


| | | |
|--|-------------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma-³³P | |

Amplification PCR de microsatellites (SSR) avec marquage radioactif gamma-³³P

Sommaire

| | |
|---|----|
| 1. Objectif | 1 |
| 2. Principe..... | 1 |
| 3. Consignes de sécurité..... | 2 |
| 4. Matériel utilisé | 4 |
| 5. Réactifs | 4 |
| 6. Opérations préalables | 5 |
| 7. Protocoles expérimentaux | 5 |
| A. Les réactifs et les quantités pour une réaction de PCR | 8 |
| B. Tableau de calcul pour marquage et PCR : | 8 |
| 8. Hygiène et élimination des déchets..... | 11 |

1. Objectif


La PCR de marqueurs de l'ADN de type microsatellites (SSR) avec marquage radioactif ³³P par utilisation de γ -³³P-dCTP, suivie d'une séparation par électrophorèse, permet la mise en évidence de loci spécifiques dans des ADN.

L'ensemble de l'expérimentation est réalisable dans le laboratoire "P33" d'AGAP.

2. Principe

→ Marquage radioactif d'un primer (amorce) SSR en utilisant du γ -³³P-ATP : transfert du phosphore sur l'extrémité 5' de l'ADN ; le phosphore marqué radioactivement est celui en position γ . Il y a ensuite amplifications de type PCR sur thermocycleurs en utilisant les amorces radioactives, puis une autoradiographie pour visualiser les positions des ADN amplifiés. Marquage et PCR se font donc en deux étapes distinctes.

Note: Un autre système de marquage radioactif utilise le α -³³P-dCTP pour le marquage radioactif de l'ADN synthétisé durant une PCR de type microsatellite (SSR): des nucléotides CTP marqués sont incorporés durant la synthèse de l'ADN ; le phosphore marqué radioactivement est celui en position α . Cette méthode est l'objet d'une autre fiche de protocole.

| | | |
|--|-------------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma-³³P | |

Le radio-isotope est ³³P est nettement moins dangereux à manipuler que ³²P, qui en revanche présente un signal plus intense à quantité égale. Les protocoles seraient peu différents avec l'isotope ³²P.

3. Consignes de sécurité

La nocivité des produits utilisés dans le labo P33 intervient à 2 niveaux :

- radioactivité
- chimie s.s.

Il conviendra donc de se protéger spécifiquement vis-à-vis de ces 2 risques.

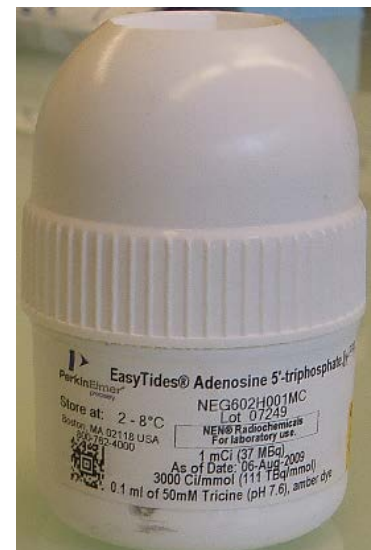
L'utilisation de générateurs de haut voltage en environnement humide induit également un risque, mais qu'on peut considérer comme bien contrôlé par les systèmes de protection au niveau des équipements eux-mêmes et des circuits d'alimentation.


Radioactivité : l'isotope 33 du phosphore, ³³P ou 33P, est utilisé pour le marquage de l'ADN ; la radiation émise par le ³³P est de type β (beta), avec demi-vie de 25.4 jours, énergie maximum de 0.249 Mev (100%), distance d'action dans l'air de 46 cm, dose-limite annuelle (ALI) 3 mCi. C'est en fait une radioactivité relativement peu dangereuse, mais un contrôle extrêmement strict des activités en manipulation du 33P et dans la zone concernée est obligatoire et indispensable :

- I- la zone de manipulation directe est limitée à 2 emplacements avec écran plexi sur une paillasse de la salle



- interdiction de manger, boire ou fumer dans le laboratoire ; pas de pipettage bouche
- les conteneurs à ³³P sont stockés dans le réfrigérateur ; ils sont marqués d'une croix une fois vides
- l'utilisation correcte de ces matières radioactives est l'objet d'une formation ; en particulier :
 - s'assurer toujours qu'il s'agit du bon produit, car il y a aussi les flacons de α-³³P-ATP



| | | |
|--|-------------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma-³³P | |

