

Traduction et adaptation de la notice de MINIPCR

A RECEPTION DU COLIS :



COMPOSITION (pour 10 binômes, jusqu'à 40 réactions de qPCR)

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 ⚠

- 2X qGRN Master Mix **600 µL (pour 40 réactions)**, comprenant :
 - Taq ADN polymérase
 - dNTPs
 - Tampon PCR avec Mg²⁺
 - qPCR colorant fluorescent
- qPCR Lab Primers **450 µL (pour 60 réactions ; en fait 40 + marge d'erreur de pipetage)**: amorces
- DNA sample **185 µL (pour 24 réaction si utilisé pur, mais doit être dilué par les élèves)**: Échantillon d'ADN Échantillon de référence
- Nuclease-Free Water : Eau exempte de nucléases **1000 µl (pour les dilutions) -20°C congélateur**
- 100bp DNA Ladder, Load-Ready™ **100 µL**: Marqueur de poids d'ADN 100bp
- Loading dye **150 µL** : colorant de charge

- ⚠ Placer le reste à température ambiante ⚠

Tubes à bandelettes PCR :

- Cinq bandes de 8 tubes (à briser en bandes de quatre)

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 kit s'appliquent toutefois (le port de gants, lunettes et blouse est conseillé). Tous les résidus peuvent être jetés à l'évier.

MATERIEL NECESSAIRE

- Agarose 2 %, Tampon TBE 1X, Agent révélateur de l'ADN : GELGREEN (2µL par gel) –ou comprimés complets
- Microtubes de 200 µL (type PCR) pour faire les dilutions 1 par binôme
- Microtubes types ependorf pour alicoter les réactifs : 2 par binôme
- Thermocycleur pédagogique miniature MINIPCR
- Cuve à électrophorèse d'ADN avec transilluminateur BLUEGEL
- Micro-onde ou bain-marie
- Gant anti-chaueur ou moufle de préhension
- Gants, Micropipettes et cônes
- Eau distillée, Flacon d'un litre

I. ACTIVITES PREPARATOIRES

A. Planification expérimentale et réalisation de dilutions

- Décongeler l'échantillon d'ADN et l'eau exempte de nucléases en plaçant les tubes sur un support ou dans un bain-marie à température ambiante.
- Pour chaque binôme, étiqueter et distribuer dans des microtubes séparés :
 - Étiquette d'échantillon d'ADN "R" pour la référence 18 µl
 - Étiquette "H2O" pour l'eau exempte de nucléases 100 µl
- Chaque binôme aura en outre besoin des fournitures suivantes :
 - Micropipettes, une par groupe (il est recommandé d'utiliser une micropipette de 2 à 20 µl).
 - Des embouts/cônes de micropipette jetables et un petit gobelet ou une tasse pour les jeter.
 - Au moins deux tubes de 200 µl pour faire les dilutions.
 - Un marqueur permanent (à pointe fine).

B. Mise en place de la PCR

- Décongeler les tubes contenant le Master Mix 2X qGRN et les amorces du TP qPCR en les plaçant sur un support ou dans un bain-marie à température ambiante. Les élèves doivent également décongeler leurs dilutions si elle a été effectuée au cours d'une période antérieure.
- Pour chaque binôme, étiqueter et distribuer dans des microtubes séparés de 1,7 ml :
 - 2X qGRN Master Mix Label as "qMM" 60 µl
 - qPCR Lab Primers Label as "Primers" 40 µl
- Chaque binôme aura en outre besoin des fournitures suivantes :
 - Une bande de 4 tubes PCR avec des bouchons. Les tubes sont fournis en barrette de huit. Il suffit de les tourner et de les tirer pour les diviser en groupes de quatre. Vous pouvez également couper la bande avec des ciseaux.

Préparation du TP (préparateur)		Activité en classe (élèves)	
Distribuer l'ADN et l'eau pour les dilutions	10 min	1	Organiser la séance et faire les dilutions 20 min
Distribuer les réactifs de PCR et préparer les équipements	20 min	2	Préparer et programmer la PCR 20 min
		3	Suivi de la qPCR 50 min
Préparer les réactifs de l'électrophorèse	20 min	Electrophorèse sur gel	
		4	Coulage des gels 10 min
		5	Migration 25 min

II. OBJECTIFS COGNITIFS

Dans ce kit, les élèves vont réaliser une version modifiée d'une réaction en chaîne de la polymérase quantitative (qPCR).

Il offre aux élèves une introduction au monde de la PCR quantitative. En utilisant des outils peu coûteux, les élèves pourront visualiser directement l'amplification de l'ADN et pourront calculer les concentrations de la matrice d'ADN.

1. Contexte et signification

La qPCR contrôle la quantité de produit PCR produite en temps réel en utilisant des colorants fluorescents ou des sondes et un appareil spécialisé de QPCR. Ce kit modifie la réaction de manière à ce que vous puissiez observer le changement en fluorescence directement, en utilisant des équipements peu coûteux. De cette manière, cette activité constitue un excellent outil d'apprentissage illustratif sur la manière dont la fluorescence et la PCR peuvent être utilisées pour quantifier les acides nucléiques tout en fournissant également une introduction au processus de PCR en général. Les élèves doivent avoir une connaissance avec le processus PCR avant de commencer cette enquête.

2. La PCR comme mesure

Lorsque la réaction en chaîne de la polymérase, ou PCR, a été inventée dans les années 1980, elle a révolutionné la biologie et a valu un prix Nobel à son inventeur, le Dr Kary Mullis. En utilisant quelques ingrédients simples, les scientifiques pourraient prélever un échantillon complexe d'ADN et faire des milliards de copies d'une séquence très spécifique, le tout en quelques heures. La PCR est rapidement devenue un pilier dans les TP de biologie du monde entier. Les appareils PCR se sont rapidement automatisés et les protocoles ont été rationalisés, mais la technique de base est restée la même. En effet, la plupart des protocoles PCR réalisés aujourd'hui sont peu modifiés par rapport à l'invention originale.

