



La PCR qu'est ce que c'est ? 10088

NOTICE



Retrouvez
l'ensemble
de nos gammes sur :
www.pierron.fr

 **PIERRON**
ÉQUIPEMENT PÉDAGOGIQUE SCIENTIFIQUE

PIERRON - ASCO & CELDA • CS 80609 RÉMELFING • 57206 SARREGUEMINES Cedex France

Tél. : 03 87 95 14 77 • Fax : 03 87 98 45 91

E-mail : education-france@pierron.fr

Composition du kit.

Échantillons

- A colorants standard avec base attribué équivalents de paire
- B échantillon après 10 cycles
- C échantillon après 20 cycles
- D échantillon après 30 cycles
- E échantillon après 40 cycles

RÉACTIFS ET FOURNITURES:

- Échantillon de solution pour essais.
- Poudre ULTRASPEC-Agarose TM
- Tampon d'électrophorèse concentré
- 1 pipette 1ml
- Éprouvette graduée de 100 ml
- Pipettes de transfert

Éléments complémentaire non fournis :

- un appareil d'électrophorèse sur gel horizontal
- Une alimentation pour électrophorèse
- Micropipettes automatiques et embouts
- Balance
- Micro-ondes, plaque chauffante ou brûleur
- Poire pour pipette
- Flacons de 250 ml ou béchers
- Gants anti-chaueur
- Système de visualisation de l'ADN (lumière blanche)
- Eau distillée ou désionisée

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a eu un impact extraordinaire sur divers aspects de la biotechnologie.

La PCR a révolutionné les bases de la recherche et du diagnostic en biologie moléculaire. Elle est une procédure simple, précise et hautement reproductible. Elle offre la possibilité d'utiliser une petite quantité d'ADN et de pouvoir l'amplifier de façon qu'il y ait une quantité suffisante d'ADN pour effectuer des expériences. Elle est analogue à une radio ou un amplificateur stéréo où les signaux des ondes radioélectriques qui normalement ne sont pas entendues sont amplifiés afin que nous puissions entendre musique. Depuis la première application de la PCR pour détecter l'anémie falciforme, un grand nombre de tests de diagnostic ont été développés et sont en train de devenir des tests de routine.

La PCR est également utilisée dans des projets de génome pour la cartographie et le séquençage de l'ADN et est appliquée à la médecine légale, les déterminations de paternité, ainsi que la détermination des relations d'évolution. Dans tous ces cas, les échantillons d'ADN qui sont extraits sont limités et la PCR amplifie des segments d'ADN qui deviennent et permettent une étude ultérieure.

Dans une réaction de PCR, la première étape est la préparation de l'échantillon d'ADN qui est extraite à partir de tissus ou de diverses sources biologiques.

Dans des expériences de PCR, l'ADN ou le gène à amplifier est désigné comme cible et les oligonucléotides synthétiques utilisés sont désignés comme amorces.

Un jeu de deux amorces (amorces sens et antisens) variant généralement entre 20 et 45 nucléotides sont synthétisés chimiquement à correspondre aux deux extrémités du gène à amplifier.

Chaque amorce se lie à l'un des deux brins d'ADN et est le point de l'amplification de l'initiation.

Les concentrations d'amorces sont toujours en excès du gène cible pour rendre possible l'amorçage subséquent.

Les séquences de nucléotides d'amorces exactes pour une réaction d'amplification spécifique sont déterminées à obtenir les meilleures conditions (hybridation) pour la formation de matrice-amorce.

