



Biotechnology Explorer™

Kit PCR

Chromosome 16 : PV92

Référence 166-2100EDU

<http://explorer.bio-rad.fr>

Remarque : Le kit contient des réactifs sensibles à la chaleur. A l'arrivée, ouvrez immédiatement et stockez les composants à -20°C ou à 4°C comme il est indiqué.

La duplication de toute partie de ce document n'est autorisée que pour l'usage en classe.



Pour le service technique, composez le 01.47.95.69.64

Bienvenue au programme Biotechnology Explorer

Les avancées techniques de ces quelques dernières décennies ont créé une nouvelle branche de la science, la biotechnologie, qui a transformé et révolutionné la recherche en sciences de la vie. Des techniques puissantes d'isolement, d'analyse et de manipulation de l'ADN, l'élément structural de base de la vie, ont déjà permis de nombreuses découvertes pour comprendre des processus biologiques, des états pathologiques humains et des méthodologies thérapeutiques. Pour ces raisons, il est devenu de plus en plus important de présenter ces concepts aux élèves. Dans les décennies à venir, lorsqu'une visite de routine au médecin de la famille pourra comprendre toute une batterie de tests de diagnostic sur l'ADN — et que les empreintes génétiques deviendront la forme définitive de l'identification personnelle — la compréhension de ces principes sera aussi importante que les enseignements sur l'hygiène et la nutrition.

Pour enseigner aux élèves des facultés, des collèges et des lycées, les technologies et les applications de la biotechnologie, Bio-Rad a développé toute une série de kits éducatifs faciles d'emploi étayés par des cours basés sur des études, des instruments et des consommables. Le programme Biotechnology Explorer est devenu le programme de choix pour les enseignants à la fois débutants et expérimentés cherchant à faire la liaison entre la science en classe et la science dans le monde réel.

Du fait de l'utilisation croissante de la technique d'amplification (PCR) en médecine et science modernes et de l'impact potentiel sur chaque membre de la société, il est important de bien faire comprendre aux élèves les principes de base et les applications de la PCR. Dans ce kit, les élèves réalisent une PCR pour amplifier un segment de leur propre ADN. Le segment d'ADN qu'ils vont amplifier est présent dans les gènes de nombreux individus, mais pas de tous. L'analyse des données générées en travaux pratiques ouvrira la porte à l'enseignement des principes de base de la biologie moléculaire, de la génétique de la population et des empreintes génétiques et elle illustrera comment la PCR est utilisée dans de nombreux autres domaines de la biologie.

Le programme Biotechnology Explorer est tout à fait unique et extrêmement innovant. Nos activités à base de travaux pratiques capturent l'imagination en faisant que les élèves prennent mieux conscience et comprennent mieux les applications de la biotechnologie qui influencera de plus en plus leur vie et affectera leurs décisions personnelles et communautaires.

Développés sur cinq ans, en collaboration avec le San Francisco Bay Area Biotechnology Educational Consortium, Rutgers University, Maxygen Inc. et le Stanford Human Genome Center Education Program, nos cours et nos kits ont été créés par des enseignants et des scientifiques qui ont travaillé ensemble. Nous nous efforçons continuellement d'améliorer nos cours et nos produits. Votre contribution est extrêmement importante pour nous. Vos histoires, commentaires et suggestions sont les bienvenus!

L'équipe Bio-Education
Bio-Rad division Bio-Recherche
3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette

Sommaire

	Page
Guide de l'enseignant	
Liste de contrôle de la composition du kit	1
Contexte pour les enseignants	3
Contenu suggéré des cours	12
Généralités sur la préparation préalable par l'enseignant	13
Préparation préalable par l'enseignant.....	16
Points du cours à souligner	25
Interprétation des résultats et guide de dépannage	30
Modes opératoires	33

Liste de contrôle de la composition du kit

Cette partie liste les composants fournis dans le kit PV92 PCR. Elle liste également les accessoires nécessaires. Chaque kit contient suffisamment de matériaux pour 8 postes de travail d'élèves, avec 4 élèves à chaque poste. Veuillez utiliser cette liste pour contrôler votre matériel avant de commencer ces TP.

Remarque : Si vous préparez de l'ADN génomique en utilisant le mode opératoire pour les follicules pileux, il faut commander de la protéase (Référence 166-2003EDU) séparément du kit.

Composition du kit	Quantité	(✓)
Stockez à -20°C (composants sensibles à la température)		
Contrôle PV92 homozygote (+/+), 100 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Contrôle PV92 homozygote (-/-), 100 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Contrôle PV92 hétérozygote (+/-), 100 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Solution d'amplification (dNTP, Taq ADN polymérase, tampon), 2X, 1,2 ml	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Mélange d'amorces directe et réverse, 50X, 25 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Marqueurs de poids moléculaire EZ Load™ (standards d'ADN), 100 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
A stocker à 4°C		
Tampon TAE 50X, 100 ml	1	<input type="checkbox"/>
Agarose en poudre, 5 g	1	<input type="checkbox"/>
Colorant d'ADN Fast Blast™, 500X, 100 ml	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Matrice InstaGene™, 20 ml	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Tampon de charge PV92 XC, 5X, 1 ml	1 flacon	<input type="checkbox"/>
A stocker à température ambiante		
Tubes de PCR	50	<input type="checkbox"/>
Tubes avec bouchon à vis, 1,5 ml	50	<input type="checkbox"/>
Microtubes à essai, sans bouchon, 1,5 ml	50	<input type="checkbox"/>
Microtubes à essai, avec bouchons attachés, 1,5 ml	60	<input type="checkbox"/>
Supports de microtubes à essai en mousse	16	<input type="checkbox"/>
Plateaux de coloration des gels	4	<input type="checkbox"/>
Manuel	1	<input type="checkbox"/>

Recharges disponibles séparément

Recharge TS de kit PV92 PCR : 166-2119EDU (comprend des amorces de PCR, des contrôles positifs, des marqueurs de poids moléculaire d'ADN, de la solution d'amplification contenant des dNTP, du tampon, de l'ADN polymérase)

Recharge TR du kit PV92 PCR : 166-2139EDU (comprend la matrice InstaGene, le tampon de charge PV92 XC ADN, le colorant d'ADN Fast Blast, l'agarose, du TAE 50X)

Accessoires nécessaires – Non inclus dans ce kit		
Poste de travail des élèves	Quantité par poste	
Micropipettes P-20, 2 à 20 µl (Référence 166-0506EDU)		
ou pipette à volume fixe de 10 µl	1	<input type="checkbox"/>
et pipette à volume fixe de 20 µl	1	<input type="checkbox"/>
Embouts de pipette Xcluda (type à filtre) 2 à 20 µl (Référence 211-2006EDU)	1 portoir	<input type="checkbox"/>
Chambre d'électrophorèse Mini-Sub [®] Cell GT		
avec plateau de gel de 7 x 7 cm, peigne pour 8 puits		
(Référence 166-4400EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Alimentation électrique PowerPac [™] Junior (Référence 165-5048EDU) ou	1	<input type="checkbox"/>
Alimentation électrique PowerPac [™] Basic (Référence 164-5050EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Seau de glace avec de la glace en cubes ou plîée	1	<input type="checkbox"/>
Marqueur permanent	1	<input type="checkbox"/>
Grands récipients pour la décoloration (si applicable)	1 à 3 pour 2 postes	<input type="checkbox"/>
Récipients avec 10 ml de solution saline à 0,9 %	4	<input type="checkbox"/>
Copie du mode opératoire	1	<input type="checkbox"/>
Pincettes (pour le mode opératoire pour le follicule pileux)	1	<input type="checkbox"/>
Ciseaux ou lame de rasoir (pour le mode opératoire pour le follicule pileux)	1	<input type="checkbox"/>
Installation de l'enseignant ou instruments des TP	Quantité par kit	
Micropipettes P-20, 2 à 20 µl (Référence 166-0506EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Micropipettes P-200, 20 à 200 µl (Référence 166-0507EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Micropipettes P-1000, 100 à 1000 µl (Référence 166-0508EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Embouts de pipette Xcluda [®] (type à filtre de PCR)	1	<input type="checkbox"/>
2 à 20 µl (Référence 211-2006EDU)	3 portoirs	<input type="checkbox"/>
20 à 200 µl (Référence 211-2016EDU)	3 portoirs	<input type="checkbox"/>
100 à 1000 µl (Référence 211-2021EDU)	1 portoir	<input type="checkbox"/>
Thermocycler Gene Cyclo [™] (Référence 170-6700EDU) ou	1	<input type="checkbox"/>
Thermocycler MyCyclo [™] (Référence 170-9701EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Four à micro-ondes	1	<input type="checkbox"/>
Bain-marie (56 et 100°C) (Référence 166-0504EDU)	1 de chaque	<input type="checkbox"/>
Protéase (Référence 166-2003EDU), uniquement pour le mode opératoire pour le follicule pileux	1,3 ml	<input type="checkbox"/>
Solution saline à 0,9 %	500 ml	<input type="checkbox"/>
Eau distillée ou déminéralisée	500 ml	<input type="checkbox"/>
Ballon d'Erlenmeyer de 1000 ml pour préparer l'agarose	1	<input type="checkbox"/>
Ballon ou bécher de 500 ml pour la coloration de l'ADN	1	<input type="checkbox"/>
Bande adhésive de TP (pas du Scotch)	1	<input type="checkbox"/>
Microcentrifugeuse (Référence 166-0612EDU) ou	1	<input type="checkbox"/>
Minicentrifugeuse (Référence 166-0613EDU)	4	<input type="checkbox"/>
Accessoires facultatifs	Quantité par classe	
Film de support de gel pour agarose (Référence 170-2984EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Plate-forme basculante (Référence 166-0719EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Vortex	1	<input type="checkbox"/>
Feuilles d'acétate pour le traçage des gels	8	<input type="checkbox"/>

Stockage et stabilité : Bien que le kit soit expédié dans des conditions ambiantes, les composants sont garantis pendant 1 an à partir de la date d'achat lorsqu'ils sont stockés dans les conditions appropriées. Le kit contient des composants sensibles à la chaleur. Ouvrez immédiatement le kit et stockez les composants soit à -20°C, soit à 4°C, soit à température ambiante selon les indications.

Contexte pour les enseignants

Introduction à la PCR

En 1983, Kary Mullis de Cetus Corporation a développé la technique de biologie moléculaire qui, depuis, a révolutionné la recherche en génétique, ce qui lui a valu le Prix Nobel en 1993. Cette technique, appelée la **technique d'amplification (PCR)**, a transformé la biologie moléculaire en outil de recherche multidisciplinaire. Nombre de techniques de biologie moléculaire utilisées avant la PCR étaient laborieuses, demandaient beaucoup de temps et réclamaient un niveau élevé d'expérience technique. En outre, travailler avec seulement des traces d'ADN rendait difficile pour les chercheurs dans d'autres domaines biologiques (pathologie, botanique, zoologie, pharmacie, etc.) d'incorporer la biologie moléculaire dans leurs schémas de recherche.

La PCR a eu un impact sur quatre domaines principaux de la biotechnologie : la cartographie des gènes, le clonage, le séquençage de l'ADN et la détection de gènes. La PCR est à présent utilisée comme outil de diagnostic médical pour détecter des mutations spécifiques qui peuvent être responsables de maladies génétiques,³ dans des enquêtes criminelles et des tribunaux pour identifier des suspects à un niveau moléculaire,⁴ et dans le séquençage du génome humain.⁵ Avant la PCR, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire pour des objectifs thérapeutiques, médico-légaux, pharmaceutiques ou médicaux n'était pas pratique ou elle était onéreuse. Le développement de la technologie de la PCR a fait passer ces aspects de la biologie moléculaire d'une science difficile à l'un des outils les plus accessibles et les plus largement utilisés en recherche génétique et médicale.

La PCR et la biotechnologie — Qu'est-ce que c'est et pourquoi cela a-t-il révolutionné toute une communauté de recherche?

La PCR produit des quantités exponentiellement importantes d'un fragment spécifique d'ADN à partir de traces de matériau de départ (matrice). La matrice peut être toute forme d'ADN double brin, tel que de l'ADN génomique. Un chercheur peut prélever des traces d'ADN à partir d'une goutte de sang, d'un simple follicule pileux ou d'une cellule de la joue et utiliser la PCR pour produire des millions de copies d'un fragment d'ADN souhaité. En théorie, un seul brin de matrice est nécessaire pour produire des millions de nouvelles molécules d'ADN. Avant la PCR, il était impossible de réaliser des études médico-légales ou génétiques avec cette petite quantité d'ADN. La possibilité d'amplifier la séquence précise d'ADN qu'un chercheur souhaite étudier ou manipuler est la véritable puissance de la PCR.

L'amplification par PCR nécessite la présence d'au moins un brin d'ADN matrice. Dans ce kit, l'ADN génomique humain isolé à partir des propres cellules des élèves sera la source des brins matrices. L'une des principales raisons pour lesquelles la PCR est un outil si puissant, est sa simplicité et sa spécificité. Tout ce dont on a besoin, ce sont des tampons de réaction peu coûteux, quatre sous-unités de l'ADN (les désoxynucléotides triphosphates d'adénine, de guanine, de thymine et de cytosine), une ADN polymérase, deux amorces d'ADN et des quantités minimales du brin matrice que l'on souhaite amplifier. La spécificité provient de la capacité à cibler et amplifier un segment spécifique de l'ADN parmi un génome complet.

La PCR utilise deux processus de base en génétique moléculaire

1. Hybridation de brin d'ADN complémentaire

2. Synthèse de brin d'ADN par l'intermédiaire d'une ADN polymérase

Dans le cas de la PCR, l'hybridation de brin complémentaire a lieu lorsque deux **amorces oligonucléotidiques** différentes s'hybrident à chacune de leurs séquences de paires de bases complémentaires respectives sur la matrice. Les deux amorces sont conçues et synthétisées au laboratoire avec une séquence spécifique de nucléotides de telle manière qu'elles peuvent s'hybrider aux extrémités opposées et sur les brins opposés de l'élongation d'ADN double brin (brin matrice) à amplifier.

Avant de pouvoir amplifier une région d'ADN, on doit identifier et déterminer la séquence d'un morceau d'ADN en amont et en aval de la région d'intérêt. Ces régions sont ensuite utilisées pour déterminer la séquence des amorces oligonucléotidiques qui seront synthétisées et utilisées comme points de départ pour la réplication de l'ADN. Les amorces sont complémentaires des régions en amont et en aval de la séquence à amplifier, aussi elles collent ou s'hybrident, à ces régions. Les amorces sont nécessaires parce que les ADN polymérases ne peuvent ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité d'une chaîne pré-existante.