La plupart des PCR sont ce que l'on appelle un test de fin de ligne. Une fois que la réaction commence, on n'observe les produits qu'à la fin de la réaction, généralement après 30 cycles ou plus.

Les copies réalisées en PCR peuvent être utilisées dans de nombreux autres protocoles, mais pendant la réaction, la PCR la machine est une boîte noire virtuelle (et parfois littérale) - il n'y a aucun moyen d'observer ce qui se passe à l'intérieur de la réaction. Cela a changé avec l'invention de la PCR quantitative (qPCR) au début des années 1990.

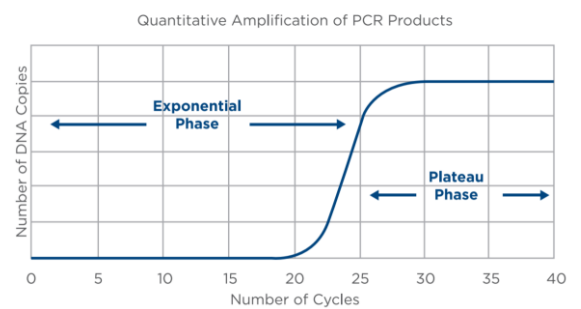
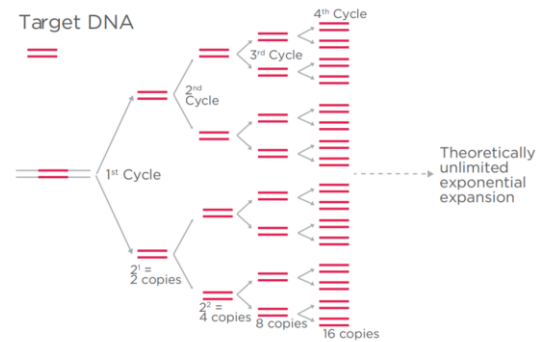
Avec la qPCR, au lieu de simplement regarder le produit à la fin de la réaction, les scientifiques utilisent la lumière pour détecter et quantifier le produit de la réaction en temps réel. La PCR fait des copies de séquences très spécifiques de l'ADN, connu sous le nom de cible, et dans chaque cycle PCR, la quantité de cette cible très spécifique est Le qPCR permet de suivre la quantité de cible produite par la réaction à chaque étape en combinant l'ADN avec un colorant fluorescent ou une sonde. Les colorants ne deviennent fluorescents que lorsqu'ils sont liés à l'ADN double brin (ADNdb), donc plus la réaction produit d'ADNdb est importante, plus la fluorescence est brillante.

GUIDE DE L'ÉLÈVE

Lorsque vous lancez une PCR, l'ADN cible qui vous intéresse est présent dans un mélange complexe avec d'autres ADN. La grande majorité de l'ADN contenu dans l'échantillon n'est pas la cible de l'expérience. La séquence très spécifique est donc relativement rare. Comme la PCR progresse, le nombre de copies de cet ADN cible doublera à chaque cycle, tandis que le reste de l'ADN ne le fera pas. Cela signifie que dans l'absolu le nombre de copies de votre ADN cible est d'abord faible et impossible à distinguer de l'ADN global.

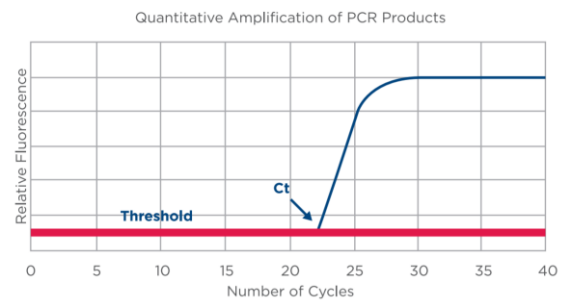
Au fur et à mesure que la réaction progresse et que le nombre de copies de votre séquence d'ADN cible double (à chaque cycle de réaction), son abondance augmente de plus en plus rapidement. C'est la croissance exponentielle.

Le nombre de copies de la séquence cible finit par plafonner quand il n'y a plus assez des réactifs pour faire la réaction. Dans la PCR classique, on essaie généralement d'attendre que la réaction atteigne ce stade.



Dans la QPCR, c'est la phase exponentielle que nous sommes intéressés. La croissance exponentielle de notre produit de PCR signifie que pendant longtemps, aucun changement réel ne sera observable. Ensuite, la quantité de produit PCR semblera augmenter extrêmement rapidement avant de se stabiliser à nouveau.

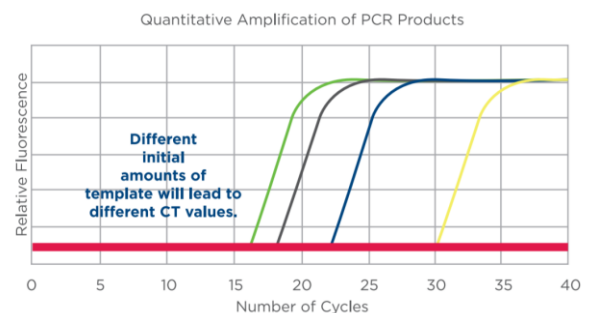
Lorsque l'on observe le colorant fluorescent dans notre réaction, cela signifie que pour une grande partie de la réaction la quantité de fluorescence sera relativement faible et impossible à distinguer. Alors à mesure que le nombre de nouvelles copies d'ADN augmentera, il devient fluorescent. À ce stade, la fluorescence devient observable. Quand la fluorescence est observable pour la première fois, on appelle ce stade Ct, pour cycle seuil.



Au fur et à mesure que la réaction progresse, le nombre d'ADN cible continue à augmenter, tout comme le niveau de fluorescence jusqu'aux plateaux de (fin de) réaction.

La clé de la qPCR est que le délai d'apparition du Ct (seuil) est directement lié à la quantité de l'ADN cible étant dans l'échantillon au départ.

