

KIT PCR SENSIBILITE AU PTC

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 AS :

- MIX PCR (tube à bouchon bleu) comprenant :
 - La Taq polymérase
 - dNTP
 - Tampon PCR avec Mg²⁺
 - Colorant de chargement sur gel
- Tube d'amorces 5' : A (tube à bouchon orange)
- Tube d'amorces 3' : B (tube à bouchon marron)
- Tampon d'extraction de l'ADN (tube à bouchon incolore)
- Protéinase K (tube à bouchon blanc)
- Marqueur de poids moléculaire taille 100 pb avec bleu de charge (tube à bouchon rouge)
- Enzyme de restriction (tube à bouchon vert)
- Tampon C 10X (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

Carnets de bandelettes de test de PTC (réf PTCTEST)

Agarose

Tampon TBE 1X

Agent révélateur de l'ADN :

GELGREEN (2µL par gel de 20 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 réelle de la migration

Micropipettes : 2-20 µL

- Techniques utilisées: extraction de l'ADN, PCR, digestion par enzyme de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation de l'ADN.
- Temps requis: deux périodes de 45 minutes (+ 1h10 pour la PCR et 30-45 min de migration pour l'électrophorèse).

OBJECTIFS COGNITIFS

A travers l'étude d'un SNP au niveau du gène TAS2R38 présent sur le chromosome 7, ce kit a pour but d'initier les élèves à la PCR et de son intérêt pour mettre en relation génotype et phénotype.

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, cellules buccales...) peuvent être directement intégrées dans le mélange réactionnel. 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 ²⁺)	L'ion Mg ²⁺ 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 ²⁺ 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.

