

### A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :

**Ouvrir le carton, ⚠ Placer les éléments suivants au congélateur à - 20°C ⚠**

**Sachet AU :**

- MIX PCR (tube à bouchon bleu) comprenant :
  - La Taq polymérase
  - dNTP
  - Tampon PCR avec Mg<sup>2+</sup> +
  - Colorant de chargement sur gel
- Tampon d'extraction de l'ADN (tube à bouchon incolore)
- Protéinase K (tube à bouchon blanc)
- Marqueur de poids moléculaire taille 50 Bp avec bleu de charge (tube à bouchon rose)
- Tube d'amorces 5' : A (tube à bouchon vert)
- Tube d'amorces 3' : B (tube à bouchon violet)

### CENTRIFUGEZ LES TUBES AVANT UTILISATION

Les éléments suivants se stockent à température ambiante :

100 Microtubes à PCR

**Les réactifs doivent être utilisés dans les 2 mois suivant leur réception.**

Tous les composants de ce kit sont sans danger. Les règles de manipulations en laboratoire s'appliquent toutefois (le port de gants, lunettes et blouse est conseillé). Tous les résidus peuvent être jetés à l'évier.

### MATERIEL ET CONSOMMABLES NECESSAIRES

Agarose

Tampon TBE 1X

Agent révélateur de l'ADN :

**GELGREEN (2µL par gel de 25 ml) : conseillé pour ce kit**

Thermocycleur MINIPCR ou autre marque

Cuve à électrophorèse d'ADN, idéalement BLUEGEL ou autre cuve avec transilluminateur pour une visualisation en temps réels de la migration

Micropipettes : 2-20 µL

## OBJECTIFS COGNITIFS

A travers l'étude de la VNTR du locus D1S80 présent sur le chromosome 1, ce kit a pour but d'initier les élèves à la PCR et aux empreintes génétiques.

### La PCR : Réaction de polymérase en chaîne

La PCR (réaction en chaîne par polymérase) est une technique d'amplification génique mise au point par Kary Mullis en 1986. A partir d'une faible quantité de matériel génétique, la PCR permet de dupliquer une séquence d'ADN cible (amplicon) un grand nombre de fois. Depuis sa découverte, elle connue de nombreuses évolutions et ses nombreuses applications la rende incontournable en biologie moléculaire.

#### 1- Le milieu réactionnel :

|  |   |
|--|---|
| Echantillon d'ADN                          | L'échantillon d'ADN peut être issu de n'importe quelle source. Il peut être extrait d'un organisme suivant différents procédés et être utilisé pour réaliser la PCR. Dans le cas d'une Direct PCR quelques cellules (fragment de tissu, poils, celles buccales...) peuvent être directement intégrées dans le mélange réactionnel.<br>L'échantillon d'ADN sert de matrice pour l'amplification.   |
| ADN polymérase                             | Les ADN polymérases sont des acteurs essentiels dans la réplication de l'ADN cible. La Taq polymérase est sans doute l'enzyme la plus connue utilisée pour la PCR. L'ADN polymérase Taq a une thermostabilité relativement élevée, avec une demi-vie d'environ 40 min à 95 ° C. Elle incorpore des nucléotides à une vitesse d'environ 60 bases par seconde à 70 ° C et peut amplifier des longueurs d'environ 5 kb. De nos jours, de nouvelles générations d'ADN polymérases ont été conçues pour améliorer considérablement les performances de la PCR. |
| Amorces (Primers)                          | Les amorces sont utilisées pour déterminer la séquence à amplifier. Les amorces de PCR sont des oligonucléotides d'ADN synthétiques d'environ 15 à 30 bases. Les amorces de PCR sont conçues pour se lier (via la complémentarité de séquence) aux séquences qui flanquent la région d'intérêt dans l'ADN matrice. Pendant la PCR, l'ADN polymérase synthétise le nouveau brin d'ADN à partir de leurs extrémités 3'.   |
| Desoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) | Les dNTP sont constitués de quatre nucléotides de base - dATP, dCTP, dGTP et dTTP . Ce sont les éléments constitutifs des nouveaux brins d'ADN. Ces quatre nucléotides sont généralement ajoutés à la réaction de PCR en quantités équimolaires pour une incorporation optimale des bases.  |
| L'ion magnésium (Mg <sup>2+</sup> )        | L'ion Mg <sup>2+</sup> fonctionne comme un cofacteur de l'activité des ADN polymérases en permettant l'incorporation des dNTPs pendant la polymérisation. Il facilite l'hybridation des amorces et des matrices d'ADN en stabilisant les charges négatives au niveau des groupements phosphates. Les ions Mg <sup>2+</sup> se lient au site actif de l'enzyme et catalysent la formation de liaisons phosphodiester entre le 3'-OH d'un dNTP et le groupement phosphate d'un autre dNTP.  |
| Tampon                                     | La PCR est réalisée dans un tampon qui fournit un environnement chimique approprié pour l'activité de l'ADN polymérase. Le pH du tampon est généralement compris entre 8,0 et 9,5 et est souvent stabilisé par du Tris-HCl.   |