Plus il y avait d'ADN cible au départ, le plus tôt le Ct sera atteint. Cela signifie qu'en observant le Ct, nous pouvons en apprendre davantage sur notre concentration originelle d'ADN. Parce que la quantité d'ADN cible double à chaque cycle, si la réaction A atteint Ct avant la réaction B, vous pouvez estimer que la réaction A a commencé avec une



séquence cible environ deux fois plus importante que la réaction B. Si la réaction A atteint Ct deux cycles avant la réaction C, on peut estimer qu'il y a eu une différence de quatre fois dans la quantité initiale de la séquence cible, et ainsi de suite.

Les utilisations de la qPCR sont nombreuses. Chaque fois qu'un chercheur souhaite quantifier la quantité d'une séquence nucléotidique particulière, il peut utiliser la qPCR. Par exemple, dans un cadre clinique, le qPCR peut confirmer la présence d'une infection en amplifiant une séquence virale particulière, mais il peut aussi mesurer la quantité de virus dans l'organisme d'une personne, en mesurant à quel point cette séquence est relativement courante dans un échantillon. L'utilisation la plus répandue de la qPCR dans la recherche a probablement été la quantification de l'ARN. Dans tout organisme, chaque cellule possède un ensemble d'ADN identique. Pourtant, les cellules utilisent cet ADN de manière très différente et réagissent aux stimuli externes en augmentant ou en diminuant la quantité de certains gènes utilisés. Dans la cellule, cela se fait en transcrivant plus ou moins d'ARN messager (ARNm), qui sera ensuite traduit en protéines. L'invention de la qPCR a permis aux scientifiques de mesurer ces niveaux d'expression gène par gène avec plus de précision que jamais auparavant. Les scientifiques peuvent désormais recueillir tout l'ARN d'un échantillon, effectuer une étape de transcription inverse, en convertissant l'ARN en ADN, et effectuer une qPCR sur l'échantillon. La comparaison de la vitesse à laquelle une séquence particulière atteint Ct par rapport à d'autres échantillons permettra de mesurer la quantité de ce gène utilisée dans le tissu à partir duquel l'échantillon a été isolé.

Le TP d'aujourd'hui

Dans ce kit, nous vous fournissons un échantillon d'ADN de concentration connue. Votre travail consiste à effectuer une qPCR sur cet échantillon, deux autres échantillons et un contrôle négatif. Pour les deux autres échantillons, le premier sera un échantillon que vous créerez en diluant l'ADN qui vous a été fourni à une nouvelle concentration de votre choix. Votre travail consistera alors à prévoir à quel cycle votre échantillon atteindra le Ct. Le deuxième échantillon vous sera fourni par un autre groupe. Votre défi avec cet échantillon sera de déterminer sa concentration relative par rapport à votre échantillon en mesurant la valeur approximative du Ct. Enfin, à la fin de votre protocole, vous aurez la possibilité de faire passer vos échantillons sur un gel d'agarose pour comparer les résultats de votre qPCR avec une approche PCR classique.

Le qPCR que vous effectuez va amplifier une courte région de l'ADN d'une concentration connue. Comme la PCR Si le processus progresse, vous prélèverez des échantillons à intervalles réguliers et vous jugerez visuellement de la quantité de fluorescence produit, à l'aide d'un illuminateur à lumière bleue. Dans un qPCR effectué dans un TP de recherche ou un établissement médical, La fluorescence est toujours contrôlée que par un fluorimètre automatisé - les gens ne regardent jamais les tubes. Bien que l'évaluation de la fluorescence à vue soit moins précise que celle d'une machine automatique, Les colorants fluorescents sont facilement visibles à l'œil nu et vous permettent d'observer la réaction.

Pour cette raison, cependant, les valeurs de Ct que vous obtenez dans ce TP doivent être considérées comme approximatives, et il faut s'attendre à de petites différences entre les valeurs attendues et observées. Malgré cela, les différences relatives entre deux échantillons de concentrations différentes devraient être facilement apparentes.

Une note sur les termes

Dans ce TP, nous appelons la PCR quantitative "qPCR". qPCR est aussi parfois appelée " PCR temps réel ", car la progression de la réaction est observée en temps réel. Nous nous entendons donc ce terme "en temps réel", car la progression de la réaction est observée en temps réel.

Une utilisation courante de la qPCR consiste à quantifier le nombre de copies d'ARN. La quantification de l'ARN nécessite une première étape de copier l'ARN cellulaire dans l'ADN, une étape connue sous le nom de "transcription inverse". Parce que le "temps réel" et la la "transcription inverse" peut être abrégé par les

lettres RT (en anglais), en désignant une réaction par RT-PCR peut être ambiguë. Nous suivons la convention qui consiste à utiliser la TR pour désigner la transcription inverse, et à utiliser RT qPCR pour désigner la mesure quantitative des niveaux de transcription de l'ARN à l'aide de la PCR.

Dans ce kit, nous utilisons un colorant fluorescent non spécifique de l'ADN pour mesurer les niveaux totaux d'ADN dans la réaction.

Les sondes ADN sont une technologie distincte mais apparentée. Une sonde est une séquence d'ADN courte et spécifique avec un fluorophore fixé qui est complémentaire d'une partie du produit de la PCR dans une réaction de QPCR.

Les sondes mesurent la quantité de produit PCR spécifique en solution, tandis que les colorants mesurent l'ADN total en solution. Les sondes peuvent être utiles car elles ne mesurent que la séquence d'ADN cible spécifique et sont donc considérés comme plus précis. De plus, l'utilisation de sondes de différentes couleurs permet au chercheur de mesurer la concentration de plusieurs séquences cibles dans une même réaction. Mais les sondes ont tendance à être beaucoup plus coûteuses que les colorants d'ADN. En outre, chaque sonde doit être conçue avec une séquence cible très spécifique, alors que les colorants d'ADN peuvent être utilisés en général dans toute réaction de qPCR.

