



Pack de réactifs pour les
enquêtes sur l'ADN
Guide de l'élève

Cat# M3052TAE
Version 100323-FR



Table des matières

Sécurité en laboratoire	2
Protocole	3

Sécurité au laboratoire

1. Portez des blouses, des gants et des lunettes de protection conformément au protocole du district.
2. Soyez prudent avec tous les équipements électriques tels que les machines PCR et les unités d'électrophorèse.
3. Les surfaces de la machine PCR peuvent être extrêmement chaudes. Soyez prudent lorsque vous ouvrez et fermez le couvercle et lorsque vous placez et retirez des tubes.
4. Chauffer et verser de l'agarose fondu présente un risque d'éclaboussures. Soyez prudent lorsque vous manipulez des liquides chauds. Porter des lunettes de protection et des gants pour éviter les brûlures.
5. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir manipulé du matériel biologique et des produits chimiques.

Mise en place de postes de travail communs

- Microcentrifugeuse de table
- Micro-ondes
- MiniOne® PCR System, ou un bain-marie réglé à 37°C
- Appareil mobile avec MiniOne® PCR App
- Gants, lunettes de protection, blouses de laboratoire
- Installation des postes de travail pour les groupes d'étudiants
- Tubes PCR de 0,2 ml si vous utilisez le système PCR MiniOne® , ou tubes de microcentrifugation si vous utilisez un bain-marie: six par groupe d'étudiants.
- Micropipette 2-20 µL
- Embouts de micropipette, au moins 12 embouts par groupe d'étudiants

Installation des postes de travail pour les groupes d'étudiants (suite)

- Enzymes de restriction aliquotées, échantillons d'ADN, tampon de dilution de l'enzyme et colorant de chargement (5X)
- Système de coulage MiniOne® et coupelle GreenGel™
- Portoir pour tubes PCR (optionnel)
- Récipient à déchets pour les pointes et les tubes
- Portoir pour tubes de microcentrifugation (en option)
- Marqueur permanent à pointe fine

Protocole

Partie I - Préparation de la réaction de digestion par EcoRV et HindIII

1. Vérifiez votre poste de travail pour vous assurer que vous disposez de tout le matériel énuméré ci-dessus.
2. Étiquetez six tubes PCR avec le nom de votre groupe et le numéro de l'échantillon conformément au tableau 1.

Tableau 1 : Dispositif expérimental

Reagent	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6
Source de l'échantillon d'ADN	Personne disparue # 1	Personne disparue # 1	Personne disparue # 1	Personne disparue # 2	Personne disparue # 2	Personne disparue # 2
Volume de l'échantillon d'ADN	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Tampon de dilution de l'enzyme	5 µL	-	-	5 µL	-	-
EcoRV dilué	-	5 µL	-	-	5 µL	-
HindIII dilué	-	-	5 µL	-	-	5 µL
Volume total	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL

3. Préparez vos digestions de restriction en ajoutant les réactifs aux six tubes conformément au tableau 1. (Utilisez des tubes PCR si l'incubation se fait dans un thermocycleur ou des tubes de microcentrifugation si l'incubation se fait au bain-marie).
4. Tapotez doucement les tubes avec le doigt pour mélanger les réactifs. Centrifugez pendant 15 secondes à 8 000 tours/minute pour faire descendre les réactifs au fond des tubes.
5. Placez vos tubes dans le système PCR MiniOne® et fermez le couvercle. Incubez le digest de restriction à 37°C pendant 1800 secondes en utilisant le mode température constante sur votre MiniOne® PCR Mobile App. Entrez 4°C pour la température d'incubation finale. Si vous n'avez pas de système PCR, vous pouvez utiliser un bain-marie réglé à 37°C et incuber pendant 30 minutes.
6. En attendant la digestion, préparez le gel d'agarose MiniOne® (partie II).
7. Lorsque l'incubation est terminée, ajouter 4 µl de colorant de chargement (5X) à chacun de vos tubes expérimentaux. Utilisez une nouvelle pointe de micropipette pour chaque échantillon. Tapotez doucement chaque tube avec le doigt pour mélanger le colorant avec les échantillons.
8. Centrifugez pendant 15 secondes à 8 000 tours/minute pour amener les réactifs au fond des tubes.
9. Remettez vos échantillons à votre professeur pour qu'il les conserve jusqu'à la prochaine leçon.

