

KIT RAPID'PCR

Réf. 912 023

Objectifs de l'expérience

Grâce à cette expérience, les étudiants comprendront le principe de la Réaction en Chaîne par Polymérase (en anglais Polymerase Chain Reaction) en trois étapes. En utilisant la PCR ainsi que l'électrophorèse sur gel d'agarose, ils pourront analyser un fragment d'ADN du phage lambda grâce à un processus rapide en deux étapes.

Table des matières

• Composants de l'expérience	Page 2
• Equipements nécessaires	Page 3
• Informations générales	Page 4
• Procédures de l'expérience	
○ Vue d'ensemble de l'expérience	Page 8
○ Module I : Amplification du phage lambda	Page 9
○ Vue d'ensemble de l'électrophorèse sur gel d'agarose et de sa coloration	Page 10
○ Module II-A : Séparation du produit PCR par électrophorèse (Colorant SYBR® Safe)	Page 11
○ Module II-B : Séparation du produit PCR par électrophorèse (Colorant Improved FlashBlue™)	Page 14
○ Questions d'études	Page 17
• Guide de l'instructeur	Page 18
○ Préparations préalables	Page 19
○ Résultats de l'expérience et Analyse	Page 22
○ Réponses – Questions d'études	Page 23
• Annexes	Page 24
○ A – Guide d'aide EDVOTEK®	Page 25
○ B – Réaliser l'expérience PCR avec deux bains-marie	Page 26
○ C – Préparation du tampon d'électrophorèse et des gels d'agarose	Page 27

Composants de l'expérience

Composants	Conservation	Validation (✓)
A – Mélange pour l'amorce LyphoPrimer™	-20°C	<input type="checkbox"/>
B – Echelle ADN EdvoQuick™	-20°C	<input type="checkbox"/>
C – Phage Lambda LyphoTemplate™	-20°C	<input type="checkbox"/>
D – Tampon TE	-20°C	<input type="checkbox"/>
PCR EdvoBeads™	Température ambiante	<input type="checkbox"/>

Chaque kit EdvoBeads™ contient : un mélange dNtP, un tampon d'ADN Polymérase Taq, l'ADN Polymérase Taq, du chlorure de sodium (MgCl₂) et un tampon de réaction.

Note : les composants A et C sont fournis dans les formats LyphoPrimer™ et LyphoTemplate™. Ces composants devront être reconstitués avant utilisation. Consultez la page 19 du guide de l'instructeur pour plus d'informations.

REACTIFS ET FOURNITURES

Conservez les composants ci-dessous à température ambiante.

Composants	Validation (✓)
UltraSpec-Agarose™	<input type="checkbox"/>
Tampon d'électrophorèse (50X)	<input type="checkbox"/>
Colorant SYBR® Safe	<input type="checkbox"/>
Colorant FlashBlue™	<input type="checkbox"/>
Tubes de micro centrifugeuse	<input type="checkbox"/>
Tubes PCR	<input type="checkbox"/>

Cette expérience est conçue pour 10 groupes de travail.

Tous les composants de l'expérience sont destinés à des recherches éducatives seulement. Ils ne conviennent pas à un usage diagnostique ou à titre médicamenteux et ne peuvent être administrés ou consommés par des humains ou des animaux.

ATTENTION !

Les conditions de cycle PCR ont été modifiées. Veuillez revoir vos paramètres de programmation PCR avant de débiter l'expérience.

Equipements nécessaires

- Un thermocycleur (de préférence #541 EDVOTEK®) ou deux bains-marie*
- Une cuve d'électrophorèse pour gels horizontale
- Une source d'alimentation
- Une micro centrifugeuse
- Un transilluminateur d'UV ou un système de visualisation à l'aide de la lumière bleue (en cas d'utilisation du colorant SYBR® Safe)
- Une paire de lunettes de sécurité anti-UV (en cas d'utilisation du colorant SYBR® Safe)
- Un système de visualisation à l'aide de la lumière blanche (en cas d'utilisation du colorant FlashBlue™)
- Des micropipettes automatiques avec embouts (5-50µL)
- Un four à micro-ondes
- Une poire à pipeter
- Des flacons ou béchers de 250ml
- Des gants de protection contre la chaleur
- Des gants de laboratoire jetables
- De la glace et des seaux à glace
- De l'eau distillée ou desionisée

*Si vous ne possédez pas de thermocycleur, cette expérience peut être réalisée avec précaution à l'aide de trois bains-marie (de préférence #544 EDVOTEK®). Toutefois, l'utilisation d'un thermocycleur assure un taux plus élevé de réussite de l'expérience. Pour plus d'informations, consultez l'annexe B de la notice.

Informations générales

La Réaction en Chaîne par Polymérase

En 1984, le biochimiste Kary Mullis a révolutionné le domaine de la biologie moléculaire en concevant une méthode simple et agile permettant de copier des segments spécifiques d'ADN. Mullis a découvert qu'il était possible de dupliquer un ADN *in vitro* en utilisant des petits oligonucléotides synthétiques d'ADN (aussi connues sous le nom d'amorces) et de l'ADN polymérase I dans un processus similaire à la réplication d'ADN dans un noyau cellulaire. Grâce au fait que les chercheurs puissent modifier les amorces afin de cibler un gène en particulier, cette méthode a permis l'amplification plus rapide de la séquence d'ADN sélectionnée. Mullis a reçu le Prix Nobel de Chimie en 1993 pour le développement de cette technique, aujourd'hui connue sous le nom de Réaction en Chaîne par Polymérase (ou PCR, signifiant Polymerase Chain Reaction en anglais).

Avant de réaliser une PCR (ou RCP), de l'ADN matrice est d'abord extraite d'un prélèvement biologique. Deux amorces sont alors créées pour correspondre aux extrémités 5' et 3' de la séquence ciblée. L'ADN matrice et les amorces sont donc mélangées avec le tampon, les quatre deoxynucléotides libres (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) ainsi qu'avec une ADN polymérase thermostable (Taq). Ensuite, le mélange PCR est soumis à des cycles de chauffage et de refroidissement successifs à différentes températures afin d'amplifier l'ADN.

- Lors de la première étape, nommée « la dénaturation », le mélange est chauffé à 94°C pour interrompre les liaisons hydrogènes entre les brins complémentaires. Cela fait en sorte que l'ADN ciblé se décompresse en un seul brin (ou alors qu'il fonde). Il est très important d'utiliser une ADN polymérase thermostable lors d'une PCR puisque son enzyme reste stable même lorsqu'il est soumis à de fortes températures.
- Ensuite, lors de la deuxième étape, nommée « l'hybridation », le mélange réactionnel est refroidi entre 45°C et 65°C. Cela permet aux amorces de se fondre avec la séquence ADN ciblée.
- Enfin, lors de la dernière étape, nommée « la synthèse », la température est élevée à 72°C. Cette température est optimale pour la Taq polymérase car elle lui permet d'ajouter des nucléotides à l'extrémité 3' de l'amorce, permettant la synthèse d'un nouveau brin d'ADN.

Ensemble, ces trois étapes – la dénaturation, l’hybridation et la synthèse – créent un cycle PCR (cf. Illustration 1). Pour simplifier ce processus, une machine spécialisée, appelée « thermocycleur » ou « machine PCR », a été créée pour chauffer et refroidir les échantillons plus rapidement.

Chaque cycle PCR double la quantité d’ADN ciblé en moins de cinq minutes. C’est donc une technique très sensible puisque seulement quelques reproductions de l’ADN matrice sont nécessaires pour la production d’une grande quantité de signaux. Mathématiquement, la PCR est décrite comme une fonction exponentielle : si nous débutons avec un chiffre de base de copie m , après n cycles, nous aurons $m \times 2^n$ copies de notre ADN ciblé. Par exemple, si nous commençons avec une seule copie de notre cible, nous aurons donc deux copies après le premier cycle PCR, quatre copies après le second cycle, huit copies après le troisième cycle et ainsi de suite. Autrement dit, le premier cycle correspond à 1×2^1 , le deuxième cycle à 1×2^2 , et le cycle 3 à 1×2^3 .

Après n cycles, nous aurons donc 1×2^n copies de notre ADN ciblé. Pour produire assez d’ADN pour notre analyse, vingt à quarante cycles peuvent être nécessaires. Après de nombreux cycles (indépendamment de la quantité d’ADN présente dans le prélèvement de base), la quantité d’ADN produite atteint la quantité maximum de produit que l’on nomme le plateau ou le niveau. Ceci est dû à la diminution de réaction des composants comme les amorces et les nucléotides et au manque d’activité de la polymérase Taq.