L'ADN polymérase utilisée dans la PCR doit être une polymérase thermostable parce que la réaction en chaîne de la polymérase passe par des cycles de températures entre 60°C et 94°C. L'ADN polymérase thermostable (*Taq*) utilisée dans la PCR a été isolée à partir d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, qui vit dans les conduits de vapeur à température élevée tels que ceux trouvés dans le Yellowstone National Park.

Deux nouveaux brins matrices sont créés à partir de la matrice double brin d'origine à chaque cycle complet de la réaction de synthèse de brin. Ceci provoque une croissance exponentielle du nombre de molécules matrices, c'est-à-dire du nombre de doubles brins d'ADN à chaque cycle. Par conséquent, après 30 cycles, il y aura 2^{30} ou plus de 1 milliard de fois plus de copies qu'au début. Une fois que la matrice a été suffisamment amplifiée, on peut la visualiser. Ceci permet aux chercheurs de déterminer la présence ou l'absence des produits souhaités de la PCR et de déterminer les similarités et les différences entre l'ADN d'individus. Selon la séquence d'ADN analysée, les différences parmi les individus peuvent être aussi grandes que des centaines de paires de bases ou aussi petites qu'une seule paire de bases ou une simple mutation ponctuelle.

Gènes et ADN

On estime que les 23 paires de chromosomes (au total 46 chromosomes) du génome humain contiennent un total de 30000 à 50000 gènes. Chaque gène détient le code pour une protéine particulière. De manière intéressante, ces 30000 à 50000 gènes ne constituent que 5 % d'ADN chromosomique. Les autres 95 % sont de l'ADN non codant. Cet ADN non codant se trouve non seulement entre les gènes, mais également au sein des gènes, les divisant en segments. Chez les eucaryotes, ces séquences au sein des gènes (appelées **introns**) sont transcrites en ARN mais à la fin elles ne fabriquent pas une protéine. Les séquences qui codent pour des protéines sont appelées **exons**. A la fois les introns et les exons sont initialement transcrits, puis les introns sont épissés en dehors de l'ARN pour créer de l'ARN messager (ARNm).

Chez les eucaryotes, l'ADN génomique est transcrit en molécules d'ARN contenant à la fois des introns et des exons pour un gène particulier. Alors que l'ARN est encore dans le noyau (avant d'être transporté hors du noyau), les introns (in = qui demeurent au sein du noyau) doivent être retirés de l'ARN alors que les exons (ex = qui sortent du noyau) sont épissés ensemble pour former la séquence codante complète pour la protéine (Figure 1). Ce processus est appelé **l'épissage d'ARN**. Certains gènes peuvent contenir quelques introns, d'autres peuvent en contenir des douzaines.

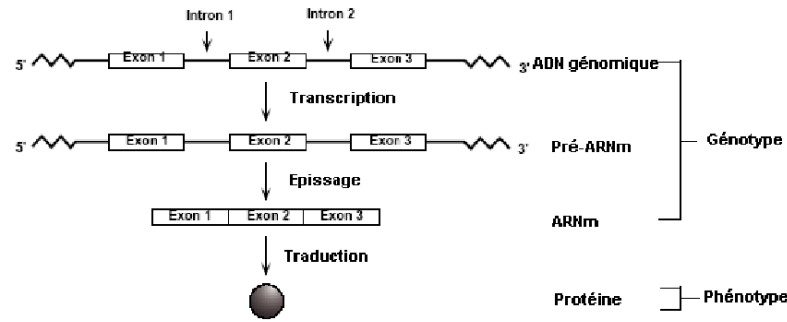


Fig. 1. Epissage d'introns à partir de gènes.

Comme nous en avons discuté, des segments fonctionnels de gènes (exons) codent pour des protéines — des molécules qui exécutent la plupart des fonctions cellulaires. Les séquences des exons sont donc similaires parmi les individus. D'autre part, les introns varient souvent en taille et en nombre parmi les individus. On pense que les séquences des introns sont le résultat de l'accumulation différentielle tout au long de l'évolution de mutations qui sont transmises silencieusement aux descendants par le code héréditaire. C'est cette différence dans les séquences des introns qui nous permet de déterminer la diversité génétique humaine. L'identification de ces caractéristiques distinctives dans l'ADN représente la base moléculaire de l'identification humaine et de la génétique d'une population.

Tout au long de l'évolution, les séquences des introns ont été la cible d'insertions aléatoires par des éléments dispersés répétitifs courts, également appelés SINE.⁷ Les SINE se sont retrouvés insérés au hasard au sein de nos introns au cours des millions d'années. Un de ces éléments répétitifs est appelé la séquence Alu (Figure 2). Il s'agit d'une séquence d'ADN d'environ 300 paires de bases de long qui est répétée, une copie à la fois, presque 500000 fois au sein du génome humain. L'origine et la fonction de telles séquences répétées de manière aléatoire ne sont pas encore connues. Le nom Alu vient du site de reconnaissance de l'**enzyme de restriction Alu I** qui se trouve dans cette séquence.

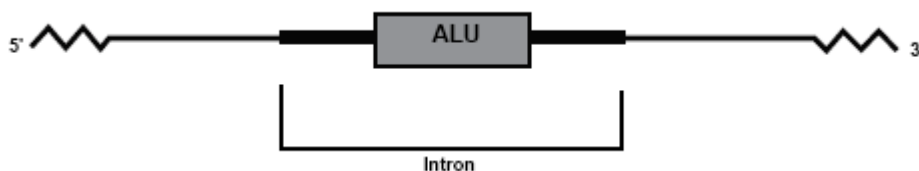


Fig. 2. Emplacement d'une insertion Alu au sein d'un intron.

Certains de ces éléments Alu présentent des caractéristiques qui les rendent très utiles pour les généticiens. S'ils sont présents au sein d'introns de gènes associés à des pathologies particulières, ils peuvent de cette manière être associés à cette maladie. Lorsqu'ils sont présents au sein des introns de gènes, les répétitions de Alu peuvent être également utilisées pour estimer la parenté parmi des individus. Dans cette activité, l'analyse des répétitions de Alu est utilisée pour estimer la fréquence d'un insert dans une population et il s'agit d'une mesure simple de variation génétique moléculaire — **sans rapport avec une maladie ou une parenté parmi des individus.**

Ce kit fournit un dépistage simple basé sur la PCR d'une seule séquence Alu au sein du locus PV92 sur le chromosome 16. Cet intron Alu particulier est dimorphe. Cela signifie que l'élément est présent chez certains individus mais pas chez d'autres (Figure 3). Certaines personnes ont l'insert dans le locus PV92 de l'un de leurs chromosomes 16, d'autres peuvent avoir l'insert dans les deux chromosomes homologues (deux allèles), et certains n'ont l'insert dans aucun des chromosomes. La présence ou l'absence de cet insert peut être détecté à l'aide de la réaction en chaîne de la polymérase suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose.

Dans cette activité, les élèves isoleront leur propre ADN génomique à partir de leurs cellules. Ils utiliseront des amorces qui flanquent l'insertion Alu entière (300 paires de bases de long) et 641 paires de bases du locus PV92 pour amplifier un fragment de 941 paires de bases (si l'élément Alu est présent) ou un fragment de 641 paires de bases (si l'élément Alu est absent). L'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR est suffisante pour faire la distinction entre les homozygotes (+/+) pour la présence de la répétition Alu (produit de 941 paires de bases uniquement), les homozygotes (-/-) pour l'absence de la répétition Alu (produit de 641 paires de bases uniquement) et les hétérozygotes (+/-) ayant à la fois les produits de 641 et de 941 paires de bases.

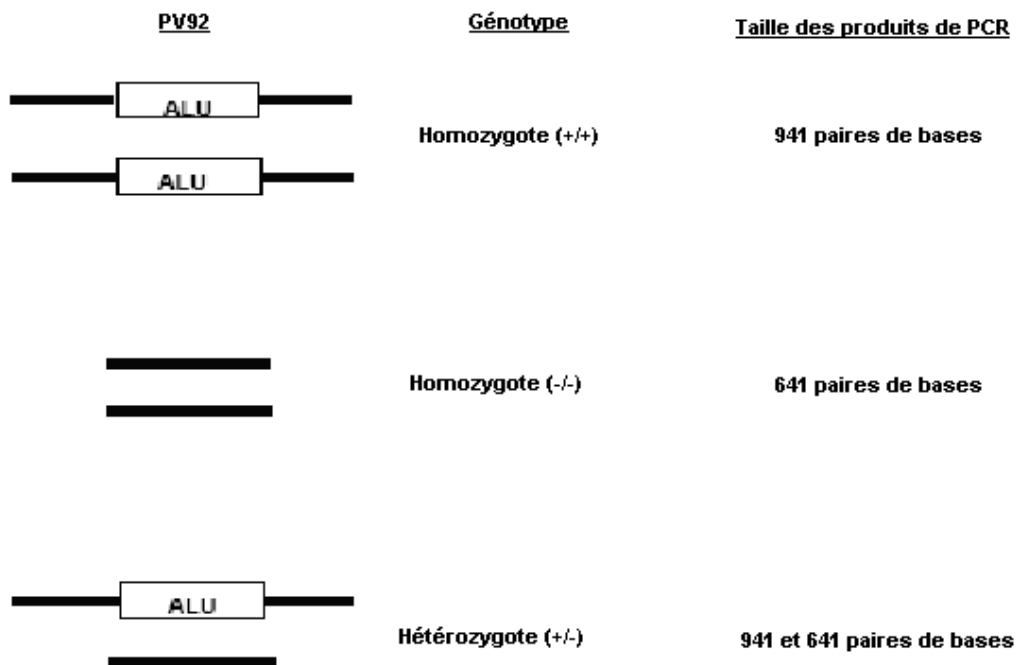


Fig. 3. Présence ou absence de l'insert Alu au sein du locus PV92 sur le chromosome 16.

Remarques importantes pour l'enseignant

Veillez noter que puisque les allèles PV92 sont hérités des parents et que, potentiellement, ils peuvent révéler des informations à propos de relations familiales, nous attirons votre attention contre la génération de données génotypiques à partir de plusieurs membres d'une famille. Si la confidentialité est un souci, nous suggérons à l'enseignant de mélanger les échantillons des élèves pour assurer l'anonymat. Les échantillons des élèves peuvent être randomisés à tout moment après la récolte des cellules.

Deux modes opératoires sont fournis pour la préparation de l'ADN génomique. L'un implique le recueil de cellules épithéliales orales à l'aide d'un bain de bouche salin. L'autre isole l'ADN génomique à partir de follicules pileux. Les deux méthodes sont très peu invasives et produisent des produits de PCR robustes. Les enseignants doivent choisir l'un ou l'autre des modes opératoires d'après leur préférence personnelle ou celle de leurs élèves ou d'après des restrictions locales.

La PCR étape par étape

La PCR implique une série répétitive de cycles, dont chacun est constitué de la dénaturation de la matrice, de l'hybridation d'une amorce et de l'élongation de l'amorce hybridée par la *Taq* ADN polymérase. Avant de commencer l'amplification de l'ADN, l'ADN génomique est préparé à partir des cellules des élèves.

Après la préparation des échantillons, l'ADN matrice, les amorces oligonucléotidiques, l'ADN polymérase thermostable (*Taq*), les quatre désoxynucléotides (A, T, G, C) et le tampon de la réaction sont mélangés dans un seul microtube à essai. Le tube est placé dans le thermocycler Gene Cycler™ ou MyCycler™. Ces thermocyclers contiennent un bloc en aluminium qui renferme les échantillons et qui peut être rapidement chauffé et refroidi à travers des différences de température extrêmes. Le chauffage et le refroidissement rapides de ce bloc thermique sont appelés le **cycle de températures** ou le **cycle thermique**.

La première étape de la technique du cycle de températures de la PCR implique le chauffage de l'échantillon à 94°C. A cette température élevée, les brins de la matrice se séparent (se dénaturent). Ceci est appelé l'**étape de dénaturation**.

Ensuite, le thermocycler refroidit rapidement à 60°C pour permettre aux amorces de s'hybrider aux brins séparés de la matrice. Ceci est appelé l'**étape d'hybridation**. Les deux brins d'origine de la matrice peuvent s'hybrider de nouveau l'un à l'autre ou entrer en compétition avec les amorces pour les sites de liaison complémentaires des amorces. Toutefois, les amorces sont ajoutées en excès de telle manière que les amorces l'emportent sur les brins d'origine de l'ADN pour les sites de liaison complémentaires des amorces.

Enfin, le thermocycler chauffe l'échantillon à 72°C pour que la *Taq* ADN polymérase étende les amorces et fabrique des copies complètes de chaque brin de l'ADN matrice. Ceci est appelé l'**étape d'élongation**. La *Taq* polymérase fonctionne de la manière la plus efficace à cette température. Deux nouvelles copies de chaque brin complémentaire sont créées. Il y a maintenant deux jeux d'ADN double brin. Il est maintenant possible d'utiliser ces deux jeux d'ADN double brin pour un autre cycle et la synthèse subséquente de brins.

A ce stade, un cycle de températures complet (cycle thermique) a été complété (Figure 4).

