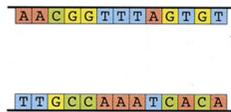
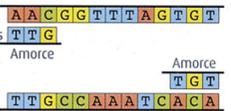
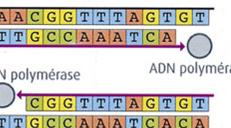
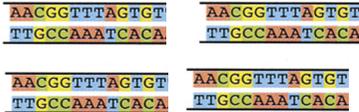


Principe de la PCR avec les kits utilisables en classe

Chaque tube soumis à la PCR contient : les fragments d'ADN à amplifier / des désoxyribonucléotides / des Taq polymérase (ADN polymérase)

Cycle(s)	Etapes	Principe	Schéma	JEULIN	SORDALAB
X 1	Dénaturation initiale	Le chauffage doit permettre de dénaturer les molécules d'ADN.		98°C 5 minutes	95°C 30 secondes
Multiples X 5 ou X 10 ou X 12 ...	Dénaturation de la matrice d'ADN	Le chauffage sépare les brins d'ADN , étape indispensable pour permettre la fixation des amorces et la polymérisation.		98°C 5 secondes	95°C 1 secondes
	Hybridation	Les amorces se fixent sur les régions correspondantes. La séquence de la région à amplifier doit donc être connue . Ces fixations doivent se faire à température plus basse.		55°C 5 secondes	55°C 1 seconde
	Polymérisation	L' ADN polymérase effectue la réplication : il s'agit de l'élongation. La température idéale de l'enzyme est de 72°C. Il s'agit de la Taq polymérase issue de la bactérie <i>Thermus aquaticus</i> qui vit près des sources chaudes. Elle est utilisée car elle résiste à des hautes températures. Cette phase doit se faire en présence de désoxyribonucléotides triphosphates .		72°C 25 secondes	72°C 1 seconde
X 1	Terminaison	Terminaison des fragments d'ADN nouvellement synthétisés.		72°C 1 minute	72°C 30 secondes
Durée totale de la phase PCR				30min pour 12 cycles	8min30sec pour 5 cycles 14min30 pour 10 cycles

Principe de l'électrophorèse

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un gel d'agarose.

L'ADN est chargé négativement par les groupements phosphates. Dans une cuve à électrophorèse, on place un gel d'agarose, les solutions d'ADN amplifié sont déposées du côté de la cathode (pôle négatif – noir).

L'ADN migre en fonction de son poids moléculaire : plus le fragment d'ADN est long plus il va migrer lentement vers l'anode (pôle positif + rouge), à l'inverse un fragment plus court se déplacera plus rapidement.

Les échantillons utilisés proviennent des tubes issus de la PCR :

	JEULIN	SORDALAB
Ajout d'un révélateur d'ADN dans chaque tube.	1,5 µL de DNA release (prépare la révélation)	2 µL de SAFEGREEN
Dépôt d'ADN dans les puits. Le dépôt doit être fait mains calées sur la table pour ne pas déborder et contaminer les autres puits. Il se réalise à mi-hauteur dans les puits, lentement et jusqu'à ce que le cône soit entièrement vide.	8 à 10 µL de chaque solution dans chaque puits	15 µL (pour le peigne à 9 dents) ou 8µL (pour le peigne à 13 dents)
Migration en fonction du poids moléculaire (donc taille). L'apparition de petites bulles sur les électrodes témoigne de la circulation correcte du courant dans le gel.	100-150 V 25 minutes	25 minutes

Révélation des fragments d'ADN en fonction de leur taille (poids moléculaire).

A l'aide d'un transilluminateur et d'un filtre orange.

10 minutes d'attente pour que l'excitation soit maximale et les bandes bien visibles. Celles-ci apparaissent en vert-jaune.

Remarque : Le Gelgreen (révélateur) peut être incorporé au gel ou déposé sur le gel après la migration.

A l'aide de la lumière bleue de la cuve BLUEGEL.

15 minutes d'attente pour un résultat visible.

Le Safegreen se fixe à l'ADN et fluoresce en vert. Seul, il est également fluorescent.

Le puit comme les molécules d'ADN qui migrent seront fluorescents.