→ sortir le flacon en verre du l'emballage protecteur en plastique au moment de pipeter, pour éviter de souiller cet emballage, qui ne serait alors plus protecteur

II- les manipulations se font à l'abri des écrans plexi et sur un matériau absorbant (film de pailleuse bleu)

→ blouse et gants obligatoires



III- contrôle et décontamination éventuelle de la zone de travail doivent être réalisés avant et après les manipulations

- le contrôle s'effectue avec le compteur Geiger ; le nettoyage peut être réalisé avec du papier-éponge, éventuellement imbibé du nettoyant spécifique
- les déchets vont dans des conteneurs spéciaux en plexi pour tous les matériels (jetables) souillés ; un stockage permettra ensuite d'attendre que la radioactivité ait naturellement décré jusq'au seuil de non-dangérosité ; pour les déchets liquides (essentiellement les solutions utilisées pour les électrophorèses), des bidons en plastique sont utilisés
- la norme en terme d'intensité à risque est un seuil de 3x le bruit de fond ambiant (atmosphère non contaminée), mesuré avec le compteur Geiger


Tout incident doit être signalé immédiatement pour être géré conformément à la réglementation : avertir en particulier l'ingénieur-sécurité responsable.

Risques chimiques : certains produits chimiques utilisés sont potentiellement dangereux ou très dangereux. Précisions :

- formamide (synonymes carbamaldehyde, methanamide) : composant du "bleu-formamide" (90% formamide, 0,02% xylène cyanole, 0,02% bleu de bromophénol, 25 mM EDTA) ; irritation des voies respiratoires, risque d'effets sur le système nerveux central, cause irritation oculaire et cutanée, risque d'effets sur la reproduction et sur le fœtus, nocif si avalé, inhalé ou absorbé par la peau, hygroscopique ; organes-cibles: système nerveux central, foie, yeux, système reproducteur, peau, muqueuses
- bleu de bromophénol, xylène cyanole, EDTA, MgCl₂, Tris-HCl, KCl, glycérol : présents en faibles concentrations et modérément ou peu irritants ou toxiques
- Taq, dNTP : enzymes (protéines) ou acides nucléiques non toxiques ou irritants.

Consignes générales en laboratoire P33:

→ gants et blouse obligatoires ; interdiction de manger ou boire

| | | |
|--|-------------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma-³³P | |

- interdiction de sortir des matériels pouvant être contaminés par de la radioactivité, hors conteneurs spéciaux
 - utiliser les poubelles prévues pour chaque type de déchet
 - contrôler et nettoyer les éventuelles souillures des équipements par la radioactivité
 - signaler les incidents de contamination radioactive
 - nettoyer les éventuelles taches, éclaboussures, d'acrylamide, afin d'éviter qu'après séchage des produits puissent se disperser ensuite sous forme de poussières qui contamineront l'air (que nous respirons) ; éventuellement signaler des chutes de produits à terre ou toute contamination importante du local pour qu'un nettoyage soit réalisé
- en cas de problème électrique:
- un interrupteur général de sécurité est installé sur un mur de la salle d'électrophorèse

4. Matériel utilisé

Principaux équipements :

- thermocycleurs (PTC, Programmable Thermal Controller)

Equipements complémentaires :


- micropipettes, pipette à répétition, pipette multicanal, eppendorfs, plaques PCR 96 puits (pas d'autre format pour les PTC présents)
- réfrigérateur, congélateur
- mini-centrifugeuse
- sondes de radioactivité



5. Réactifs

| <i>Nom du réactif</i> | <i>Formule chimique et caractéristiques</i> |
|------------------------------------|--|
| γ - ³³ P-dCTP | adenosine 5' triphosphate γ - ³³ P (3000Ci/mmol, 10mCi/ml) |
| formamide (dans le bleu-formamide) | synonymes carbamaldehyde, methanamide, CH3NO, MW 45.04 |
| bleu de bromophénol | 3,3',5,5'-Tetrabromophenol sulfonphthalein; 4,4'-(3H-2,1-benzoxathiol-3-ylidene)bis[2,6-dibromophenol] S,S dioxide |
| xylène cyanole | synonymes xylene cyanole FF, cyanol FF, MW 538.61 |
| EDTA | ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate, C10H18N2O10Na2, MW 372.20 |
| MgCl2 | magnesium chloride, MW 95.2 |
| Taq polymerase | protéine, taille 835 aminoacides |
| ADN, dNTP | acides nucléiques |