Cycle de températures = étape de dénaturation + étape d'hybridation + étape d'élongation

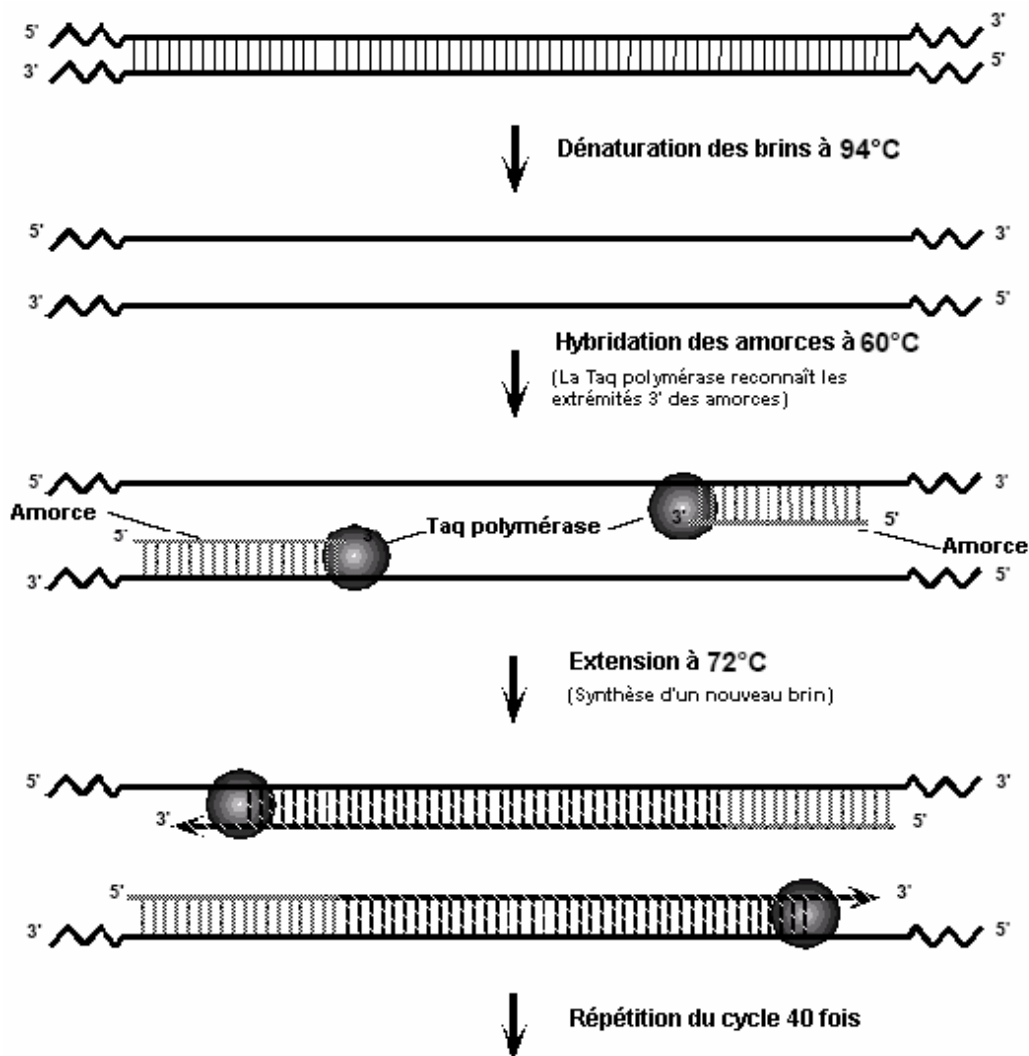


Fig. 4. Un cycle complet de PCR.

Habituellement, le cycle thermique continue pendant environ 40 cycles. Après chaque cycle thermique, le nombre de brins de la matrice double, ce qui entraîne une augmentation exponentielle du nombre de brins de l'ADN matrice. Après 40 cycles il y aura $1,1 \times 10^{12}$ copies de plus du nombre d'origine de molécules d'ADN matrice.

La PCR génère de l'ADN d'une longueur et d'une séquence précises. Lors du premier cycle, les deux amorces s'hybrident aux brins de l'ADN génomique matrice d'origine aux extrémités opposées et sur les brins opposés. Au terme du premier cycle de températures, deux nouveaux brins sont générés, lesquels sont plus courts que les brins matrices d'origine mais cependant plus longs que la longueur de l'ADN que le chercheur souhaite amplifier. Ce n'est pas avant le troisième cycle thermique que des fragments de la longueur précise sont générés (Figure 5).

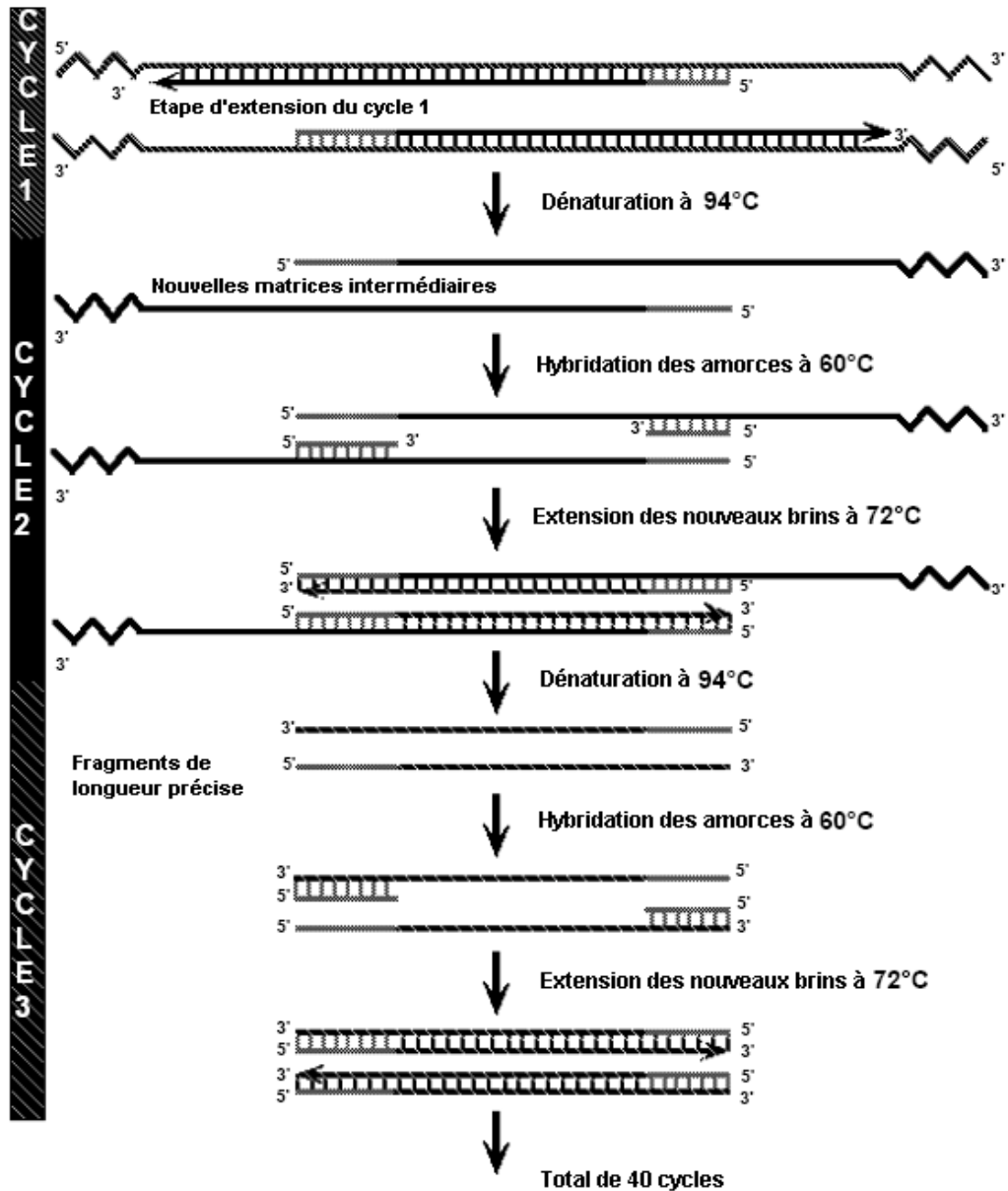


Fig. 5. Génération de fragments de longueur précise.

Ce sont les brins matrices de la longueur précise qui sont amplifiés exponentiellement (X^n , où X = le nombre de brins matrices d'origine et n = le nombre de cycles). Il y a toujours un jeu de molécules d'ADN matrice de la longueur d'origine qui n'est pas totalement dupliqué. Après chaque cycle thermique, deux brins de longueur intermédiaire sont produits, mais parce qu'ils ne peuvent être générés qu'à partir des brins matrices d'origine, les brins intermédiaires ne sont pas amplifiés exponentiellement. Ce sont les brins de longueur précise générés à partir des brins intermédiaires qui s'amplifient exponentiellement à chaque cycle. Par conséquent, si 20 cycles thermiques ont été conduits à partir d'une molécule d'ADN double brin, il y aura 1 jeu de brins d'ADN génomique matrice d'origine, 20 jeux de brins matrices intermédiaires et 1 048 576 jeux de brins matrices de la longueur précise. Après 40 cycles, 1 jeu de brins d'ADN génomique matrice d'origine, 40 jeux de brins matrices intermédiaires et $1,1 \times 10^{12}$ jeux de brins matrices de la longueur précise (Figure 6).

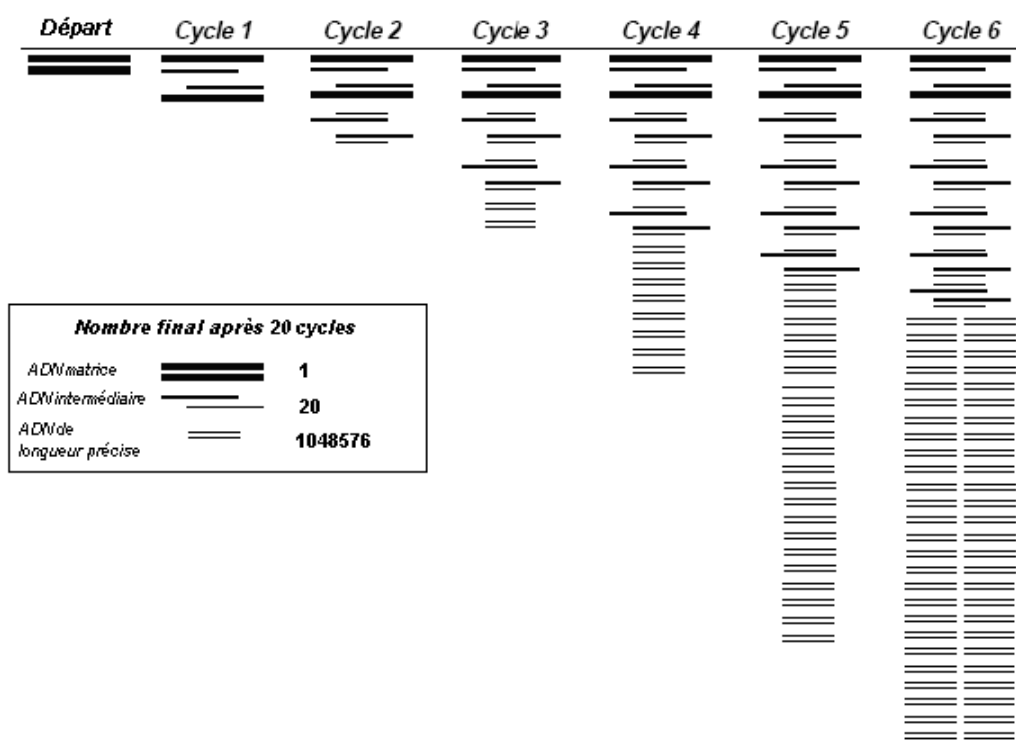


Fig. 6. Schéma de l'amplification par PCR de fragments d'ADN.

Contenu suggéré des cours

Il y a quatre cours dans ce programme sur la PCR. Tous les cours sont conçus pour être réalisés en périodes consécutives de 50 minutes. Les cours 1 et 2 présentent des points d'arrêt pratiques et deux options. Les enseignants doivent choisir la préparation d'ADN de cellules de la joue ou de follicule pileux. Les enseignants peuvent souhaiter présenter aux élèves l'une ou l'autre méthode en option ou ils peuvent choisir de réaliser un mode opératoire particulier selon les restrictions locales. Les échantillons peuvent être stockés pendant plusieurs jours pour concilier les week-ends et les TP qui se déroulent tous les deux jours.

Emploi du temps des élèves

Cours 1 Activité	Préparation de l'ADN matrice de cellules de la joue Isolement de cellules de la joue Préparation d'ADN génomique provenant de cellules de la joue (Point d'arrêt)
Cours 1 Activité	Préparation de l'ADN matrice de follicules pileux Isolement de cheveux Préparation d'ADN génomique provenant des follicules pileux (Point d'arrêt)
Cours 2 Activité	Amplification par PCR Installation et réalisation des réactions de PCR Couler les gels d'agarose (ceci peut être réalisé par l'enseignant au cours de la préparation préalable) (Point d'arrêt)
Cours 3 Activité	Electrophorèse sur gel des échantillons amplifiés de PCR et coloration des gels d'agarose Chargement et migration sur les gels Coloration des gels (Remarque : si vous suivez le mode opératoire de coloration rapide, enregistrez les résultats et séchez les gels)
Cours 4 Activité	Analyse et interprétation des résultats Enregistrement des résultats et séchage des gels (si vous suivez le mode opératoire de coloration pendant une nuit) Analyse et discussion des résultats

Généralités sur la préparation préalable par l'enseignant

Cette partie présente l'emploi du temps recommandé pour la préparation préalable par l'enseignant. Un guide détaillé de la préparation préalable est fourni aux pages 16 à 24.

Quand	Activité	Temps requis
Immédiatement	Lecture du manuel de PCR	2 heures
Avant le Cours 1	Aliquotage de la matrice InstaGene	30 min
Avant le Cours 2	Installation des postes de travail des élèves	1 heure
	Préparation de la solution d'amplification	
	Installation des réactions de PCR contrôles	
	Préparation du tampon TAE	
	Préparation de l'agarose fondu	
Avant le Cours 3	Programmation du Gene Cyclor™ ou MyCycler™	20 min
	Installation des postes de travail des élèves	
	Préparation du colorant d'ADN Fast Blast	
Avant le Cours 4	Installation des postes de travail des élèves	10 min

Remarque : Choisissez l'une des deux options de préparation de l'ADN matrice.

Liste de contrôle quotidien des éléments des postes de travail

Postes de travail des élèves : Les matériaux et les consommables nécessaires pour chaque poste de travail des élèves avant l'exercice sont listés ci-dessous. Les composants fournis dans ce kit sont suffisants pour 8 postes de travail avec 4 élèves à chaque poste.

Poste de travail (commun) de l'enseignant : Les matériaux, les consommables et les instruments nécessaires à un emplacement accessible à tous les élèves sont également listés ci-dessous. C'est à l'enseignant de décider si les élèves auront accès aux solutions tampons/instruments communs ou si l'enseignant aliquotera les solutions et fera fonctionner les instruments.

Cours 1 – Préparation de l'ADN matrice

Postes de travail des élèves	Quantité par poste	(✓)
Microtubes à essai de 1,5 ml (pour le MO pour les cellules de la joue)	4	<input type="checkbox"/>
Tubes avec bouchon à vis avec la matrice InstaGene™ (pour le MO pour les cellules de la joue)*	4	<input type="checkbox"/>
Tubes avec bouchon à vis avec la matrice InstaGene™ et la protéase* (pour le MO pour les follicules pileux)	4	<input type="checkbox"/>
Supports de microtubes à essai en mousse	2	<input type="checkbox"/>
Micropipette P-20, pour le MO pour les cellules de la joue uniquement	1	<input type="checkbox"/>
Embouts de pipette (type à filtre), 2 à 20 µl, pour le MO pour les cellules de la joue uniquement	4	<input type="checkbox"/>
Marqueur permanent	1	<input type="checkbox"/>
Récipient à déchets	1	<input type="checkbox"/>
Copie du mode opératoire	1	<input type="checkbox"/>
Récipients avec 10 ml de solution saline à 0,9% (pour le MO pour les cellules de la joue uniquement)	4	<input type="checkbox"/>
Pincettes (pour le MO pour les follicules pileux)	1	<input type="checkbox"/>
Ciseaux ou lame de rasoir (pour le MO pour les follicules pileux)	1	<input type="checkbox"/>

*Choisissez l'une des deux méthodes.