A. Planification expérimentale et réalisation de dilutions

Vous étudierez **3 échantillons et un contrôle négatif** en utilisant le qPCR

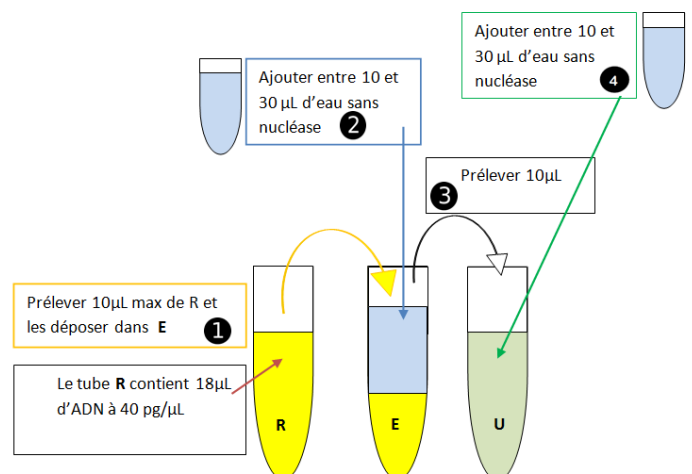
1. Votre professeur vous fournira un tube étiqueté R (Référence)

- Celui-ci contient une concentration connue de matrice d'ADN : 40 pg/μL.

Vous utiliserez cet échantillon de référence comme base pour calculer la concentration relative les concentrations de vos autres échantillons.

2. Utilisez les tableaux "Planification des échantillons expérimentaux" ci-dessous pour planifier l'échantillon E (expérimental)

- Pour fabriquer l'échantillon E, vous mélangerez de l'eau exempte de nucléase et une partie de votre échantillon R afin d'obtenir une nouvelle dilution de l'ADN.
- Prévoyez de faire entre 20 et 40 μl de l'échantillon E, mais n'utilisez pas plus de 10 μl de votre R échantillon pour le faire.
- Votre objectif avec l'échantillon E est de choisir un nombre de cycles auquel vous attendez à ce que votre échantillon soit fluorescent par rapport à R, et créer une dilution qui sera visiblement fluorescente à ce cycle.
- Une fois que vous avez planifié cette nouvelle dilution, votre travail consiste à prévoir à quel cycle PCR vous aller voir la fluorescence dans votre échantillon. Ceci est basé sur le fait que, théoriquement, la quantité de produit PCR devrait doubler à chaque cycle de PCR. C'est vous qui décidez du degré de dilution



Que vous voulez faire dans votre échantillon E. Nous recommandons d'utiliser une dilution qui produira une fluorescence entre 3 et 10 cycles après votre échantillon R original.

3. Utilisez le tableau ci-dessous pour vous aider à calculer comment faire votre échantillon E

			Utiliser seulement si vous faites une dilution en série	
	ADN de référence	Dilution	2nd tube	3ème tube
Concentration	1X (40 pg/μL)			
Volume ajouté à partir du tube précédent	--			
eau ajoutée	--			

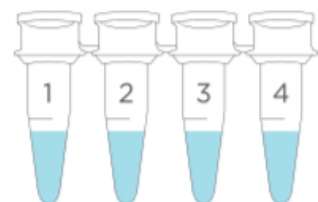
Des gants et des lunettes de protection doivent être portés pendant toute la durée de cette expérience.

4. Étiqueter un nouveau tube de 200 μl : Étiquetez votre tube E, pour Expérimental.
5. Faites votre dilution dans le tube E
 - Utilisez les échantillons R et H₂O pour effectuer votre dilution comme vous l'avez décrit dans le tableau ci-dessus.
 - Si votre facteur de dilution est important, vous pouvez utiliser plusieurs tubes et effectuer une dilution en série.
6. Étiquetez un nouveau tube de 200 μl : Étiquetez le tube U pour inconnU.
 - À l'aide d'une micropipette, prélevez au moins 10 μl de votre échantillon E et mettez-le dans le tube étiqueté U.
 - Assurez-vous que votre tube E contient toujours au moins 10 μl.
7. Trouvez un autre groupe et échangez les tubes U
 - Ne dites pas à l'autre groupe la concentration de votre ADN. C'est à eux de le découvrir !
 - Votre travail avec ce tube est d'estimer la concentration de l'autre groupe qui a rendu leur échantillon.
8. Planifiez votre expérience
 - Avant de passer à B. Mise en place de la PCR, remplissez la première colonne (Cycle #) du tableau 2 (page 14).
 - Vous pouvez choisir votre intervalle d'observation - combien de cycles PCR attendre entre les observations. Nous recommandons de vérifier vos tubes au maximum tous les trois à cinq cycles, mais utilisez votre facteur de dilution comme guide.
 - Votre première observation de la fluorescence devrait se situer au cycle 10.
 - Après cette observation, vous pouvez faire jusqu'à 7 observations supplémentaires.

B. Mise en place de la PCR

Des gants et des lunettes de protection doivent être portés pendant toute la durée de cette expérience.

1. Avant de mettre en place votre PCR, vous devez terminer la planification de votre expérience
 - Indiquez dans le tableau 2 (page 12) les cycles que vous prévoyez d'observer pour votre réaction.
2. Étiquetez votre bande de quatre tubes PCR de 200 μl à paroi mince sur le côté, et non sur le bouchon, du tube
 - Étiquetez les tubes 1 à 4.
 - Le tube 1 sera pour votre contrôle négatif (N).
 - Le tube 2 sera pour votre ADN de référence (R).
 - Le tube 3 est destiné à votre échantillon expérimental (E).
 - Le tube 4 est destiné à votre échantillon inconnu (U).



3. Ajoutez des réactifs PCR à chaque tube PCR de 200 µl de les tubes

- Utilisez une micropipette pour ajouter chacun des réactifs.