Voir les fiches correspondant à ces différents produits pour leur toxicité et les précautions réglementaires.

| | | |
|--|--------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma- ³³ P | |

A titre indicatif :

| Nom du réactif | Toxicité | Protection cutanée | Protection oculaire | Protection respiratoire |
|------------------------------------|---|--------------------|---------------------|-------------------------|
| γ - ³³ P-ATP | danger radioactif éviter tout contact et exposition rapprochée et/ou prolongée | X | | |
| formamide (dans le bleu-formamide) | toxique risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant | | | |

6. Opérations préalables

- ADN étudié prêt, dosé suivant protocole
- Primers prêts, dilution 20 μ mole/l à 100 20 μ mole/l en général
- Réserver les équipements : PTC en particulier ; chacun indique pour la semaine suivante les souhaits de nombres de PTC sur le tableau collé à la porte du laboratoire P33 ; les négociations, si nécessaires, ont lieu le jeudi matin 10h
- Commander la radioactivité pour la semaine suivante (attention congés et fériés!) : jeudi matin dernier délai.

7. Protocoles expérimentaux

Le protocole ci-dessous concerne les méthodes pour PCR de marqueurs de type micro-satellites avec marquage ³³P (phosphore isotope 33 radioactif) des amorces de PCR, sur ADN extrait de plantes, pour, ultérieurement, séparation par électrophorèse et visualisation par autoradiographie.

Méthode microsatellite alpha³³P – AGAP/labo P33

Les ADN


Deux catégories d'ADN sont concernés :

→ **Primers**

- les amorces ou primers SSR sont en général issus de synthèse par des laboratoires spécialisés ; ils sont donc purs et leurs concentrations sont connues
- les primers SSR fonctionnent en couples F (forward) / R (reverse) ou 5'/3'
- les primers neufs sont en général sous forme lyophilisée dans un tube ; on crée une solution de stock à 100 μ M dans de l'eau pure stérile ; puis parfois une solution d'usage à 20 μ M (coton, par ex.) ou 10 μ M ; ces opérations sont à réaliser hors du labo P33.

→ **ADN étudié**

- généralement obtenu par extraction de tissus végétaux ; il peut être obtenu par diverses méthodes d'extraction (MATAB, CTAB, etc..) avec éventuellement purification, sans

| | | |
|--|--------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma- ³³ P | |

affecter les résultats, pour autant que les concentrations en contaminants inhibiteurs de la PCR restent faibles.

- la concentration de travail des ADN étudiés pour les SSR est basse (relativement à celle pour AFLP, par ex.) : 10 ng/μl ou moins, dans H₂O stérile ; pour le coton, par ex., 0,2 à 5 ng/μl sont utilisés ; de petites quantités d'extrait peuvent donner de meilleurs résultats si éventuellement les extraits ne sont pas très propres, car il y aura alors moins d'inhibiteurs de PCR

- ne pas conserver l'ADN à ces concentrations basses, car l'activité hydrolytique entraînera sa dégradation ; des congélations/décongélations répétées d'ADN faiblement concentré entraîneront également sa dégradation ; maintenir donc un stock concentré (au moins 200 ng/μl) et diluer dans de l'eau pure stérile des quantités à utiliser sous des délais brefs, conservées à +4°C

- utiliser des plaques 96 puits en polypropylène transparent

- pour des expérimentations répétant une disposition identique des ADN dans les plaques, préparer à l'avance les plaques en distribuant l'ADN avec des micropipettes à répétition ; mettre ensuite un opercule adhésif et stocker au froid jusqu'à utilisation, réfrigérateur pour quelques jours ou -20°C pour plusieurs semaines (ces opérations sont à réaliser hors du labo P33).