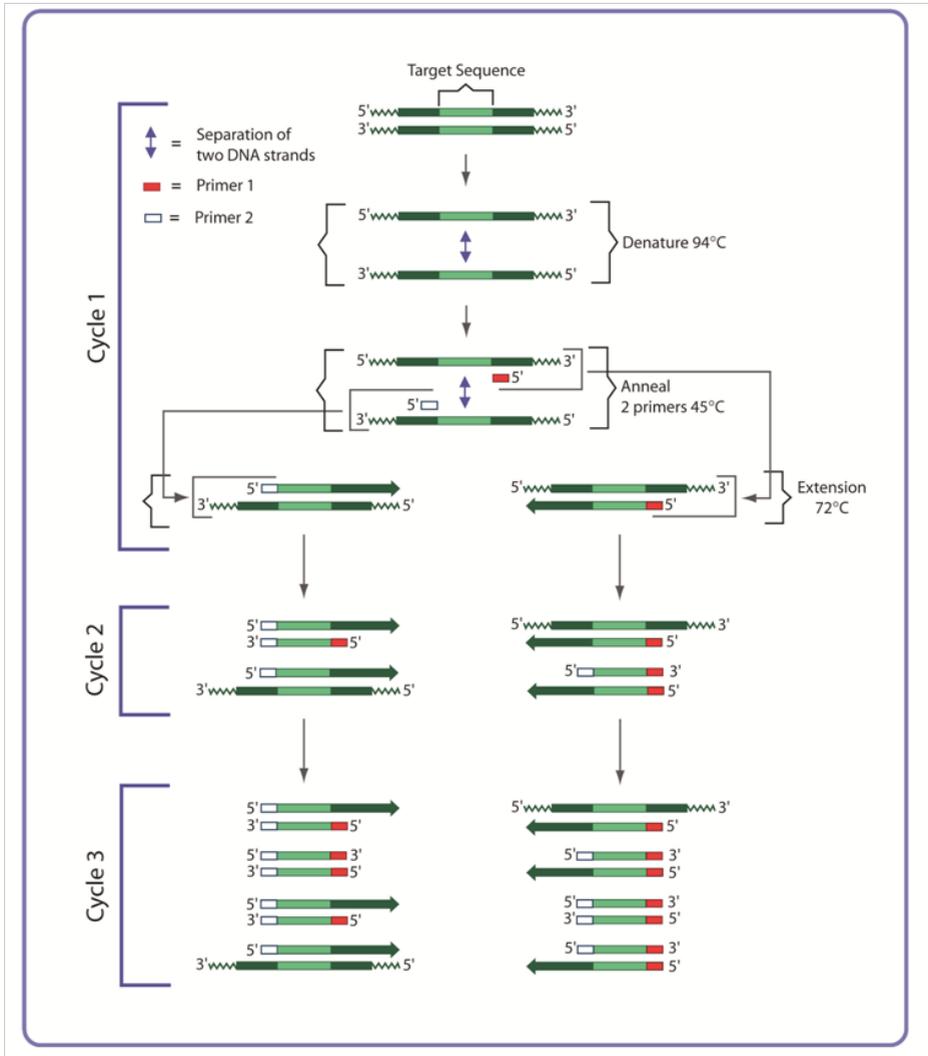
La spécificité de la synthèse d'ADN est dictée par les règles d'appariement des bases Watson et Crick et est dirigée par l'ADN de matrice.

Le brin synthétisé est complémentaire et antiparallèle au brin d'ADN matrice.

La synthèse du brin d'ADN de novo catalysée par une ADN polymérase ne peut se produire sans une amorce ayant une connexion «groupe hydroxyle terminal 3, qui est nécessaire pour l'addition du nucléotide suivant.

L'amorce est antiparallèle et est jumelé à la base du brin matrice.

Apperçu global de la réaction



Un mélange typique de réaction PCR contient l'ADN, l'ADN polymérase Taq, et les quatre désoxynucléotides triphosphates dans le tampon approprié.

La réaction totale d'incubation est habituellement de 10-20 µl ou plus petit en volume.

Le mélange d'incubation est ensuite exposé à un cycle de température à trois étapes qui se répète.

La première température est de 94 °C pour faire fondre les liaisons hydrogène entre les deux brins d'ADN.

La température est ensuite tombée à 42 °C et entre 60 °C à hybrider deux amorces sur les deux brins cibles d'ADN.