Grâce à sa facilité d’utilisation et à sa capacité d’amplifier l’ADN rapidement, la PCR est devenue indispensable aux milieux médical et scientifique, avec une efficacité incomparable à des méthodes traditionnelles plus coûteuses en temps et en énergie. Les laboratoires de recherches peuvent maintenant générer rapidement des copies d’un segment ADN en particulier pour des applications de clonage par exemple. Les diagnostics médicaux utilisent la PCR pour identifier des mutations génétiques ou des agents infectieux. De plus, puisque l’amplification par PCR requiert peu de matériel de base, il est donc idéal de l’utiliser pour des analyses légales d’échantillons biologiques ou encore pour des tests de paternité.

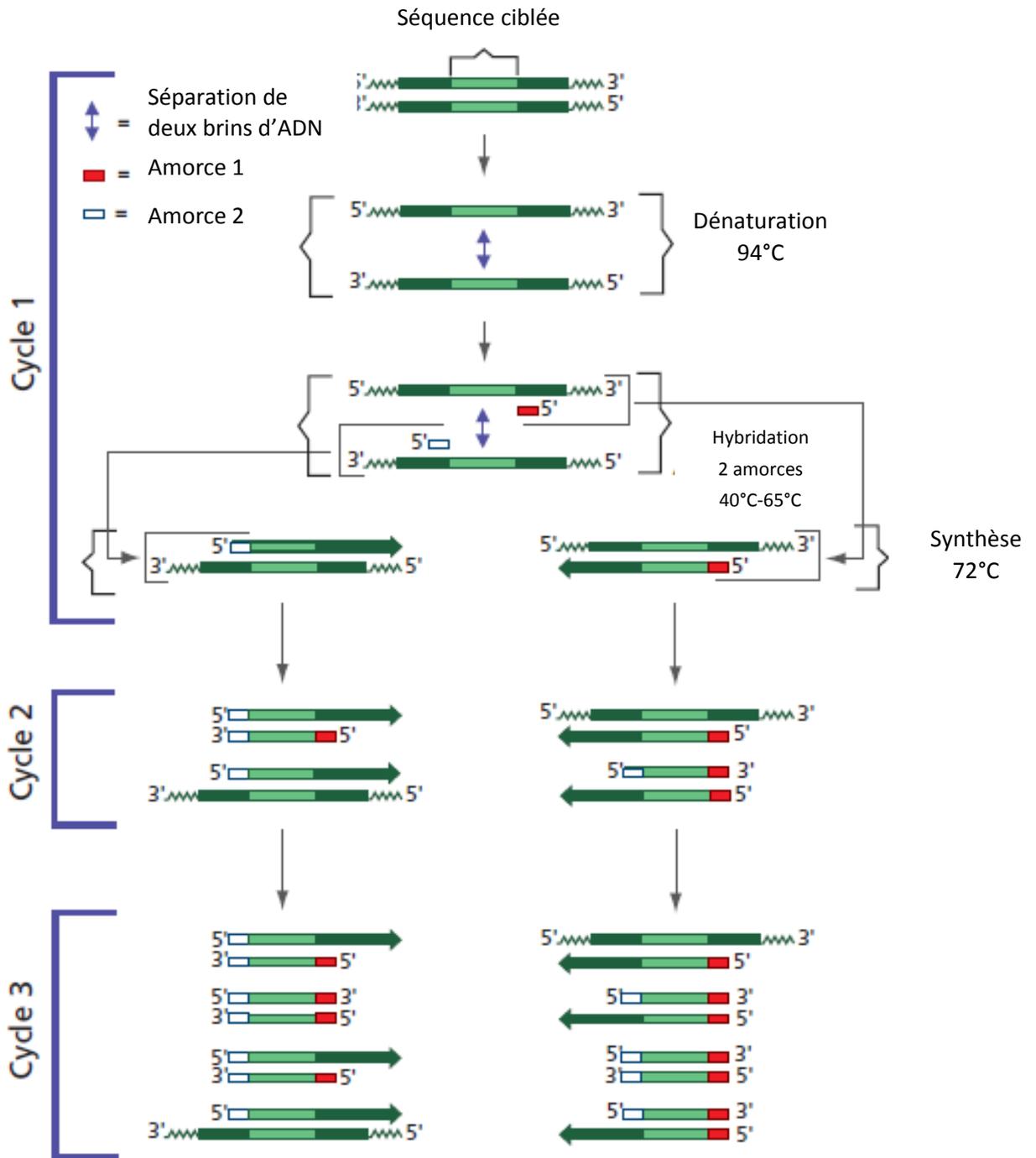


Illustration 1 : la Réaction en Chaîne par Polymérase

REINVENTER LA PCR

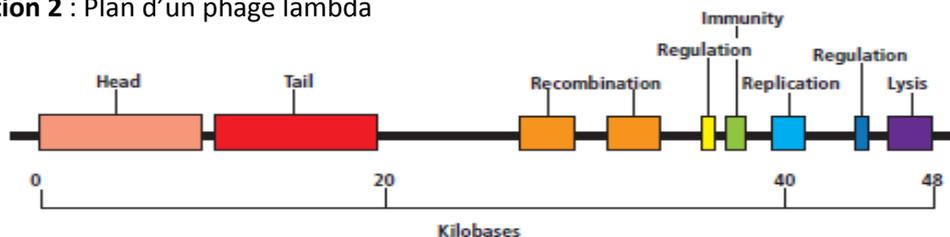
Alors que la PCR est une technique relativement rapide et simple comparée aux techniques traditionnelles appelées « Southern Blot », celle-ci requiert tout de même plusieurs heures pour finaliser l'expérience. En réponse à cela, les chercheurs ont élaboré différentes stratégies pour réduire le temps nécessaire pour amplifier une séquence spécifique. Une de ces stratégies d'économie de temps prend en compte la conception des amorces afin que la température de la dénaturation et de la synthèse soient assez proches. Cela permettrait aux chercheurs de combiner les étapes de dénaturation et de synthèse du traditionnel cycle PCR. Une autre stratégie serait celle de réduire le temps passé à chaque changement de température. En modifiant le programme PCR, les chercheurs pourraient réduire la durée de chaque cycle passant donc de 90 ou 150 secondes à un cycle de 60 secondes ou moins (cf. Tableau 1). Ces changements pourraient donc réduire le temps nécessaire pour réaliser cette expérience d'au moins 50%.

Tableau 1 : Comparaison entre la PCR traditionnelle et rapide

	PCR traditionnelle	PCR rapide
Dénaturation (95°C)	45 secondes	30 secondes
Hybridation (40°C-60°C)	45 secondes	0 seconde
Synthèse (72°C)	45 secondes	30 secondes
TEMPS TOTAL (30 cycles)	~ 70 minutes	~ 30 minutes

Dans cette recherche, nous utiliserons la technique de la PCR rapide pour analyser l'ADN génomique isolé d'un virus qui infecte *E.coli*, aussi connu sous le nom de bactériophage (ou phage) lambda. Historiquement, le phage lambda est un virus important dans le domaine de la biologie moléculaire. Les premières études sur le génome lambda ont aidé à la compréhension de la réplication, la transcription mais aussi à la traduction de l'ADN. Les 48,500 paires de base du génome contiennent l'information nécessaire pour que le virus puisse entrer dans la cellule, produire de nouveaux virions et effectuer la lyse de la cellule hôte (cf. Illustration 2). Les amorces utilisées dans l'expérience ont donc été fabriquées pour amplifier 500 paires de base de la protéine de la capsid virale. Elles ont été conçues pour une température de dénaturation atteignant 71°C, ce qui est proche de la température optimale de l'activité de l'ADN polymérase Taq. Cela nous permet donc de combiner les étapes PCR de dénaturation et de synthèse. Par conséquent, cette amplification complète peut être réalisée en trente minutes, permettant donc aux élèves de pouvoir réaliser une PCR lors d'un seul cours pratique en laboratoire.

Illustration 2 : Plan d'un phage lambda





Vue d'ensemble de l'expérience

LES OBJECTIFS DE L'EXPERIENCE :

Grâce à cette expérience, les étudiants comprendront le principe de la Réaction en Chaîne par Polymérase (en anglais Polymerase Chain Reaction) en trois étapes. En utilisant la PCR ainsi que l'électrophorèse sur gel d'agarose, ils pourront analyser un fragment d'ADN du phage lambda grâce à un processus rapide en deux étapes.

LA SECURITE DU TRAVAIL EN LABORATOIRE :

Prenez soin de lire et de comprendre toutes les instructions avant de commencer l'expérience. Si vous avez un quelconque doute, demandez à votre instructeur.