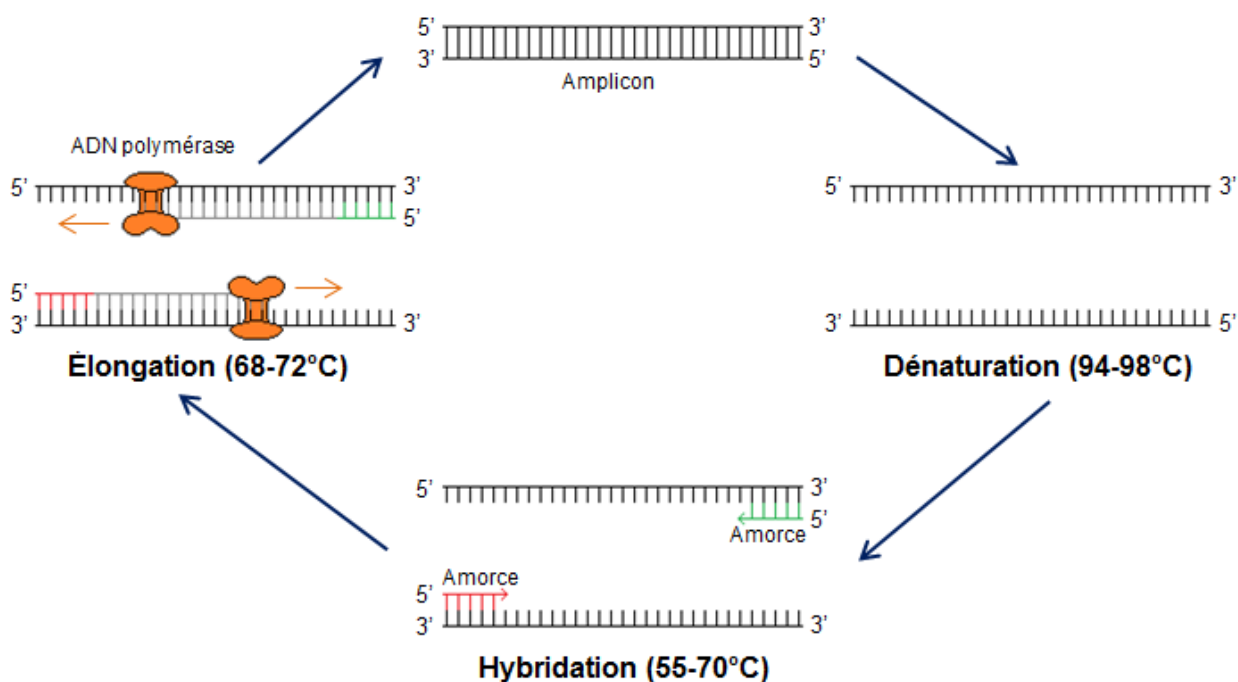


Fig. 1 : Illustration simplifiée des principales étapes de la PCR

SNP et relations génotype/phénotype

Environ 99,9% du génome humain est identique d'un individu à l'autre; l'autre 0,1% rend chacun de nous unique. Le génome humain contient environ 3 milliards de paires de bases, mais un simple changement de nucléotide peut altérer ou supprimer la fonction des gènes et peut donner lieu à un nouveau phénotype. Le **polymorphisme d'un seul nucléotide ou SNP** est une variation d'une seule paire de base dans une séquence d'ADN chez des individus de la même espèce. Les SNP sont la forme de variation la plus commune dans le génome humain et représentent une grande partie de notre diversité génétique et phénotypique.

Sentir ou ne pas sentir le goût amer, telle est la question. Et la réponse est étonnamment simple: quelques nucléotides. Dans cette activité, nous examinerons comment les SNP peuvent modifier notre capacité à percevoir le goût des aliments. Le sens du goût humain est composé d'un réseau neurophysiologique complexe, mais il ne faut que de petits changements à un gène pour modifier notre sensibilité à certaines molécules. Dans ce kit, les élèves étudieront un SNP associé à leur propre phénotype. Les élèves testeront leur capacité à goûter le phénylthiocarbamide (PTC), un produit chimique, et détermineront les corrélations entre cette capacité et leur génotype au locus TAS2R38, qui code pour un récepteur du goût exprimé au niveau des papilles gustatives. Il existe deux allèles communs pour le gène TAS2R38, un allèle « sensible » et un allèle « non sensible ». La différence entre ces allèles résulte de la combinaison de seulement trois SNP. L'objectif de cette activité est d'illustrer comment de très petits changements génétiques peuvent avoir des conséquences fonctionnelles importantes.

Notre capacité à goûter se fait par l'intermédiaire des GPCR (récepteurs couplés aux protéines G) qui constituent une grande classe de protéines diverses et hautement conservées avec sept domaines transmembranaires (Figure 1).

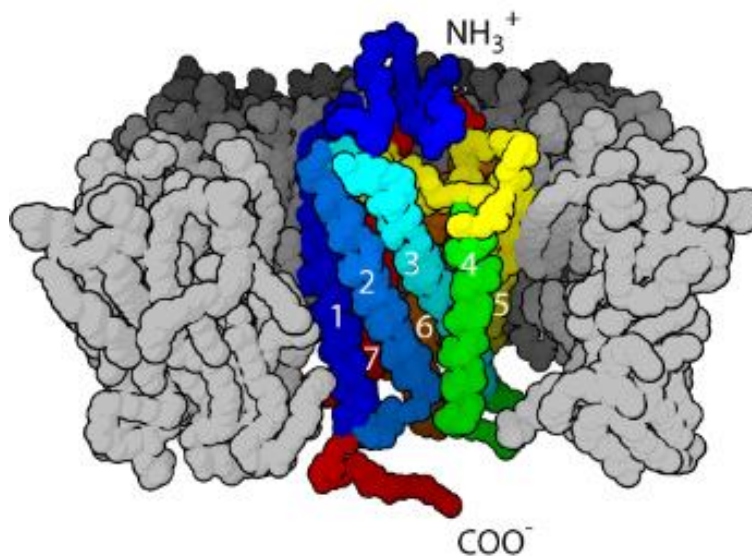


Fig. 2 : Structure d'un GPCR (récepteur couplé à la protéine G, Wikipedia)

Des milliers de GPCR humains différents ont été identifiés. Ils jouent un rôle dans un large éventail de processus physiologiques, de la communication hormonale à la perception sensorielle. Les GPCR sont intégrés à la membrane plasmique d'une cellule où ils interagissent avec les protéines G qui déclenchent des cascades de transduction du signal à l'intérieur de la cellule.