Tubes	1	2	3	4
2X qGRN Master MIX (qMM)	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
qPCR Primers (Primers)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL

4. Ajouter des échantillons d'ADN à chaque tube. Utiliser un nouvel embout pour chaque échantillon

- Ajoutez 7.5 µl de votre ADN/dilutions. Pour votre contrôle négatif (tube 1), ajoutez 7,5 µl H2O

Tubes	1	2	3	4
Echantillons (ADN ou Négatif)	7,5 µL H2O "N"	7,5 µL "R"	7,5 µL "E"	7,5 µL "U"

- Pipeter de haut en bas trois fois pour bien mélanger.
- Le volume final dans tous les tubes devrait maintenant être de 30 µl.

5. Fermez les bouchons des tubes, en appuyant fermement pour assurer une bonne étanchéité

- Assurez-vous que tout le volume de liquide s'accumule au fond du tube.
- Si nécessaire, secouez-le d'un coup de poignet ou faites-le tourner brièvement dans une microcentrifugeuse.

6. Observez vos tubes dans P51™ ou dans un autre illuminateur à lumière bleue. Enregistrez vos observations dans le tableau 1 ("Tableau des observations initiales", page 13) à la ligne intitulée "Température de la salle".

- Diminuez la lumière ambiante selon les besoins pour une observation correcte.
- Vous ferez votre deuxième observation peu après avoir lancé le programme PCR.

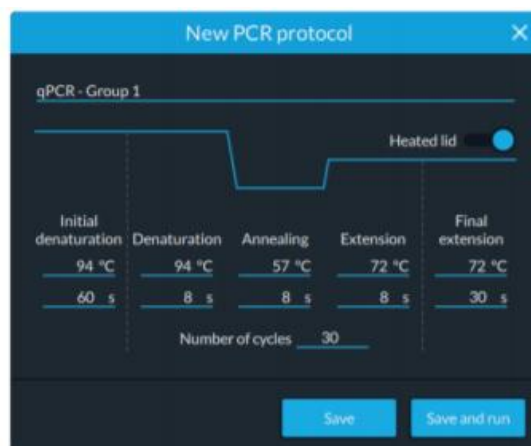
7. Placez les tubes à l'intérieur de l'appareil de PCR

- Appuyez fermement sur les bouchons des tubes pour assurer un ajustement serré.
- Fermez le couvercle de l'appareil PCR et serrez doucement le couvercle.

C. Programmation de la PCR

1. Ouvrez l'application logicielle miniPCR et restez sur l'onglet "Bibliothèque"
2. Cliquez sur le bouton dans le coin supérieur droit
3. Sélectionnez PCR dans le menu déroulant supérieur
4. Entrez un nom pour le protocole ; par exemple, "qPCR- Groupe 1".
5. Entrez les paramètres du protocole PCR :

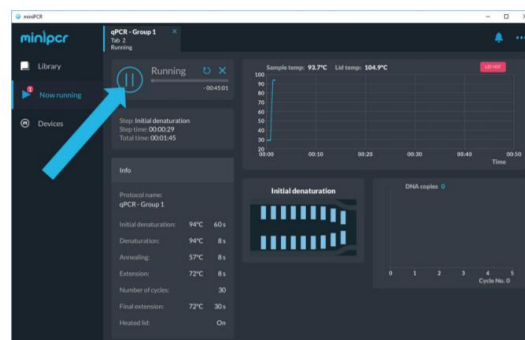
- Dénaturation initiale 94°C, 60 sec
- Dénaturation 94°C, 8 sec
- Recuit 57°C, 8 sec
- Extension 72°C, 8 sec
- Nombre de cycles 30
- Extension finale 72°C, 30 sec
- Couvercle chauffant ON



6. Cliquez sur "Sauvegarder" pour enregistrer le protocole ou "Save and run" pour démarrer le protocole
7. Si vous y êtes invité, choisissez le numéro de série du miniPCR que vous utilisez à partir de la liste
 - Les numéros de série se trouvent sur l'autocollant blanc sous l'interrupteur.
8. Assurez-vous que l'interrupteur situé à l'arrière du miniPCR est en position "ON"
9. Pour contrôler les paramètres de la PCR en temps réel, choisissez l'onglet "En cours d'exécution" à gauche
 - Si plusieurs miniPCR sont connectés au même appareil, choisissez la machine que vous voudriez faire un suivi en utilisant les onglets en haut de la fenêtre.

D. Surveillance du QPCR

1. Vers la fin de l'étape de dénaturation initiale de votre PCR, appuyez sur pause sur le logiciel miniPCR
 - La dénaturation initiale est de 60 secondes. Vous pouvez appuyer sur la touche pause à n'importe quel moment de la la dénaturation initiale, mais assurez-vous que les tubes ont été à 94°C pendant au moins 25 quelques secondes avant de le retirer pour le visualiser.
2. Ouvrez le couvercle et retirez vos tubes



Faites attention en ouvrant le miniPCR ; le couvercle et le bloc chauffant seront encore chauds

3. Placez immédiatement les tubes dans la visionneuse P51™ ou dans un autre dispositif d'éclairage à lumière bleue
 - Diminuez la lumière ambiante selon les besoins pour une observation correcte.
 - Notez vos observations sur le TABLEAU DES OBSERVATIONS INITIALES (tableau 1, page 10).
 - N'oubliez pas de garder les lumières bleues de P51™ éteintes entre les observations pour économiser les piles.
4. Remettez les tubes dans la machine miniPCR et appuyez sur le bouton Run
5. Laissez la PCR se poursuivre jusqu'à la première observation prévue, le premier cycle indiqué dans le tableau 2, colonne 1
6. Pendant que vous attendez, complétez les questions de la page 14 Questions de la section : 'avant le montage expérimentale', et, si vous ne l'avez pas encore fait remplissez le tableau **Observation de la qPCR** (page 11)
 - Il vous faudra environ 15 minutes pour atteindre le cycle 10 de votre protocole PCR.
 - Gardez un œil sur l'évolution de votre PCR. Vous ne voulez pas manquer votre première observation !