- Portez des gants et des lunettes de protection dans le laboratoire.
- Faire attention lorsque vous manipulerez dans le laboratoire : vous utiliserez des équipements et des composants qui peuvent être dangereux s'ils ne sont pas utilisés et manipulés avec précaution.
- Portez de gants de protection contre la chaleur lorsque vous manipulerez des réactifs chauds comme de l'eau bouillante ou de l'agarose fondue.
- Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche, utilisez les poires à pipeter !
- Lavez-vous bien les mains avec de l'eau et du savon après avoir réalisé l'expérience.

LES CARNETS DE LABORATOIRE :

Les scientifiques documentent et expliquent tout ce qu'il se passe lors d'une expérience, comme les conditions expérimentales mais aussi les pensées et différentes observations lors du déroulé de celle-ci, et, bien entendu, les informations scientifiques récoltées. Aujourd'hui vous documenterez cette expérience dans un carnet de laboratoire ou sur une feuille vierge.

Avant de commencer l'expérience :

- Lisez attentivement l'introduction et le protocole. Utilisez ces informations pour formuler une hypothèse sur cette expérience.
- Estimez quels seront les résultats de votre expérience.

Pendant l'expérience :

- Notez vos observations.

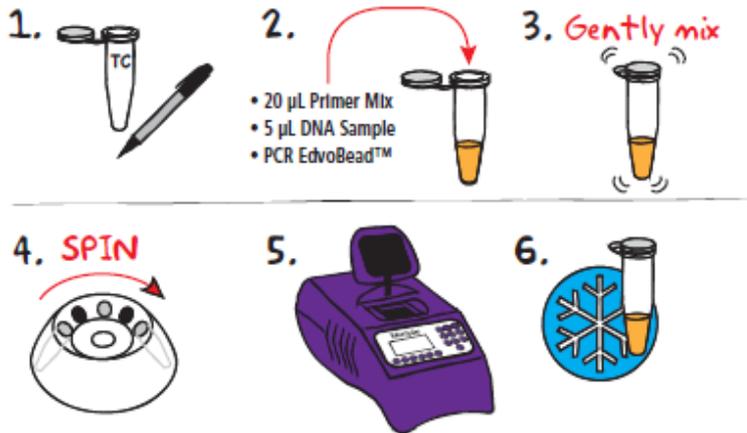
Après l'expérience :

- Interprétez les résultats : est-ce que vos données collectées appuient ou contredisent votre hypothèse ?
- Si vous deviez recommencer cette expérience, que changeriez-vous ? Corrigez votre hypothèse pour expliquer ce changement.

MODULE I	MODULE II
Amplification du phage lambda (45 minutes)	Analyse du produit PCR par électrophorèse (15 à 20 minutes) Optionnel : Coloration des gels d'agarose (5 à 30 minutes)

Les temps indiqués ci-dessus sont approximatifs.

Module I : Amplification du phage lambda



1. **Marquez** votre tube PCR avec vos initiales et le numéro d'échantillon.
2. **Ajoutez** 20µL de mélange pour amorce (jaune), 5µL de prélèvement d'ADN (rouge) et le contenu du kit PCR EdvoBeads™ jusqu'à remplir à peu près 0.2mL du tube PCR.
3. **Mélangez** chaque prélèvement PCR. Assurez-vous que le contenu du kit EdvoBeads™ soit bien dissout. Note : assurez-vous que l'amorce et l'ADN ont bien été ajoutés en regardant la couleur de votre mélange dans le tube PCR. Le mélange doit être orange avec l'amorce et l'ADN mélangés.
4. **Centrifugez** les échantillons pendant quelques secondes afin de faire descendre les prélèvements en bas des tubes.
5. **Amplifiez** l'ADN en utilisant les étapes PCR.

Les conditions de cycles PCR :

- Dénaturation initiale 94°C pendant 3 minutes
 - 94°C pendant 30 secondes
 - 71°C pendant 30 secondes
- } 20 cycles

6. Après la PCR, **placez** les tubes dans la glace. **Procédez** ensuite au Module II : la séparation des produits PCR par électrophorèse.

NOTES ET RAPPELS :

Au moins un témoin négatif doit être réalisé par classe. Pour préparer ce témoin, ajoutez 20µL de mélange d'amorce et 5µL de phage lambda dans un tube PCR.

Aucun contenu PCR EdvoBeads™ ne doit être ajouté.

Si votre thermocycleur ne possède pas de couvercle chauffant, il est nécessaire de recouvrir la réaction PCR avec de la cire pour éviter toute évaporation.

ATTENTION !

Les conditions de cycle PCR ont été modifiées. Veuillez revoir vos paramètres de programmation PCR avant de débiter l'expérience.

POINT OPTIONNEL : Si vous souhaitez procéder au module II plus tard, vous pouvez conserver les prélèvements PCR dans un congélateur à -20°C.

Vue d'ensemble de l'électrophorèse sur gel d'agarose et de sa coloration

1. Préparez le gel d'agarose et sa cuve. Si vous utilisez le colorant SYBR® Safe (méthode de préférence), les indications de préparation du gel se trouvent à la page 11. Si vous utilisez le colorant FlashBlue™, les indications de préparation du gel se trouvent page 14.

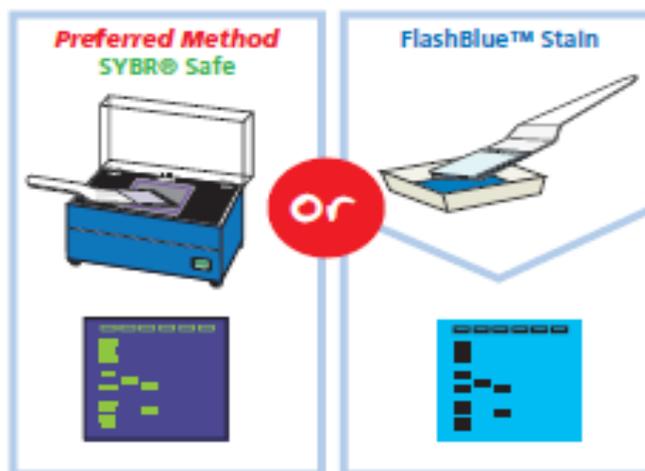
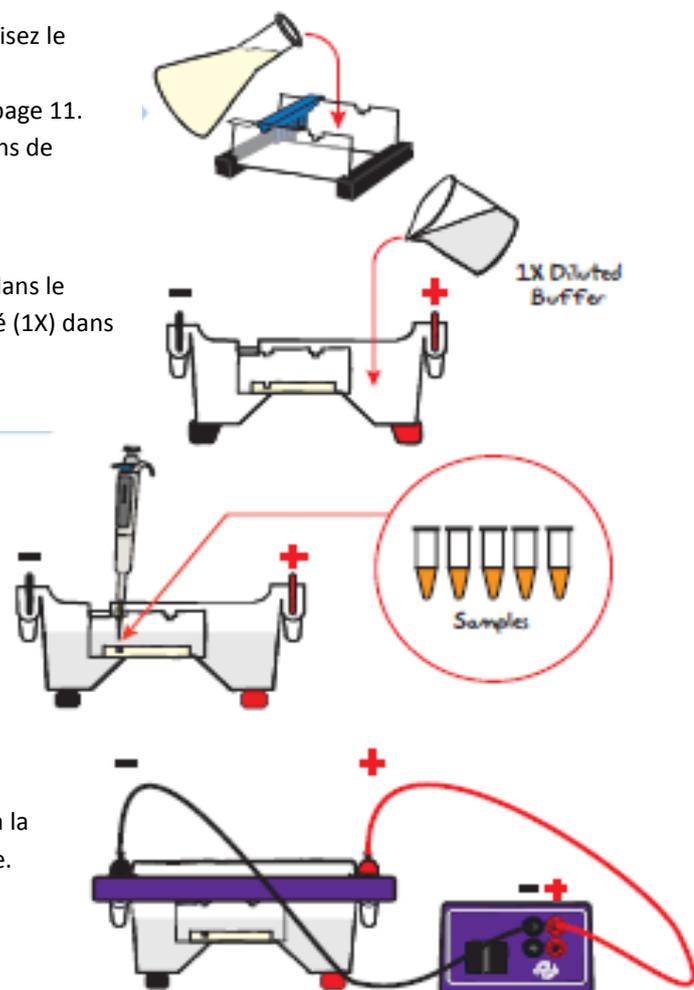
2. Retirez les embouts et le peigne. Placez la cuve dans le réservoir d'électrophorèse. Ajoutez le tampon dilué (1X) dans le réservoir afin d'y immerger le gel.