PCR avec marquage radioactif $\gamma^{33}\text{P}$

La PCR ou "*polymerase chain reaction*" de microsatellites (SSR) avec marquage radioactif $\gamma^{33}\text{P}$ comprend 2 étapes :

1- marquage radioactif d'une des 2 amorces de chaque SSR, en général l'amorce F


2- PCR

Pour chacune des étapes, on peut traiter 1 seul SSR ou plusieurs simultanément ("multiplexage", couramment utilisé et permettant des économies de temps et de consommables).

1- Marquage radioactif.

| 1. Amorces à 10 μM | | μl | 2. Amorces à 100 μM | | μl |
|-----------------------------|--|-------|-----------------------------|--|-------|
| eau Merck QSP | | 0.075 | eau Merck QSP | | 0.155 |
| Tampon kinase « A » | | 0.025 | Tampon kinase « A » | | 0.025 |
| ATP $\gamma^{33}\text{P}$ | | 0.04 | ATP $\gamma^{33}\text{P}$ | | 0.04 |
| T4 Kinase (10 U/μl) « PNK » | | 0.01 | T4 Kinase (10 U/μl) « PNK » | | 0.01 |
| Amorce F (10 μM) | | 0.1 | Amorce F (100 μM) | | 0.02 |
| Total | | 0.25 | Total | | 0.25 |

On marque avec le phosphore radioactif, généralement 1 seule des 2 amorces de chaque SSR, l'amorce "F" (forward, 5') en standard ; le marquage avec $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP se fait par transfert du phosphore sur l'extrémité 5', avec l'enzyme T4 Polynucleotide Kinase (T4-PNK). Les réactifs et les quantités pour une réaction de base, correspondant à la quantité de primer

| | | |
|--|-------------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma-³³P | |

pour l'amplification d'un ADN, sont, pour des primers à 20 µM et à 100 µM et un volume de 10 µl/puits de la PCR qui suivra :

- Incubation : 37°C x 30 mn, au bain-marie, dans portoir plexi (pas de polystyrène)
- Inactiver la T4-PNK en mettant les eppendorfs à 70°C x 10 mn
- Stocker au réfrigérateur (portoir plexi) ou utiliser de suite pour la PCR

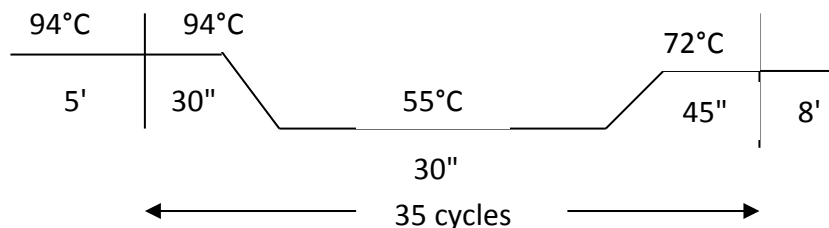
Note: la T4 Polynucleotide Kinase (T4-PNK) est d'un coût très élevé.

Multipliées par le nombre d'ADN à amplifier, dans le cas de plusieurs dizaines d'ADN à amplifier sur une plaque 96 puits, les quantités totales deviennent assez importantes pour être pipetées de façon fiable.

Mais dans le cas de petits nombres d'ADN à amplifier (< 10 ADN environ), les quantités restent trop petites pour être correctement manipulables. Pour de petits nombres d'ADN impliqués dans un tri de SSR polymorphes (screening), en particulier, par ex. sur les 2 parents d'un croisement ou un échantillon représentatif d'une population, on utilisera préférentiellement un marquage radioactif en synthèse de l'ADN avec du dCTP α³³P (v. mode opératoire "ModOp_PCR_SSR_alpha33P").

2- La PCR ou "polymerase chain reaction" est réalisée selon le principe classique avec la *Taq* polymérase (ADN polymérase thermorésistante de *Thermus aquaticus/Thermus thermophilus*) ; on peut utiliser d'autres polymérases que la *Taq* (dépourvue d'activité exonucléasique 3'-5', donc sans correction d'erreur lors de la copie).


Un programme-type de PCR est schématisé ci-dessous :



Un des paramètres importants est la température d'hybridation, caractéristique de chaque couple de primers ; elle sera un des premiers paramètres à prendre en compte lors de la programmation des thermocycleurs.