Partie I: Electrophorèse

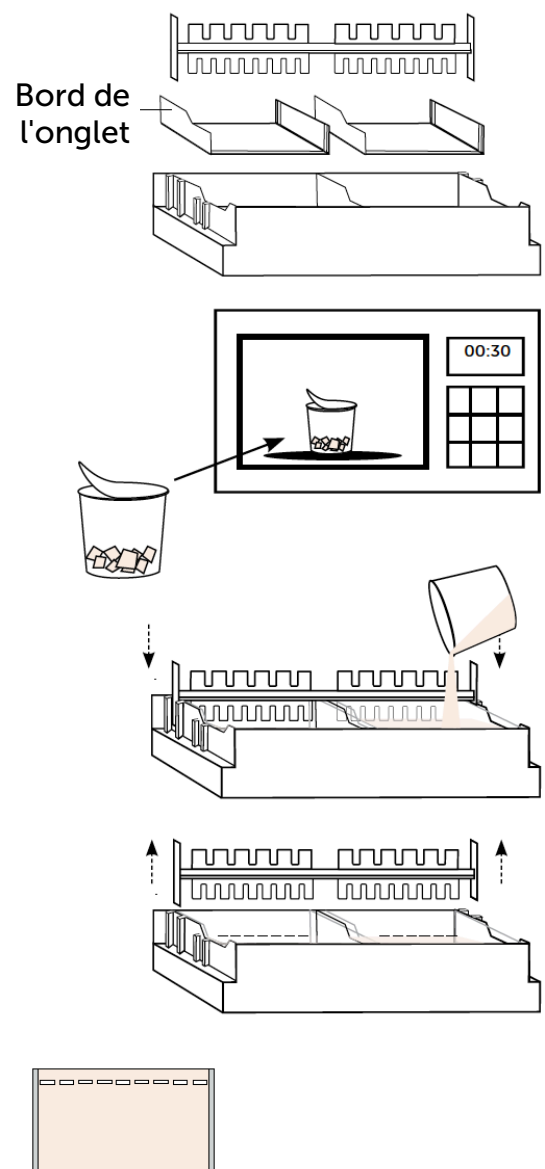
Materials

- 1 Système de coulage MiniOne®
- 1 Système d'électrophorèse MiniOne®
- 1 Coupelle agarose GreenGel™ (1%)
- 9 aliquotes d'échantillons d'ADN
- Le tampon de migration TAE (135 mL)
- 1 micropipette (2-20µL)
- 10 Embouts de micropipettes


Coulage du gel

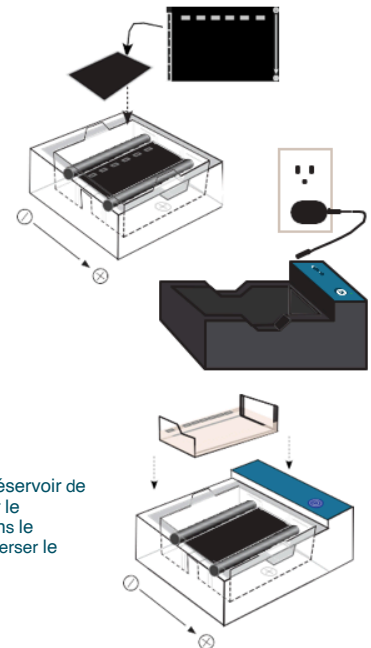
1. Placez le support de coulage de gel MiniOne® sur une surface plane et placez des plateaux de gel dans les deux cavités. Pour une orientation correcte du plateau, placez le bord de la languette du plateau sur le côté gauche. Insérez le peigne dans les fentes en haut du support de coulage avec le côté 9 puits vers le bas.
2. Décollez partiellement le film d'une coupelle avec le GelGreen™ et le mettre au micro-ondes pendant 20 secondes. Laissez refroidir pendant 15 secondes. **NE PAS mettre plus de 2 coupelles de gel au micro-ondes à la fois.**
3. **Exigence de sécurité :** La surveillance d'un adulte est requise si les élèves manipulent seuls des coupelles de gel!
4. **Une coupelle de gel sert à fabriquer un gel d'agarose** Versez lentement la solution d'agarose chaude dans un moule. Assurez-vous qu'il n'y a pas de bulles d'air dans la solution d'agarose. Laissez le gel d'agarose se solidifier pendant 10 minutes ou jusqu'à ce qu'il soit opaque. **NE PAS remuer le gel ou faire vibrer le support avant que le temps soit écoulé.**
5. Retirez soigneusement le peigne lorsque le gel est prêt. Retirez le plateau de gel avec le gel solidifié du support de coulage et essuyez tout excès d'agarose du fond du plateau.