3. Utilisez une micropipette pour prélever chaque échantillon dans chaque puit.

4. Fixez le couvercle de sécurité, connectez les fils à la source d'alimentation et démarrez l'électrophorèse.

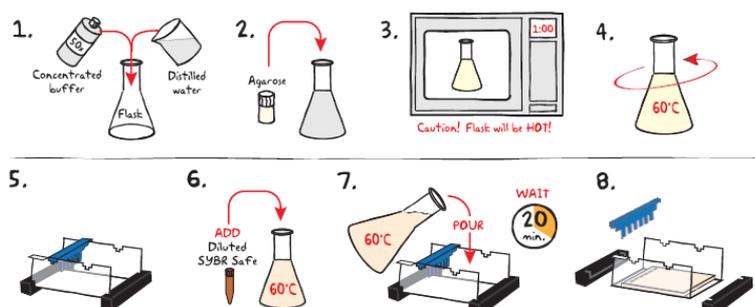
5. Après l'électrophorèse : si vous avez utilisé le colorant SYBR® Safe, procédez directement à la visualisation du gel. Si vous avez utilisé le colorant FlashBlue™, transférez le gel pour la coloration.

6. Visualisez les résultats sur un transilluminateur ou sur un système de visualisation à la lumière bleue (SYBR® Safe) ou un système de visualisation à la lumière blanche (FlashBlue™).



Gel pattern will vary depending upon experiment.

Module II-A : Séparation du produit PCR par électrophorèse (Colorant SYBR® Safe)



PREPARATION DU GEL D'AGAROSE AVEC LE COLORANT SYBR® SAFE

- Diluez** le mélange de tampon concentré (50X) avec de l'eau distillée pour créer un nouveau tampon (1X) (cf. Tableau A.1).
- Mélangez** la poudre d'agarose avec le nouveau tampon (1X) dans un flacon de 250mL. (cf. Tableau A.1.)
- Dissolvez** la poudre d'agarose en faisant bouillir la solution. **Réchauffez** la solution dans le four à micro-ondes pendant une minute à la plus haute puissance. **Enlevez** avec précaution le flacon du four et **mélangez** en agitant celui-ci. Continuez à **réchauffer** la solution pendant 15 secondes jusqu'à ce que l'agarose se dissolve (la solution doit être aussi transparente que de l'eau claire).
- Refroidissez** l'agarose jusqu'à 60°C en agitant le flacon avec précaution afin de dissiper la chaleur.
- Pendant que l'agarose refroidit, **fermez** les extrémités du bac de gel avec les embouts en caoutchouc. **Placez** le peigne dans l'encoche appropriée.
- Avant de couler le gel, **ajoutez** le colorant SYBR® Safe à l'agarose qui a maintenant fondu et refroidi, remuez pour mélanger. (cf. Tableau A.1.)
- Versez** la solution d'agarose refroidie dans le bac de gel. Le gel devrait se solidifier en moins de 20 minutes. Le gel va donc durcir et devenir de moins en moins transparent.
- Enlevez** les embouts en caoutchouc et le peigne. Faites très attention lorsque vous enlèverez le peigne afin de ne pas endommager les puits.

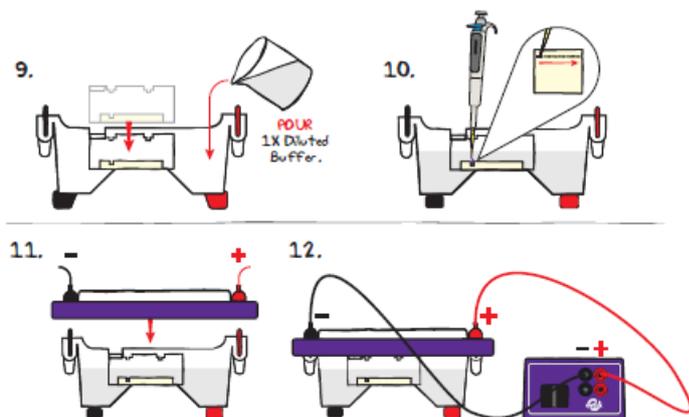
ATTENTION !

Des gels de 7 x 7 cm sont recommandés. Placez le peigne dans la première encoche.

POINT OPTIONNEL : Si vous le souhaitez, vous pouvez conserver les gels submergés par le tampon d'électrophorèse pendant une nuit dans un réfrigérateur et à l'abri de la lumière.

Tableau A.1. Gel individuel d'agarose (0,8%) avec le colorant SYBR® Safe					
Taille du bac de gel	Tampon concentré (50X)	Eau distillée	Quantité d'agarose	Volume total	SYBR® dilué (étape 6)
7x7cm	0,5mL	24,5mL	0,23g	25mL	25µL
7x14cm	1,0mL	49,0mL	0,46g	50mL	50µL

Suite du Module II-A : Séparation du produit PCR par électrophorèse
(Colorant SYBR® Safe)



APPLICATION DU GEL

9. **Placez** le gel dans le bac de la cuve d'électrophorèse. **Recouvrez** le gel avec un tampon d'électrophorèse (cf. Tableau B.1 pour les volumes recommandés). Le gel doit être entièrement recouvert.
10. En utilisant le tableau 2 comme guide, **déposez** l'échantillon (25µL) dans les puits de gel l'un après l'autre.
11. **Placez** le couvercle de sécurité. **Assurez-vous** que le gel soit bien stable. N'oubliez pas que les prélèvements d'ADN doivent migrer jusqu'à l'électrode positive (l'électrode rouge).
12. **Connectez** les fils à la source d'alimentation et **mettez en marche** l'électrophorèse. (cf. Tableau C pour connaître les indications de temps et de voltage).
13. A la fin de l'électrophorèse, **enlevez** le gel et le bac de la cuve d'électrophorèse.

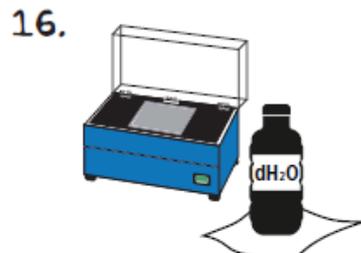
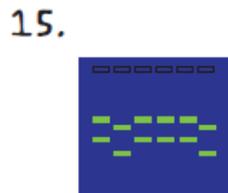
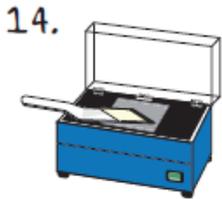
POINT OPTIONNEL : Les gels peuvent être conservés pendant quelques jours. Mettez le gel dans un sac congélation avec 2mL de tampon d'électrophorèse et placez-les dans le réfrigérateur.

Tableau 2		
Ligne	Recommandation	Nom de l'échantillon
1	Echelle ADN EdvoQuick™	
2	Témoin négatif	
3	Groupe d'étudiants n°1	
4	Groupe d'étudiants n°2	
5	Groupe d'étudiants n°3	
6	Groupe d'étudiants n°4	

Tableau B.1	Modèle EDVOTEK (référence)	Tampon d'électrophorèse (Chambre de protection)	
		Dilution	
	Volume total recommandé	Tampon concentré (50X)	Eau Distillée
M6+&M12 (nouveau)	300mL	6mL	294mL
M12 (classique)	400mL	8mL	392mL
M36	1000mL	20mL	980mL

Tableau C	Indications de temps et de voltage		
	Volts	Temps recommandé	
		Minimum	Maximum
150	10 minutes	20 minutes	
125	20 minutes	35 minutes	
70	35 minutes	1 heure	

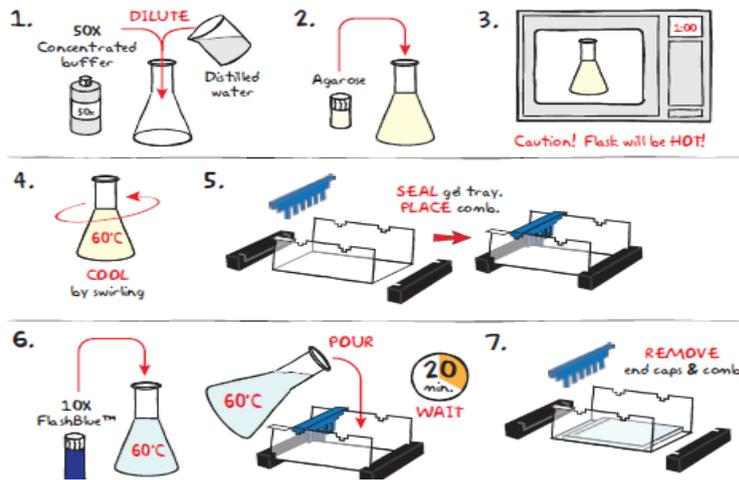
Suite du Module II-A : Séparation du produit PCR par électrophorèse
(Colorant SYBR® Safe)



VISUALISATION DU GEL SYBR®

14. **Faites glisser** le gel présent dans le bac sur la surface de visualisation du transilluminateur et allumez-le. **Ajustez** la luminosité selon vos besoins pour maximiser la visualisation. Vous devinerez l'ADN grâce à ses bandes vertes vives sur un fond noir.
15. **Prenez en photo** les résultats.
16. **Enlevez et jetez** le gel. **Nettoyez** la surface de visualisation du transilluminateur avec de l'eau distillée.