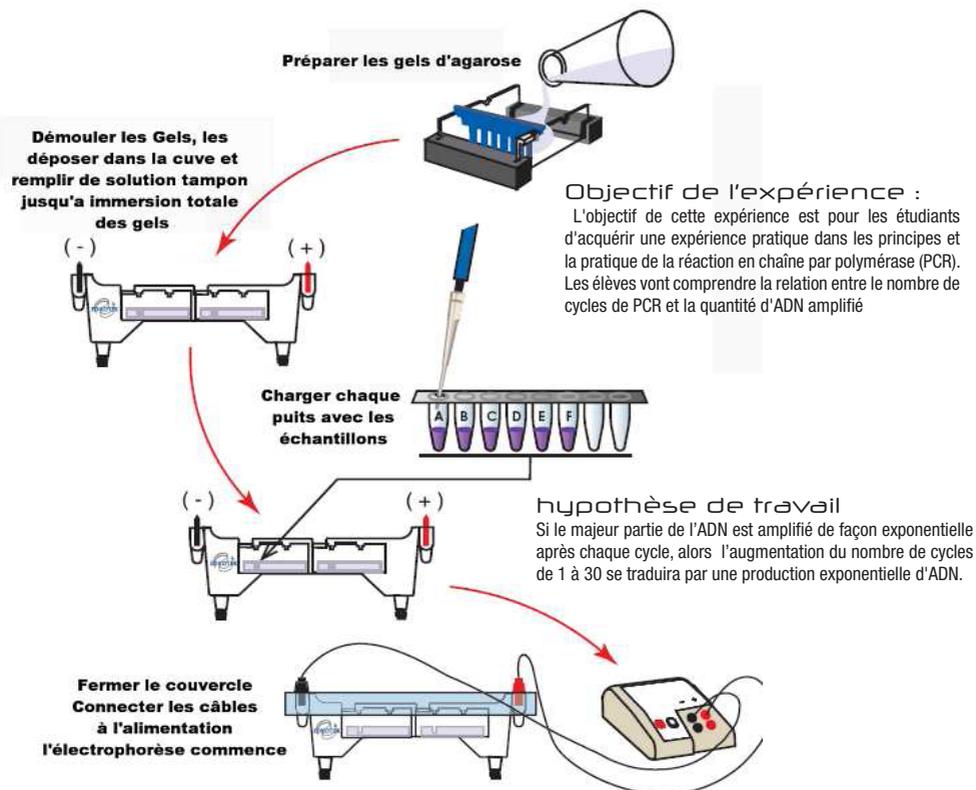
La température est ensuite augmentée à 72 °C, ce qui est la température optimale pour l'ADN polymérase Taq.

À cette température, l'ADN polymérase synthétise le brin opposé de l'ADN en utilisant les fils en tant que modèles originaux.

Ces cycles de température sont répétées 20 à plusieurs centaines de fois. Ce processus est rendu efficace en plaçant les tubes de réaction dans les thermocycleurs spécialement conçus qui sont programmées à des températures alternées rapidement et avec précision.

Le produit amplifié est ensuite détecté en séparant le mélange réactionnel par électrophorèse sur gel et analyse.

Aperçu de l'expérience



Avant de commencer l'expérience

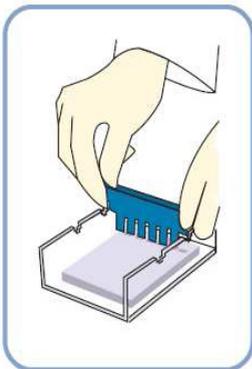


**N'oubliez pas,
lunettes et gants
de protection
indispensables**

1. Lisez toutes les instructions avant de commencer l'expérience.
2. Écrire une hypothèse qui reflète l'expérience et permettra de prédire les résultats expérimentaux.
3. Ne jamais pipeter à la bouche.
4. Exercer prudence lors de l'utilisation de tout équipement électrique dans le laboratoire.
5. Toujours se laver soigneusement les mains avec de l'eau et du savon après manipulation de réactif.

Préparation du gel

1. Fermer les extrémités du support de gel pour pouvoir l'utiliser comme moule. Utiliser les patins caoutchouc ou à défaut du ruban adhésif.
2. Placez un peigne dans le premier jeu de crans du support de gel.
3. Assurez-vous que le peigne repose fermement et uniformément sur le lit.



Utiliser un ballon de 250 ml pour préparer la solution de gel.

