



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 le sachet AW au congélateur à - 20°C ⚠

- MIX PCR (tube à bouchon blanc) de 220 µL comprenant :
 - La Taq polymérase
 - dNTP
 - Tampon PCR avec Mg²⁺ +
 - Colorant de chargement sur gel
- ADN de phage lambda 4X (tube à bouchon marron) : 20 µL
- Marqueur de poids moléculaire taille 1 Kb avec bleu de charge (tube à bouchon rouge) : 16 µL
- Amorces A, 20µM (tube à bouchon jaune) : 16 µL
- Amorces B, 20 µM (tube à bouchon orange) : 16 µL
- Amorces C, 20µM (tube à bouchon vert) : 16 µL
- Amorces D, 20 µM (tube à bouchon bleu) : 16 µL

Les éléments suivants se stockent à température ambiante :
100 Microtubes à PCR

Les réactifs doivent être utilisés dans les 2 mois suivant leur réception. Une fois mélangés, les réactifs ne se conservent pas., Il faut donc les préparer juste avant la séance.

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

Agarose

Tampon TBE 1X

Agent révélateur de l'ADN :

GELGREEN (2µL par gel de 20 ml)

Thermocycleur MINIPCR ou autre marque

Cuve à électrophorèse d'ADN, idéalement BLUEGEL ou autre cuve avec transilluminateur pour une visualisation en temps réels de la migration

Micropipettes : 2-20 µL

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, celles 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.

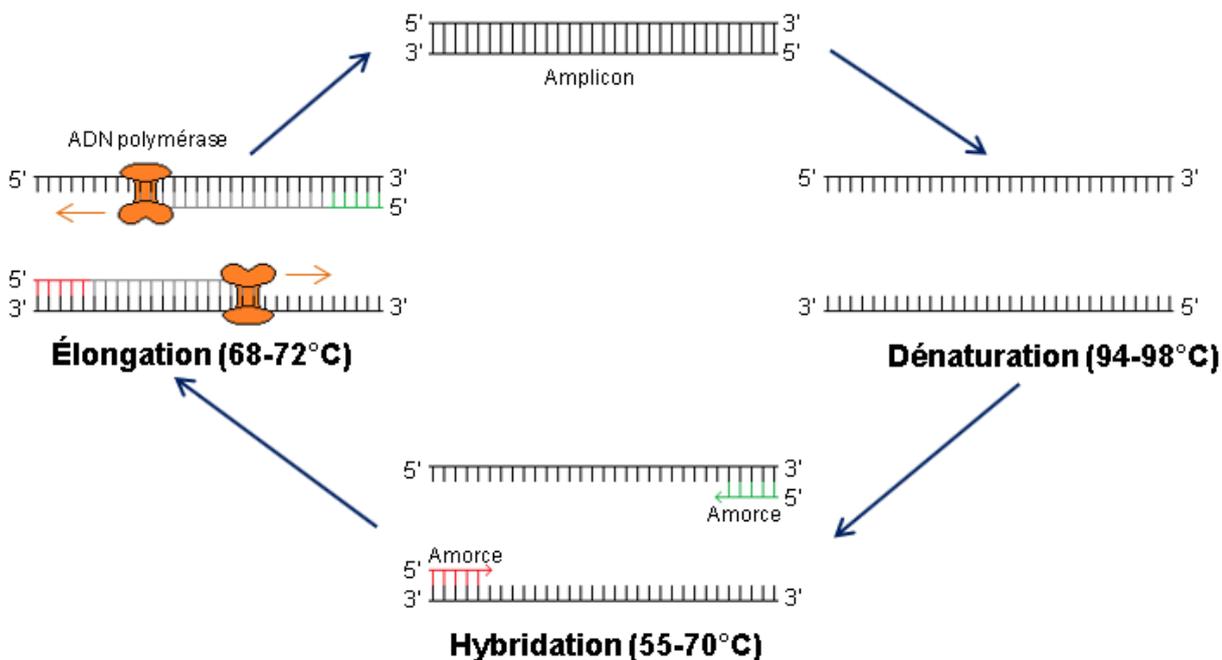


Fig. 1 : Illustration simplifiée des principales étapes de la

OBJECTIFS COGNITIFS

Ce kit propose de réaliser une PCR d'ADN synthétique, puis une électrophorèse sur gel d'agarose afin d'observer les résultats de la PCR.

Nous vous proposons ensuite plusieurs scénarios très simplifiés, qui permettent des illustrations d'applications possibles de ces techniques (PCR et électrophorèse), à choisir en fonction de vos affinités ou des points que vous souhaitez illustrer.

