ORGANISATION DE LA SÉANCE EN TERMINALE
4 tables par demi-groupe avec sur chaque table 4 ou 5 élèves préparant 4 tubes en collaboration.

Sur chaque table :
- ADN témoin d'un nigra pur (homozygote)
- ADN témoin d'un deltoides pur (homozygote)
- ADN du peuplier de génotype inconnu (appartenant au lot des 100 étudiés)
- tampon avec enzyme (pour 3 tubes)
- tampon sans enzyme (pour 1 tube)

+ un tube de rouge neutre par table, un tube d'eau et 1 tube vide par élève pour un essai préalable au maniement de la micropipette.

Le premier demi-groupe dépose sur le flashgel en haut + un marqueur de taille **tamponné** au centre.
Les 4 tubes d'une même table sont déposés côte à côte. Dans l'ordre suivant :
1er à gauche : ADN témoin nigra pur avec enzyme
puis ADN témoin deltoides pur avec enzyme
puis ADN à tester avec enzyme
puis ADN témoin deltoides pur sans enzyme.

Protocole élève

Protocole de digestion d'un amplifiat d'ADN par une enzyme de restriction :

Marquez ses tubes

1) Introduire dans un mini-tube Eppendorf successivement :
- 2,5 µL de l'ADN purifié
- 7,5 µL du **tampon avec l'enzyme** puis mixer par un « aspirer-refouler ».

2) Mettre à incuber 30 minutes au bain marie 37°C.

Protocole à mettre en œuvre pour un ADN témoin non soumis à l'enzyme :

1) Introduire dans un mini-tube Eppendorf successivement :
- 2,5 µL de l'ADN purifié
- 7,5 µL du **tampon SANS l'enzyme** puis mixer par un « aspirer-refouler ».

2) Mettre à incuber 30 minutes au bain marie 37°C.

Fiche laboratoire

- bain-marie 37°C
- 4 micro pipettes p10 ou p20 spécial amplifiat (pour éviter les contaminations)
- mini-tube Eppendorf de 0,6mL ou un tube PCR
- une solution de tampon sans enzyme (commune par table),
- solution d'enzyme NlaIV* présentée dans un bac à glace (commune par table).
  Compter par échantillon:
  - 5,5 µL d'Eau haute pureté (milliQ) (ou 6,3µL fourchette max)
  - 1 µL du tampon Cutsmart@Buffer x10
  - 1 µL de l'enzyme retenue à 2000 U/mL (ou 0,2µL fourchette min, à tester)

- une cassette Flashgel** à double rangées de 17 puits soit 34 puits. **Déposer 5µL.**
  → 34 puits (2x4 tables de 4 tubes + un dépôt de marqueur de taille **tamponné** par rangée).
- ADN : les amplifiats à tester (un par table) et les témoins (un par table).
- + un tube de rouge neutre par table, un tube d'eau et 1 tube vide par élève pour un essai préalable au maniement de la pipette.

*https://international.neb.com/products/r0126-nlaiv#Product%20Information
**FlashGel DNA Cassettes, 2.2%, 16 + 1well double-tier (34 well) à commander chez Ozyme.