initiales de l'expérimentateur et la faire tourner comme un mélangeur 3 à 4 fois puis la sortir en prenant soin de ne pas emporter trop de volume réactionnel (fig3).
- ✓ Fermez le microtube PCR aux initiales de l'expérimentateur. On utilisera plutôt une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.

4° - Lancement de la PCR

- ✓ Chaque groupe place le microtube PCR aux initiales de l'expérimentateur contenant le prélèvement dans le thermocycleur.
- ✓ Lancez le programme qui a été configuré par le professeur lorsque l'ensemble des groupes a placé ses tubes.

5° - préparation de l'ADN amplifié pour l'électrophorèse

- ✓ Retirez le microtube PCR aux initiales de l'expérimentateur du thermocycleur après la fin complète de l'amplification.
- ✓ Ouvrez délicatement le microtube PCR aux initiales de l'expérimentateur et y ajouter 2 µL de la solution "**DNA-Release**" (**tube à pastille rouge**). Mélangez par pipetage doux.
- ✓ Ajoutez 170 µ d'eau stérile le microtube PCR aux initiales de l'expérimentateur.

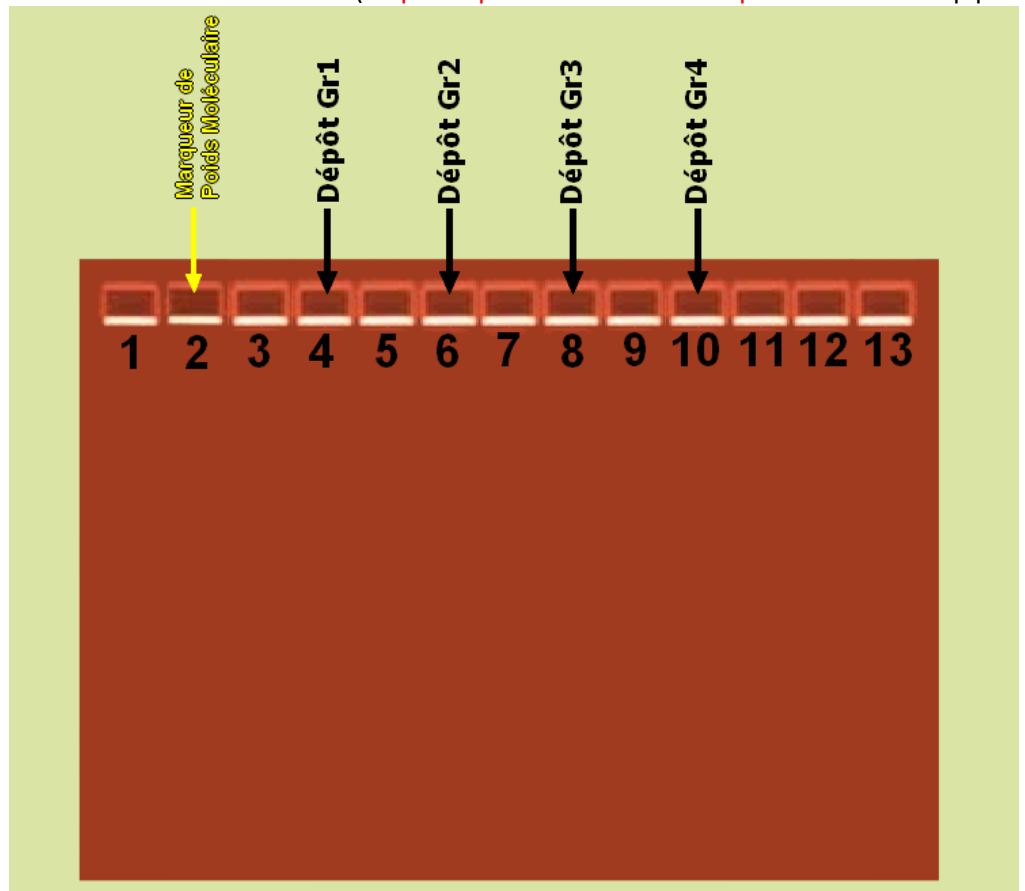
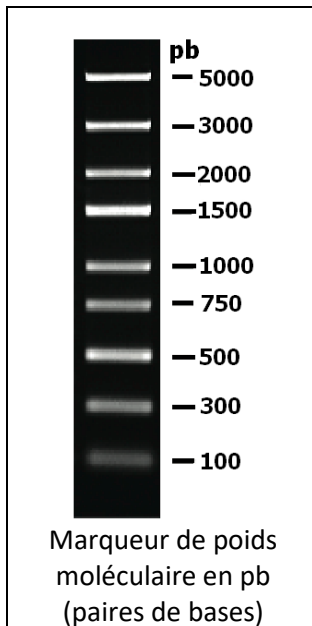


C'est le résultat de ce mélange présent dans le microtube aux initiales de l'expérimentateur qu'il faudra déposer dans la cuve à électrophorèse d'ADN.

6° - L'électrophorèse des fragments d'ADN amplifiés

a – Dépôts dans les puits du gel d'agarose

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 1e butée du piston** de la micropipette)



Puits 1 : à ne pas utiliser

Puits 2 : Déposez 5 μ L de marqueur de poids moléculaire présent dans le tube jaune (échelle moléculaire)

Puits 3 : ne pas utiliser

Puits 4 : Déposez 5 μ L d'ADN amplifié par la PCR provenant du tube marqué par l'opérateur du groupe 1

Puits 5 : ne pas utiliser

Puits 6 : Déposez 5 μ L d'ADN amplifié par la PCR provenant du tube marqué par l'opérateur du groupe 2

Puits 7 : ne pas utiliser

Puits 8 : Déposez 5 μ L d'ADN amplifié par la PCR provenant du tube marqué par l'opérateur du groupe 3

Puits 9 : ne pas utiliser

Puits 10 : Déposez 5 μ L d'ADN amplifié par la PCR provenant du tube marqué par l'opérateur du groupe 4

Puits 11 : ne pas utiliser

Puits 12 : ne pas utiliser

Puits 13 : ne pas utiliser

b – Réalisation de l'électrophorèse :

- ✓ Placez la cassette sur le dock
- ✓ Connectez l'alimentation au dock en respectant les couleurs conventionnelles
- ✓ Réglez l'alimentation pour une durée de migration de 7 minutes
- ✓ Lancez l'électrophorèse

7° - Lecture des résultats

Lorsque le temps de migration est écoulé :

- ✓ Appuyez sur le bouton « lumière » et lire les résultats. Vous pouvez en prendre un cliché.