Pour chaque scénario, vous pouvez faire faire une des deux amplifications comme 'témoin' à un élève.

Pour une classe de 9 binômes il faudra 3 gels d'électrophorèse avec 9 puits répartis de la manière suivante : 1 témoin, 7 dépôts d'échantillons à analyser, 1 marqueur de poids moléculaire.



I. Scénario 1 : Hybridation des abeilles

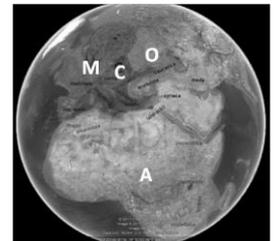
Ce kit propose de réaliser une PCR d'ADN puis une électrophorèse sur gel d'agarose afin de simuler le génotypage d'espèces d'abeilles récoltées en France à partir de leur ADN mitochondrial ; amplifié sur une séquence spécifique par la technique la PCR.

Pourquoi génotyper les abeilles grâce à la technique de PCR ?

L'effondrement des colonies d'abeilles est un problème majeur qui touche tous les continents. Cet effondrement peut être lié à plusieurs facteurs tels que l'utilisation massive des pesticides, les monocultures, le développement de parasites comme le varroa, les espèces invasives ...

Une pratique apicole peu évoquée est l'hybridation ; croisement entre plusieurs sous-espèces d'abeilles. L'hybridation pourrait aussi être un facteur de fragilisation des colonies car il introduit des espèces non endémiques qui vont entrer en compétition avec les espèces locales (endémiques) pour la conquête de l'espace. De plus, n'étant pas adaptées à leur nouvel écosystème, ni lui à elles, ces espèces exogènes perturbent cet écosystème et par conséquent les espèces locales qui y étaient adaptées.

Il s'agit donc pour les apiculteurs de déterminer le taux d'hybridation de leur(s) rucher(s) afin d'identifier l'ensemble des causes potentielles d'une décimation de colonies.



L'abeille est un hyménoptère, appartenant au genre *Apis*, qui comporte plusieurs espèces sociales.

L'*Apis mellifera* se rencontre en Europe, en Afrique, au Proche-Orient, et dans une partie de la Sibérie. Sa très grande extension géographique et les conditions climatiques différentes ont produit des lignées aux caractères morphologiques et comportementaux variés.

Il existe 4 lignées évolutives de l'espèce *Apis mellifera* sur leur aire de répartition naturelle :

- la lignée M (ouest-méditerranéennes = abeille noire)
- la lignée A (africaines)
- la lignée C (nord-méditerranéennes)
- la lignée O (Turquie et Caucase)

Lorsque l'on s'intéresse aux aires de répartitions de ces 4 lignées, on s'aperçoit qu'elles sont vastes et peuvent notamment s'expliquer par la cartographie des périodes de glaciations. Par exemple, la divergence entre les lignées M et C-O s'explique par la présence d'une calotte glaciaire qui longeait leurs lignes de démarcations. Le réchauffement climatique et la fonte de ces calottes glaciaires a ensuite conduit au «métissage» des lignées (NB : toutes peuvent se reproduire entre elles).

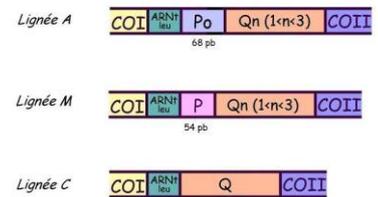
Aujourd'hui, le métissage est essentiellement dû à la pratique de plus en plus rependue de l'hybridation. Un des pionniers de l'hybridation contrôlée chez les abeilles était le frère Adam qui vivait en Angleterre dans l'abbaye de Buckfast. Il développa ce principe d'hybridation car il pensait pouvoir obtenir «l'abeille idéale». A l'époque il s'agissait d'améliorer la race locale décimée par la maladie de l'île Wight (causée par *Acaparis woodi* une «mite trachéale»). De nos jours, les apiculteurs poursuivent ses méthodes afin de trouver une abeille excellente butineuse, propre, peu agressive et aussi peu essaimeuse (c'est-à-dire qui ne forme pas de ruche/colonie ailleurs qu'au lieu où elle a été implantée). La buckfast (connue dans le monde entier) est donc le résultat d'une hybridation considérée comme réussie par de nombreux professionnels ; croisement de plusieurs races résistantes importées de diverses régions du monde (sAuarienne, ligustica, mellifera). Ses qualités et ses performances continuent de s'améliorer grâce à une

sélection continue (pour cumuler les qualités et écarter les défauts) car il est difficile de stabiliser les caractères de l'abeille sur plusieurs générations. C'est pourquoi il est important de pouvoir identifier sur des caractères physiques et/ou génétiques l'état d'hybridation d'une colonie. La PCR est un des moyens rapides d'identifier un individu sur des caractéristiques génétiques.