Poste de travail (commun) de l'enseignant

Micropipette P-1000 ou micropipette P-200
Embouts de pipette (type à filtre), 20 – 200 µl,
ou embouts de pipette (type à filtre), 100 – 1000 µl
Bains-marie (56 et 100°C)
Microcentrifugeuse
ou minicentrifugeuse
Vortex (facultatif)

Quantité par classe

1
1 boîte
1 boîte
1 de chaque
1
4
1

Cours 2 – Amplification par PCR**Poste de travail des élèves**

Tubes de PCR
Microtubes à essai, sans bouchon
Solution d'amplification complète (contenant les amorces) sur glace
Micropipette P-20
ou pipettes à volume fixe de 10 µl et 20 µl
Embouts de pipette (type à filtre), 2 – 20 µl
Supports de microtubes à essai en mousse
Seau rempli de glace
Marqueur permanent
Copie du mode opératoire
Récipient à déchets

Quantité par poste

4 (✓)
4
1 tube
1
1 de chaque
8
2
1
1
1
1

Poste de travail (commun) de l'enseignant

Plateaux de gels
Agarose fondu (voir la préparation préalable)
Scotch à autoclave pour les plateaux de gels
Thermocycler Gene Cyclor ou MyCycler
Microcentrifugeuse
ou minicentrifugeuse

Quantité par classe

1 pour 2 postes
40 ml par gel
1 par poste
1
1
4

Cours 3 – Electrophorèse sur gel des échantillons de PCR amplifiés et coloration des gels d'agarose

Postes de travail des élèves	Quantité par poste	(✓)
Gel d'agarose	1	<input type="checkbox"/>
Echantillons de PCR	1 par élève	<input type="checkbox"/>
Tampon de charge d'ADN PV92 XC	1 tube	<input type="checkbox"/>
Micropipette P-20	1	<input type="checkbox"/>
ou pipettes de volume fixe de 10 µl et 20 µl	1 de chaque	<input type="checkbox"/>
Marqueurs de poids moléculaire EZ Load™ (standards)	1 tube	<input type="checkbox"/>
Embouts de pipette (type à filtre), 2 – 20 µl	12	<input type="checkbox"/>
Marqueur permanent	1	<input type="checkbox"/>
Support de microtubes à essai en mousse	2	<input type="checkbox"/>
Cuves et alimentation électrique	1	<input type="checkbox"/>
Plateau de coloration des gels	1 pour 2 postes	<input type="checkbox"/>
Colorant d'ADN Fast Blast™, solution 1X ou 100X*	120 ml pour 2 postes	<input type="checkbox"/>
Film de support de gel (facultatif)	1	<input type="checkbox"/>
Feuilles d'acétate transparente pour le traçage des gels (facultatif)	1	<input type="checkbox"/>
Eau du robinet chaude pour la décoloration des gels (pour le mode opératoire de coloration rapide)	1,5 à 2 l pour 2 postes	<input type="checkbox"/>
Grands récipients pour la décoloration (pour le mode opératoire de coloration rapide)	1 à 3 pour 2 postes	<input type="checkbox"/>
Récipient à déchets	1	<input type="checkbox"/>
Copie du mode opératoire	1	<input type="checkbox"/>
Poste de travail de l'enseignant	Quantité par classe	
Tampon d'électrophorèse TAE 1X	275 ml par cuve	<input type="checkbox"/>
Echantillons contrôles positifs amplifiés (4 de chaque)	12	<input type="checkbox"/>
PV92 homozygote (+/+)		
PV92 homozygote (-/-)		
PV92 hétérozygote (+/-)		
Plate-forme basculante (facultatif)**	1	<input type="checkbox"/>
Microcentrifugeuse	1	<input type="checkbox"/>
ou minicentrifugeuse	4	<input type="checkbox"/>

Cours 4 - Analyse et interprétation des résultats

Postes de travail des élèves	Quantité par poste	(✓)
Film de support de gel (facultatif)	1	<input type="checkbox"/>
Feuilles d'acétate transparente pour le traçage des gels (facultatif)	1	<input type="checkbox"/>
Copie du mode opératoire	1	<input type="checkbox"/>

Poste de travail de l'enseignant

Aucun nécessaire

* Selon le mode opératoire de coloration suivi, rapide ou pendant une nuit.

** Fortement recommandé.

Préparation préalable par l'enseignant

Cette partie décrit la préparation à réaliser par l'enseignant avant l'exercice. Une estimation du temps de préparation est incluse dans chaque partie.

Cours 1 – Préparation de l'ADN matrice

Préparation préalable

Objectifs	Aliquotage de la matrice InstaGene™ Installation des postes de travail des élèves et de l'enseignant Réglage des bains-marie à 56 et 100°C	
Temps requis	30 minutes	
Matériaux requis	Tubes avec bouchon à vis Matrice InstaGene™ Micropipette P-20 (2 – 20 µl) Embouts à filtre (2 – 20 µl) Micropipette P-200 (20 – 200 µl) Embouts à filtre (20 – 200 µl) Vortex	Microtubes à essai Pincettes (pour prép. foll. pileux) Ciseaux (pour prép. foll. pileux) Cupules (pour prép. cell. joue) Protéase (pour prép. foll. pileux)

Modes opératoires

1. Aliquotez la matrice InstaGene™ (préparation de cellules de joue).*
 - A. Homogénéisez la matrice InstaGene en agitant la bouteille doucement ou en la passant au vortex plusieurs fois pour remettre la matrice en suspension. Assurez-vous que la matrice est bien mélangée lorsque vous l'aliquotez. Les billes se déposent rapidement dans la solution, aussi homogénéisez doucement la bouteille plusieurs fois au cours de l'aliquotage.
 - B. Pipetez 200 µl de matrice InstaGene dans chaque tube avec bouchon à vis. Distribuez un tube à chaque élève. Chaque poste de travail des élèves doit disposer de 4 tubes de matrice pour 4 élèves.
2. Préparez et aliquotez la matrice InstaGene avec la protéase (mode opératoire pour les follicules pileux).*
 - A. Préparez une solution de matrice InstaGene contenant 66 µg/ml de protéase. La protéase (référence 166-2003EDU) est fournie à une concentration de 20 mg/ml. Pour obtenir 66 µg/ml, diluez la protéase mère au 1/300 en volume dans la matrice InstaGene.
Par exemple, pour fabriquer 5 ml de matrice InstaGene contenant 66 µg/ml de protéase (suffisamment pour approximativement 20 élèves) :
 - Aliquotez 5 ml de matrice InstaGene dans un nouveau tube (assurez-vous d'homogénéiser le puits de InstaGene avant l'aliquotage)
 - Ajoutez 17 µl de protéase mère aux 5 ml de matrice InstaGene
 - B. Pipetez 200 µl de matrice InstaGene avec la protéase dans chaque tube avec bouchon à vis. Distribuez un tube à chaque élève. Chaque poste de travail des élèves doit disposer de 4 tubes matrice pour 4 élèves.
3. Préparez et aliquotez la solution saline (mode opératoire pour les cellules de la joue).
 - A. Préparez une solution saline à 0,9%. Une bouteille de 500 ml d'eau potable, ajoutez 4,5 grammes de sel non iodé. Le sel de table est recommandé. Retournez la bouteille jusqu'à ce que le sel entre en solution.
 - B. Pour chaque élève, placez 10 ml de solution saline dans un récipient séparé. Chaque poste de travail d'élèves doit disposer de 4 récipients de solution saline.

*Choisissez l'une des deux méthodes.

Cours 2 – Amplification par PCR

Préparation préalable (pour 8 postes de travail d'élèves)

Objectifs	Préparation de la solution d'amplification complète en y mélangeant les amorces et aliquotez (pas plus de 30 minutes avant les cycles de PCR) Installation des réactions de PCR contrôles Programmation du thermocycler Gene Cyclor ou MyCycler Couler les gels d'agarose. Si vous demandez à vos élèves de couler leurs propres gels au cours du TP, préparez l'agarose à l'avance. L'agarose, une fois fondu, peut être conservé dans un bain-marie réglé à 45–50°C jusqu'à ce que les élèves l'utilisent.
Temps requis	Installation des postes de travail des élèves et de l'enseignant 1 à 1,5 heure (selon comment vous choisissez de préparer les gels d'agarose) Préparation de la solution d'amplification et installation des échantillons vers la fin de la préparation préalable.
Matériaux requis	Microtubes à essai (avec bouchons attachés) Tubes avec bouchons à vis Solution d'amplification Mélange des amorces Contrôle PV92 homozygote (+/+) Contrôle PV92 homozygote (-/-) Contrôle PV92 hétérozygote (+/-) 12 tubes de PCR Cuves d'électrophorèse, plateaux de moulage et peignes Tampon d'électrophorèse (TAE 50X) Poudre d'agarose Micropipettes (P-20 et P-200) Embouts à filtre (20 – 200 µl et 100 – 1000 µl)

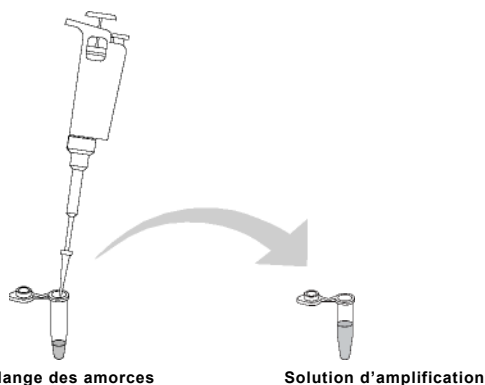
Le thermocycler Gene Cyclor peut recevoir 24 échantillons, tandis que le thermocycler MyCycler supporte 96 échantillons. Si vous utilisez le Gene Cyclor, vous devrez faire fonctionner la machine de PCR plus d'une fois s'il y a plus de 24 échantillons (y compris les échantillons contrôles positifs). **Pour obtenir les meilleurs résultats, ne préparez pas les réactions des élèves et les échantillons contrôles plus de 30 minutes avant les cycles de PCR.**

Modes opératoires

Remarque : Avant d'ouvrir l'un quelconque des tubes de réactif, centrifugez le contenu (~ 3 secondes) dans une centrifugeuse pour entraîner le contenu au fond des tubes. Le contenu se loge souvent sous les bouchons au cours de l'expédition.

1. Préparez la solution d'amplification complète en ajoutant les amorces. Pour obtenir les meilleurs résultats, vous devez réaliser les étapes suivantes **dans les 15 à 30 minutes qui suivent la réaction de PCR.**
 - A. Pipetez 1100 µl de la solution d'amplification dans un microtube à essai étiqueté. Si vous choisissez d'amplifier 16 échantillons d'élève ou moins, divisez la solution d'amplification dans deux tubes avec 550 µl chacun. Un tube sera immédiatement utilisé et la solution d'amplification restant peut être de nouveau congelé pour un usage ultérieur.
 - B. Pour 32 élèves ou 8 postes de travail d'élèves (divisez en deux pour 16 élèves), étiquetez 8 microtubes à essai "SA" et placez les tubes sur de la glace.
 - C. Ajoutez 22 µl du mélange des amorces aux 1100 µl de la solution d'amplification. Passez au vortex pendant 10 secondes pour homogénéiser. Il est impératif que la solution d'amplification soit uniformément homogénéisée après l'addition des amorces. La solution doit être jaune.

Les amorces sont fournies sous la forme d'une solution jaune concentrée dans un tampon Tris. Puisque les amorces sont beaucoup plus stables sous une forme concentrée, ajoutez les amorces à la solution d'amplification juste avant de commencer l'exercice des travaux pratiques — **Pas plus de 15 à 30 minutes avant** l'amplification par PCR.



- D. Aliquotez 95 μ l de la solution d'amplification complète dans les 8 microtubes à essai étiquetés "SA", en distribuant un tube pour chaque poste de travail des élèves (1 à 8). Gardez la solution d'amplification complète restant pour les réactions des contrôles positifs. Placez ces tubes sur de la glace jusqu'à leur utilisation.
2. Installez les réactions de PCR contrôles.
- A. Étiquetez les tubes de PCR contrôles : +/+ , -/- et +/- . Si vous utilisez le kit entier sur une seule période de TP, installez 4 tubes de chaque contrôle soit un total de 12 tubes. Si vous divisez le kit entre deux périodes de TP, installez 2 tubes de chaque contrôle soit un total de 6 tubes. Les solutions contrôles inutilisées doivent être stockées dans le congélateur jusqu'à leur utilisation.
- Pipetez 20 μ l de la matrice +/+ dans chaque tube de PCR +/+.
 - Pipetez 20 μ l de la matrice -/- dans chaque tube de PCR -/-.
 - Pipetez 20 μ l de la matrice +/- dans chaque tube de PCR +/-.
- B. Pipetez 20 μ l de solution d'amplification complète dans chacun des tubes contrôles. **Utilisez un nouvel embout pour chaque tube.**
- C. Placez les tubes sur de la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à les charger dans le Gene Cycler ou le MyCycler. Amplifiez les échantillons contrôles de PCR avec les échantillons des élèves durant ce cours (voir le mode opératoire).
3. Préparez les gels d'agarose. Ces modes opératoires peuvent être réalisés 1 ou 2 jours au préalable par l'enseignant ou durant le cours par les équipes individuelles des élèves.
- A. Préparez le tampon d'électrophorèse. Le tampon d'électrophorèse est fourni sous la forme d'une solution concentrée 50X. Vous avez besoin de tampon TAE 1X pour fabriquer le gel d'agarose et également pour chaque chambre d'électrophorèse. Trois litres de tampon TAE 1X suffiront pour faire fonctionner 8 chambres d'électrophorèse et pour couler 8 gels d'agarose. Pour fabriquer 3 l de TAE 1X à partir de TAE concentré 50X, ajoutez 60 ml de concentré à 2,94 l d'eau distillée.
- B. Fabriquez la solution d'agarose. La concentration de gel recommandée pour cette application en classe est de l'agarose à 1 %. Cette concentration d'agarose produit une séparation excellente et minimise le temps de fonctionnement requis pour la séparation électrophorétique des fragments de PCR. Pour fabriquer une solution à 1 %, ajoutez 1 g d'agarose à 100 ml de tampon d'électrophorèse TAE 1X. Pour 8 gels, vous aurez besoin d'approximativement 350 ml d'agarose fondu (3,5 g d'agarose pour 350 ml de tampon TAE 1X). L'agarose doit être fabriqué en utilisant du tampon d'électrophorèse, **pas de** l'eau.