2- Les étapes de la PCR :

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Dénaturation initiale (94-98°C) | L'étape de dénaturation initiale est réalisée au début de la PCR pour séparer l'ADN matrice double brin en monocaténaires afin que les amorces puissent se lier à la région cible et initier l'extension. La dénaturation complète de l'ADN d'entrée permet d'assurer une amplification efficace de la séquence cible pendant le premier cycle d'amplification. En outre, la température élevée à cette étape aide à inactiver les protéases ou nucléases thermolabiles qui peuvent être présentes dans l'échantillon, avec un impact minimal sur les ADN polymérases thermostables. |
| Dénaturation (94-98°C)          | Après l'étape de dénaturation initiale, les cycles de PCR suivants commencent par une étape de dénaturation distincte. Le temps et la température doivent être optimisés en fonction de la nature de l'ADN matrice, de l'ADN polymérase et des composants du tampon.   |
| Hybridation (55-70°C)           | Dans cette étape, la température de réaction est abaissée pour permettre l'hybridation des amorces sur l'ADN cible.  |
| Élongation (68-72°C)            | Pour l'étape d'élongation, la température augmente pour atteindre la température optimale de l'ADN polymérase afin que son activité soit maximale. L'ADN polymérase incorpore des dNTPs pour polymériser le nouveau brin d'ADN complémentaire de la matrice à partir de l'extrémité 3'-OH des amorces.   |
| Nombre de cycles                | Les étapes de PCR de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sont répétées (ou «cyclées») plusieurs fois pour amplifier l'ADN cible. Le nombre de cycles est en général de 25 à 35, mais peut varier en fonction de la quantité d'ADN de départ et du rendement souhaité en produit de PCR.  |
| Élongation finale (68-72°C)     | La dernière étape d'extension suit l'achèvement du dernier cycle de PCR. Dans cette étape, le mélange PCR est incubé à la température d'élongation. La durée de cette étape finale dépend de la longueur et de la composition de l'amplicon et doit être optimisée pour assurer une polymérisation complète et un bon rendement de l'ADN cible.  |