Module II-B : Séparation du produit PCR par électrophorèse (Colorant Improved FlashBlue™)



ATTENTION !

Des gels de 7 x 7 cm sont recommandés. Placez le peigne dans la première encoche.



Portez des lunettes et des gants de protection !

PREPARER LE GEL D'AGAROSE AVEC LE COLORANT FlashBlue™

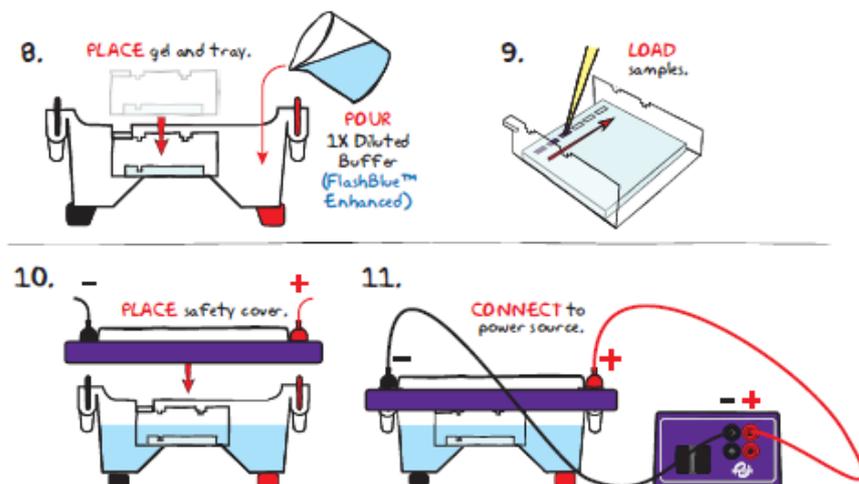
1. **Diluez** le mélange de tampon concentré (50X) avec de l'eau distillée pour créer un nouveau tampon (cf. Tableau A.2).
2. **Mélangez** la poudre d'agarose avec le nouveau tampon dans un flacon de 250mL. (cf. Tableau A.2)

Taille du bac de gel	Tampon concentré	Eau distillée	Quantité d'agarose	Volume total
7x7cm	0.6mL	29.4mL	0.23g	30mL
7x14cm	1.2mL	58.8mL	0.46g	60mL

3. **Dissolvez** la poudre d'agarose en faisant bouillir la solution. **Réchauffez** la solution dans le four à micro-ondes pendant une minute à la plus haute puissance. **Enlevez** avec précaution le flacon du four et **mélangez** en agitant celui-ci. Continuez à **réchauffer** la solution pendant 15 secondes jusqu'à ce que l'agarose se dissolve (la solution doit être aussi transparente que de l'eau claire).
4. **Refroidissez** l'agarose jusqu'à 60°C en agitant le flacon avec précaution afin de dissiper la chaleur.
5. Pendant que l'agarose refroidit, **fermez** les extrémités du bac de gel avec les embouts en caoutchouc. **Placez** le peigne dans l'encoche appropriée.
6. **Ajoutez** la solution FlashBlue™ (10X) à l'agarose refroidie (cf. Tableau A.3. pour connaître les quantités exactes). **Versez** la solution d'agarose refroidie dans le bac de gel. Le gel devrait se solidifier en moins de 20 minutes. Le gel va donc durcir et devenir de moins en moins transparent.
7. **Enlevez** les embouts en caoutchouc et le peigne. Faites très attention lorsque vous enlèverez le peigne afin de ne pas casser les puits.

Taille du bac de gel	Quantité de colorant FlashBlue™
7x7cm	10µL
7x14cm	20µL

Suite du Module II-B : Séparation du produit PCR par électrophorèse (Colorant Improved FlashBlue™)



RAPPEL

Avant de déposer les échantillons, assurez-vous que le gel soit bien stable dans l'appareil.



Portez des lunettes et des gants de protection !

APPLICATION DU GEL

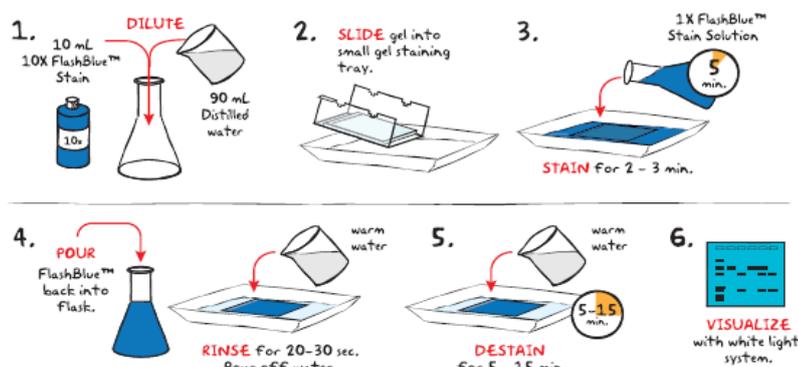
8. **Placez** le gel dans le bac de la cuve d'électrophorèse. **Versez** le tampon dilué FlashBlue™ (1X) dans la cuve d'électrophorèse. (cf. Tableau B.2 pour connaître les volumes recommandés) Le gel doit être entièrement recouvert.
9. **Déposez** les échantillons (25µL) dans les puits de gel les uns après les autres comme indiqué dans le tableau 2.
10. **Placez** le couvercle de sécurité. **Assurez-vous** que le gel soit bien stable. N'oubliez pas que les échantillons doivent migrer jusqu'à l'électrode positive (l'électrode rouge).
11. **Connectez** les fils à la source d'alimentation et **mettez en marche** l'électrophorèse (cf. Tableau C pour connaître les indications de temps et de voltage). Pour obtenir de meilleurs résultats, le colorant de repérage orange doit migrer au moins à 4 centimètres des puits.
12. Après l'électrophorèse, **enlevez** le gel et le bac de la cuve d'électrophorèse afin de procéder à la **coloration** du gel d'agarose avec le colorant FlashBlue™ (page 16).

Tableau B.2.	Préparation pour le tampon FlashBlue™ (1X)			
	Modèle EVOTEK (référence)	Volume total recommandé	Dilution	
Tampon concentré (50X)			Eau distillée	Solution FlashBlue (10X)
M6+ & M12 (nouveau)	300mL	6mL	294mL	100µL
M12 (classique)	400mL	8mL	392mL	130µL
M36	1000mL	20mL	980mL	330µL

Tableau C	Indications de temps et de voltage		
	Volts	Temps recommandé	
		Minimum	Maximum
150	10 minutes	20 minutes	
125	20 minutes	35 minutes	
70	35 minutes	1 heure	

Tableau 2		
Ligne	Recommandation	Nom de l'échantillon
1	Echelle ADN EdvoQuick™	
2	Témoin négatif	
3	Groupe d'étudiants n°1	
4	Groupe d'étudiants n°2	
5	Groupe d'étudiants n°3	
6	Groupe d'étudiants n°4	

Suite du Module II-B : Séparation du produit PCR par électrophorèse (Colorant Improved FlashBlue™)



COLORATION ET VISUALISATION AVEC LE COLORANT FLASHBLUE™

1. **Diluez** 10mL de la préparation FlashBlue™ (10X) avec 90mL d'eau distillée dans un flacon. Mélangez bien.
2. **Enlevez** le gel d'agarose et le bac de la cuve d'électrophorèse. **Faites glisser** le gel dans un autre bac propre pour la coloration.
3. **Recouvrez** le gel avec la solution de coloration FlashBlue™. **Laissez la coloration** poser pendant 5 minutes. Pour obtenir de meilleurs résultats, utilisez un agitateur orbital pour agiter délicatement le gel pendant la coloration. **Attention : laisser la coloration du gel pendant plus de trois minutes requiert plus de temps de décoloration !**
4. **Versez** la coloration FlashBlue™ à nouveau dans le flacon (la coloration peut être réutilisée). **Recouvrez** le gel d'eau chaude (entre 40 et 45°C) et **rincez** ensuite le gel entre 20 et 30 secondes. **Enlevez** l'eau.
5. **Recouvrez** à nouveau le gel d'eau chaude claire (toujours entre 40 et 45°C). **Laissez décolorer** entre 5 et 15 minutes en remuant légèrement (le plus longtemps possible pour obtenir de meilleurs résultats). Les bandes d'ADN vont commencer à apparaître au bout de 5 minutes. Si vous changez fréquemment d'eau, la coloration s'accélérera.
6. **Enlevez** délicatement le gel de la solution de décoloration. Vous pouvez ensuite **visualiser** les résultats en utilisant un système de visualisation à la lumière blanche. Vous devinerez l'ADN grâce à ses branches bleues foncées sur un fond bleu ciel.