Les gènes récepteurs du goût des familles TAS1R et TAS2R codent des GPCR exprimés dans les cellules réceptrices du goût des papilles gustatives de la langue. Différents récepteurs gustatifs interviennent dans des modalités gustatives spécifiques (amer, sucré, salé, etc.). Les humains possèdent 43 récepteurs différents du goût amer au sein de la famille des gènes TAS2R. L'un des récepteurs gustatifs les mieux caractérisés est codé par le gène TAS2R38. Ce récepteur se lie à des ligands tels que le 6-n-propylthiouracile (PROP6) et le phénylthiocarbamide (PTC), deux produits chimiques similaires à ceux que l'on trouve dans les légumes au goût amer, comme le brocoli.

Lorsque les ligands se lient au récepteur, ils provoquent un changement de conformation de la protéine du récepteur TAS2R38, qui active une voie de transduction du signal qui transmet en fin de compte une impulsion nerveuse au cerveau donnant la sensation d'amertume.

Le récepteur TAS2R38 est l'un des seuls récepteurs du goût pour lesquels on sait que des variations au niveau de l'ADN influent sur la perception du goût. Les SNP du gène TAS2R38 ont été associés à une altération de la perception du goût amer (pour une analyse génomique détaillée de la perception du goût amer, voir Roudnitzky et al., 2015). Cela serait dû à un déficit de transduction du signal après la liaison du récepteur à ses ligands (comme les produits chimiques PROP6 et PTC). Il existe 3 SNP communément trouvés sur le gène TAS2R38 qui sont corrélés à la capacité d'un individu à sentir l'amertume du PTC, ce qui donne deux allèles souvent appelés PAV et AVI (initiales des acides aminés exprimés en fonction des SNP).

L'allèle PAV est associé à une sensibilité élevée au goût amer (allèle «sensible»), tandis que l'AVI est associé à une sensibilité faible, voire nulle (allèle «non sensible»). Chez les populations humaines, nous trouvons des individus homozygotes pour le PAV (très sensibles), homozygotes pour l'allèle AVI (non sensibles) ou hétérozygotes (peu sensible).

Position du nucléotide / acide aminé	Allèle sensible (PAV)		Allèle non sensible (AVI)	
	Nucléotide	Acide aminé	Nucléotide	Acide aminé
145 / 49	C	Proline	G	Alanine
785 / 262	C	Alanine	T	Valine
886 / 296	G	Valine	A	Isoleucine

Tableau 1 : Polymorphismes au sein du gène TAS2R38

Utilisation d'une enzyme de restriction

Une enzyme de restriction est une protéine capable de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence nucléotidique définie appelée site de restriction. Nous utiliserons les propriétés de l'enzyme de restriction Fnu4HI pour distinguer les allèles PAV et AVI.

En effet, Fnu4HI reconnaît la séquence **5' GCNGC 3'** (N étant n'importe quel nucléotide). En fonction de l'allèle PAV ou AVI, ce site de restriction est présent ou non :

Allèle PAV	5' - - - CTGTGG C TGCCTTCA - - - 3'	La séquence est reconnue par Fnu4HI, il y a coupure
Allèle AVI	5' - - - CTGTGG T TGCCTTCA - - - 3'	La séquence n'est pas reconnue par Fnu4HI, il n'y a pas coupure

Tableau 2 : Présence du site de restriction de Fnu4HI en fonction de l'allèle PAV ou AVI

MANIPULATION

Les élèves vont amplifier leur propre ADN par PCR pour déterminer leur génotype au niveau du gène TAS2R38. Ils utiliseront un couple d'amorces placées de part et d'autre de l'emplacement du SNP 785 et obtiendront des amplicons de 230 pb. Ce produit de PCR sera ensuite incubé avec l'enzyme de restriction Fnu4HI. Si l'allèle PAV est présent, il y aura coupure au niveau de la SNP 785 et nous obtiendrons des fragments de 150 pb et 80 pb. Enfin, les élèves effectueront une électrophorèse pour visualiser les résultats obtenus et ainsi déterminer leur génotype en fonction de la taille des fragments d'ADN obtenus.

En parallèle, les élèves pourront tester leur phénotype en goûtant des bandelettes imprégnées de PTC.