Les **principaux ajustements expérimentaux** aux nombreux paramètres d'une PCR portent sur :

- l'adaptation de la température d'hybridation aux primers
- un décément ("touch-down") de température d'hybridation progressif (plus de sélectivité)
- le nombre de cycles (généralement 35-36 cycles au total, au-delà l'activité de la *Taq* est incertaine)

| | | |
|--|--------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma- ³³ P | |

- la durée des étapes d'hybridation et d'extension (par ex. 30 s - 45 s, ou 30 s – 1 mn)
- le volume global de la réaction dans chaque puits : de 25 µl (par ex. 5 µl d'ADN + 20 µl de mix), on peut descendre, pour économiser et sachant qu'on utilisera environ 6 µl pour une électrophorèse, à 15, 12, ou même 10 µl ; 10 µl semble une limite relativement à la répétabilité avec les plaques 96
- la quantité d'ADN initiale, suivant son titre ; pour certains plantes, des quantités beaucoup plus importantes que dans le tableau ci-dessous sont préconisées ; notons que des quantités réduites limitent les concentrations en inhibiteurs de la PCR présents dans des extraits non purifiés, améliorant considérablement la PCR
- la concentration des primers ; de 0.2 µM en standard, elle peut être augmentée, certains auteurs mettant 0,3, par ex.
- le multiplexage, combinaison de différents SSR compatibles au niveau températures d'hybridation des primers et différenciation des bandes après électrophorèse, est possible, sauf dans le cas d'un screening
- l'adaptation de la quantité de Taq selon les caractéristiques de celle effectivement utilisée (à AGAP, normalement, Taq courante évaluée à 2 U et non 5)

A. Les réactifs et les quantités pour une réaction de PCR

Les réactifs et les quantités pour une réaction (marquage radioactif) de base, correspondant à la quantité de primer pour l'amplification d'1 ADN, sont, pour des primers à 20 µM et un volume de la PCR de 10 µl/puits dont 5 µl d'ADN testé :

| | Conc. | Concentr. finale | | µl / puits |
|--------------------------------|-----------|------------------|--------------|-------------|
| eau Merck QSP | - | - | | 2.65 |
| Tampon 10x | 10 | 1 | X | 1 |
| dNTP (2.5mM) | 2500 | 200 | µM | 0.8 |
| MgCl ₂ (50 mM) | 50000 | 500 | µM | 0.1 |
| Primer xxxxx F | 20 | 0.2 | µM | 0.1 |
| Primer xxxxx R | 20 | 0.2 | µM | 0.1 |
| Taq polymérase (2 U/µl) | 2 | 0.05 | U/µl | 0.25 |
| Total sauf ADN | | | | 5 |
| ADN à dosage : ng/µl | 1 | 0.5 | ng/µl | 5 |
| Volume total PCR | | | | 10 |

Pour plusieurs ADN sur une plaque, on multiplie les quantités par le nombre correspondant, et le "mix" est réparti dans les différents puits (où les ADN sont généralement déjà disposés).

B. Tableau de calcul pour marquage et PCR :

Pour faciliter les calculs des quantités suivant les différentes conditions : nombre d'ADN, volume total de PCR par puits, concentrations des primers, multiplexage (jusqu'à 3 SSR simultanés), utiliser des tableaux sur feuille de calcul.




Mode opératoire
P32 P33

PCR SSR gamma-³³P

Le tableau joint, format Excel, permet de modifier tous ces paramètres. Il suffit de "double-cliquer" sur le tableau, puis de le réenregistrer sous un nouveau nom en classeur Excel.