Ajoutez la poudre d'agarose dans un récipient approprié (par exemple, un ballon d'Erlenmeyer de 1000 ml, une bouteille de Wheaton, etc.). Ajoutez la quantité appropriée de tampon d'électrophorèse TAE 1X et faites tourner pour mettre en suspension la poudre d'agarose dans le tampon. Si vous utilisez un ballon d'Erlenmeyer, retournez une fiole d'Erlenmeyer de 50 ml sur l'ouverture du ballon d'Erlenmeyer de 1000 ml contenant l'agarose. La petite fiole fonctionne comme une chambre de reflux, permettant une ébullition sans une grosse perte de volume de tampon. L'agarose peut être fondu pour mouler le gel sur une plaque brûlante magnétique ou dans un four à micro-ondes (voir ci-dessous). Chauffez le mélange jusqu'à ébullition en utilisant un four à micro-ondes ou un bain-marie brûlant jusqu'à la dissolution complète de la poudre d'agarose.

Il est nécessaire d'observer soigneusement pour déterminer lorsque la poudre est complètement dissoute. Tenez le ballon contre la lumière et recherchez de petits paquets transparents d'agarose en suspension. Ces particules indiquent que l'agarose n'est pas complètement dissous. Vous devez poursuivre le chauffage et la rotation jusqu'à ce que vous ne puissiez plus voir ces particules transparentes.

Précaution : Utilisez des gants de protection, des gants pour le four, des lunettes de protection et une blouse de TP comme il convient lors de la préparation et du moulage des gels d'agarose. L'agarose fondu bouillant ou les récipients contenant l'agarose brûlant peuvent causer des brûlures sévères.

Méthode de la plaque brûlante magnétique. Ajoutez un bâton magnétique dans le ballon contenant l'agarose et le tampon. Chauffez le mélange jusqu'à ébullition tout en agitant sur une plaque brûlante magnétique. Les bulles ou la mousse doivent se rompre avant de s'élever vers le col du ballon. Portez la solution à ébullition jusqu'à la dissolution de **toutes** les petites particules transparentes d'agarose. Avec la petite fiole toujours en place, mettez l'agarose de côté pour refroidir à 60°C avant de couler les gels.

Méthode du four à micro-ondes. Placez la solution d'agarose dans le four à micro-ondes. Desserrez le bouchon de la bouteille s'il y en a un. Utilisez une puissance moyenne et réglez sur 3 minutes. Arrêtez le four à micro-ondes toutes les 30 secondes et faites tourner le ballon pour mettre en suspension l'agarose non dissous. Cette technique est le moyen le plus rapide et le plus sécuritaire pour dissoudre l'agarose. Portez à ébullition et faites tourner la solution jusqu'à la dissolution de toutes les petites particules transparentes d'agarose. Avec la petite fiole toujours en place, mettez l'agarose de côté pour refroidir à 60°C avant de couler les gels.

Des gels d'agarose pré-coulés pratiques (référence 161-3057EDU) sont disponibles chez Bio-Rad. Ce sont des gels de TAE à 1 % à 2 x 8 puits.

Mode opératoire pour le moulage des gels

En utilisant le système Mini-Sub[®] Cell GT de Bio-Rad, les gels peuvent être coulés directement dans la cuve en utilisant des barrières de coulées avec le plateau de gels. Si vous ne disposez pas de barrières de coulées, utilisez la méthode avec du scotch à autoclave pour le moulage des gels, telle que présentée ci-dessous. D'autres méthodes sont détaillées dans le manuel d'instructions du Bio-Rad Sub-Cell GT.

- Etape 1. Scellez bien les extrémités du plateau de gels avec du scotch à autoclave. Pressez fermement sur le scotch aux bords du plateau de gels pour former un joint étanche aux liquides.
- Etape 2. Uniformisez le plateau de gels sur une table d'uniformisation ou une paillasse en utilisant le niveau à bulle fourni avec l'instrument.
- Etape 3. Préparez la concentration et la quantité souhaitées d'agarose dans du tampon d'électrophorèse TAE 1X. Portez l'agarose à ébullition jusqu'à dissolution.
- Etape 4. Refroidissez l'agarose à au moins 60°C avant de verser.
- Etape 5. Alors que l'agarose refroidit à 60°C, placez le peigne dans la fente appropriée du plateau de gels. Les peignes doivent être placés à ~ 2 cm de l'extrémité du plateau de moulage des gels (pas au milieu du gel).
- Etape 6. Laissez le gel se solidifier à température ambiante pendant 10 à 20 minutes — il est translucide lorsqu'il est prêt à l'emploi.
- Etape 7. Retirez le peigne avec précaution du gel solidifié. Retirez le scotch des bords du plateau de gels.
- Etape 8. Placez le plateau sur la cuve d'électrophorèse d'ADN à niveau de manière à ce que les puits des échantillons soient à l'extrémité de la cathode (noire) de la base. Les échantillons d'ADN migreront vers l'extrémité de l'anode (rouge) de la base durant l'électrophorèse.

4. Programmez le thermocycler Gene Cyclor ou MyCyclor.

Le thermocycler doit être programmé pour 3 étapes dans le cycle 2, qui se répétera 40 fois. Le cycle 3 final assure que la réaction d'élongation finale arrive à son terme et que tous les produits de PCR possibles sont fabriqués. La réaction de PCR prendra approximativement 3,5 heures.

Cycle	Etape	Fonction	Température	Temps
1	Etape 1	Pre-dénaturation	94°C	2 minutes
	Répétition 1 fois			
2	Etape 1	Dénaturation	94°C	1 minute
	Etape 2	Hybridation	60°C	1 minute
	Etape 3	Elongation	72°C	2 minutes
	Répétition 40 fois			
3	Etape 1	Elongation finale	72°C	10 minutes
	Répétition 1 fois			

Reportez-vous au manuel d'instructions du Gene Cyclor ou du MyCyclor pour obtenir des instructions de programmations spécifiques.

Cours 3 – Electrophorèse des échantillons de PCR amplifiés et coloration des gels d'agarose

Préparation préalable

Objectifs	Préparation des échantillons contrôles positifs amplifiés Aliquotage du tampon de charge PV92 XC Aliquotage des marqueurs de poids moléculaire EZ Load (standards d'ADN) Installation des postes de travail des élèves et de l'enseignant Préparation du colorant d'ADN Fast Blast soit 1X soit 100X (selon si vous suivez le mode opératoire de coloration rapide ou pendant une nuit)
Temps requis	40 minutes
Matériaux requis	8 microtubes à essai avec des bouchons attachés Micropipettes (P-20, P-200 et P-1000) et des embouts à filtre 8 tubes avec des bouchons à vis Eau distillée ou déminéralisée pour préparer le colorant d'ADN Fast Blast Film de support de gel (pour le mode opératoire de coloration rapide) Acétate pour le traçage des gels (pour le mode opératoire de coloration rapide) Ballon de 500 ml

Modes opératoires

1. **Préparez les échantillons contrôles positifs.** Ajoutez 10 µl de tampon de charge PV92 XC dans chaque échantillon contrôle positif amplifié (+/+, -/-, +/-). Déposez les tubes sur le poste de travail de l'enseignant. Soit vous soit un groupe d'élèves chargera les échantillons contrôles positifs et négatifs sur chaque gel, comme il est indiqué à la page 28.
2. **Aliquotez les standards de taille d'ADN.** Aliquotez 11 µl des marqueurs de poids moléculaire EZ Load dans 8 microtubes et étiquetez "MPM". Les tailles des bandes des standards d'ADN sont de 1000 pb, 700 pb, 500 pb, 200 pb et 100 pb.
3. **Aliquotez le tampon de charge PV92 XC.** Etiquetez 8 tubes avec bouchons à vis "TC" avec du tampon de charge et aliquotez 50 µl dans chaque tube. Distribuez aux postes de travail des élèves.
4. **Préparez le colorant d'ADN Fast Blast.** Le colorant d'ADN Fast Blast est fourni sous la forme d'un concentré 500X qui doit être dilué avant utilisation. Le colorant peut être utilisé comme un colorant rapide lorsqu'il est dilué à 100X pour permettre la visualisation de l'ADN en 12 à 15 minutes ou il peut être utilisé comme un colorant pendant une nuit lorsqu'il est dilué à 1X. Lorsqu'un gel d'agarose est immergé dans du colorant d'ADN Fast Blast, les molécules de colorant se fixent aux molécules d'ADN piégées dans le gel d'agarose. Lorsque les bandes d'ADN sont visibles, vos élèves peuvent déterminer leurs génotypes pour l'insert Alu.
Le colorant d'ADN Fast Blast est une alternative pratique, sans risque et non toxique au bromure d'éthidium pour la détection de l'ADN dans des gels d'agarose après l'électrophorèse. Fast Blast contient un composé cationique qui appartient à la famille de colorants des thiazines. Les molécules de colorant chargées positivement sont attirées par et se lient aux groupes phosphates chargés négativement sur l'ADN. La formule déposée du colorant colore l'ADN en bleu profond dans les gels d'agarose et fournit des résultats très nets et cohérents.

AVERTISSEMENT

Bien que le colorant d'ADN Fast Blast soit non toxique et non cancérigène, vous devez porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation du colorant ou des gels colorés pour empêcher vos mains de devenir bleues. Vous devez porter des blouses de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour éviter de colorer vos vêtements. Éliminez les solutions colorantes selon les modes opératoires suivis sur votre site. Utilisez soit de l'eau de Javel à 10 % soit une solution d'alcool à 70 % pour éliminer le Fast Blast de la plupart des surfaces. Vérifiez que ces solutions ne sont pas nocives pour la surface avant de les utiliser.

1. Pour préparer du colorant 100X (pour la coloration rapide), diluez 100 ml de Fast Blast 500X avec 400 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans un ballon ou une bouteille de taille appropriée et mélangez. Couvrez le ballon et stockez-le à température ambiante jusqu'à ce que vous soyez prêt à l'utiliser.
2. Pour préparer du colorant 1X (pour la coloration pendant une nuit), diluez 1 ml de Fast Blast 500X avec 499 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans un ballon ou une bouteille de taille appropriée et mélangez. Couvrez le ballon et stockez-le à température ambiante jusqu'à ce que vous soyez prêt à l'utiliser.

Note:

- Nous recommandons l'utilisation de 120 ml de Fast Blast dilué pour colorer deux gels d'agarose de 7 x 7 cm ou de 7 x 10 cm dans des plateaux de coloration individuels fournis dans le kit (vous pouvez souhaiter faire une encoche aux coins des gels pour une identification). Si vous utilisez d'autres plateaux de coloration, ajoutez un volume suffisant de solution colorante pour submerger complètement les gels.
- Après l'électrophorèse, vous devez retirer les gels d'agarose de leurs plateaux avant de les déposer dans la solution colorante. Ceci s'accomplit facilement en tenant la base du plateau de gels d'une main et en expulsant doucement le gel avec le pouce de l'autre main.
- Parce que le gel est fragile, faites particulièrement attention lorsque vous le manipulez. Nous vous recommandons fortement d'utiliser une grande spatule ou une autre surface de support pour transférer le gel d'un récipient à un autre au cours des étapes de décoloration impliquées dans le mode opératoire de coloration rapide.
- La décoloration (pour le mode opératoire de la coloration rapide) nécessite l'utilisation d'au moins un récipient de grand volume, pouvant contenir au moins 500 ml, à chaque poste de travail des élèves. Chaque groupe d'élèves peut utiliser des récipients de lavages séparés pour chaque étape de lavage ou ils peuvent simplement utiliser un seul récipient qui est vidé après chaque lavage et rempli pour le lavage suivant.
- Il est important que vous secouiez les gels doucement et de manière intermittente durant la coloration pendant une nuit dans du colorant d'ADN Fast Blast ; les petits fragments d'ADN tendent à diffuser sans agitation.
- Le Fast Blast 100X peut être réutilisé au moins 7 fois.
- Il n'est pas nécessaire de laver ou de décolorer lorsque vous suivez le mode opératoire de coloration pendant une nuit.

Cours 4 – Analyse et interprétation des résultats

Préparation préalable

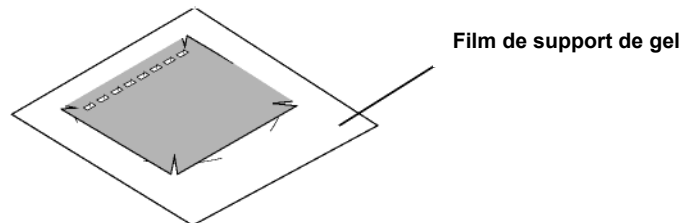
Objectifs	Pas de préparation préalable nécessaire
Matériaux requis	Film de support de gel (pour le mode opératoire de coloration pendant une nuit) Acétate pour le traçage des gels (pour le mode opératoire de coloration pendant une nuit)

Obtention d'un enregistrement permanent du gel avant le séchage

Pour obtenir un enregistrement permanent du gel avant qu'il soit séché, soit vous tracez le contour du gel (y compris les puits et les bandes d'ADN) sur un morceau de papier ou d'acétate et vous prenez une photographie à l'aide d'un appareil et d'un film standard (système de documentation de gels standard de Bio-Rad, référence 170-3742EDU), soit vous photocopiez le gel coloré.

Remarque : Le séchage des gels d'agarose nécessite l'utilisation d'agarose pour analyse de résistance élevée spécialement formulé de Bio-Rad. D'autres milieux de gel peuvent ne pas être appropriés pour cet objectif.

Nous vous recommandons d'utiliser le film de support de gel exclusif de Bio-Rad (référence 170-2984EDU) pour sécher les gels d'agarose. Retirez le gel d'agarose coloré de son plateau de coloration et découpez tous les couloirs non chargés avec un couteau ou une lame de rasoir. Déposez le gel directement sur le côté hydrophile d'un morceau de film de support de gel. (L'eau formera des billes sur le côté hydrophobe mais s'étalera sur le côté hydrophile du film.) Centrez le gel sur le film et éliminez les bulles qui peuvent se former entre le gel et le film. Déposez le film sur une serviette en papier et laissez-le sécher, assurez-vous d'éviter toute exposition directe à la lumière. Alors que le gel sèche, il se fixera au film mais ne rétrécira pas. S'il n'est pas dérangé sur le film de support, le gel séchera complètement à température ambiante après 2 à 3 jours. Le résultat sera un enregistrement plat, transparent et durable de l'expérience.