L'ADN mitochondrial de l'abeille est caractérisé par des régions intergéniques dont la longueur varie d'une race à une autre. Dans ces régions, il existe des sous-unités P (54 pb) et des sous-unités Q (192-196 pb). Ces sous-unités peuvent se combiner selon différentes séquences de répétitions : P, PQ, PQQ ...

- Les sous unités P suivies d'un ou plusieurs Q correspondent à lignée M
- Les sous unités Po suivies d'un ou plusieurs Q correspondent à la lignée A
- La présence d'un unique Q correspond à la lignée C.

Les échantillons d'ADN fournis ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spéciales ciblant les régions P et Q.



Les échantillons d'ADN fournis correspondent à 2 fragments qui représentent 2 espèces d'abeilles.

- Vous pouvez choisir un des deux échantillons qui servira de témoin et identifier si les élèves ont amplifié l'ADN de la même colonie que l'abeille témoin ou pas.
- Ou alors les élèves ont chacun l'ADN d'une abeille, les deux lots d'abeilles ayant été prélevés dans des colonies différentes, ils doivent déterminer à quelle colonie appartient leur abeille.

MANIPULATIONS PAR LES ELEVES

1) PCR :

Il y a deux séries d'amplifications différentes à faire ; une avec l'ADN et les amorces A (9 tests), l'autre avec l'ADN et les amorces B (9 tests). **Voir fiche élève PCR.**

2) Mise en œuvre de l'électrophorèse (voir fiche de préparation), mise en place du gel:

- Enlever délicatement les peignes.
- Placer le moule à gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Le détrompeur garantit que le gel sera bien positionné dans la cuve.
- Verser le tampon TBE 1X sur le gel pour remplir les puits, puis de part et d'autre du gel jusqu'à l'affleurement (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- Pulvériser une dose de produit anti-condensation dans le couvercle orange de la cuve, puis l'essuyer avec le petit chiffon bleu prévu. A refaire entre chaque migration.

3) Dépôt et migration des ADN : **Voir fiche élève électrophorèse.**

RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

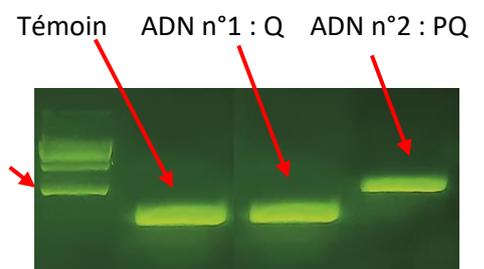
La hauteur de migration des bandes d'ADN correspond à la taille des fragments d'ADN contenu dans chaque échantillon. Cette taille peut être quantifiée grâce à l'échelle de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue. En effet, un fragment d'une taille donnée migre toujours à la même vitesse et plus le fragment est court, plus il migre vite à travers les mailles du gel d'agarose.

Ainsi, les bandes hautes correspondent à des ADN de grande taille qui ont migrés lentement, telles que les séquences Q ou PQ. Les bandes plus basses correspondent à des ADN de plus petite taille qui ont migrés plus rapidement, telles que les séquences P.

Voici un exemple de résultats obtenus avec ce kit :

Suite à la migration sur gel, on peut identifier les ADN comme suit :

Marqueur de poids moléculaire, bande à 1Kb



II. Scénario 2 : Dépistage de la drépanocytose

Ce scénario présente une situation de prédiction médicale recréée artificiellement. On considère une famille fictive dans laquelle l'hémoglobine drépanocytaire est présente et pour laquelle on souhaite établir les génotypes des individus et l'arbre généalogique de façon à évaluer la probabilité que la maladie se manifeste chez un enfant à naître. Les ADN des parents et de leurs enfants sont représentés par l'ADN synthétique fourni.