AUTRE ALTERNATIVE :

1. **Diluez** 1mL de la coloration FlashBlue™ (10X) dans 499mL d'eau distillée.
2. **Recouvrez** le gel avec la coloration diluée.
3. **Faites tremper** le gel dans la coloration pendant au moins 3 heures. Pour de meilleurs résultats, vous pouvez laisser la coloration tremper toute la nuit.
4. **Enlevez** délicatement le gel de la solution de coloration. Vous pouvez **visualiser** les résultats à l'aide d'un système de visualisation à la lumière blanche. Vous devinerez l'ADN grâce à ses branches bleues foncées sur un fond bleu ciel.

Questions d'études

1. Pourquoi l'ADN polymérase thermostable est-elle nécessaire dans un processus d'amplification d'ADN par PCR ?
2. Pourquoi avons-nous besoin de deux amorces différentes pour obtenir une réaction PCR ?
3. En quoi la PCR traditionnelle et la PCR rapide sont-elles différentes ?
Comment ces changements influencent-ils le temps passé à réaliser une PCR ?

Guide de l'instructeur

VUE D'ENSEMBLE GENERALE DE LA PREPARATION DU LABORATOIRE

Cette partie présente les différentes préparations recommandées du laboratoire et du temps requis pour réaliser chaque activité.

Ce kit contient deux options de coloration différentes pour analyser les gels d'agarose : le colorant SYBR® Safe et le colorant amélioré FlashBlue™. L'instructeur doit décider quel colorant les élèves utiliseront avant de débiter la préparation du gel du module II. Voir à la page 20 pour obtenir des informations complémentaires sur les deux colorants.

Préparation pour?	Que faire ?	Quand?	Temps approximatif
Module I : Amplification du phage lambda	Préparer et aliquoter les différents réactifs (l'amorce, l'ADN matrice, l'échelle...)	Au maximum 2 heures avant le début de l'expérience	30 minutes
	Programmer le thermocycleur	Avant le début de l'expérience	15 minutes
Module II : Séparation du produit PCR par électrophorèse	Préparer les tampons d'électrophèse dilués	Au maximum une semaine avant le début de l'expérience	45 minutes
	Préparer l'agarose fondue et des lots de gel (optionnel)		
Module II-A : colorant SYBR® Safe	Préparer la coloration SYBR® Safe	Au maximum 24 heures avant le début de l'expérience	10 minutes
Module II-B : Colorant FlashBlue™	Préparer les composants de la coloration	Pendant ou après le cours	10 minutes

Bleu = Flexible, peut être préparé jusqu'à une semaine avant le début de l'expérience.

Vert = A préparer juste avant le début de l'expérience.

ATTENTION

Les conditions des cycles PCR ont peut-être été modifiées. Avant de démarrer cette expérience, vérifiez que le programme correspond aux informations ci-dessous.

- Dénaturation initiale 94°C pendant 3 minutes
 - 94°C pendant 30 secondes
 - 71°C pendant 30 secondes
- } 20 cycles

Préparations préalables – Module I

AMPLIFICATION DU PHAGE LAMBDA

Ce kit comprend les composants EDVOTEK® suivants : le mélange pour l'amorce LyphoPrimer™ et le phage lambda LyphoTemplate™. Ces réactifs sont codés par couleur dans le but d'obtenir une couleur orange à la fin de l'expérience PCR, signe de réussite. Cette innovation participe à la réussite de cette expérience.

PREPARATION DU MELANGE DE L'AMORCE

1. Décongelez le tampon TE (D). Mélangez bien avant l'utilisation.
2. Avant de préparer le mélange pour l'amorce, assurez-vous que la partie solide du tube LyphoPrimer™ (C) se trouve en bas. Si ce n'est pas le cas, centrifugez le tube à vitesse maximum pendant 20 secondes ou tapez-le sur la table du laboratoire.
3. Diluez le phage lambda LyphoPrimer™ en ajoutant 1mL du tampon TE dans le tube. Fermez le tube, mélangez bien puis déposez-le sur la glace. La solution doit être transparente et jaune clair, aucun élément solide ne doit être présent.
4. Distribuez 25µL de l'amorce diluée dans chaque tube. Etiquetez ces 10 tubes avec l'inscription « Mélange d'amorce ». Distribuez un tube par groupe d'étudiants.

PREPARATION DU MELANGE DE L'ADN MATRICE

1. Décongelez le tampon TE (D). Mélangez bien avant l'utilisation.
2. Avant de préparer le mélange pour l'ADN matrice, assurez-vous que la partie solide du tube LyphoTemplate™ (C) se trouve en bas. Si ce n'est pas le cas, centrifugez le tube à vitesse maximum pendant 20 secondes ou tapotez-le sur la table du laboratoire.
3. Diluez la solution LyphoTemplate™ en ajoutant 75µL du tampon TE dans le tube. Fermez le tube, mélangez bien puis déposez-le sur la glace. La solution doit être transparente et rouge, aucun élément solide ne doit être présent.
4. Distribuez 6µL de l'amorce diluée dans chaque tube. Etiquetez ces 10 tubes avec l'inscription « Phage Lambda ». Distribuez un tube par groupe d'étudiants.
5. Ce kit fournit assez d'ADN matrice pour créer deux témoins négatifs. Distribuez un tube supplémentaire contenant 6µL de phage lambda aux groupes préparant les échantillons de contrôle.

MATERIAUX SUPPLEMENTAIRES

Chaque groupe doit recevoir un tube PCR de 0.2mL et un kit PCR EdvoBead™.

L'AMPLIFICATION PAR PCR

Le thermocycleur doit être programmé comme indiqué dans le module I dans la partie des procédures de l'expérience destinée aux étudiants.

Le respect de la température et la durée des cycles est primordial. Nous vous recommandons de tester un cycle (entre 3 et 5 minutes) avant de démarrer l'expérience afin de s'assurer que le thermocycleur soit bien programmé.

Pour les thermocycleurs qui ne possèdent pas de couvercle chauffant, il est nécessaire de placer une couche de cire ou d'huile minérale au-dessus des réactions PCR dans les tubes de la micro centrifugeuse afin d'éviter toute évaporation.

Pour le module I, chaque groupe doit recevoir un tube PCR et un kit EdvoBead™, 25µL de mélange d'amorce dilué, 6µL de phage lambda dilué.

Préparations préalables – Module II

SEPARATION DES PRODUITS PCR PAR ELECTROPHORESE

☞ L'instructeur doit décider quel colorant (SYBR®Safe ou FlashBlue™) sera utilisé pour visualiser le gel avant de procéder à la préparation du gel dans le module II.

PREPARER LE COLORANT SYBR® SAFE (SI UTILISATION)

1. Suivez les indications dans l'annexe C, préparez un tampon d'électrophorèse (1X) en combinant 10µL du mélange de tampons concentrés (50X) avec 490µL d'eau distillée.
2. Ajoutez 250µL du tampon (1X) de la première étape au tube de colorant SYBR®Safe et mélangez le tube en le tapotant plusieurs fois. La coloration est alors prête à être utilisée pendant la préparation du gel d'agarose.

PREPARATION DU GEL INDIVIDUEL

Pour réaliser cette expérience, il est nécessaire d'avoir un total de 3 gels d'agarose (0.8%) pour la classe entière. Chaque groupe d'étudiants peut s'occuper du coulage de son gel pendant l'expérience. Pour plus d'informations, voir dans le module II dans la partie destinée aux procédures de l'expérience pour les étudiants. Les étudiants auront besoin d'un tampon d'électrophorèse (50X), de l'eau distillée, de la poudre d'agarose et soit le colorant dilué SYBR®Safe ou la solution FlashBlue™ (10X).

PREPARATION DES LOTS DE GEL

Pour gagner du temps, vous pouvez préparer une plus grande quantité de solution d'agarose pour la partager à la classe entière. Le tampon électrophorèse peut aussi être préparé en plus grande quantité. Voir l'annexe C.

PREPARER LES GELS A L'AVANCE

Les gels peuvent être préparés à l'avance et être conservés pour une utilisation ultérieure. Les gels solidifiés peuvent être conservés en dessous des tampons au réfrigérateur à 4°C pendant maximum deux jours.