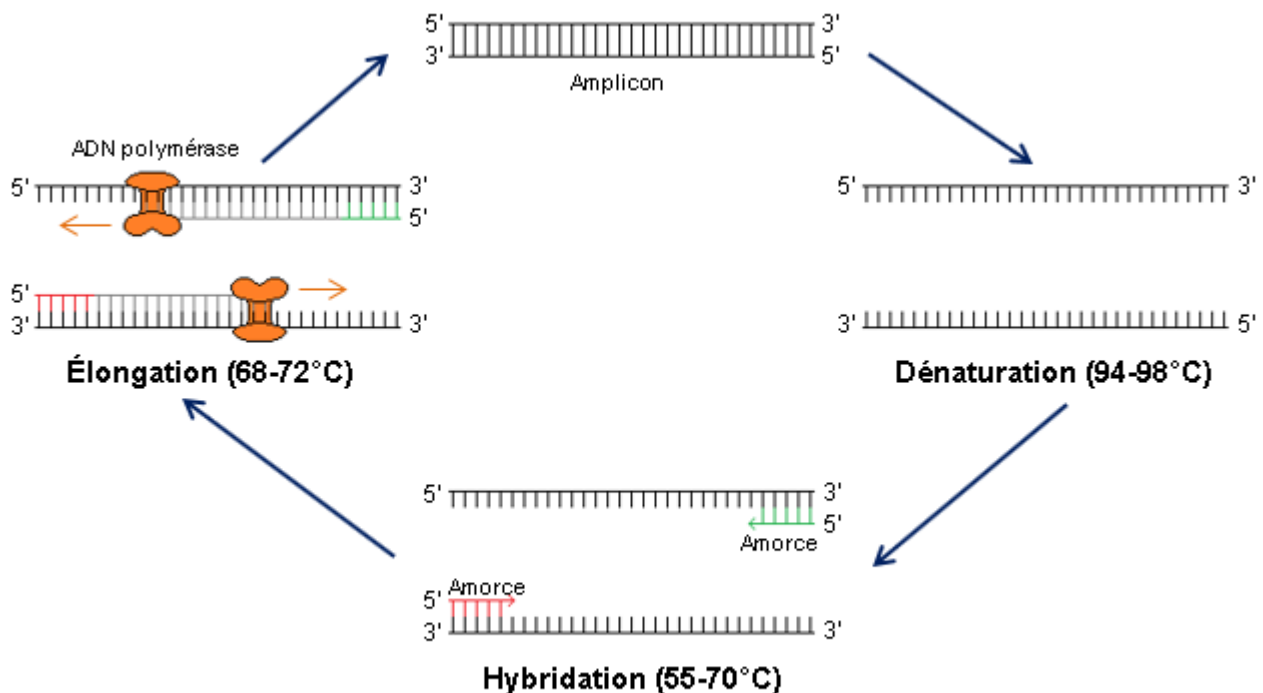


Fig. 1 : Illustration simplifiée des principales étapes de la PCR

VNTR et empreintes génétiques

Le matériel génétique des humains est composé de 6,4 milliards de nucléotides répartis sur 23 paires de chromosomes. Bien que ce matériel soit globalement identique entre chaque individu, il comporte de petites différences nous rendant unique. 90% de ces différences sont représentées par les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui concernent la variation d'une seule paire de base (Voir kit PCR du gène de sensibilité au PTC, réf PCRPTC). Il existe d'autres types de polymorphisme génétique, notamment les STR (Short Tandem Repeats) et les VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), « répétitions en tandem à nombre variable ». Il s'agit de séquences d'ADN répétées en tandem qui varient suivant les individus. Les STR comportent de 2 à 6 paires de bases (pb) répétées de 3 à 100 fois et le VNTR comportent de 15 à 70 pb répétées de 5 à 100 fois.

L'étude de ces variations permet de déterminer une empreinte génétique qui est propre à chaque individu et est employé dans de nombreux domaines (recherche fondamentale, génétique des populations, médecine légale...).

Nous nous intéressons ici à la VNTR du locus D1S80 présent sur le chromosome 1 où une séquence de 16 pb est répétée de 13 à 44 fois (32 allèles possibles). Les élèves vont amplifier leur propre ADN pour déterminer leur profil génétique. Ils utiliseront un couple d'amorces placées de part et d'autre de la VNTR et obtiendront des amplicons de 255 à 751 pb en fonction du nombre de répétitions.

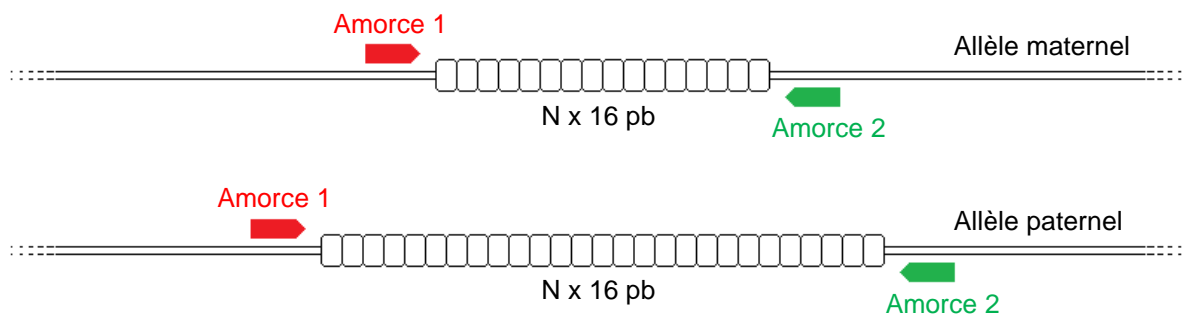
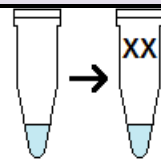