Ajouter les composants suivants :

Tampon concentré

Eau distillée

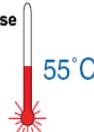
Poudre d'agarose

4. Dissoudre l'agarose
5. Prenez soin de noter les concentrations des solutions
6. Chauffer le mélange pour dissoudre la poudre d'agarose. La solution finale doit être limpide (comme l'eau) sans aucune particule en suspension.
 - Méthode de micro-onde :
 - Couvrir le flacon avec un film plastique pour réduire au minimum l'évaporation.
 - Chauffer le mélange sur T° maximale pendant 1 minute.
 - Remuer le mélange (25 secondes) jusqu'à ce que toute l'agarose soit dissoute.
 - Méthode plaque chauffante:
 - Couvrir le flacon avec du papier d'aluminium pour empêcher l'évaporation excessive
 - Porter le mélange à l'ébullition et mélanger de temps en temps. Maintenir à ébullition jusqu'à ce que toute agarose soit complètement dissoute.

Vérifier que l'agarose est complètement dissout

7. Refroidir la solution d'agarose à 55°C
8. Verser la solution refroidie d'agarose dans le lit. S'assurer que le lit est sur une surface de niveau.
9. Permettre au gel de se solidifier complètement. Il deviendra ferme et frais au contact après approximativement 20 minutes.
10. Laisser le gel de se solidifier complètement. Il deviendra ferme et froid au toucher après environ 20 minutes.

Refroidir l'agarose
à 55°C.



**NE PAS VERSER
L'AGAROSE EN ÉBULLITION
DIRECTEMENT DANS
LES MOULES DE COULAGE**

L'Agarose très chaude risque de
déformer irrémédiablement
le lit du moule

Préparer le gel pour électrophorèse

11. Après le gel est complètement solidifié, soigneusement et lentement enlever les barrages en caoutchouc ou du ruban du lit de gel.

Soyez particulièrement prudent de ne pas endommager ou de déchirer les puits de gel lors de la suppression des barrages en caoutchouc. Un couteau en plastique, une spatule ou une pipette pointe fine peut être inséré entre le gel et les barrages pour briser la tension de surface possible.

12. Retirer le peigne en tirant doucement vers le haut. Pour ce faire, soigneusement et régulièrement pour éviter la déchirure les puits d'échantillon.
13. Placer le gel (sur son lit) dans la chambre d'électrophorèse, bien orientée, centrée et le niveau de la plate-forme.
14. Remplir la chambre d'appareil d'électrophorèse avec le volume nécessaire de tampon dilué pour l'unité spécifique que vous utilisez (voir les directives dans le tableau B).

Pour l'analyse de l'ADN, la Tampon d'électrophorèse EDVOTEK 50x est utilisé pour préparer à la fois le tampon en gel d'agarose et le tampon de la chambre. La formule pour la dilution du tampon EDVOTEK (50x) est la suivante : 1 volume de tampon concentré dans 49 volumes d'eau distillée ou désionisée.

Table B Dilution of Electrophoresis (Chamber) Buffer

EDVOTEK Model #	Concentrated Buffer (50x) (ml)	+ Distilled Water (ml)	= Total Volume (ml)
M6+	6	294	300
M12	8	392	400
M36 (blue)	10	490	500
M36 (clear)	20	980	1000

Le tampon électrophorèse est du Tris-acétate-EDTA (20 mM de Tris, l'acétate de sodium 6 mM, 1 mM acide EDTA di sodique) de pH 7.8.

Chargement du gel

Une technique de distribution d'échantillon précis assure les meilleurs résultats possibles.

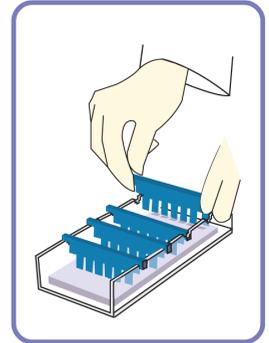
Les erreurs de pipetage peut entrainer une dilution de l'échantillon dans le tampon ou endommager les puits avec la pointe de la micropipette.

Si vous n'êtes pas familier avec le chargement des échantillons dans des gels d'agarose, il est recommandé de vous entraîner avant la conduite de l'expérience réelle. EDVOTEK expériences d'électrophorèse.

Le Kit contient un tube de solution neutre pour s'entraîner. Cette solution peut être laissée dans les puits, elle n'altère en rien la migration des échantillons proprement dits.