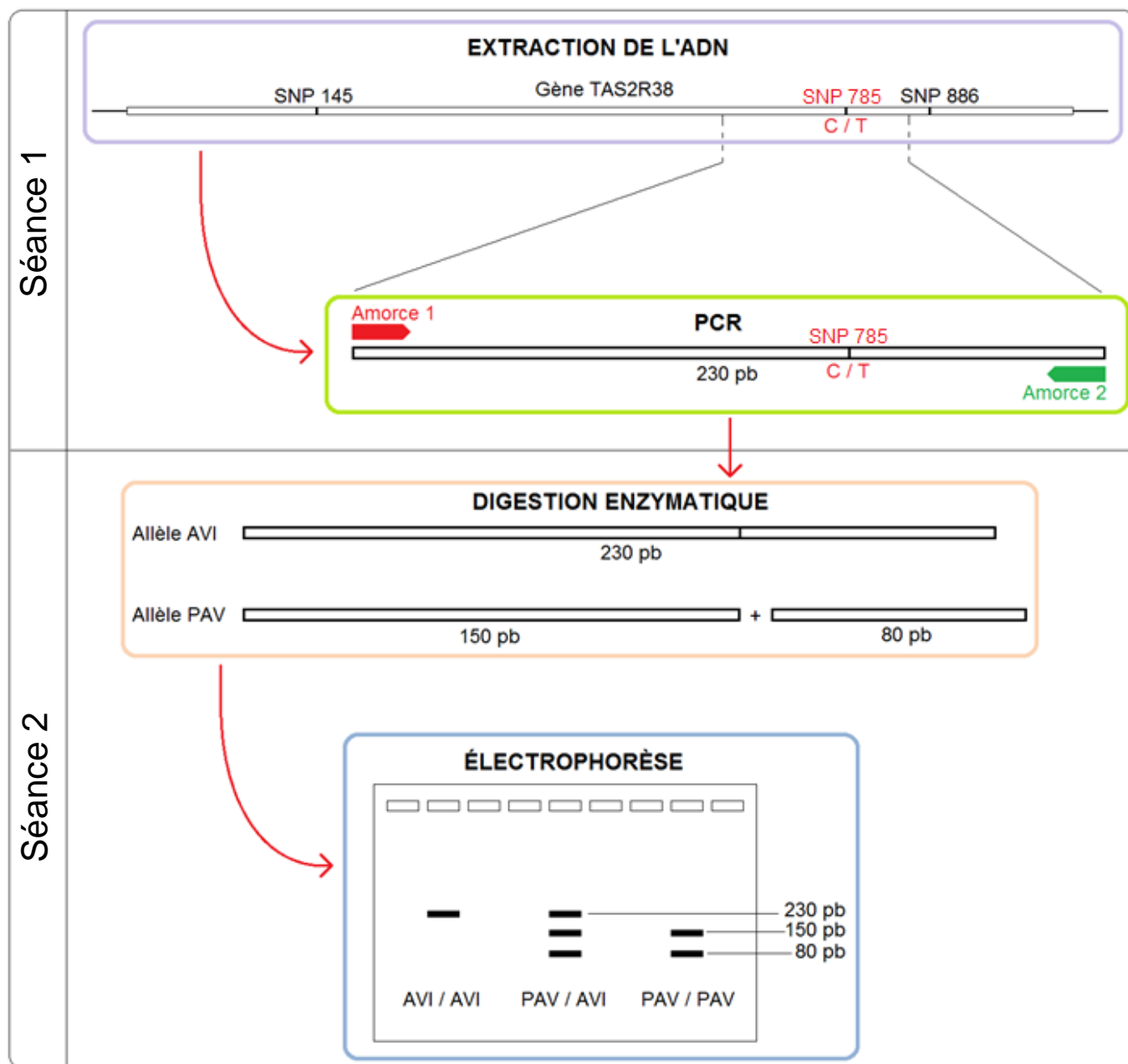
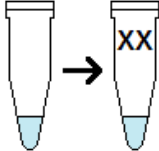
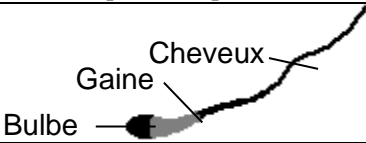
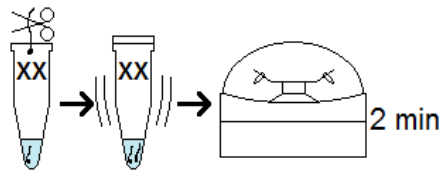
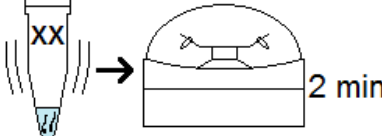
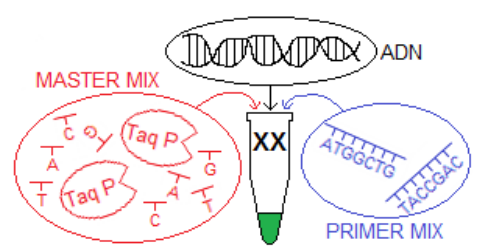