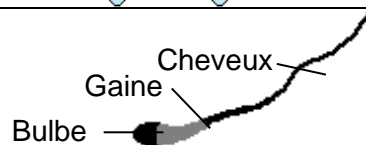
Fig. 2 : Exemple d'amplification pour un individu

## EXTRACTION DE L'ADN

Notez vos initiales sur le côté d'un microtube PCR contenant 20 µL de tampon d'extraction de l'ADN.



Prélevez 2 cheveux présentant si possible un joli bulbe et une gaine de cellules épithéliales visible.



Coupez l'extrémité des cheveux (**5 mm max**) au-dessus du microtube contenant le tampon d'extraction de l'ADN.

**NB : placer une feuille blanche sur la paillasse pour retrouver le cheveu s'il tombe**

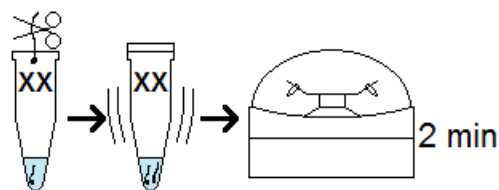
Fermez le microtube et tapotez le fond ou utiliser un vortex pour homogénéiser le tampon.

Placez les microtubes dans la centrifugeuse (étape commune).

**! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !**

Centrifugez les tubes pendant **2 min**.

**! Vérifiez que les extrémités des cheveux sont bien dans le tampon d'extraction de l'ADN !**



Incubez le microtube pendant **2 min à 37°C puis 1 min à 95°C**.

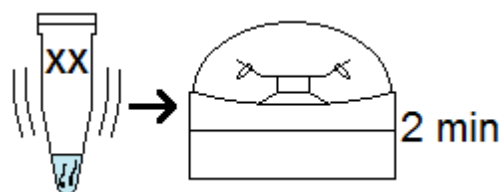
Vous pouvez effectuer cette étape au bain-marie ou bien directement dans le thermocycleur MiniPCR :

- 1- Cliquez sur « + »
- 2- Choisissez « Flex »
- 3- Entrez un nom pour le protocole ; par exemple « Extraction de l'ADN »
- 4- Cliquez sur « Ajouter une étape »
- 5- Choisissez « Incubation »
- 6- Définissez les paramètres d'incubation : **37°C / 2min**
- 7- Cliquez sur « Ajouter une étape »
- 8- Choisissez « Incubation »
- 9- Définissez les paramètres d'incubation : **95°C / 1 min**
- 10- Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole ou cliquez sur "Démarrer" pour lancer l'incubation.

Une fois l'incubation terminée, retirez le microtube et laissez-le refroidir sur un portoir à température ambiante (étape commune).

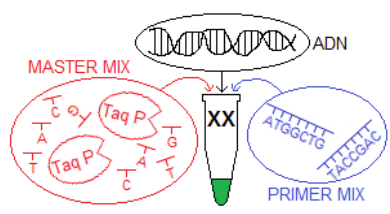

Tapotez le fond du microtube ou utilisez un vortex pour remettre le contenu du microtube en suspension puis centrifugez les microtubes pendant **2 min**.