Bien	Nom de l'échantillon	Volume de chargement
1	Personne disparue 1, non coupé	10 µL
2	Personne disparue 1, coupée avec EcoRV	10 µL
3	Personne disparue 1, coupée avec HindIII	10 µL
4	Personne disparue 2, non coupé	10 µL
5	Personne disparue 2, coupée avec EcoRV	10 µL
6	Personne disparue 2, coupée avec HindIII	10 µL
7	Échantillon d'ADN du squelette coupé avec EcoRV	10 µL
8	Échantillon d'ADN de squelette coupé avec HindIII	10 µL
9	Marqueur d'ADN MiniOne	10 µL

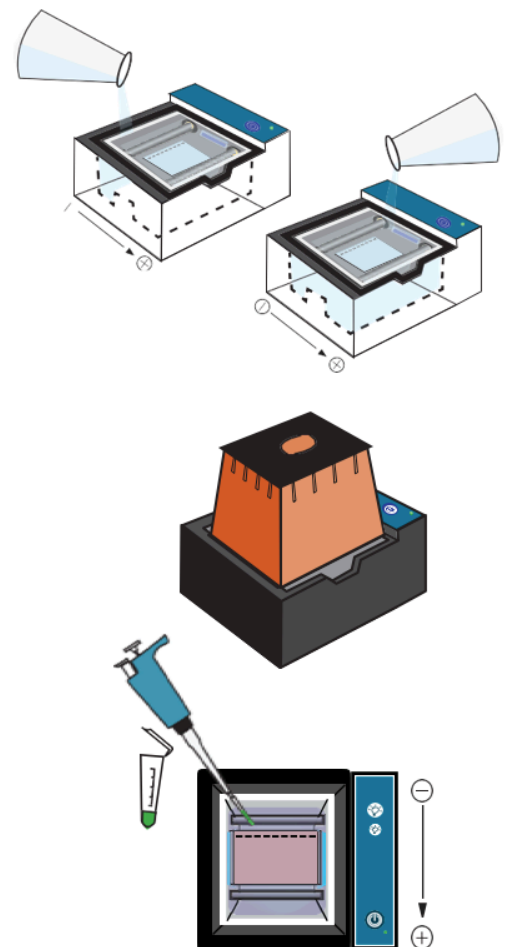


Comment charger un gel


1. Assurez-vous que la plate-forme d'observation noire se trouve dans le réservoir de gel. Assurez-vous que les puits sont alignés avec les marques de la plate-forme sur l'extrémité négative.
2. Branchez l'alimentation électrique au secteur et insérez soigneusement l'autre extrémité à l'arrière du générateur MiniOne®.
3. Placez la cuve d'électrophorèse dans le générateur de manière à ce que les électrodes de carbone touchent les rivets dorés et que la cuve soit au niveau du chariot.
4. Placez le plateau avec le gel dans la cuve de gel.
5. Le réservoir de gel ne doit pas contenir de tampon lorsque vous placez le plateau de gel avec le gel dans celui-ci.
6. Allumez la LED bleue de faible intensité en appuyant sur le  bouton du générateur.
7. Mesurez 135 ml de tampon migration TAE et le verser dans un côté de la cuve. Regardez l'air sortir entre le plateau de gel et la plate-forme d'observation. Une fois que l'air a été retiré du dessous du plateau de gel, versez le tampon restant dans l'autre côté de la cuve.
8. Placez le filtre orange sur le générateur.
9. Appuyez sur le bouton marche qui devrait maintenant être un feu vert fixe. Si le voyant vert est allumé, éteignez l'appareil et passez au chargement des gels. Si le voyant vert **clignote**, consultez le guide de dépannage.
10. Assurez-vous que la lumière bleue de faible intensité est allumée. Déposez dans chaque puits les échantillons de volume appropriés à votre activité. Les MiniLabs sont conçus pour utiliser 10 µL par puits. N'oubliez pas de changer les embouts de pipette pour chaque échantillon. **Notez le nom de chaque échantillon correspondant aux puits adéquat pour faciliter l'analyse ultérieure**



Note : Placez le réservoir de gel avec le gel sur le plateau de gel dans le chariot avant d'y verser le tampon.