| PROTOCOLE PCR SSR GAMMA33P | | | | | |
|---|---|------------------|--|-----------------|--------------------------------------|
| 1 - Marquage γ33P d'1 amorce SSR (amorce "F") | | | | | |
| 1-1- Marquage γ33P SIMPLE | | | | | |
| Valeurs en bleu = modifiables. Attention aux formules ! | | | | | |
| Volume total PCR (μ l) = 9 | [Finale] μ M in PCR titre μ M mix, si $\neq 0.2 \mu$ M | | ajouter ~10% à N ADN nombre ADN = 25 | | |
| < tableau 2-PCR plus bas | | | | | |
| Tableau de réactifs (1-1-1) | | | | | |
| | Conc. | Conc. finale mix | marquage | μ l / adn | μl pour 25 adn |
| eau Merck QSP | - | - | | 0.0675 | 1.7 |
| Tampon kinase « A » | 10 | 1 | X | 0.0225 | 0.6 |
| γ ³³ P-ATP | - | | | 0.036 | 0.9 |
| T4 Kinase (10 U/ μ l) "PNK" | 10 | 0.4 | U/ μ l | 0.009 | 0.2 |
| Total intermédiaire | | | | 0.135 | 3.375 |
| Primer SSRx F | 20 | 8 | μ M | 0.09 | 2.3 |
| Total | | | | 0.225 | 5.6 |
| 1-2- Marquage γ33P de plusieurs SSR (tubes séparés) : | | | | | |
| nombre SSR = | | | | | 1 |
| >> Mix γ ATP33P-kinase commun, à répartir dans 1 tubes : | | | | | |
| μl / 25 adn x 1 SSR | | | | | |
| eau Merck QSP 1.7 | | | | | |
| Tampon kinase « A » 0.6 | | | | | |
| γ ATP ³³ P 0.9 | | | | | |
| T4 Kinase (10 U/ μ l) "PNK" 0.2 | | | | | |
| Total intermédiaire | | | | 3.375 | |
| Homogénéiser le Mix ATP-kinase, Répartir dans 1 eppendorf (μl/eppendorf) : | | | | | 3.375 |
| Primer SSR "F" correspondant à chaque eppendorf | | | | | 2.3 |
| - Mettre à incuber au bain-marie à 37°C x 30mn-1h, dans portoir plexi (pas polystyrène) | | | | | |
| - Inactiver la T4-PNK en mettant les eppendorfs à 70°C x 10 mn | | | | | |
| - Stocker au réfrigérateur (portoir plexi) ou utiliser de suite pour la PCR | | | | | |
| 2 - PCR SSR γ33P : calcul Mix pour 1 à 3 SSR | | | | | |
| Quantité de primer "F" marqué 33P automatiquement reportée. Données en bleu modifiables. Attention aux formules ! | | | | | |
| changer ou effacer noms et [] des SSR ci-dessous | | | | | |
| Nom du μ -sat | | titre μ M | [Finale] μ M si $\neq 0.2$ | | |
| SSR1 | | 20 | | 1 μ -sat | nombre ADN = 25 |
| Tableau de réactifs (2-1) | | | | | |
| | Conc. | Concentr. finale | | μ l / puits | μl pour 25 adn |
| eau Merck QSP | - | - | | 4.885 | 118.8 |
| Tampon 10x | 10 | 1 | X | 0.9 | 22.5 |
| dNTP (2.5mM) | 2500 | 200 | μ M | 0.72 | 18.0 |
| MgCl2 (50 mM) | 50000 | 500 | μ M | 0.09 | 2.3 |
| Primer SSR1 F*** | 20 | 0.2 | μ M | 0.09 | 5.6 |
| Primer SSR1 R | 20 | 0.2 | μ M | 0.09 | 2.3 |
| 1F 11 | | | | | |
| 1R 11 | | | | | |
| 2F 21 | | | | | |
| 2R 21 | | | | | |
| 3F 31 | | | | | |
| 3R 31 | | | | | |
| Taq polymérase (2 U/ μ l) | 2 | 0.05 | U/ μ l | 0.225 | 5.6 |
| Total MIX / puits | | | | 7 | 175.0 |
| ADN à dosage : ng/ μ l | 4.5 | 1 | ng/ μ l | 2 | |
| Volume total PCR | | | | 9 | |
| - Mettre une goutte d'huile dans chaque puits (contre l'évaporation) | | | | | |
| - Placer dans PTC du labo 33P avec programme adéquat | | | | | |
| Après la PCR : | | | | | |
| Bleu formamide 2 x | 2 | 1 | 9.0 | μ l | |
| Volume final | | | | 18.0 | μ l |
| - Noter très lisiblement la date de PCR (sur la languette de l'adhésif) | | | | | |
| - Stocker au réfrigérateur (derrière porte plexi de protection) | | | | | |
| - ou utiliser de suite en électrophorèse (attention à avoir homogénéisé) | | | | | |