RAPPELS

Introduction générale sur la drépanocytose :

Extension : drépanocytose et paludisme

La drépanocytose provoque une maladie à vie et réduit la durée de vie globale. Dans certaines régions d'Afrique, on estime que 90% des enfants nés avec l'anémie falciforme ne vivent pas jusqu'à l'âge de cinq ans. Des allèles qui réduisent ainsi la forme physique d'un individu devraient disparaître des populations au fil du temps par la sélection naturelle. La question est donc de savoir pourquoi l'allèle drépanocytaire (HbS) est-il trouvé à une fréquence aussi élevée dans certaines régions du monde ? La réponse est surprenante : le paludisme. Le paludisme est une infection transmissible par le sang transmise par les moustiques. Les parasites qui causent le paludisme proviennent tous du genre Plasmodium. Plasmodium falciparum est le plus mortel de ces parasites et est également responsable de la plupart des infections paludéennes. Les humains sont infectés quand un moustique les pique, et Plasmodia continue à se reproduire dans les globules rouges humains. Quand une personne infectée est piquée par un moustique, le parasite du paludisme est absorbé et peut ensuite se propager à d'autres personnes. Le paludisme tue plus d'un million de personnes chaque année, principalement des enfants de moins de cinq ans, et infecte plusieurs centaines de millions de personnes supplémentaires, causant des symptômes sévères et perpétuant le cycle de transmission.

Lorsque le parasite du paludisme infecte les globules rouges, il peut provoquer la drépanocytose si la drépanocytose est présente. Pour les personnes qui sont homozygotes pour l'allèle HbS, cela peut être extrêmement dangereux. Chez les individus qui sont hétérozygotes et qui portent un allèle HbS et un allèle HbA, cependant, juste assez de leurs cellules infectées par la drépanocytose pour que la rate les retire du corps, en réduisant leur taux global d'infection par le parasite Plasmodium. Pour cette raison, les personnes atteintes du trait drépanocytaire montrent une certaine résistance au paludisme. Le paludisme continue à toucher ces personnes, mais elles sont moins susceptibles d'en mourir. L'examen des cartes de répartition du paludisme et de la drépanocytose indique avec quelle clarté les deux maladies interagissent. En Afrique, dans les régions où le paludisme est répandu, la drépanocytose est également extrêmement pathogène.

Dans les régions où le paludisme est absent, il en va généralement de même de la drépanocytose. C'est un cas de ce que l'on appelle l'avantage hétérozygote. Dans l'avantage hétérozygote, les deux formes de l'homozygote sont, pour une raison quelconque, moins résistantes que l'hétérozygote. Dans le cas de la bêta-globine, une personne homozygote pour l'HbA a une bonne condition physique liée à la fonction sanguine, mais est plus susceptible de mourir du paludisme. Une personne homozygote pour l'HbS est susceptible de mourir de drépanocytose. Les personnes hétérozygotes, cependant, risquent moins de mourir du paludisme et présentent peu ou pas de symptômes de drépanocytose.

Lorsque l'allèle drépanocytaire est rare dans la population, la plupart des allèles HbS se retrouvent chez les hétérozygotes et très peu de personnes contractent la drépanocytose. Dans les régions touchées par le paludisme, ces personnes bénéficieront d'une protection antipaludique et transmettront l'allèle HbS, augmentant ainsi sa fréquence dans la population. À mesure que l'allèle drépanocytaire devient plus commun, de plus en plus d'individus naîtront sous la forme d'homozygotes HbS. Étant donné que la drépanocytose était presque toujours fatale, du moins jusqu'à tout récemment, les individus homozygotes ne transmettaient pas leurs allèles, ce qui réduisait la fréquence de la drépanocytose. Tant que le paludisme est présent, les allèles HbS et HbA resteront équilibrés de cette manière, conduisant à l'autre nom de ce phénomène, un polymorphisme équilibré

La drépanocytose ou anémie falciforme est l'hémoglobinopathie héréditaire la plus répandue dans le monde : elle affecte plusieurs centaines de milliers de personnes dont plus de 5 000 en France.

Dans cette maladie, lorsque la pression partielle en oxygène est faible, comme dans les capillaires périphériques, l'hémoglobine des sujets atteints a tendance à polymériser en longues fibres rigides qui déforment les globules rouges en leur conférant une forme de faucille qui les empêche de passer dans les capillaires les plus fins, freinant ou bloquant leur circulation.

L'hémoglobine anormale, S (*sickle*), ne diffère de l'hémoglobine normale, A, que par un seul acide aminé de la chaîne bêta en position 6 (acide glutamique remplacé par valine). **Les deux allèles ne diffèrent que par un codon.**

On peut distinguer les deux allèles par amplification, car la mutation et les séquences d'amorces sélectionnées permettront d'obtenir deux amplicons différents : l'un 'sain' (plus petit), l'autre muté (plus gros).

NB : dans la réalité après l'amplification il faudrait faire une digestion enzymatique qui couperait différemment les allèles mutés / non mutés, homozygotes ou hétérozygotes. Ce kit permet uniquement de simuler une application de l'usage de la PCR/électrophorèse, en illustrant le problème de la drépanocytose. Pour une approche plus réaliste utilisez le kit DREPADN.