E. Mesure du Ct approximatif (à partir du cycle 10, voir tableau 2)

7. Pour observer la fluorescence dans votre tube, appuyez sur pause lorsque l'appareil entre dans l'extension (72°C)
 - Les échantillons seront ainsi maintenus à 72°C.
 - Laissez vos échantillons à 72°C pendant au moins 8 secondes avant de les retirer.
 - Ouvrez la machine miniPCR et retirez vos échantillons.

Appuyez sur la touche pause avant que le miniPCR n'atteigne 72°C. Si l'appareil est entré dans l'extension mais n'a pas encore atteint 72°C, il continuera à chauffer jusqu'à ce que la température soit atteinte et s'arrêtera à ce moment-là.

Si vous appuyez sur la touche pause trop tard dans le cycle, la machine continuera à passer au stade de la dénaturation et se maintenir à 94°C. Si cela se produit, vos échantillons se dénatureront et aucune fluorescence ne sera visible. Sauter ce cycle et mesurer à l'étape suivante de l'extension.

8. Immédiatement après avoir retiré vos échantillons, placez vos tubes dans la visionneuse moléculaire P51™
 - Diminuez la lumière ambiante selon les besoins pour une observation correcte.
 - Vous pouvez choisir d'utiliser une caméra pour enregistrer la fluorescence de vos échantillons.
 - Enregistrez vos observations dans le tableau d'observation du qPCR (**tableau 2, page 14**).
9. Remettez les tubes dans l'appareil miniPCR et appuyez sur le bouton Run
 - N'oubliez pas d'éteindre le P51 entre deux observations pour économiser les piles.
10. A chacune de vos observations programmées, répétez les étapes 7 à 8
11. Lorsque votre PCR est terminée, retirez les tubes du thermocycleur
 - Le produit de la PCR est stable après amplification à température ambiante pendant plusieurs jours. À long terme stockage, déplacer les tubes vers un congélateur (jusqu'à 1 mois).

F. Tableaux d'observation

Pour les tableaux 1 et 2, nous recommandons d'enregistrer les observations comme :

0- pas de fluorescence / 1- faible fluorescence / 2- fluorescence modérée / 3- fluorescence complète

Vous pouvez vous attendre à ce qu'au moins un tube soit à pleine fluorescence à la température de votre pièce d'origine. Observation

1. Tableau 1 :	Tube 1 (témoin négatif)	Tube 2 (ADN de référence)	Tube 3 (expérimentale)	Tube 4 (U, inconnU)
Température ambiante				
94 °C				

Résumez vos observations à partir du tableau ci-dessus sous forme de phrases :

Vos tubes contiennent trois réactifs principaux : l'échantillon d'ADN, le Master Mix qGRN (qui comprend un colorant qPCR) et les amorces. Sachant cela, et en utilisant vos connaissances de l'ADN et de la PCR, vous affirmez si vous pensez que chaque réactif est important pour expliquer vos observations initiales*.

**Le colorant fluorescent utilisé dans l'expérience ne sera fluorescent que s'il est lié à de l'ADN double brin.*

qGRN Master Mix (important: O/N)	<i>Qu'est-ce qui vous amène à penser cela?</i>
Amorces (important: O/N)	<i>Qu'est-ce qui vous amène à penser cela?</i>
Echantillons d'ADN (important: O/N)	<i>Qu'est-ce qui vous amène à penser cela?</i>

2. Tableau 2 :

Dans le tableau ci-dessous, notez à quel cycle vous avez observé vos réactions et vos observations de chaque tube. Remplissez les cycles dans lesquels vous observerez vos échantillons avant de commencer votre réaction. Vous pouvez choisir le nombre d'observations à faire, jusqu'à un maximum de sept.

Note : Nous recommandons de vérifier les échantillons tous les 3 à 5 cycles. Votre fréquence exacte peut dépendre de votre concentration expérimentale. Comme vous utilisez la détection visuelle de la fluorescence, des observations plus fréquentes peuvent ne pas entraîner de différences discernables en luminosité et allongera inutilement l'ensemble du protocole. Nous vous recommandons de faire votre première observation au cycle 10.

Le tableau permet de faire huit observations. Vous pouvez faire moins de sept observations, le cas échéant.

Observation de la qPCR (à l'extension, température de 72°C)				
Cycle #	Tube 1 (témoin négatif)	Tube 2 (ADN de référence)	Tube 3 (expérimentale)	Tube 4 (U, inconnU)
10				

3. Tableau 3 - Calculs de concentration

Enregistrez le cycle auquel vous avez observé pour la première fois la fluorescence (Ct approximatif). En utilisant l'échantillon R original comme référence, calculez la concentration initiale approximative de vos échantillons pour les échantillons E et U en fonction de leur Ct. approximatif. Inscrivez ce nombre dans la colonne "Concentration basée sur la fluorescence observée". Il sera difficile d'obtenir des concentrations précises*, mais faites de votre mieux. Vous devriez au moins être capable de dire quels échantillons étaient plus ou moins concentrés.

Dans la colonne "Concentration basée sur des valeurs connues", notez la concentration du tube E basée sur vos calculs initiaux dans la fiche de planification de l'échantillon expérimental (pages 4 et 5). Après avoir calculé vos concentrations basées sur son Ct approximatif, obtenez la concentration calculée de votre groupe jumeau pour l'échantillon U et enregistrez-la ici.