Fig. 3 : Schéma des différentes étapes de la détermination du génotype associé à la sensibilité au PTC

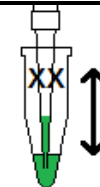
EXTRACTION DE L'ADN	
<p>Notez vos initiales sur le côté d'un microtube PCR contenant 20 μL de tampon d'extraction de l'ADN.</p>	
<p>Prélevez 2 cheveux présentant si possible un joli bulbe et une gaine de cellules épithéliales visible.</p>	
<p>Coupez l'extrémité des cheveux (5 mm max) au-dessus du microtube contenant le tampon d'extraction de l'ADN. <i>NB : placer une feuille blanche sur la paillasse pour retrouver le cheveu s'il tombe</i></p> <p>Fermez le microtube et tapotez le fond où utiliser un vortex pour homogénéiser le tampon.</p> <p>Placez les microtubes dans la centrifugeuse (étape commune). <i>! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !</i></p> <p>Centrifugez les tubes pendant 2 min. <i>! Vérifiez que les extrémités des cheveux sont bien dans le tampon d'extraction de l'ADN !</i></p>	
<p>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 :</p> <ol style="list-style-type: none"> 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. <p>Une fois l'incubation terminée, retirez le microtube et laissez-le refroidir sur un portoir à température ambiante (étape commune).</p>	
<p>Tapotez le fond du microtube ou utilisez un vortex pour remettre le contenu du microtube en suspension puis centrifugez les microtubes pendant 2 min. <i>! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !</i></p>	

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

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

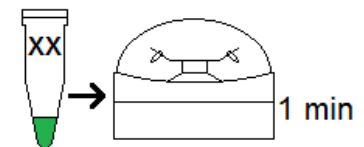
Ajoutez les réactifs suivants :	Mix (M) 10 µL	
	Amorces (A) 10 µL	
	Echantillon d'ADN 2 µL	
 Prélevez l'ADN en surface du tampon d'extraction. Si un précipité s'est formé dans le tube d'extraction, ne le transférez surtout pas dans le microtube PCR.		

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 **1 min** (étape commune).

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



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
Nombre de cycles	30	

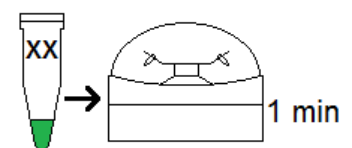
Si vous possédez un thermocycleur MiniPCR :

- 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.

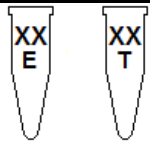

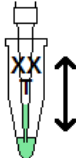
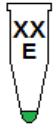
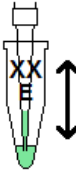
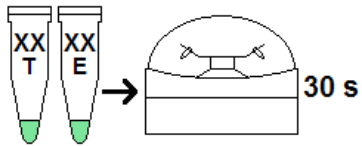
Une fois la PCR terminée, ouvrez le couvercle et retirez les microtubes.

Centrifugez les tubes pendant **1 min**.