Remarque : Évitez une exposition prolongée des gels séchés à la lumière directe pour éviter le palissement des bandes. Toutefois, les bandes d'ADN réapparaîtront si les gels séchés sont stockés à l'obscurité pendant 2 à 3 semaines après le palissement.

Cours 5 – Analyse des résultats de la classe en utilisant la bioinformatique

Préparation préalable

Objectifs	Se familiariser avec le Allele Server sur le site web du Dolan DNA Learning Center Inscription pour établir un compte personnel gratuit
Temps requis	30 à 45 minutes
Matériaux requis	Aucun

Démarrage sur le Allele Server

Remarque : Le site web du Dolan DNA Learning Center est continuellement mis à jour. Certaines des informations suivantes peuvent changer.

1. Sur votre explorateur internet, allez à **vector.cshl.org**
2. Cliquez sur **Resources**
3. Cliquez sur **BioServers**
4. Sous **Allele Server**, cliquez sur **Register**. L'inscription est gratuite et vous permet d'établir un compte personnel. Il n'est pas nécessaire de vous inscrire à chaque fois que vous retournez sur ce site.

Utilisation du Allele Server

1. Connectez-vous au Allele Server en utilisant le nom d'utilisateur et le mot de passe que vous avez enregistrés.
2. Une fois que vous êtes connecté, suivez les instructions fournies dans la fenêtre d'affichage pour utiliser le Allele Server. Vous pouvez également ouvrir une nouvelle fenêtre et aller à **dnalc.org/help/sad/topic_3.html** pour obtenir davantage d'informations détaillées. Suivez les instructions détaillées sur comment peupler l'espace de travail, analyser des groupes, comparer des groupes et interroger la base de données. Souvenez-vous qu'en tant qu'utilisateur enregistré, vous pouvez stocker tous les groupes que vous avez chargés dans votre base personnelle de Allele Server et les analyser à votre convenance.

Points du cours à souligner — Questions fréquemment posées

Cette partie décrit les étapes des modes opératoires expérimentaux qui peuvent poser des problèmes du point de vue technique ou qui sont extrêmement importantes pour le résultat global et la compréhension des expériences. Les enseignants doivent attirer l'attention de leurs élèves sur ces points et, lorsque c'est possible, montrer la technique avant que les élèves la tentent.

Le manuel de l'élève et le mode opératoire contiennent des descriptions détaillées et des schémas de toutes les étapes et techniques de travaux pratiques employées dans chaque cours. Reportez-vous y si vous avez des questions à propos des modes opératoires expérimentaux utilisés dans les TP.

Cours 1 – Préparation des échantillons

Traitement des échantillons de cellules de la joue et de follicules pileux pour obtenir un ADN génomique matrice pour la PCR

A. Matrice InstaGene : Quelle est sa fonction ?

La matrice InstaGene est constituée d'une suspension de billes microscopiques Chelex® chargées négativement qui fixent les cations bivalents comme le magnésium (Mg^{2+}). Il est important d'éliminer les cations bivalents des échantillons d'ADN génomique des élèves parce que les cations aident les enzymes qui dégradent l'ADN matrice. Lorsque des cellules de la joue ou des follicules pileux sont lysés et portés à ébullition en présence de matrice InstaGene, les cations bivalents libérés des cellules se fixent aux billes et la chaleur inactive les enzymes de dégradation de l'ADN. Les billes sont ensuite transformées en culot par centrifugation. Le surnageant, qui contient l'ADN génomique intact propre, peut être utilisé comme matrice dans les réactions de PCR.

Les billes de la matrice InstaGene se déposent rapidement dans la solution. Il est extrêmement important que le flacon de matrice soit parfaitement homogénéisé avant de pipeter des aliquots pour chaque poste de travail des élèves, de manière à ce que les aliquots contiennent des quantités équivalentes de billes.

Chaque élève préparera de l'ADN génomique à partir de cellules de la joue isolées en utilisant un bain de bouche salin ou à partir de follicules pileux. Pour les élèves utilisant le mode opératoire pour les cellules de la joue, 1 ml de cellules recueillies en utilisant un bain de bouche procure suffisamment de matériau pour la préparation de l'ADN. Certains élèves peuvent avoir besoin d'utiliser 2 ml ou plus de bain de bouche salin pour obtenir suffisamment de cellules pour préparer l'ADN. Veuillez noter : il **n'est pas** recommandé d'utiliser plus de 3 ml de bain de bouche salin pour préparer l'ADN, (voir 'Interprétation des résultats et Guide de dépannage' à la page 30). Une fois que les cellules ont été centrifugées dans une centrifugeuse, un culot cellulaire d'environ la taille d'une tête d'allumette devra fournir assez de cellules pour les étapes suivantes. Il n'est pas recommandé de manger avant le recueil des cellules car les particules alimentaires peuvent rendre la préparation des cellules plus difficile. Si vous ne disposez pas d'une micropipette P-1000, les élèves peuvent verser soigneusement ~ 1 ml de la solution saline utilisée pour se rincer la bouche dans un microtube à essai. Les graduations figurant sur le côté du microtube à essai peuvent être utilisées pour juger de la quantité de liquide dans le tube.

Si les échantillons d'ADN ne sont pas amplifiés dans les 24 heures, vous pouvez les stocker dans le réfrigérateur dans la matrice InstaGene pendant 1 semaine. Pour un stockage plus long, déposez les échantillons dans le congélateur pour empêcher la dégradation de l'ADN. Avant d'utiliser les échantillons dans la PCR, les billes doivent être remises en culot par centrifugation juste avant de constituer les réactions de PCR. Toutefois, il est recommandé de traiter les échantillons dans les 24 heures. Voir les étapes suivantes pour des conseils de traitement.

B. Préparation d'ADN génomique à partir de cellules de la joue ou de follicules pileux

Pour les élèves suivant le mode opératoire pour l'ADN de cellules de la joue, les cellules sont recueillies en utilisant un bain de bouche salin. Pour les élèves suivant le mode opératoire pour l'ADN des follicules pileux, il est recommandé aux élèves de recueillir deux cheveux pour la préparation de l'ADN génomique.

C. Incubation : Quelles sont les fonctions de chaque étape d'incubation?

L'étape de pré-incubation est réalisée à 56°C et elle a deux fonctions :

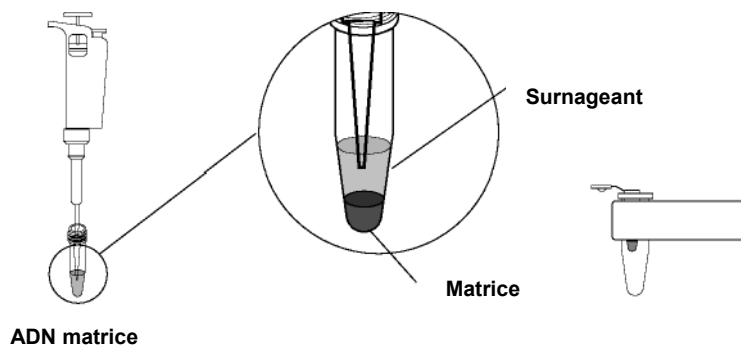
1. Le chauffage de la suspension cellulaire aide à rompre le tissu conjonctif qui maintient les cellules ensemble. La rupture du tissu rend la lyse des cellules plus facile au cours de l'étape d'incubation suivante à 100°C.
2. La pré-incubation à 56°C inactive les ADNases, des enzymes qui sont naturellement présentes dans les suspensions cellulaires et qui pourraient dégrader l'ADN génomique et inhiber les réactions de PCR.

Le chauffage des échantillons de cellules à 100°C rompt les membranes cellulaires, libérant de cette manière le contenu cellulaire qui comprend l'ADN génomique. L'ADN génomique sert de matrice dans les réactions de PCR.

D. Dois-je éliminer la matrice InstaGene avant la PCR?

Il est extrêmement important de transformer en culot les billes de InstaGene complètement au fond du tube avant de prélever un aliquot du lysat pour la réaction de PCR. Les billes se fixent aux cations bivalents tels que Mg^{2+} , qui sont essentiels à la fonction de la *Taq* ADN polymérase. Ainsi, si des billes sont transportées dans la réaction de PCR, celle-ci pourrait être inhibée. La matrice InstaGene peut être transformée en culot de manière efficace par centrifugation (6000 x g pendant 5 min).

Le surnageant au-dessus des billes (qui contient l'ADN génomique) est prélevé pour la réaction de PCR. Prélevez soigneusement 20 µl du surnageant, sans déranger la matrice InstaGene, et transférez-les dans un tube de PCR qui est déposé dans un adaptateur sans bouchon.



Cours 2 - Amplification par PCR des échantillons d'ADN génomique

Solution d'amplification : Qu'est-ce que c'est?

La solution d'amplification contient un mélange de nucléotides ou dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), du tampon et de la *Taq* ADN polymérase. La solution d'amplification complète est préparée en ajoutant des amorces à la solution d'amplification juste avant la période de travaux pratiques. Ainsi, lorsqu'un aliquot de 20 µl du lysat de cellules de la joue ou de follicules pileux (qui fournit l'ADN matrice) est ajouté à un aliquot de 20 µl de solution d'amplification complète, tous les composants nécessaires pour une réaction de PCR de 40 µl sont présents. La solution d'amplification 2X contient 0,05 unités/µl de *Taq* ADN polymérase, 3 mM de $MgCl_2$, 1,6 mM de dNTP et 1 µM de chaque amorce. La concentration finale 1X ou de travail de ces composants dans le tube de PCR après l'association des amorces, de la solution d'amplification et de la matrice sera supérieure de la moitié des valeurs ci-dessus.

Remarque : Une fois que la solution d'amplification et les amorces ont été mélangés, ils doivent être conservés sur de la glace et utilisés dans les 15 à 30 minutes. Ces réactifs sont extrêmement sensibles.

Pourquoi les amorces sont-elles jaunes?

Le mélange des amorces contient un colorant compatible avec la PCR appelé la tartrazine qui co-migre avec de l'ADN de ~ 50 pb. Ce colorant jaune a été ajouté pour permettre aux élèves de visualiser facilement l'échantillon.

La PCR dans un thermocycler

L'amplification par PCR a lieu dans un thermocycler qui effectue des cycles d'étapes de chauffage et de refroidissement en alternance. Ces TP utilisent un cycle à trois étapes : l'ADN subit une dénaturation à 94°C pendant 1 minute, une hybridation à 60°C pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 2 minutes. Ce cycle est répété 40 fois au cours de la progression de l'amplification par PCR. Au cours de la dénaturation, les deux brins de l'ADN matrice sont fondus et séparés pour donner accès aux amorces de la PCR. Au cours de l'étape d'hybridation, les amorces de la PCR reconnaissent et se lient à l'ADN matrice. Une fois que les amorces sont liées, la *Taq* ADN polymérase étend les amorces pour répliquer le segment d'ADN au cours de l'étape d'élongation. La réaction de PCR prendra approximativement 3,5 heures pour être complète.

Les tubes de PCR sont très petits et demandent des précautions lorsqu'ils sont manipulés. Il est important de boucher soigneusement et complètement les tubes avant de les déposer dans le thermocycler. Si les tubes ne sont pas complètement fermés, une évaporation substantielle peut avoir lieu et l'amplification par PCR sera inhibée. Pour obtenir les meilleurs résultats, si vous devez faire fonctionner le thermocycler plus d'une fois (c'est-à-dire, si vous avez plus de 24 échantillons et que vous utilisez le thermocycler Gene Cyclo de Bio-Rad), préparez chaque groupe de réactions des élèves pas plus de 30 minutes avant les cycles de la PCR. Une incubation prolongée de la solution d'amplification et de l'ADN génomique diminue l'efficacité de l'amplification.

Les thermocyclers de Bio-Rad ont été développés pour fonctionner sans huile. De l'huile n'est pas nécessaire dans les puits des blocs thermiques ou dans les tubes des échantillons. Les puits des échantillons ont une certaine forme permettant un contact uniforme avec la plupart des tubes de PCR à paroi fine de 200 µl. **N'utilisez pas des microtubes à essai à paroi fine de 500 µl avec ces thermocyclers.** Le couvercle chauffant du bloc des échantillons maintient une température supérieure au bloc des échantillons à tout moment au cours d'un programme de cycles thermiques. Ceci empêche la vapeur d'eau de se condenser sous le bouchon du tube à échantillon, réduisant de cette manière l'évaporation des échantillons et éliminant le besoin de surcouches d'huile dans les tubes.

La PCR manuelle

Il est possible de réaliser manuellement la PCR sans un thermocycler automatisé, bien que la PCR ne soit pas aussi efficace. Pour une amplification par PCR manuelle, les réactions doivent être réalisées dans des tubes avec des bouchons à vis et surmontés d'une goutte d'huile minérale pour empêcher l'évaporation. Les tubes sont déposés dans un bloc thermique ou dans un bain-marie réglé à 95°C pendant 1 minute, puis ils sont transférés manuellement dans un bloc thermique ou un bain-marie réglé à 60°C pendant 1 minute et finalement ils sont transférés dans un bloc thermique ou dans un bain-marie réglé à 72°C pendant 2 minutes. Quarante cycles de PCR manuelle doivent prendre ~ 3 heures. C'est fastidieux mais cela fonctionne. Bonne chance!

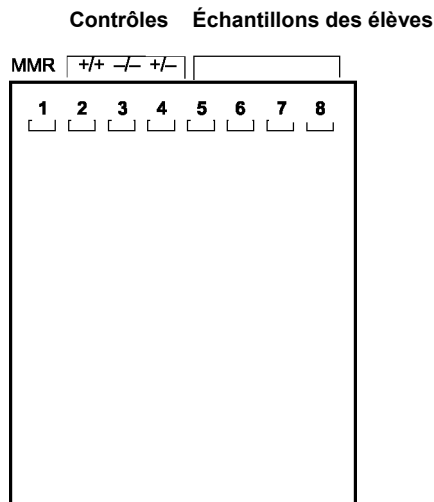
Cours 3 – Electrophorèse sur gel des échantillons de PCR amplifiés et coloration des gels d'agarose

Préparation des échantillons pour l'électrophorèse

Avant de soumettre les échantillons amplifiés à une électrophorèse, les élèves doivent ajouter 10 µl de tampon de charge PV92 XC 5X dans chacun de leurs tubes de PCR. Le tampon de charge d'ADN contient du glycérol qui augmente la densité de l'échantillon et assure qu'il sombre dans le puits du gel d'agarose. En outre, le tampon de charge d'ADN contient un colorant appelé le Xylène Cyanole qui co-migre à la même vitesse qu'un fragment d'ADN de 4000 pb vers l'anode.

Quel volume d'échantillon de PCR vaut-il mieux charger sur les gels?