Echantillon	Ct approximatif	Concentration basé sur l'observation de la fluorescence	Calculs	Concentration basée sur des valeurs connues
Tube 1 (témoin négatif)				
Tube 2 (ADN de référence)				
Tube 3 (expérimentale)				
Tube 4 (U, inconnu)				

Calculs de concentrations :

*Les machines de qPCR sont capables de faire des calculs de concentration précis car elles surveillent la réaction à chaque cycle et utilisent des fluoromètres précis pour mesurer de très petites différences de fluorescence. En utilisant votre œil et en enregistrant chacune de vos observations, en quelques cycles, vous devez vous attendre à pouvoir facilement classer vos échantillons en termes de concentration relative (décroissante) et calculer la concentration de départ dans un ordre de grandeur.

D. Électrophorèse sur gel

Cette activité préparatoire peut être effectuée avant les cours par l'instructeur, ou pendant les cours par les élèves. Les gels peuvent être préparés jusqu'à trois jours à l'avance et conservés à température ambiante, couvert d'un film plastique étanche à l'air et protégé de la lumière.

I. Préparation du gel

1. Préparer un plateau de coulée de gel d'agarose propre et sec
 - Scellez les extrémités du plateau selon les besoins de votre appareil.
 - Placez un peigne de formation de puits au sommet du gel (5 voies ou plus).
2. Pour chaque binôme, préparez un gel d'agarose à 2 % en utilisant un tampon d'électrophorèse
 - Par exemple, ajoutez 0,4 g d'agarose à 20 ml de tampon 1X TBE (pour blueGel™).
 - Ajustez les volumes et les poids en fonction de la taille de votre plateau de gel.
 - Mélangez les réactifs dans un flacon de verre ou un bécher et faites tourner pour mélanger.
3. Chauffer le mélange à l'aide d'un micro-ondes ou d'une plaque chauffante
 - Chauffer jusqu'à ce que la poudre d'agarose soit dissoute et que la solution devienne claire.
 - Faites attention, car le mélange a tendance à faire des bulles sur le dessus et est très chaud.
4. Laissez la solution d'agarose refroidir pendant environ 1 minute à température ambiante
 - Faites tourner le flacon par intermittence.
5. Ajouter un colorant pour gel (par exemple GelGreen™)
 - Suivez les instructions du fabricant de colorants.
 - Par exemple, 2 µl de 10 000X GelGreen™ par 20 ml de gel d'agarose.
6. Versez la solution d'agarose dans le plateau de coulée du gel avec un peigne
7. Laissez le gel se solidifier complètement (jusqu'à ce qu'il soit ferme au toucher) et retirez le peigne
 - Généralement, ~10 minutes pour les gels blueGel™
8. Placer le gel dans la chambre d'électrophorèse et le recouvrir d'un tampon d'écoulement
 - Ajoutez juste assez de tampon pour remplir les réservoirs aux deux extrémités du gel et pour couvrir à peine le gel.

Nous recommandons de faire migrer vos produits de qPCR sur un gel d'électrophorèse pour comparer les produits de PCR avec vos résultats de qPCR. Cependant, cette section peut être sautée.

II. Migration

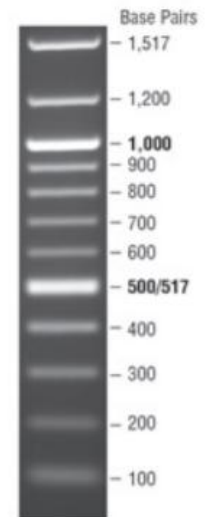
1. S'assurer que le gel est complètement immergé dans le tampon d'électrophorèse
 - Assurez-vous qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits (secouez doucement le gel si des bulles doivent être délogés).
 - Remplissez les réservoirs aux deux extrémités de la chambre d'électrophorèse et ajoutez juste assez de tampon pour couvrir le gel et les puits.
2. Ajoutez le colorant de chargement à votre échantillon
 - Ajouter 6 µl de 6X Loading Dye (colorant de charge) à chaque tube.
 - Pipeter de haut en bas pour mélanger.
3. Charger les échantillons d'ADN sur le gel dans l'ordre suivant
 - Voie 1 : 7 µl Marqueur de poids d'ADN
 - Voie 2 : 15 µl Produit PCR du tube 1
 - Voie 3 : 15 µl Produit PCR du tube 2
 - Voie 4 : 15 µl Produit PCR du tube 3
 - Voie 5 : 15 µl Produit PCR du tube 4
4. Placez le couvercle sur la cuve à électrophorèse sur gel

5. laissez migrer pendant environ 25 minutes ou jusqu'à ce que le colorant ait progressé d'au moins la moitié la longueur du gel

- Vérifiez que de petites bulles se forment près des bornes dans la boîte.
- Un temps d'électrophorèse plus long permet d'obtenir une meilleure résolution de la taille.

III. Électrophorèse sur gel - Visualisation

1. Allumez l'illuminateur de lumière bleue blueGel™
 - Ou placez le gel sur un transilluminateur si vous n'utilisez pas blueGel™.
2. S'assurer que la résolution de la bande d'ADN est suffisante dans la plage 100-500 pb de l'échelle d'ADN de 100 pb
 - Faites migrer le gel plus longtemps si nécessaire pour augmenter la résolution.
3. déterminer la taille des fragments d'ADN amplifiés par la PCR en comparant la PCR produits au marqueur de référence de poids moléculaire (échelle d'ADN 100 pb)
 - Prendre une photo des résultats avec l'appareil photo d'un smartphone (ou autre).



Échelle d'ADN de 100 pb visualisée par coloration au bromure d'éthidium sur un gel d'agarose TAE à 1,3 %.
-Biolabs de la Cour de la Nouvelle-Angleterre

IV. Questions de l'étude

A. Questions de la section : 'avant le montage expérimentale'

1. En quoi la RCPQ est-elle différente d'une expérience de PCR en bout de chaîne ?

2. Définissez Ct avec vos propres mots.

3. Si un échantillon d'ADN F, a une valeur de Ct supérieure de 3 cycles à celle d'un autre échantillon, Q, quelle est la la concentration de votre séquence d'intérêt dans l'échantillon F par rapport à l'échantillon Q?

Expliquez en quelques mots comment vous avez obtenu votre réponse.