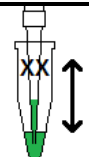
**! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !**

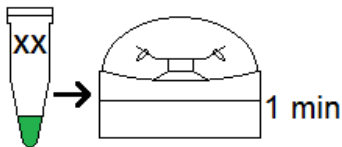


## PCR ( Polymerase chain reaction) : Amplification de l'ADN

Notez vos initiales sur le côté d'un microtube PCR propre.

|   |  |   |
|---|--|---|
| Ajoutez les réactifs suivants :   | <b>Mix (M) 10 µL</b><br><b>Amorces (A) 10 µL</b><br>Echantillon d'ADN <b>2 µL</b>  |  |
|  | Prélevez l'ADN en surface du tampon d'extraction. Si un précipité s'est formé dans le tube d'extraction, ne le transférez surtout pas dans le microtube PCR. |   |

|   |   |
|---|---|
| Aspirez et refoulez plusieurs fois avec la micropipette pour bien mélanger les réactifs de PCR (ou utilisez un vortex). |  |
|---|---|

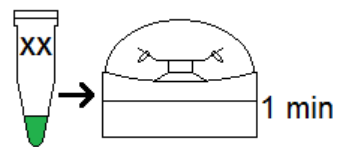
|  |   |
|--|---|
| Bouchez soigneusement le microtube et centrifugez-le pendant <b>1 min</b> (étape commune).<br><i>! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !</i> |  |
|--|---|

Placez le tube dans le thermocycleur et fermez soigneusement le couvercle (étape commune).

Programmez le thermocycleur (étape commune) :

| CYCLE                   | T (°C)    | t (s) |
|-------------------------|-----------|-------|
| Dénaturation initiale   | 94°C      | 120 s |
| Dénaturation            | 94°C      | 15 s  |
| Hybridation             | 60°C      | 15 s  |
| Elongation              | 68°C      | 20 s  |
| Elongation finale       | 68°C      | 120 s |
| <b>Nombre de cycles</b> | <b>30</b> |       |

- Si vous possédez un thermocycleur MiniPCR :
- Cliquez sur « + ».
  - Choisissez « PCR ».
  - Entrez un nom pour le protocole, par exemple « PTC ».
  - Entrez les paramètres du protocole PCR.
  - Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole.
  - Cliquez sur "Démarrer" pour lancer la PCR.

|  |   |
|--|---|
| Une fois la PCR terminée, ouvrez le couvercle et retirez les microtubes.<br>Centrifugez les tubes pendant <b>1 min</b> .<br><i>! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !</i> |  |
|--|---|