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



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

DIGESTION ENZYMATIQUE	
Notez vos initiales suivies de « E » (Enzyme) sur le côté d'un microtube PCR propre et « T » (Témoin) sur le côté d'un deuxième microtube PCR.	
Préparation du produit de PCR témoin	
Prélevez 5 µL de produit de PCR (contenant l'ADN amplifié) et déposez-les au fond du microtube PCR.	
Ajoutez 10 µL de solution tampon directement dans le produit de PCR du microtube noté « T ». Aspirez et refoulez délicatement une dizaine de fois avec la micropipette pour bien mélanger la solution tampon avec l'ADN.	
Préparation du produit de PCR digéré par l'enzyme de restriction	
Prélevez 5 µL de produit de PCR (contenant l'ADN amplifié) et déposez-les au fond du microtube PCR.	
Ajoutez 10 µL de solution tampon contenant l'enzyme de restriction directement dans le produit de PCR du microtube noté « E ». Aspirez et refoulez délicatement une dizaine de fois avec la micropipette pour bien mélanger les enzymes de restriction avec l'ADN.	
Centrifugation	
Bouchez soigneusement les microtubes et centrifugez-le pendant 30 s (étape commune). <i>! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !</i>	
Incubation	
Incubez le microtube pendant 20 min à 37°C	
Si vous possédez un thermocycleur MiniPCR : <ul style="list-style-type: none"> - Cliquez sur le '+' - Choisissez « Incubation » - Entrez un nom pour le protocole ; par exemple « Digestion enzymatique » - Entrez les paramètres d'incubation : 	
Température	37°C
Temps	20 min
<ul style="list-style-type: none"> - Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole. - Cliquez sur "Démarrer" pour lancer l'incubation. 	
Une fois que la digestion est terminée, retirez les microtubes du thermocycleur ou du bain-marie.	

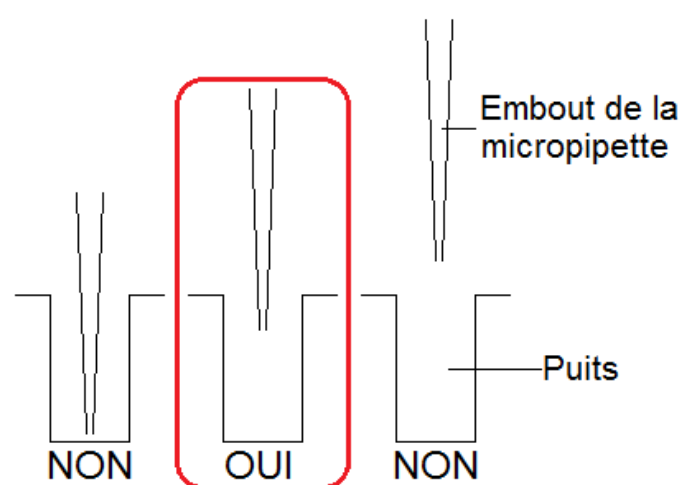
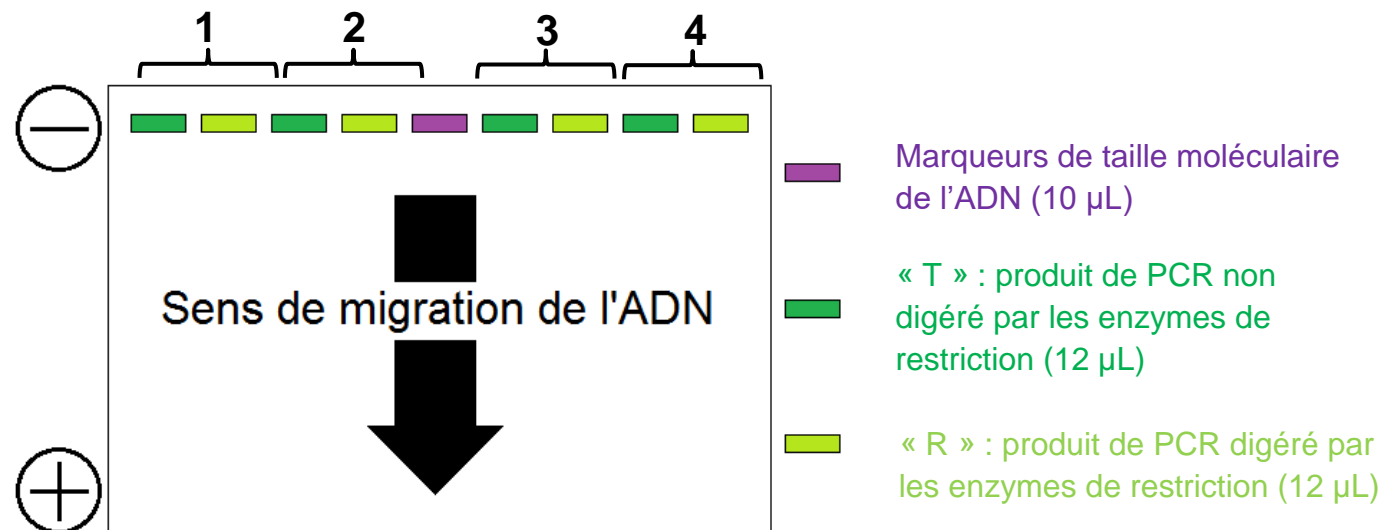
ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

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 4 individus.