Pour une visibilité optimale, vous devez charger 10 µl de chaque échantillon contrôle, 10 µl de marqueurs de poids moléculaire EZ Load (standard d'ADN) et 20 µl des échantillons amplifiés des élèves, sur chaque gel. Un modèle de gel est fourni ci-dessous et la configuration du gel est également décrite (Figure 7).



Configuration du gel (1 gel pour 4 élèves ; 8 gels pour 32 élèves)

Couloir	Echantillon	Volume de chargement
1	MPM	10 µl
2	Contrôle homozygote (+/+)	10 µl
3	Contrôle homozygote (-/-)	10 µl
4	Contrôle hétérozygote (+/-)	10 µl
5	Elève 1	20 µl
6	Elève 2	20 µl
7	Elève 3	20 µl
8	Elève 4	20 µl

* MPM = marqueurs de poids moléculaire (standard d'ADN)

Fig. 7. Modèle de gel et ordre suggéré de chargement des échantillons.

Coloration des gels

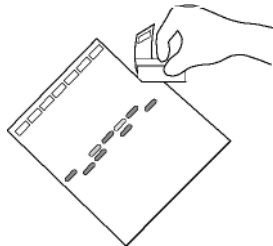
Des instructions détaillées sur l'utilisation du colorant d'ADN Fast Blast sont incluses dans le manuel de l'élève. **A cause de l'épaisseur des gels, un mouvement de bascule doux sur une table à agitation produit une coloration plus efficace.**

Les gels peuvent être également colorés et visualisés avec du bromure d'éthidium (non inclus dans le kit). Si vous utilisez du bromure d'éthidium comme colorant, les gels doivent contenir 0,05 µg/ml de bromure d'éthidium dans l'agarose. Cette concentration de bromure d'éthidium produit un contraste maximal des bandes amplifiées. Remarque : Le colorant d'ADN Fast Blast stoppe la coloration du bromure d'éthidium, aussi il vous faut visualiser avec le bromure d'éthidium avant le colorant Fast Blast.

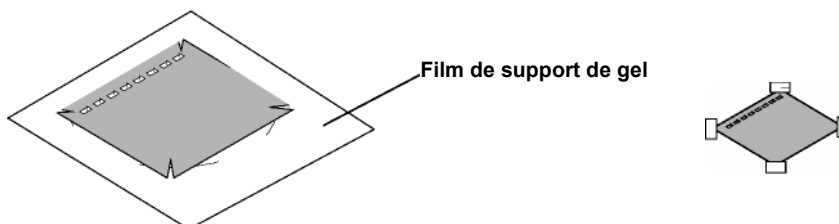
Cours 4 – Analyse et interprétation des résultats

Une fois que le gel a été coloré avec le colorant d'ADN Fast Blast (en utilisant le mode opératoire de coloration soit rapide soit pendant une nuit), il sera analysé. Parce que les bandes palissent légèrement lors du séchage du gel, il vaut mieux analyser les gels colorés avant le séchage. Les gels peuvent être éclairés par en-dessous pour amplifier la visualisation des bandes.

- a. Déposez votre gel sur un fond clair et enregistrez vos résultats en faisant un schéma comme suit. Placez une feuille transparente de plastique ou d'acétate sur le gel. Avec un marqueur permanent, tracez les puits et les aspects des bandes sur la feuille en plastique pour fabriquer une image qui réplique votre gel. Retirez la feuille en plastique pour une analyse ultérieure. Ou bien, les gels peuvent être photocopiés sur une feuille jaune de film transparent pour un contraste optimal.
- b. Séchez le gel d'agarose comme enregistrement permanent de l'expérience.
 - i. Découpez tous les couloirs non chargés avec un couteau ou une lame de rasoir. Coupez votre gel du haut vers le bas pour éliminer les couloirs dans lesquels vous n'avez pas chargé des échantillons.



- ii. Déposez le gel directement sur le côté hydrophile d'un morceau de film de support de gel. (L'eau formera des billes sur le côté hydrophobe d'un morceau de film de support de gel.) Centrez le gel et éliminez les bulles qui peuvent se former entre le gel et le film. Déposez le film sur une serviette en papier et laissez-le sécher dans une zone bien ventilée, en vous assurant d'éviter une exposition directe à la lumière. Alors que le gel sèche, il se fixera au film mais ne rétrécira pas. S'il n'est pas dérangé sur le film de support, le gel séchera complètement à température ambiante après 2 à 3 jours. Le résultat sera un enregistrement plat, transparent et durable de l'expérience.

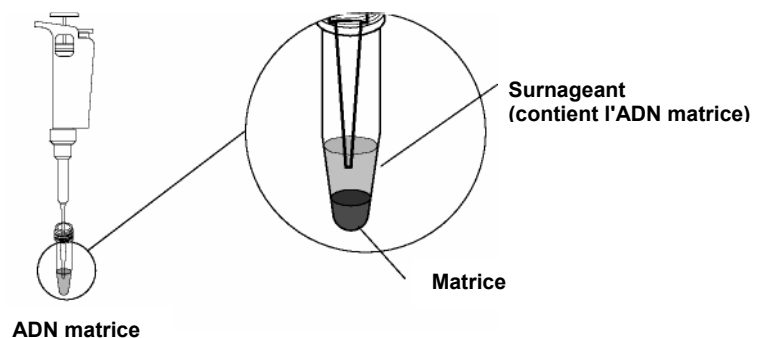


Interprétation des résultats et guide dépannage

Explications pour les “couloirs vides” ou les échantillons non amplifiés

Des explications multiples peuvent justifier les échantillons des élèves qui ne sont pas amplifiés dans les réactions de PCR.

1. **Un recueil inadéquat des cellules de la joue.** Un culot cellulaire visible d'environ la taille d'une tête d'allumette doit être obtenu après la centrifugation du bain de bouche salin. Si aucun culot cellulaire n'est visible ou si le culot est trop petit, davantage de solution saline utilisée pour se rincer la bouche peut être centrifugée jusqu'à l'obtention d'un culot de la taille souhaitée. Toutefois, il n'est pas recommandé de recueillir plus de 3 ml de cellules (voir le point ci-dessous).
2. **Un nombre excessif de cellules.** Tout comme trop peu de cellules ne produiront pas assez d'ADN génomique, un nombre excessif de cellules saturera la capacité de la matrice InstaGene, entraînant une petite ou aucune amplification.
3. **La matrice InstaGene non transférée.** Chaque poste de travail est équipé de tubes de matrice InstaGene qui ont été aliquotés par l'enseignant et déposés sur de la glace. Ces tubes de matrice doivent être homogénéisés avant chaque pipetage pour amener les billes en suspension. Si aucune bille n'a été transférée dans le tube des élèves, les cations bivalents ne seront pas éliminés de la préparation d'ADN génomique et la réaction de PCR sera inhibée.
4. **Le transfert de matrice InstaGene dans la réaction de PCR.** Bien que les billes de la matrice InstaGene soient nécessaires pour la préparation de l'ADN matrice, il est important que la matrice InstaGene ne soit pas transférée dans la réaction de PCR. Si des billes sont transférées dans le tube de PCR, les ions magnésium dont la *Taq* polymérase a besoin, seront éliminés et la réaction de PCR sera inhibée.



Interprétation des échantillons hétérozygotes

1. **Compétition au cours de l'amplification.** L'amplification des échantillons hétérozygotes est plus difficile que les deux amplifications d'homozygotes à cause de la compétition entre les réactions qui produisent les bandes plus petites (641 pb) et plus grosses (941 pb). Parce que la bande plus petite de 641 pb est amplifiée plus efficacement que la bande de 941 pb, les échantillons hétérozygotes sur les gels d'agarose montreront la bande plus petite comme étant plus intense que la bande plus grosse (voir la bande indiquée par un astérisque sur le gel ci-dessous). **Un examen soigneux des gels est nécessaire pour faire la distinction entre des individus hétérozygotes (+/-) et homozygotes (-/-).** Ou bien, l'utilisation de bromure d'éthidium et un instrument de photodocumentation (le système de documentation de gels de Bio-Rad) augmentera la sensibilité et rendra plus facile la visualisation des échantillons hétérozygotes pâles.
2. **Bande plus grosse dans les échantillons (+/-).** Les échantillons hétérozygotes contiendront souvent des bandes plus grosses qui migrent à ~ 1100 pb et à 1700 pb dans le gel (voir les bandes indiquées par des flèches sur le gel ci-dessous). Ces bandes sont des hétéroduplex qui se forment entre les brins de 641 et 941 nucléotides et qui contiennent la structure secondaire qui fait que les bandes d'ADN migrent à une vitesse plus lente dans le gel (Figure 8).

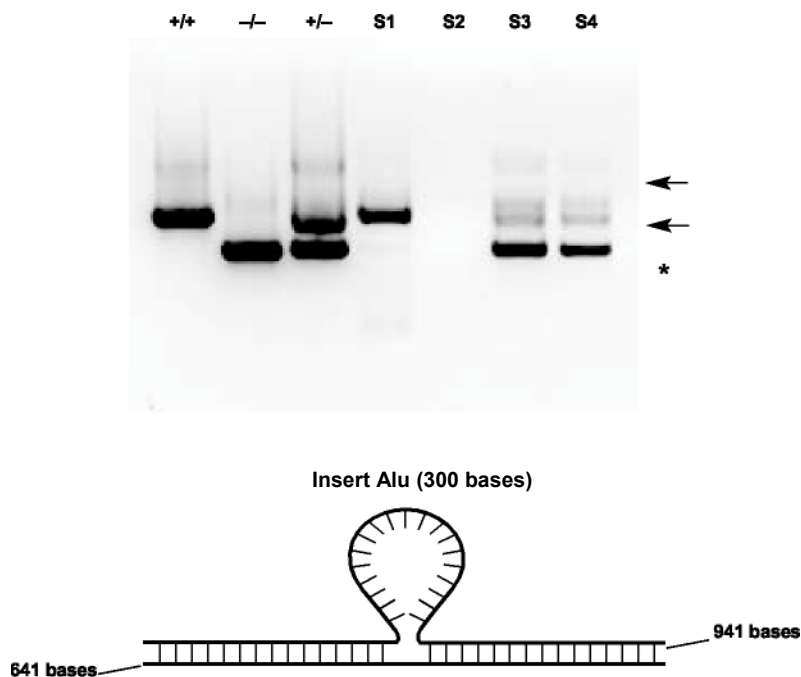
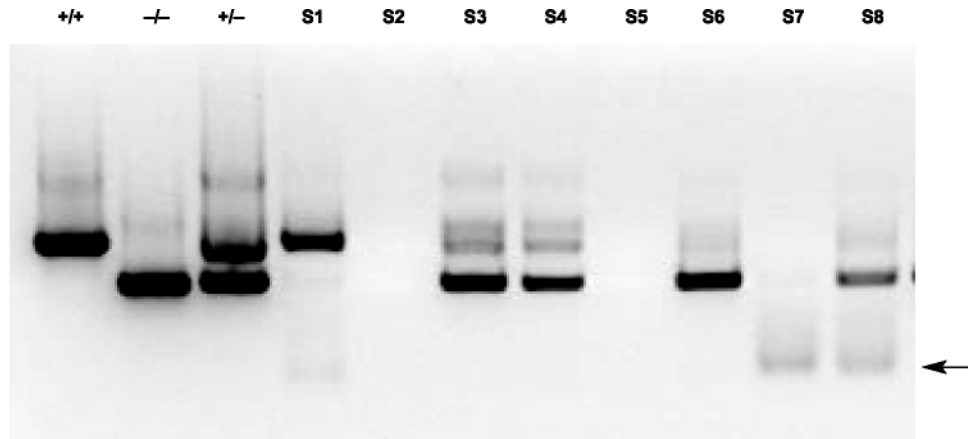


Fig. 8. Hétéroduplex formé entre les brins de 641 et 941 nucléotides.

3. **Formation de dimères d'amorces.** Certaines réactions PCR peuvent montrer la formation de dimères d'amorces. Les dimères d'amorces sont des bandes que l'on observe en bas des gels et qui correspondent à des complexes des deux amorces. La formation de dimères d'amorces est plus intense dans les réactions qui montrent peu ou pas de produit amplifié. Ainsi, la formation de dimères d'amorces est plus susceptible de survenir dans des tubes réactionnels avec une contamination avec de la matrice InstaGene, peu ou pas de matrice, ou dans des échantillons qui ont été préparés bien en avance du dépôt dans le thermocycler. La flèche sur la figure ci-dessous montrent des dimères d'amorces.

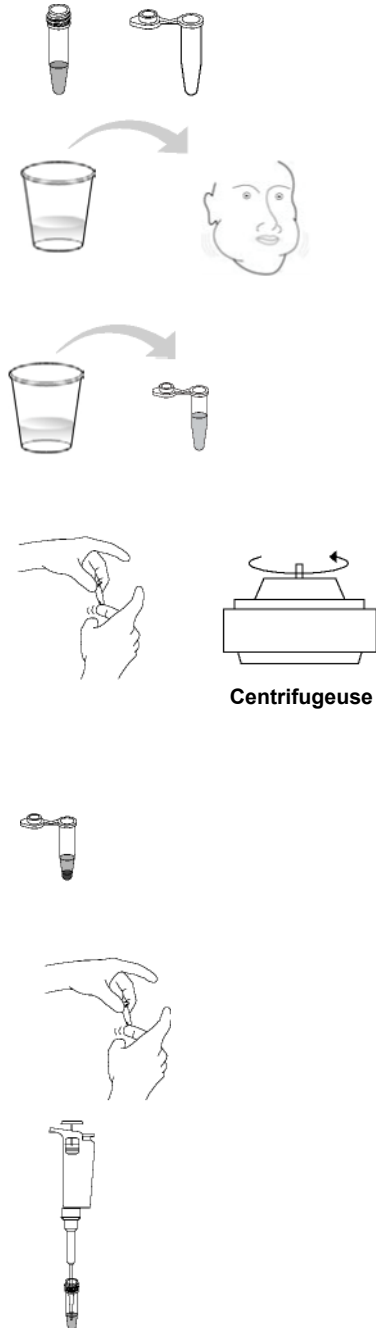


4. **Des bandes semblent pâlir.** Le colorant bleu dans le colorant d'ADN Fast Blast est sujet à un blanchiment réversible lorsqu'il est exposé à des lumières brillantes dans la pièce. Lorsque les gels séchés sont examinés 3 à 5 jours après le séchage, les bandes peuvent sembler pâlir. Le placement des gels dans un endroit sombre (dans une boîte ou collés dans un cahier fermé) et leur examen plusieurs heures plus tard fourniront les bandes les plus intenses. Le plus pratique est de laisser les gels sécher sur la pailasse des TP pendant 3 à 5 jours, de les coller dans un cahier de TP et d'examiner les gels le jour suivant.