- Chaque PCR peut inclure 1 SSR ou plusieurs simultanément ("multiplex") ; le tableau permet les calculs pour 1 à 3 SSR

| | | |
|--|-------------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma-³³P | |

- Nota: bien préciser le volume final de la PCR par puits et la concentration de l'ADN, car tous les volumes sont calculés en fonction de ces paramètres, depuis le marquage radioactif de l'amorce F jusqu'à la PCR.
- Les 2 tableaux, marquage et PCR, peuvent assez facilement être séparés et utilisés indépendamment si souhaité.

Remarques :


- le tampon 10X contient 15 mmol/l MgCl₂, donnant en concentration finale 1.5 mmol/l MgCl₂ ; le MgCl₂ rajouté porte la concentration finale à 2.0 mmol/l MgCl₂
- avec γ -³²P au lieu de γ -³³P, mettre 0,15 μ l / puits au lieu de 0.20.

Notes importantes :

- bien préciser le volume final de la PCR par puits, qui détermine le calcul des quantités de tous les composants ;
- la concentration d'ADN en ng/ μ l est très variable suivant l'espèce végétale et la qualité de l'ADN ; par ex. 0.2 à 1 ng/ μ l pour le coton.
- au nombre réel d'ADN à amplifier, on ajoute en général 10% pour les calculs, en compensation des erreurs dans la distribution et des pertes diverses
- créer à l'avance les plaques PCR avec les ADN disposés dans les puits ; mettre un opercule spécial adhésif ; identifier les plaques ; centrifuger brièvement pour assurer que les échantillons sont au fond des puits ; stocker au réfrigérateur pour quelques jours, au congélateur pour plus longtemps (recentrifuger avant utilisation)
- la distribution du mix dans les puits se fait généralement avec une pipette à répétition, qui permet rapidité et grande précision des quantités ; assurer qu'elle sera disponible et sa batterie chargée
- les PTC du labo P33 n'ont pas de couvercle chauffant et le mix doit être recouvert d'une couche d'huile contre l'évaporation (1 goutte d'huile par puits avec mix PCR d'une plaque 96 puits).
- après amplification, ajouter du bleu-formamide 2X en quantité égale au volume de la PCR par puits ; stocker au réfrigérateur dans compartiment avec porte plexi ; si on va utiliser le jour même, il est impératif d'homogénéiser le mélange PCR+bleu dans chaque puits ; si on utilise le lendemain, une homogénéisation s'opèrera seule progressivement au cours du stockage.

Disposition dans la plaque PCR :

- les pipettes multicanal sont adaptées aux plaques PCR 96 puits, MAIS cet écartement est double de celui entre les puits des gels de polyacrylamide verticaux dans le cas commun de 62 puits de nos équipements. Aussi, pour pouvoir conserver un ordre particulier des échantillons sur l'autoradiographie du gel, il faut disposer les ADN alternés sur 2 colonnes dans la plaque PCR 96 puits.

| | | |
|--|-------------------------------------|--|
|  | Mode opératoire P32 P33 | |
| | PCR SSR gamma-³³P | |

Tampons :

- tampon de stockage de la T4-Kinase : 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM, DTT and 50% (v/v) glycerol
- tampon 10X pour transfert du phosphore : 500 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM spermidine (C7H19N3), 1 mM EDTA
- tampon 10X pour échange du phosphore : 0.5 M imidazole-HCl (pH 6.4), EDTA and 1 mM adenosine diphosphate
- tampon de stockage de la Taq : 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 0.1% Triton® X-100, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, and 50% glycerol ou 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol, 0.5% polysorbate 20, 0.5% NP-40, pH 7.4 (25°C).
- 10X standard Taq PCR Reaction Buffer : 100mM Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 1% Triton® X-100, 15mM MgCl₂
- tampon standard Taq 1X : 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, pH 8.3 (25°C)

8. Hygiène et élimination des déchets

- Blouse et gants obligatoires, lunettes fortement conseillées suivant les activités menées
- poubelles et conteneurs spéciaux pour les différentes catégories de déchets, incluant entre autre le verre à recycler, suivant instructions spéciales.

Christopher Viot