Pour chaque analyse, vous disposez d'un **microtube PCR témoin « T » (produit de PCR non digéré par les enzymes de restriction)** et d'un **microtube PCR noté « E » (produit de PCR digéré par les enzymes de restriction)**.

Pour connaître la taille des fragments d'ADN, vous disposez également d'un microtube contenant **des marqueurs de taille 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.

Mettez le cache sur la cuve et contrôlez 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 µL de tampon de lyse dans un microtube Eppendorf.
- Ajoutez 12 µL 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 µL de solution de lyse dans 18 microtubes PCR.

PCR
Préparation du Mix d'amorces

- Pipetez 184 µL d'eau distillée (dH₂O) dans un microtube Eppendorf.
- Pipetez 8 µL du tube d'amorces A à 10 µM et les ajouter dans le tube contenant l'eau.
- Pipetez 8 µL du tube d'amorces B à 10 µM 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 µL de Mix d'amorces dans 18 microtubes Eppendorf.

Préparation du Mix PCR

- Aliquotez le Mix PCR : pipetez 11 µL de Mix d'amorces dans 18 microtubes Eppendorf.

DIGESTION ENZYMATIQUE
Préparation de la solution tampon « témoin »

- Pipetez 180 µL d'eau distillée (dH₂O) dans un microtube Eppendorf.
- Ajoutez 20 µL de tampon C 10x.
- Mélanger délicatement en aspirant et refoulant à la micropipette de manière à bien homogénéiser la solution.
- Aliquotez la solution tampon « témoin » : pipetez 11 µL de solution tampon dans 18 microtubes Eppendorf.

Préparation de la solution tampon contenant l'enzyme Fnu4HI

- Pipetez 178 µL d'eau distillée (dH₂O) dans un microtube Eppendorf.
- Ajoutez 20 µL de tampon C 10x.
- Ajoutez 2 µL d'enzyme de restriction Fnu4HI.
- Mélanger délicatement en aspirant et refoulant à la micropipette de manière à bien homogénéiser la solution.
- Aliquotez la solution tampon contenant l'enzyme Fnu4HI: pipetez 11 µL de solution tampon contenant l'enzyme Fnu4HI dans 18 microtubes Eppendorf.

ÉLECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Préparez les gels d'agarose à 2% additionnés de Gelgreen (2 µL pour 25 mL) avec du tampon TBE 1X

Exemple pour 100 mL de gel d'agarose à 2% :

- Mélangez 2 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 µL 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