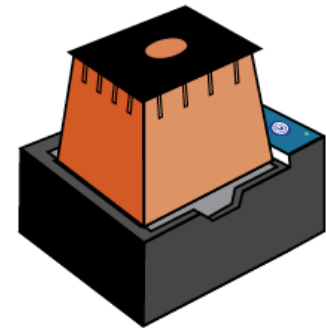


Migration et résultats


1. Une fois que le gel est chargé, ne le déplacez pas. Assurez-vous que l'alimentation électrique est branchée et placez le filtre orange sur le générateur. Allumez l'appareil en appuyant sur le  bouton.

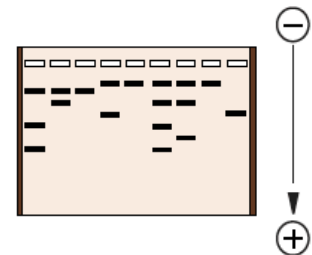
Le voyant vert à côté du bouton s'allume.

- **Le voyant vert ne s'allume pas si :**
 - **La cuve n'est pas correctement placée à l'intérieur du générateur.**
 - **Il n'y a pas de tampon dans la cuve.**
 - **Le tampon est trop dilué.**
 - **Le filtre orange n'est pas sur le générateur.**
 - **Il y a trop peu de tampon de migration.**
 - **L'alimentation électrique n'est pas branchée.**
- Vérifiez en allumant les LED bleues.**



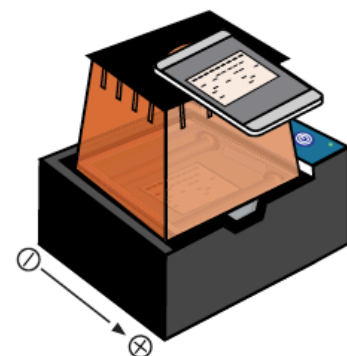
2. Demandez aux élèves de vérifier périodiquement la migration des bandes (toutes les cinq minutes).

3. Laissez le gel migrer pendant **25 minutes** ou jusqu'à ce que la séparation de l'ADN soit suffisante. N'oubliez pas que les petits échantillons d'ADN migrent plus vite, il est donc important de vérifier périodiquement où se trouvent vos bandes. Une fois votre analyse terminée, coupez l'alimentation en appuyant sur le  bouton. Utilisez la basse intensité pour le visionnage pendant la migration. La lumière affaiblit le signal fluorescent de l'ADN.



4. **Archivez vos résultats.**

Si nécessaire, **essuyez la condensation à l'intérieur du filtre orange avec un chiffon doux**, puis remettez la filtre orange sur le générateur. Allumez la lumière à haute intensité. Placez votre téléphone portable ou votre appareil photo directement sur le filtre orange pour prendre une photo de la migration de l'ADN. Ne pas zoomer, ni de flash car les photos seraient alors floues. (Le filtre orange photo est déjà à la distance focale optimale pour un smart phone.)












Nettoyage

Note d'instruction : Tous les réactifs de ce laboratoire peuvent être éliminés comme des déchets non dangereux.

1. Après avoir recueilli les données et documenté les résultats, retirez la hotte photo et débranchez l'alimentation électrique de la prise et de l'arrière du chariot MiniOne®. Retirez le réservoir transparent du chariot et retirez le gel et le plateau du réservoir.
2. Versez le tampon utilisé dans l'évier ou dans un béccher à déchets. Jetez le gel. Rincez le réservoir en plastique transparent, le plateau à gel, le peigne et le système de coulage avec de l'eau déminéralisée ou distillée. Laissez les cuves sécher à l'air libre avant de les ranger.
3. Utilisez une serviette en papier ou un kimwipe pour essuyer délicatement les rivets dorés du chariot (où les électrodes sont connectées) afin de vous assurer que toute l'humidité a été éliminée. Essuyez tout tampon qui aurait pu se répandre dans le chariot noir. Suivez toutes les instructions supplémentaires données par l'instructeur pour le nettoyage et le stockage.

Partie II: Résultats

A quoi ressemble votre gel ? Enregistrez des images du gel.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
								

Voie 1: _____

Voie 2: _____

Voie 3: _____

Voie 4: _____

Voie 5: _____

Voie 6: _____

Voie 7: _____

Voie 8: _____

Voie 9: _____

miniOne®

S Y S T E M S

 theminione.eu

 +32 475 36 68 34

 info@theminione.eu

FastTag, GreenGel et PrepOne sont des marques commerciales d'Embi Tec. GelGreen est une marque de commerce de Biotium. MiniOne est une marque déposée de C.C. IMEX.
Brevets délivrés : US 10 641 731 B2, US 20110253541 A1.