

1- Extraction d'ADN

1) Préparation du tampon d'extraction

| Composants | Pour une solution mère de 50 ml |
|--|--|
| 10 mM Tris-Cl pH 8,2 | (préparée) 50 ml |
| 1 mM EDTA 1M = 292,24 g 1mM = 0,29224 g | 15 mg $1 \text{ mM} \cdot (V/1l) = 0,292 \cdot (V/1l)$ |
| 25 mM NaCl (FW 58,44) 1M = 58,44 g 25 mM = 1,461 g | 73 mg $25 \text{ mM} \cdot (V/1l) = 1,461 \cdot (V/1l)$ |
| Protéinase K à ajuster à 200 µg / ml | (10 mg) |

- 2) Placer une mouche dans un tube eppendorf de 1,5 ml et l'écraser dans 50 µl de tampon d'extraction. Conserver sur glace pendant le traitement des autres échantillons.
- 3) Incuber à 37°C pendant 30 minutes.
- 4) Inactiver la Protéinase K par dénaturation à 95°C pendant 2 minutes.
- 5) Conserver à 4°C jusqu'à utilisation dans le cadre de la PCR ou bien pour stockage.

2- Réalisation de la PCR

- 1) Choisir l'amorce, calculer la température d'hybridation adaptée (<http://fernandez.guillaume.club.fr/horlogecircadienne/ngi.html>).
- 2) Préparation du mélange PCR
 - a) réalisation du mélange des quatre types de dNTPs à 2,5 mM.
 - b) Réalisation du mélange PCR
 - Diluer les amorces à 20 µM

| Composant du mélange PCR | Quantité unitaire |
|---|-------------------|
| MgCL2 (1-4mM) | 2-8 |
| dH2O | 36 |
| 5x GoTaq buffer Promega© | 5 |
| Mélange dNTP(2.5 mM) | 4 |
| Fw Primer (d'une dilu. à 20 µM resp. 50 µM) | 1 (resp. 0,4) |
| Re Primer (d'une dilu. à 20 µM resp. 50 µM) | 1 (resp. 0,4) |
| GoTaq polymerase Promega© | 0,25 |
| ADN de mouche | 2 |
| Total | 50 µl |

- c) Répartir 47 µl de mélange dans tous les tubes PCR de 0,2 µl
- d) Ajouter 2 µl d'ADN de chacune des extractions précédemment réalisées.
- e) Ajouter 0,25 µl de Taq polymérase en dernier dans tous les tubes.

3) Lancement de la PCR

Voir § Matériel et méthodes.

4) Conservation des résultats de PCR à 4°C

3- Migration sur gel d'agarose des amplicons

Gel à 1% : 1,1g d'agarose dans 110 ml de TBE 0,5X