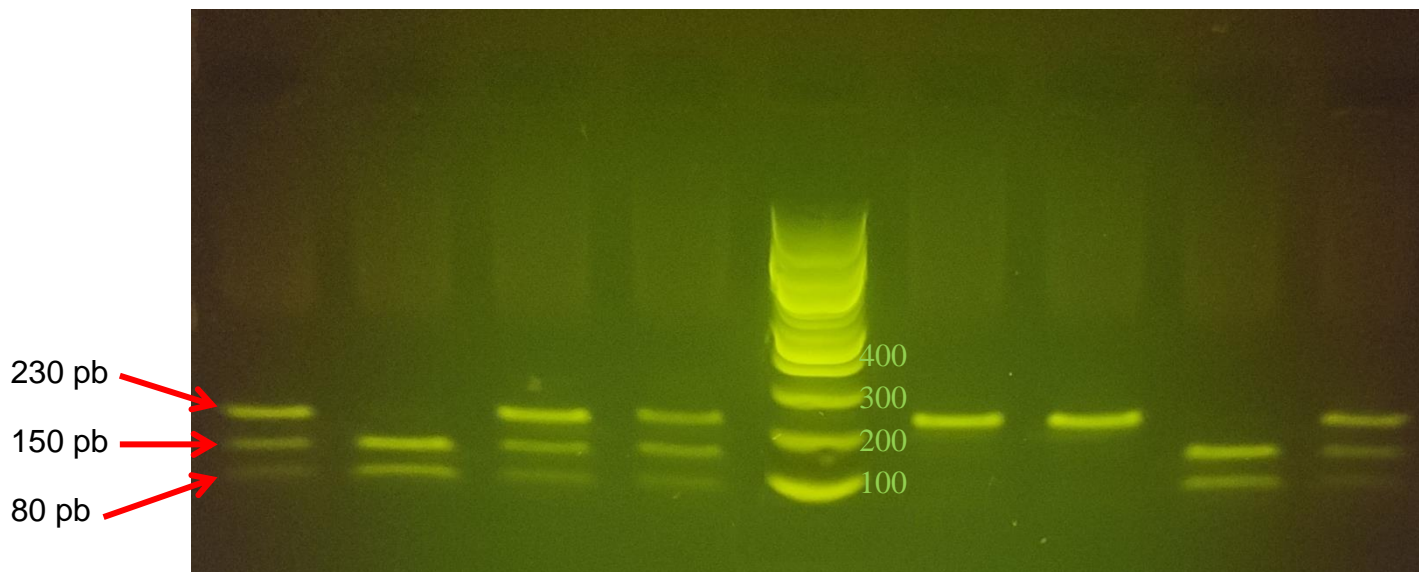
- Préparez le mix d'amorces au dernier moment juste avant le TP.
- Le mix PCR peut être aliquoté quelques jours avant le TP et remis au congélateur avant utilisation.
- Ne prélevez pas plus de 2 µL de suspension d'ADN. En règle générale, il faut s'assurer que l'utilisation de la micropipette est maîtrisée 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.

DIGESTION ENZYMATIQUE

- La solution tampon témoin peut être préparée et aliquotée quelques jours avant le TP et remis au congélateur avant utilisation.
- Préparez la solution tampon contenant l'enzyme Fnu4HI juste avant le TP et conservez-la au frais jusqu'au dernier moment.
- Mélangez délicatement et consciencieusement l'enzyme avec le tampon. Pour ce faire, réglez une micropipette sur 100 µL et aspirez et refoulez plusieurs fois pour bien homogénéiser la solution.
- N'utilisez pas de vortex.

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 µL, leurs embouts sont plus adaptés aux dépôts dans les puits.
- Vérifier que le gel n'a pas été déplacé sur son support avant de lancer la migration.
- 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 1,5 % cependant).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET ANALYSE


Ligne	Échantillon	Taille	Génotype
1	Individu 1	80 pb, 150 pb, 230 pb	PAV / AVI
2	Individu 2	80 pb, 150 pb	PAV / PAV
3	Individu 3	80 pb, 150 pb, 230 pb	PAV / AVI
4	Individu 4	80 pb, 150 pb, 230 pb	PAV / AVI
5	Marqueur de taille moléculaire de l'ADN	De 100 pb à 1200 pb (100, 200, 300, 400, ... ,1200 pb)	
6	Individu 5	230 pb	AVI / AVI
7	Individu 6	230 pb	AVI / AVI
8	Individu 7	80 pb, 150 pb	PAV / PAV
9	Individu 8	80 pb, 150 pb, 230 pb	PAV / AVI

Les individus 2 et 7 sont sensibles à l'amertume du PTC.

Les individus 1, 3, 4 et 8 sont peu sensibles à l'amertume du PTC.

Les Individus 5 et 6 ne sont pas sensibles à l'amertume du PTC.

Attention, le génotype ne détermine pas forcément une aversion particulière pour les brocolis. Un individu PAV / PAV appréciant l'amertume mangera des brocolis avec plaisir !

Remarque : il existe un site de restriction pour Fnu4HI en position 860. Cependant, Fnu4HI ne peut pas digérer l'ADN à cet endroit-là car il se situe sur l'extrémité de l'amplicon (il faut au moins 6 nucléotides entre le site de restriction et l'extrémité de l'amplicon pour qu'il y ait coupure).

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.