**Vous pouvez mettre les tubes au congélateur à ce stade, pour terminer à la séance suivante**

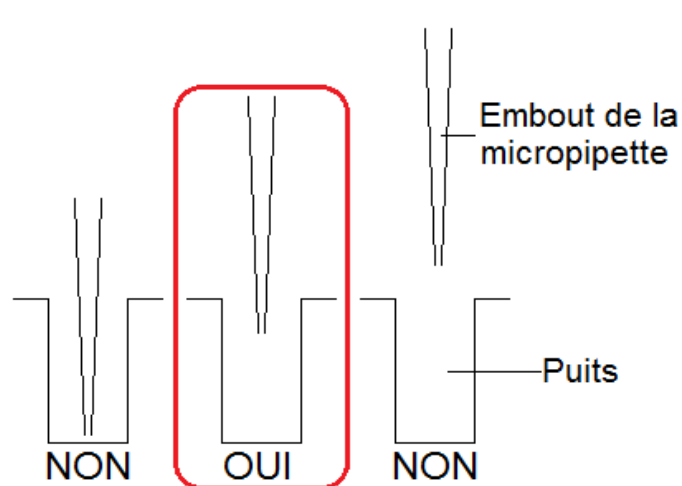
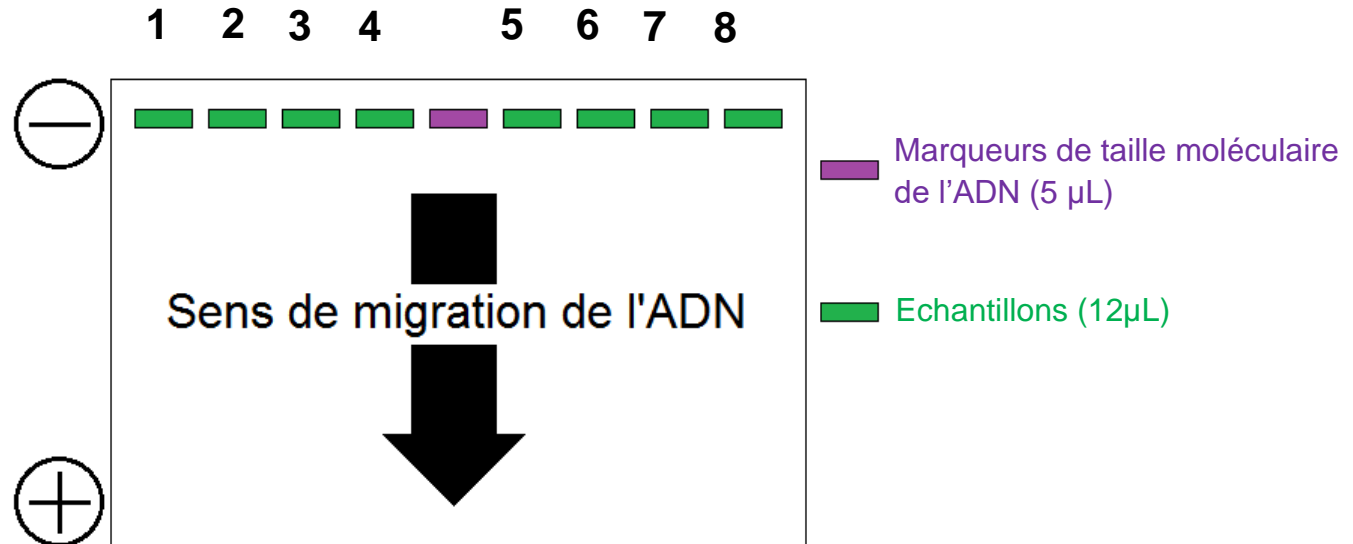
## ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE


La cuve à électrophorèse contient un gel d'agarose à 9 puits immergé dans 25 mL de tampon TBE.

Chaque gel est prévu pour analyser le génotype de 8 individus.

Pour connaître la taille des fragments d'ADN, vous disposez également d'un microtube contenant **un marqueur de poids moléculaire de l'ADN** (mélange de différents fragments d'ADN de taille connue).

Déposer les échantillons d'ADN dans les puits du gel d'agarose comme indiqué ci-dessous :



 Le dépôt des échantillons se fait à la micropipette. La manière d'effectuer ces dépôts conditionne la réussite de la manipulation !

Si on effectue le dépôt au fond du puits, il y a un risque de débordement ou pire de percer le fond du puits !

Si on effectue le dépôt trop au-dessus du puits, le dépôt se fera hors du puits !

Placez le couvercle sur la cuve d'électrophorèse.



Mettez en marche la cuve d'électrophorèse.

Mettre le cache sur la cuve et contrôler régulièrement l'avancée de l'électrophorèse.

Une fois l'électrophorèse terminée, prenez une photo du gel.

Eteignez et débranchez la cuve.

### FICHE LABORATOIRE

#### EXTRACTION DE L'ADN

##### Préparation de la solution de lyse

- Pipetez 400  $\mu$ L de tampon de lyse dans un microtube Eppendorf.
- Ajoutez 12  $\mu$ L de Protéinase K.
- Mélanger en aspirant et refoulant à la micropipette ou brièvement avec un vortex.
- Centrifuger 15 s.
- Aliquotez la solution de lyse : pipetez 20  $\mu$ L de solution de lyse dans 18 microtubes PCR.

#### PCR

##### Préparation du Mix d'amorces

- Pipetez 184  $\mu$ L d'eau distillée (dH<sub>2</sub>O) dans un microtube Eppendorf.
- Pipetez 8  $\mu$ L du tube d'amorces A à 10  $\mu$ M et les ajouter dans le tube contenant l'eau.
- Pipetez 8  $\mu$ L du tube d'amorces B à 10  $\mu$ M et les ajouter dans le tube contenant l'eau.
- Mélanger en aspirant et refoulant à la micropipette ou brièvement avec un vortex.
- Centrifuger 15 s.
- Aliquotez ce Mix d'amorces : pipetez 11  $\mu$ L de Mix d'amorces dans 18 microtubes Eppendorf.