4. En quoi ce laboratoire est-il différent de la façon dont la RCPQ est normalement effectuée dans un laboratoire ?

Questions pour après l'expérience

1. Votre tube expérimental (E) a-t-il été fluorescent quand vous vous y attendiez ?
2. Si ce n'est pas le cas, pouvez-vous expliquer quelles sources d'erreur auraient pu provoquer sa fluorescence à un autre moment ?
3. Votre concentration calculée dans votre tube inconnu correspondait-elle à ce que votre groupe jumeau a déclaré il devrait l'être ?
4. Si ce n'est pas le cas, pouvez-vous expliquer quelles sources d'erreur auraient pu conduire à votre concentration calculée d'être différent du numéro qu'ils ont fourni ?
5. Les deux échantillons suivants étaient identiques, mais analysés par des groupes différents. Quelle était la Ct approximatif et concentration de départ calculée pour les deux échantillons ?

U échantillon que vous avez testé :

Ct. Approximatif

Concentration calculée :

échantillon E testé par groupe de partenaires :

Ct approximatif

Concentration calculée :

6. Les chiffres correspondent-ils ? S'ils ne correspondent pas, pouvez-vous expliquer quelles sources d'erreur ont pu conduire votre la concentration calculée est-elle différente du nombre qu'ils ont fourni ?
7. Les deux échantillons suivants étaient également identiques, mais analysés par des groupes différents. Quelle était la Ct approximatif et concentration de départ calculée pour les deux échantillons ?

E échantillon que vous avez testé :

Ct. approximatif

Concentration calculée :

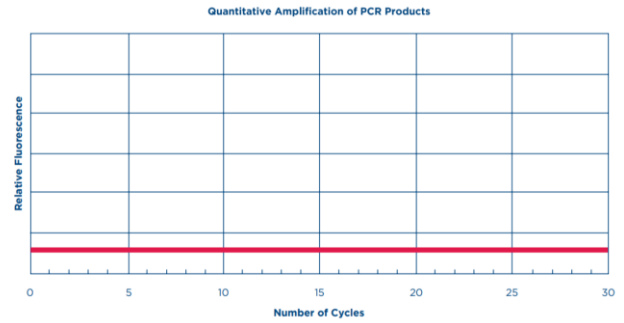
échantillon U testé par groupe de partenaires :

Ct approximatif

Concentration calculée :

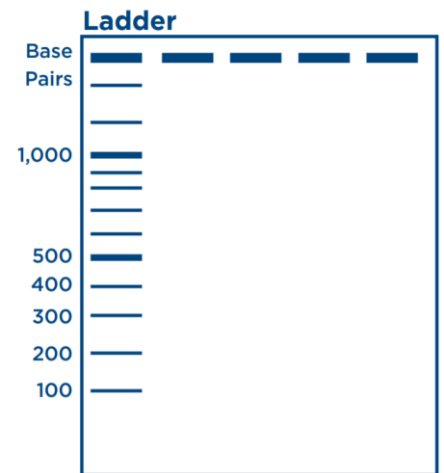
8. Les chiffres correspondent-ils ? Si ce n'est pas le cas, pouvez-vous expliquer quelles sources d'erreur ont pu conduire votre la concentration calculée est-elle différente du nombre qu'ils ont fourni ?

9. Sur le graphique ci-dessous, reportez vos résultats. Vous n'avez pas de chiffres exacts pour les valeurs de fluorescence, mais faites de votre mieux pour obtenir une approximation de ce que vous pensez que le graphique de vos données devrait ressembler. Voir page 2 de l'introduction, par exemple des graphiques et des explications.



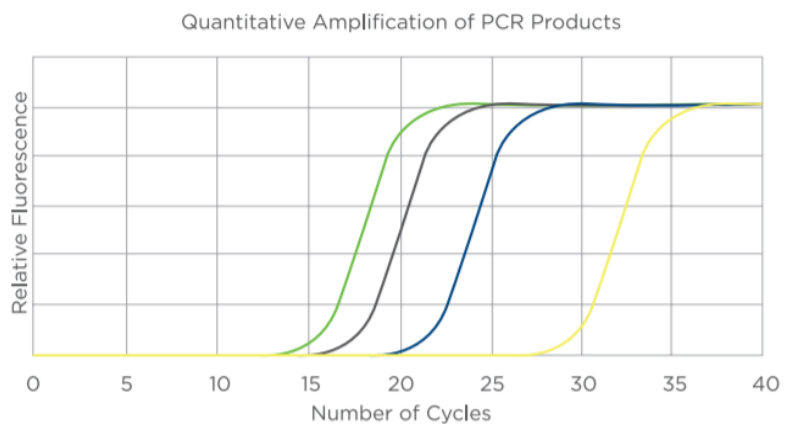
Questions pour l'électrophorèse sur gel

- Utilisez l'image de droite pour illustrer à quoi ressemble votre gel. Veillez à étiqueter chaque voie avec l'échantillon correct (N, R, E, U).
- Comparez la luminosité des bandes de votre gel les unes par rapport aux autres. A partir du gel uniquement, pouvez-vous déterminer si l'un des échantillons a commencé avec une concentration plus ou moins élevée ? Expliquez votre réponse.



- Si vous avez répondu oui à la question précédente, dans quelle mesure pouvez-vous être précis sur ces concentrations ? Expliquez.

- Regardez le graphique ci-dessous qui montre les résultats du qPCR. Imaginez qu'une PCR ait été effectuée sur ces quatre mêmes échantillons et qu'au cycle 25, vous ayez arrêté la PCR et effectué un gel des quatre échantillons. Expliquez à quoi ressembleraient les quatre voies de votre gel. Défendez votre réponse avec les preuves du graphique.



- Puits 1
- Puits 2
- Puits 3
- Puits 4

- Quelles informations pouvez-vous tirer de votre gel que vous n'avez pas pu obtenir en observant votre réaction dans un tube ?