Si vous utilisez le colorant FlashBlue™ et son protocole, le tampon doit contenir le colorant FlashBlue™ en question. Vous trouverez plus de détails dans le tableau B.2. à la page 15.

Ne congelez pas les gels à -20°C, la glace détruira les gels !

Les gels qui ont été sortis de leur bac pour la conservation doivent être remis dans le bac avec quelques gouttes d'agarose. Cela permettra aux gels de ne pas glisser dans le bac et dans la cuve.

MATERIAUX SUPPLEMENTAIRES

Versez 35µL d'échelle ADN EdvoQuick™ (B) dans les trois tubes de la micro centrifugeuse avec les étiquettes « Echelle ». Distribuez un tube d'échelle ADN par gel.

ATTENTION

Il est indispensable d'utiliser les mesures exactes afin de mener à bien votre expérience. Cette expérience a été conçue pour des étudiants ayant déjà utilisé les techniques de micropipette et de gel d'agarose pour l'électrophorèse. Si ce n'est pas le cas, nous vous recommandons l'utilisation de micropipettes #S-44 ou #S-43.

Pour le module II, chaque groupe doit recevoir un mélange de tampons concentrés (50X), de l'eau distillée, de la poudre d'agarose, une échelle ADN ainsi que le colorant choisi par l'instructeur.

Préparations préalables – Module II

COLORATION ET VISUALISATION DES GELS D'AGAROSE

Module II-A : Le colorant SYBR®Safe (méthode recommandée)

Ce colorant est un colorant fluorescent spécialement conçu pour visualiser l'ADN. Les étudiants obtiendront des résultats rapides et fiables suite à leur expérience d'électrophorèse en y ajoutant la solution diluée du colorant SYBR®Safe pour ramollir l'agarose avant de couler le gel. Lorsque le colorant est soumis aux UV ou à la lumière bleue, il va colorer l'ADN en vert vif. Les colorants fluorescents (dont SYBR®Safe fait partie) sont parfaits pour les expériences comme celle de la PCR car ils sont très agiles, ce qui permet de compter facilement des petites quantités d'ADN. Utilisez un transilluminateur UV milieu de gamme (#558) ou le transilluminateur à la lumière bleue TruBlu™ (#577) pour visualiser les gels colorés avec SYBR®Safe. Les gels sont prêts à être visualisés dès que l'électrophorèse est terminée.

Module II-A : Le colorant FlashBlue™

Le colorant FlashBlue™ est optimisé pour une durée plus courte du temps pour les étapes de coloration et de décoloration. Les gels sont pré-colorés avec le colorant FlashBlue™ en ajoutant le concentré au gel et au tampon de migration. Les gels d'agarose peuvent être colorés avec le colorant dilué FlashBlue™ pendant 5 minutes et être décolorés pendant seulement 20 minutes. Pour de meilleurs résultats, vous pouvez laisser le gel dans le liquide pendant une nuit. Cela permettra aussi au gel coloré de s'équilibrer dans la solution décolorante, ce qui laissera apparaître des bandes d'ADN bleues foncées, contrastant avec un fond uniforme bleu ciel. Nous vous recommandons d'utiliser le transilluminateur à la lumière blanche (#552) pour visualiser les gels colorés avec FlashBlue™.

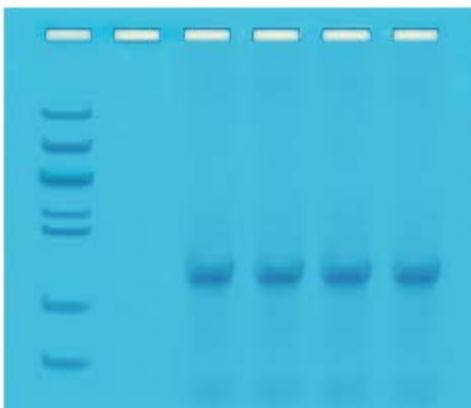
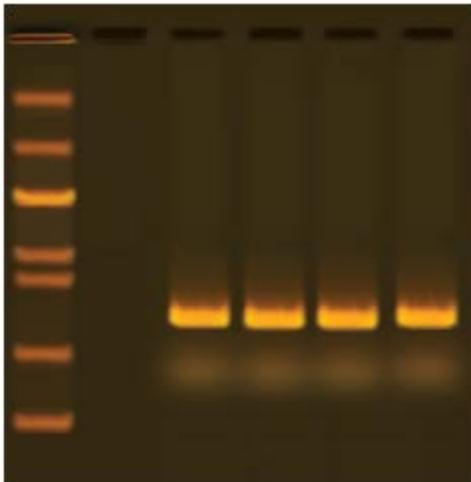
- Les gels colorés peuvent être conservés dans le liquide décolorant pendant plusieurs semaines au réfrigérateur, même si les bandes peuvent s'effacer avec le temps. Si cela vous arrive, colorez à nouveau le gel.
- Les gels décolorés peuvent être jetés dans une collecte de déchets solides. Les solutions décolorantes peuvent être jetées dans les égouts.

Pour le module II-B, chaque groupe doit recevoir 10mL de colorant concentré FlashBlue (10X) OU un colorant dilué FlashBlue, un bac en plastique et de l'eau soit distillée soit desionisée.

OPTIONNEL : LA PHOTO-DOCUMENTATION D'ADN

Une fois que les gels sont colorés, vous pouvez photographier les résultats. Il y a plusieurs systèmes de photo-documentation prêts à l'emploi, y compris certains logiciels informatiques. Les instructions spécifiques dépendent du type de système de photo-documentation que vous utilisez.

Résultats de l'expérience et Analyse



Les photos des résultats représentent les produits PCR colorés avec le colorant SYBR®Safe (en haut) et le colorant FlashBlue™ (en bas). Cette expérience PCR va amplifier 500 paires de base d'une protéine de la capside virale codée par le génome lambda. L'expérience témoin ne va pas produire de produits PCR puisqu'il n'y a pas le contenu du kit PCR EdvoBead™.

- 1 – Echelle ADN EdvoQuick™
- 2 – Témoin négatif (pas de kit PCR EdvoBead™).
- 3 – Groupe n°1 Réaction PCR (20 cycles)
- 4 – Groupe n°2 Réaction PCR (20 cycles)
- 5 – Groupe n°3 Réaction PCR (20 cycles)
- 6 – Groupe n°4 Réaction PCR (20 cycles)

En fonction des conditions PCR utilisées, une bande moléculaire diffuse de petite taille, connue sous le nom de « primer dimer » peut être présente dans le marqueur. C'est un artefact des tests PCR qui ne peut être ignoré.

Les colorants rouges et jaunes des composants LyphoTemplate™ et LyphoPrimer™ peuvent migrer à différentes positions du gel d'électrophorèse. Assurez-vous d'utiliser bande bleue de l'échelle, qui se différencie des bandes rouges et jaunes des témoins, pour déterminer jusqu'où les échantillons d'ADN ont migré.

INCLUS DANS LE KIT : LA NOUVELLE ECHELLE ADN EDVOQUICK™.

Permet une meilleure séparation, une meilleure prise de mesure à bandes et assure l'utilisation de toutes ses bandes.

Tailles des échelles d'ADN EdvoQuick™ : 2640, 1400, 1100,

Les réponses aux questions d'études se trouvent à l'intérieur du kit.