Une activité proposée est présentée ci-dessous:

1. préparez un gel avec le nombre maximum de puits possibles.
 2. Après la solidification du gel, placer sous tampon. Le gel d'agarose est parfois appelé un "gel de sous-marin", car il est submergée par tampon pour le chargement des échantillons et la séparation électrophorétique.
 3. Déposer les échantillons en prenant soin de ne pas endommager le gel avec la pointe de la micropipette.
- Pour électrophorèse de colorants, de charger l'échantillon bien avec 35-38 microlitres d'échantillon.



Cette manipulation peut très bien être effectuée avec un gel neutre préparé avec de l'eau et le l'agar agar, et ensuite être immergé dans de l'eau pour simuler le tampon, pour éviter d'utiliser les produits nécessaire à l'expérience réelle.

Échantillons pour l'électrophorèse

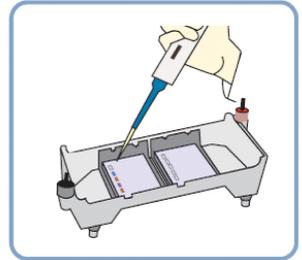
Les échantillons de cette expérience d'électrophorèse sont emballés dans tubes précalibrés.

Pour prélever des échantillons à partir des tubes QuickStrip™, tout simplement percer l'opercule avec la pointe de micropipette et prélever l'échantillon.

Chargement des échantillons

1. Vérifiez les volumes d'échantillon. Parfois, une petite quantité d'échantillon restera le long des parois des tubes. Assurez-vous que la totalité du volume de l'échantillon est au fond des tubes avant de commencer à charger le gel.

- Si vos échantillons sont en QuickStrip™, tapoter l'opercule de sorte échantillons tombent au fond des tubes.
- Si vos échantillons sont dans des microtubes individuels de 1,5 ml ou 0,5 ml, centrifuger brièvement les tubes d'échantillon, ou tapoter sur chaque tube sur la paillasse pour faire tomber tout l'échantillon au fond du tube.



2. Déposer les échantillons A - E dans les puits dans l'ordre consécutif. La quantité d'échantillon qui doit être chargé est 35-38 ul.

Lane	Label	Sample
1	A	Standard dyes with assigned base pair equivalents
2	B	Sample after 10 cycles
3	C	Sample after 20 cycles
4	D	Sample after 30 cycles
5	E	Sample after 40 cycles

MIGRATION

1. Une fois les échantillons sont chargés, casser délicatement le couvercle vers le bas sur les bornes d'électrodes.

Assurez-vous que le couvercle est bien orienté et connecté.

2. Insérez la fiche noire dans l'entrée noire de l'alimentation (entrée négative). Insérez la fiche du fil rouge dans l'entrée rouge de la source d'alimentation (entrée positive).
3. Réglez la source d'alimentation à la tension requises et la conduite électrophorèse pour la durée de temps déterminée par votre instructeur. Des directives générales sont présentées dans le tableau C.
4. Vérifiez que le courant passe bien - vous devriez voir la formation de bulles sur les électrodes.
5. Après environ 10 minutes, vous allez commencer à voir la séparation des colorants colorés.
6. Après la fin de l'électrophorèse, coupez l'alimentation, débranchez l'alimentation, débrancher les fils et retirez le couvercle.
7. Enregistrez les résultats obtenus.
8. Une variété de méthodes de documentation peut être utilisée, y compris un dessin du gel, en prenant une photographie ou un scanner à plat.

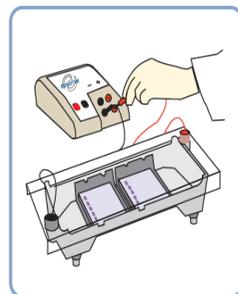


Table C Time and Voltage

Electrophoresis of Dyes	
Volts	Recommended Time
125	20 min
70	40 min
50	60 min

La coloration n'est pas nécessaire pour cette expérience, mais les résultats doivent être analysés à la fin de la séparation électrophorétique. Étant donné que les molécules de colorant sont extrêmement petites, ils diffusent hors du gel. Ainsi, le gel ne peut pas être sauvé.