##### Préparation du Mix PCR

- Aliquotez le Mix PCR : pipetez 11  $\mu$ L de Mix d'amorces dans 18 microtubes Eppendorf.

#### ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE

Préparez les gels d'agarose à 1.5 % additionnés de Gelgreen (2  $\mu$ L pour 25 mL) avec du tampon TBE 1X  
Exemple pour 100 mL de gel d'agarose à 2% :

- Mélangez 1.5 g d'agarose avec 110 mL de tampon TBE 1X et portez à ébullition au micro-onde jusqu'à complète dissolution de l'agarose.
- Ajoutez 8  $\mu$ L de Gelgreen et mélangez.
- Laissez refroidir la solution d'agarose pendant 2 min.
- Coulez les gels en suivant la notice de vos cuves à électrophorèse. Si vous utilisez une cuve Bluegel, coulez des gels de 20 mL.
- Placez les gels dans les cuves à électrophorèse.
- Immergez les gels d'agarose avec le tampon TBE 1X en suivant la notice de vos cuves à électrophorèse. Si vous utilisez une cuve Bluegel, mettez 25 mL de tampon TBE 1X



## CONSEILS ET ASTUCES

### EXTRACTION DE L'ADN

Cette étape est déterminante !

- Préparez le tampon d'extraction juste avant le TP.
- Attention aux contaminations : le matériel utilisé doit être propre et manipulé uniquement par la personne qui extrait son ADN. La PCR est une technique très sensible, même une faible quantité d'ADN peut contaminer un échantillon (possibilité de « faux positifs »).
- Assurez-vous bien que les extrémités des cheveux sont bien immergées dans le tampon d'extraction avant l'incubation.
- Pour les cheveux fins, vérifiez la présence du bulbe avec une loupe à main ou une loupe binoculaire.
- Ne mettez pas plus de 2 cheveux dans le tube d'extraction. Une trop grande quantité peut inhiber l'extraction de l'ADN.
- Utilisez préférentiellement un thermocycleur pour effectuer l'incubation. Si, malgré tout, vous décidez d'utiliser un bain-marie, utilisez un microtube à vis pour éviter d'éventuelles projections et soyez précis sur les températures d'incubation.
- La centrifugation finale est importante, elle permet de séparer l'ADN extrait des débris cellulaires qui pourraient inhiber à la réaction de PCR.

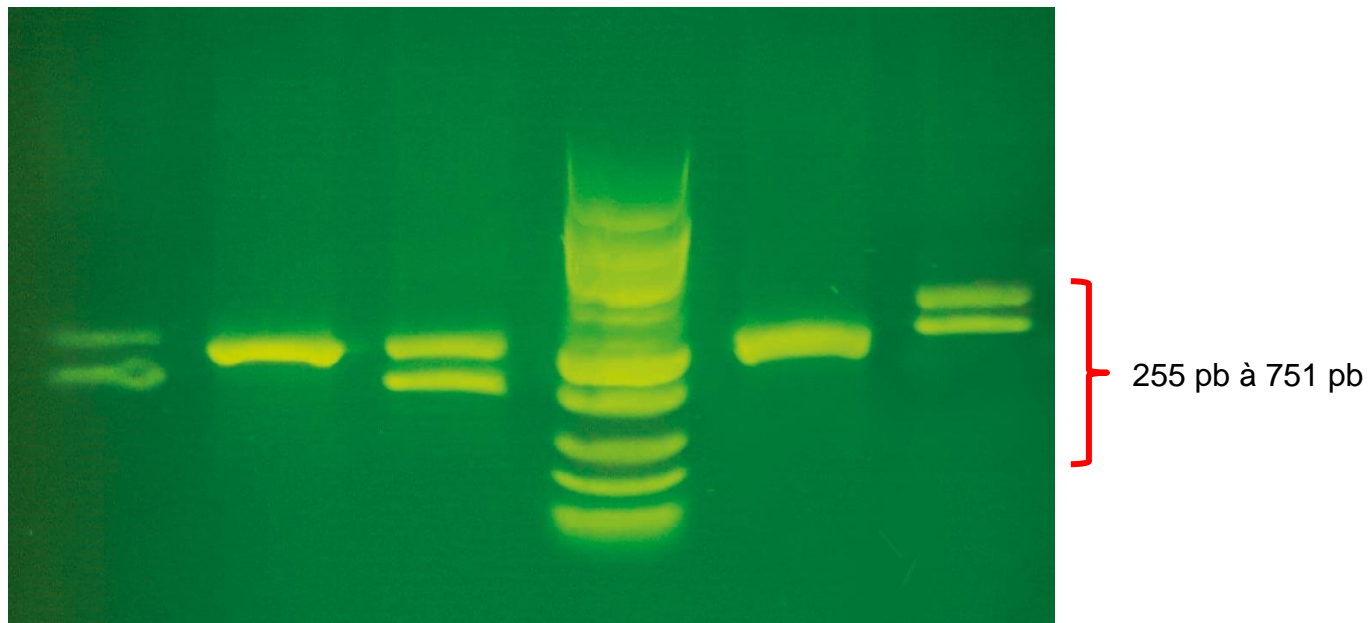
### PCR ( Polymerase chain reaction ) : Amplification de l'ADN