Mode opératoire

Cours 1 – Préparation d'ADN matrice de cellules de la joue

1. Etiquetez un microtube à essai de 1,5 ml avec vos initiales. Etiquetez un tube avec bouchon à vis contenant 200 μ l de matrice InstaGene avec vos initiales.
2. Demandez à votre enseignant un récipient contenant de la solution saline. Versez la solution saline dans votre bouche et rincez vigoureusement pendant 30 secondes. Recrachez la solution saline dans le récipient.
3. Transférez 1 ml de votre solution saline dans le microtube à essai (PAS le tube avec bouchon à vis) portant vos initiales. Si vous ne disposez pas de micropipette P-1000, versez **soigneusement** ~ 1 ml de votre rinçage salin dans votre microtube à essai (utilisez les graduations figurant sur le côté du microtube à essai pour estimer 1 ml).
4. Centrifugez votre tube dans une centrifugeuse équilibrée à pleine vitesse pendant 2 minutes. Lorsque la centrifugeuse s'est complètement arrêtée, retirez votre tube. Vous devez observer un culot de cellules blanchâtres de la taille d'une tête d'allumette au fond du tube. Si vous n'observez pas un culot de cette taille, décantez la solution saline, remplissez votre tube avec davantage de rinçage oral et répétez la centrifugation.
5. Après la formation d'un culot de vos cellules, déversez la solution saline. En prenant soin de ne pas perdre votre culot, séchez brièvement votre tube sur une serviette en papier ou un tissu. Il n'y a pas de problème si une petite quantité de solution saline (< 50 μ l, environ la même taille que votre culot) demeure au fond du tube.
6. Remettez le culot en suspension avec un vortex ou en tapotant le tube de manière à ce qu'aucun agrégat cellulaire ne demeure.
7. En utilisant une micropipette à volume ajustable de 2 à 20 μ l réglée sur 20 μ l, transférez la totalité de vos cellules remises en suspension dans le tube avec bouchon à vis contenant la matrice InstaGene.
8. Vissez fermement le bouchon sur le tube. Agitez ou passez au vortex pour mélanger le contenu du tube.



9. Lorsque tous les membres du groupe ont recueilli leurs échantillons, déposez les tubes dans le support des microtubes à essai en mousse et incubez à 56°C pendant 10 minutes dans un bain-marie. A mi-temps (5 minutes), agitez ou passez au vortex les tubes doucement puis remettez-les dans le bain-marie à 56°C pendant les 5 minutes restantes.



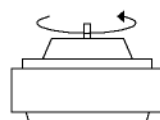
56°C, 10 min

10. Retirez les tubes, agitez ou passez au vortex et déposez les tubes dans un bain-marie bouillant (100°C). Incubez à 100°C pendant 5 minutes.



100°C, 5 min

11. Retirez les tubes du bain-marie bouillant et agitez ou passez au vortex le contenu pour remettre en suspension. Transformez la matrice en culot par centrifugation à 6000 x g pendant 5 minutes (ou 2000 x g pendant 10 minutes) dans une centrifugeuse.



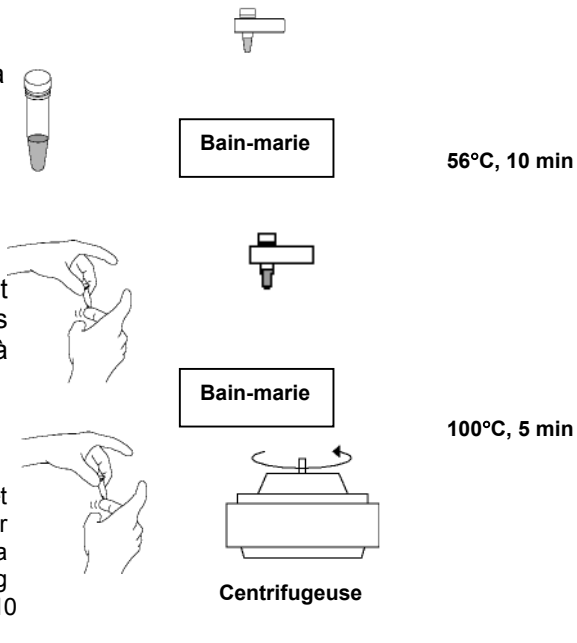
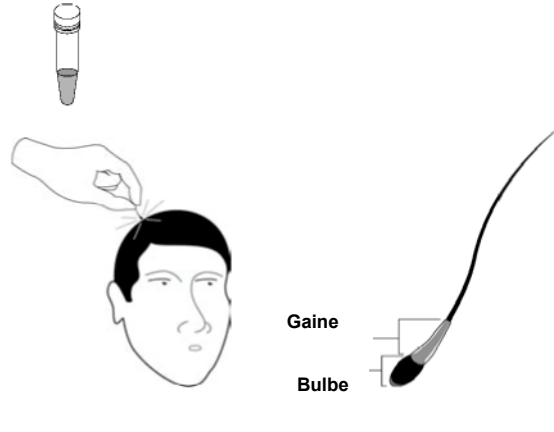
Centrifugeuse

12. Stockez votre tube avec bouchon à vis dans le réfrigérateur jusqu'à la période de travaux pratiques suivante (ou passez à l'étape 2 du Cours 2).

Mode opératoire

Cours 1 – Préparation de l'ADN matrice de follicule pileux

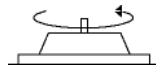
1. Inscrivez vos initiales sur 1 tube avec bouchon à vis contenant 200 µl de matrice InstaGene plus protéase.
2. Prélevez 2 cheveux sur vous-même. Choisissez des cheveux qui présentent une gaine visible (revêtement de cellules épithéliales près de la base du cheveu) soit une racine de bonne taille (base du cheveu en forme de bulbe). Coupez le cheveu, en laissant les ~ 2 derniers cm de la base du cheveu. Déposez les cheveux coupés dans le tube avec bouchon à vis portant vos initiales.
3. Placez votre tube dans le support de microtubes à essai en mousse et incubez à 56°C pendant 10 minutes dans un bain-marie. Au milieu de la période (5 minutes), agitez ou passez doucement au vortex, puis remettez-le dans le bain-marie à 56°C pour les 5 minutes restantes.
4. Retirez les tubes, agitez-les doucement ou passez-les au vortex et déposez-les dans un bain-marie (100°C). Incubez à 100°C pendant 5 minutes.
5. Retirez les tubes du bain-marie bouillant et agitez ou passez au vortex le contenu pour remettre en suspension. Transformez la matrice en culot par centrifugation à 6000 x g pendant 5 minutes (ou 2000 x g pendant 10 minutes) dans une centrifugeuse.
6. Stockez votre tube avec bouchon à vis dans le réfrigérateur jusqu'à la période de travaux pratiques suivante (ou passez à l'étape 2 du cours 2).



Mode opératoire

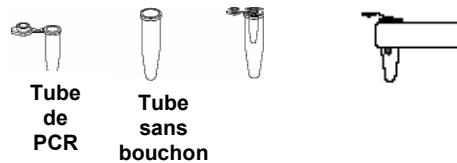
Cours 2 – Amplification par PCR

1. Sortez le tube contenant votre ADN matrice du réfrigérateur. Centrifugez le tube avec bouchon à vis pendant 2 minutes à 6000 x g (5 minutes à 2000 x g) dans une centrifugeuse.



Centrifugeuse

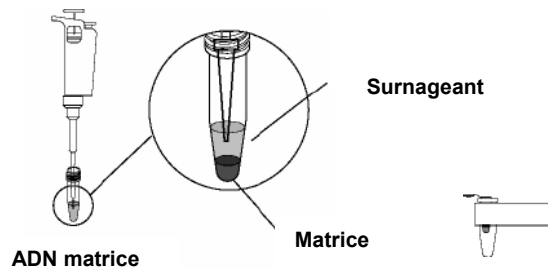
2. Inscrivez vos initiales sur un tube de PCR et sur un microtube à essai sans bouchon. Placez le tube de PCR dans le tube sans bouchon comme il est illustré et placez les deux tubes dans le support en mousse.



Tube de PCR

Tube sans bouchon

3. Transférez 20 µl de l'ADN matrice (le surnageant) du tube avec bouchon à vis dans le fond du tube de PCR. Prenez soin de **ne pas** transférer des billes de la matrice dans le tube de PCR.

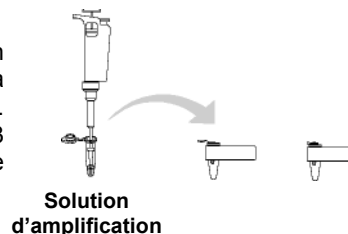


Surnageant

ADN matrice

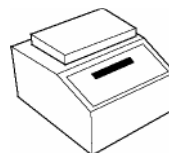
Matrice

4. Placez le tube de la solution d'amplification jaune sur de la glace et transférez 20 µl de la solution d'amplification dans le tube de PCR. Mélangez en aspirant et en expulsant 2 ou 3 fois avec une pipette. Bouchez bien le tube de PCR. Le mélange doit être jaune.

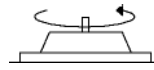


Solution d'amplification

5. Placez le tube de PCR dans le thermocycler. A ce moment-là, placez également les réactions contrôles préparées par l'enseignant dans la machine de PCR. Les réactions doivent être soumises à 40 cycles d'amplification par PCR.



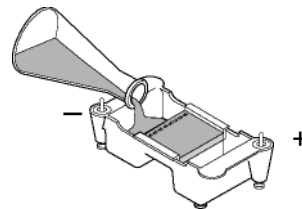
- Sortez votre tube de PCR du thermocycler et placez-le dans le microtube à essai sans bouchon. Centrifugez le tube pendant ~ 3 secondes à 2000 x g.



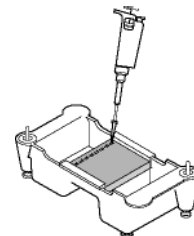
Centrifugeuse

- Ajoutez 10 µl de tampon de charge PV92 XC dans votre tube de PCR et mélangez doucement.
- Placez un gel d'agarose dans l'appareil d'électrophorèse. Vérifiez que les puits des gels d'agarose se trouvent près de l'électrode noire (-) et que la base du gel se trouve près de l'électrode rouge (+).

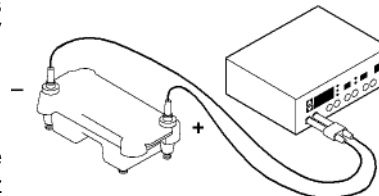
- Remplissez la chambre d'électrophorèse et couvrez le gel de tampon TAE 1X. Ceci nécessitera ~ 275 ml de tampon 1X.
- En utilisant un embout propre pour chaque échantillon, chargez les échantillons dans 8 puits du gel dans l'ordre suivant :



	Echantillon	Volume de chargement
1	MPM (standards d'ADN)	10 µl
2	Contrôle homozygote (+/+)	10 µl
3	Contrôle homozygote (-/-)	10 µl
4	Contrôle hétérozygote (+/-)	10 µl
5	Elève 1	20 µl
6	Elève 2	20 µl
7	Elève 3	20 µl
8	Elève 4	20 µl

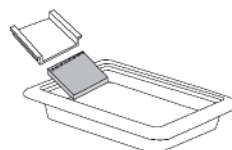


- Fixez le couvercle sur la cuve. Le couvercle ne se fixera sur la base que dans une seule orientation : rouge sur rouge et noir sur noir. Branchez les fils électriques à l'alimentation électrique.
- Allumez l'alimentation électrique et soumettez vos échantillons à une électrophorèse à 100 V pendant 30 minutes.



Coloration des gels d'agarose

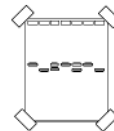
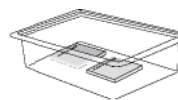
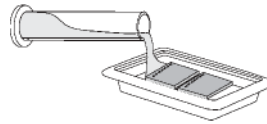
- Lorsque l'électrophorèse est terminée, éteignez le courant et retirez le couvercle de la cuve. Retirez soigneusement le plateau de gels et le gel de la cuve. Faites attention, **le gel est très glissant**. Délogez le gel du plateau de gels avec votre pouce et glissez-le soigneusement dans votre plateau de coloration en plastique.



2. Il existe deux modes opératoires pour la coloration de votre gel. Votre enseignant vous dira lequel suivre.

**Mode opératoire 1 : Coloration rapide
(nécessite 12 à 15 minutes)**

- Ajoutez 120 ml de colorant Fast Blast 100X dans votre plateau de coloration (2 gels par plateau).
- Colorez les gels pendant 2 minutes avec une agitation douce. Gardez le colorant utilisé pour un usage ultérieur. Le colorant peut être réutilisé au moins 7 fois.
- Transférez les gels dans un grand récipient de lavage et rincez avec de l'eau du robinet chaude (40 à 55°) pendant approximativement 10 secondes.
- Décolorez en les lavant chacun **deux fois** dans de l'eau du robinet chaude pendant 5 minutes en agitant doucement pour obtenir les meilleurs résultats.
- Placez le gel sur un fond clair et enregistrez votre résultat. Avec un marqueur permanent, tracez les puits et les aspects des bandes sur une feuille de plastique transparent ou une feuille d'acétate.
- Avec l'aide de votre enseignant, déterminez si vous êtes homozygote ou hétérozygote pour l'insertion de Alu.
- Découpez tous les couloirs vides du gel avec un couteau ou une lame de rasoir.
- Pour obtenir un enregistrement permanent, séchez à l'air le gel sur le film de support du gel. Collez le gel séché dans votre cahier de TP. Éviter toute exposition du gel coloré à une lumière directe qui fera pâlir les bandes.



Mode opératoire 2 : Coloration pendant une nuit

- Ajoutez 120 ml de colorant d'ADN Fast Blast 1X dans votre plateau de coloration (2 gels par plateau).
- Laissez les gels se colorer pendant une nuit, avec une agitation douce pour obtenir les meilleurs résultats. Aucune décoloration n'est nécessaire.
- Le jour suivant, videz le colorant dans un bécher à déchet.
- Placez le gel sur un fond clair et enregistrez votre résultat. Avec un marqueur permanent, tracez les puits et les aspects des bandes sur une feuille de plastique transparent ou une feuille d'acétate.
- Avec l'aide de votre enseignant, déterminez si vous êtes homozygote ou hétérozygote pour l'insertion de Alu.
- Découpez tous les couloirs vides du gel avec un couteau ou une lame de rasoir.
- Pour obtenir un enregistrement permanent, séchez à l'air le gel sur le film de support du gel. Collez le gel séché dans votre cahier de TP. Éviter toute exposition du gel coloré à une lumière directe qui fera pâlir les bandes.