Annexes

A – Guide d'aide EDVOTEK®

B – Réaliser l'expérience PCR avec deux bains-marie

C – Préparation du tampon d'électrophorèse et des gels d'agarose

Annexe A – Le guide d'aide EDVOTEK®

Problème?	Cause?	Réponse
Il reste peu de liquide dans le tube après l'expérience PCR.	Le prélèvement s'est évaporé.	Assurez-vous que le couvercle chauffant atteigne la température appropriée.
		Si votre thermocycleur n'a pas de couvercle chauffant, protégez la réaction PCR avec de la cire.
	Assurez-vous que les étudiants ferment bien le couvercle des tubes PCR.	
Il y a eu une erreur dans le pipetage.	Assurez-vous que les étudiants pipètent 20µL de mélange pour amorce et 5µL de phage lambda dans le tube approprié. Lorsque ceux-ci sont bien préparés, le prélèvement d'ADN devient orange.	
L'échelle et les produits PCR des étudiants ne sont pas visibles sur le gel.	Le gel n'a pas été bien préparé.	Assurez-vous que le tampon d'électrophorèse soit correctement dilué.
		Les gels avec une grande concentration (>0.8%) demandent une attention plus particulière lors de la chauffe de l'agarose. Assurez-vous que la solution soit transparente et qu'il n'y ait pas de morceaux solides avant de verser les gels.
		Le tampon d'électrophorèse n'a pas été ajouté à la préparation du gel. Assurez-vous d'y ajouter le tampon d'électrophorèse (1X).
	Le gel n'a pas été coloré proprement.	Assurez-vous que le colorant soit ajouté au gel. Recommencez la coloration.
Il y a un dysfonctionnement de l'appareil d'électrophorèse ou de source d'alimentation.	Contactez le fournisseur de l'appareil d'électrophorèse ou de la source d'alimentation.	
Après la coloration du gel avec FlashBlue™, les bandes d'ADN se voient peu.	Le gel n'a pas été longuement coloré.	Recommencez le protocole de coloration.
Après la coloration du gel avec FlashBlue™, le fond est très noir.	Le gel a encore besoin d'être décoloré.	Immergez le gel dans de l'eau distillée ou désionisée. Laissez le gel sous l'eau pendant 5 minutes.
Après la coloration, l'échelle est visible sur le gel mais certains échantillons ne se voient plus.	Le kit PCR EdvoBead™ a été ajouté dans le mauvais tube.	Assurez-vous que le kit PCR EdvoBead™ soit ajouté dans le tube PCR de 0.2mL.
	De mauvaises quantités d'ADN et de mélange d'amorce ont été ajoutées à la réaction PCR.	Utilisez davantage les micropipettes. Lorsque tout est proprement préparé, l'échantillon PCR deviendra orange.
Il y a peu de petites bandes moléculaires dans les échantillons PCR.	"Primer dimer".	Une concentration trop basse d'ADN dans les échantillons PCR peuvent résulter d'une erreur de pipetage. Assurez-vous que les étudiants pipètent 5µL d'ADN matrice dans le tube approprié.
Les bandes ADN ne sont pas apparues.	Pour s'assurer d'une séparation adéquate des bandes, assurez-vous que la coloration bleue migre au moins 3.5 cm dans les bacs de gel 7x7cm et 6 cm dans les bacs 7x14cm.	Assurez-vous que le gel coule sur la bonne distance avant de le colorer et de visualiser l'ADN.
Les bandes ADN s'effacent lorsque les gels sont conservés à 4°C.	L'ADN coloré avec le colorant FlashBlue™ peut disparaître avec le temps.	Colorez à nouveau le gel avec le colorant FlashBlue™.

LA PCR ET L'ELECTROPHORESE

Annexe B – Réaliser l'expérience avec deux bains-marie

Cette expérience peut être modifiée en utilisant deux bains-marie à la place d'un thermocycleur. Dans cette méthode, les prélèvements PCR sont soumis à des cycles différents entre les deux bains-marie, chacun maintenu à une température différente pendant une durée précise. Le placement successif des prélèvements dans un bain-marie, puis dans le second, se résume en un cycle PCR entier. Veuillez noter que les résultats obtenus en utilisant les deux bains-marie sont généralement très variables. *Un thermocycleur assure un meilleur taux de réussite de l'expérience.*

Si vous ne possédez pas de thermocycleur, nous vous recommandons l'utilisation du bain-marie digital pour PCR EDVOTEK® #544.

Préparer les échantillons comme indiqué dans les étapes 1 à 4 du module I. Avant de procéder aux cycles des échantillons, assurez-vous de :

- Laisser les bains-marie atteindre leur température indiquée dans le module I (94°C et 71°C) pendant au moins 15 minutes.
- Recouvrir les bains-marie lorsqu'ils ne sont pas utilisés pour garder leur température et éviter toute évaporation.
- La quantité de l'échantillon PCR est petite et peut donc s'évaporer plus facilement. Pour éviter toute évaporation, placez une bille de cire sur chaque échantillon PCR. La cire fondue forme donc une barrière de l'échantillon pour éviter que son contenu s'évapore à cause de la chaleur.
- Que les échantillons soient intacts, notamment en bas du tube. Si nécessaire, centrifugez ou remuez le tube afin que l'échantillon se trouve bien en bas du tube.
- Placer les échantillons PCR dans un portoir flottant avant de les mettre dans le bain-marie.

Continuez l'expérience avec l'étape 5 (cycles thermiques) et suivez le protocole suivant :

- Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes
 - 94°C pendant 30 secondes
 - 71°C pendant 30 secondes
- } 20 cycles

Manipulez les échantillons avec précaution lorsque vous les changerez de bain-marie. Utilisez les forceps pour lever et baisser le portoir flottant dans les bains-marie. Il est très important d'enlever les échantillons lorsque la durée de temps de leur cycle est terminée. Faites attention de ne pas toucher la couche de cire lorsque vous retirerez l'échantillon. Nous vous recommandons de placer le tube dans de la glace pendant quelques secondes afin de pouvoir solidifier la cire. Utilisez un embout de pipette propre pour casser la couche de cire, laissant donc assez de place pour passer l'embout de la pipette. Utilisez donc un nouvel embout de pipette propre et retirez le produit PCR afin de le transférer dans le tube approprié.

Placez les tubes dans la glace. **Procédez** ensuite au module II, la séparation des produits PCR par électrophorèse.

Annexe C – Préparation du tampon d'électrophorèse et des gels d'agarose

Pour gagner du temps, le tampon d'électrophorèse et la solution de gel d'agarose peuvent être préparés en grande quantité pour ensuite les partager aux étudiants. Le reste de solution de tampon dilué inutilisé peut être utilisé plus tard et la solution de gel d'agarose solidifiée peut être réchauffée à nouveau.

POUR UNE GRANDE QUANTITE DE TAMPON D'ELECTROPHORESE

La quantité de préparation pour 3 litres de tampon d'électrophorèse est indiquée dans le tableau D ci-dessous.

Tableau D	Grande quantité de préparation de tampon d'électrophorèse	
Tampon d'électrophorèse concentré (50X)	Eau distillée	Volume total recommandé
60mL	2,940mL	3000mL (3L)

NB : Si vous décidez de colorer les gels avec FlashBlue, ajoutez 1mL de colorant concentré FlashBlue (10X) dans le tampon dilué et mélangez complètement.

PREPARATION DES LOTS DE GEL D'AGAROSE (0.8%)

La préparation en grande quantité de gel d'agarose est indiquée dans le tableau E.

Tableau E	Grande quantité de préparation du gel d'agarose (0.8%) en lots				Refroidir à 60°C ajoutez :	
Quantité de gel d'agarose	Tampon concentré (50X)	Eau distillée	Volume total	Soit du colorant SYBR dilué	Soit du colorant FlashBlue	
2.4g	6.0mL	294mL	300mL	Tube entier	130µL	

- Utilisez un flacon de 500mL pour préparer le tampon d'électrophorèse dilué.
- Versez la quantité appropriée de gel d'agarose dans le tampon préparé. Agitez pour dissiper les grumeaux.
- Avec un marqueur, indiquez le niveau du volume de la solution à l'extérieur de le flacon.
- Réchauffez la solution d'agarose comme indiqué précédemment dans la préparation du gel individuel. Il faut donc ajuster le temps de chauffage par rapport au volume plus large de la solution de tampon concentré.
- Refroidissez la solution d'agarose à 60°C en agitant le flacon pour permettre la dissipation de la chaleur. En cas d'évaporation, ajoutez de l'eau distillée pour atteindre à nouveau les quantités de base indiquées dans l'étape 3.
- Si les gels sont colorés avec SYBR®Safe, ajoutez le volume entier du colorant dilué (cf. page 20) à l'agarose refroidie et mélangez complètement.
 - Si les gels sont colorés avec FlashBlue™, ajoutez 130µL de concentré FlashBlue à l'agarose refroidie et mélangez complètement.
- Préparez le volume recommandé de solution d'agarose refroidie pour mouler chaque gel. Mesurez 30mL pour un bac de 7x7cm, 50mL pour un bac de 7x10cm et 60mL pour un bac de 7x14cm. *Pour cette expérience, nous vous recommandons d'utiliser un bac de gel 7x7cm.*
- Laissez le gel se solidifier complètement. Il va devenir ferme et froid au toucher après approximativement 20 minutes. Les gels peuvent être utilisés immédiatement ou conservés dans une petite quantité de tampon au réfrigérateur pendant plusieurs jours.

Les composants du kit UltraSpec-Agarose™ sont étiquetés avec leurs quantités exactes. Veuillez lire l'étiquette avec attention. Si la quantité d'agarose n'est pas spécifiée ou si le bouchon de la bouteille est cassé, pesez l'agarose pour afin d'être sûr d'utiliser les quantités exactes.

Nous contacter:

Ce matériel est garanti 2 ans. Pour toutes questions, veuillez contacter :

sav@sciencethic.com

www.sciencethic.com