- Préparez le mix d'amorces au dernier moment juste avant le TP.
- Le mix PCR peut être aliquoté quelques jours avant le TP et remis au congélateur avant utilisation.
- Ne prélevez pas plus de 2  $\mu$ L de suspension d'ADN. En règle générale, il faut s'assurer que l'utilisation de la micropipette est maîtrisée avant d'effectuer les différentes manipulations !
- Comme indiqué sur le protocole, pipetez l'ADN en surface du tampon d'extraction pour éviter d'incorporer des débris cellulaires dans le milieu réactionnel.
- Quel que soit le thermocycleur utilisé, respectez les températures et temps indiqués pour chaque étapes de la PCR. Ces valeurs sont optimales pour l'ADN polymérase et les amorces utilisées.

### ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

- Si vous utilisez une cuve Bluegel, Respectez scrupuleusement les volumes des gels (20 mL) et du tampon TBE 1X (25 mL). Assurez-vous que les puits du gel sont bien immergés.
- Lors du dépôt des produits de PCR dans les puits, il n'est pas nécessaire d'aller jusqu'à la deuxième butée de la micropipette pour éviter les bulles d'air.
- Utilisez une micropipette 2-20  $\mu$ L, leurs embouts sont plus adaptés aux dépôts dans les puits.
- Le pourcentage d'agarose des gels est parfaitement adapté pour les cuves Bluegel. Suivant le matériel utilisé, la migration de l'ADN peut être plus longue. Pour une migration plus rapide, réalisez des gels d'agarose plus fins ou diminuez la quantité d'agarose (au moins 1 % cependant).

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET ANALYSE



Voici un exemple de résultat obtenu avec 5 individus. La taille des fragments d'ADN peut aller théoriquement de 255 pb à 751 pb et donner lieu à 528 génotypes différents !

Ce kit peut être utilisé pour une multitude de scénarios : enquêtes policières, tests de parentés...

### **FICHE SECURITE (guide non exhaustif)**

- Ne pas inhaler ni ingérer les produits contenus dans ce kit. Eviter les projections dans les yeux. En cas de projection dans les yeux, rincer à grande eau.  
Cependant, aucun des produits contenus dans ce kit ne requièrent de précaution particulière.
- Le gel d'agarose chaud peut provoquer des brûlures. Manipuler avec des gants anti-chaleur.  
***En cas de brûlures, passer la zone atteinte sous l'eau froide pendant 15 minutes.***
- Nous vous conseillons de manipuler les colorants avec des gants.

### **FICHE CONSERVATION**

**Les échantillons d'ADN sont stockés à -20°C pendant 2 mois.**

*Attention : ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit pendant 2 mois.*

### **FICHE TRI ET RECUPERATION**

Les ADN, et le TBE peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau.

Les tubes de plastiques, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon).

L'agarose peut être jeté à la poubelle.