En analysant la taille du gène (simulé) amplifié, on peut donc déterminer quelle(s) hémoglobine(s) il possède et en déduire son génotype : hétérozygote, HbA/HbS ou homozygote HbA/HbA ou HbS/HbS. Ainsi, il est possible d'étudier les relations génotype-phénotype mais aussi de construire un arbre généalogique et de faire des prévisions en génétique humaine. Dans ce kit nous n'illustreront que les homozygotes HbA/HbA ou HbS/HbS.

En outre, l'identification des génotypes dans diverses populations permet d'établir la fréquence des allèles et de relier génétique et évolution.

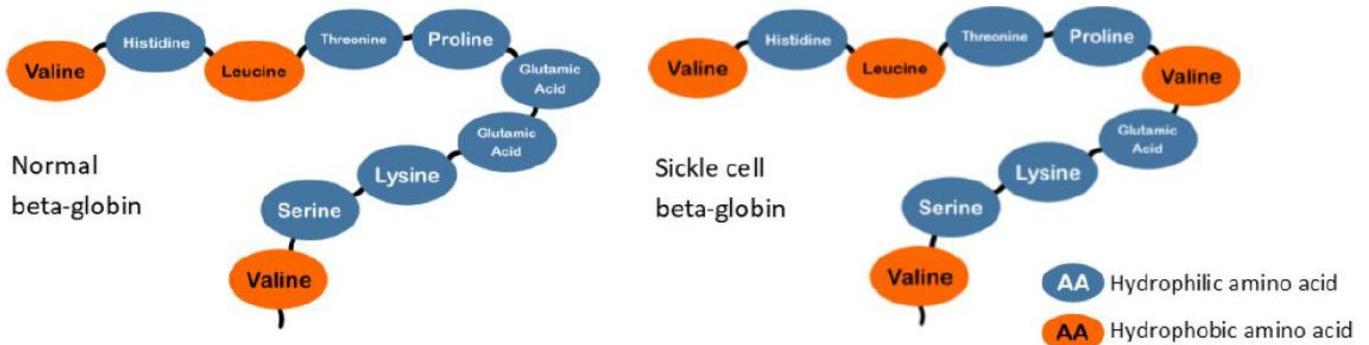


Figure 1: Les dix premiers acides aminés de la beta-globine normale (à gauche) et de la beta-globine de drépanocytose (droite).

MANIPULATIONS PAR LES ELEVES

4) PCR :

Il y a deux séries d'amplifications différentes à faire ; une avec l'ADN et les amorces A + B (9 tests), l'autre avec l'ADN et les amorces C + D (9 tests). Voir fiche élève PCR.

5) Mise en œuvre de l'électrophorèse (voir fiche de préparation), mise en place du gel:

- Enlever délicatement les peignes.
- Placer le moule à gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Le détrompeur garantit que le gel sera bien positionné dans la cuve.
- Verser le tampon TBE 1X sur le gel pour remplir les puits, puis de part et d'autre du gel jusqu'à l'affleurement (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- Pulvériser une dose de produit anti-condensation dans le couvercle orange de la cuve, puis l'essuyer avec le petit chiffon bleu prévu. A refaire entre chaque migration.

6) Dépôt et migration des ADN : Voir fiche élève électrophorèse.

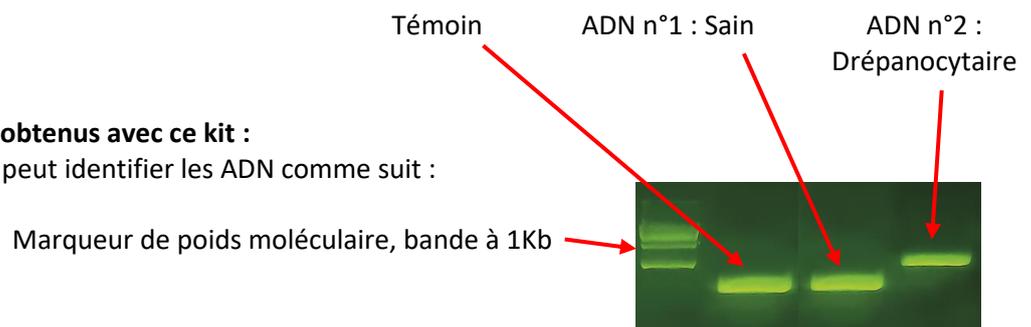
RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

La hauteur de migration des bandes d'ADN correspond à la taille des fragments d'ADN contenu dans chaque échantillon. Cette taille peut être quantifiée grâce à l'échelle de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue. En effet, un fragment d'une taille donnée migre toujours à la même vitesse et plus le fragment est court, plus il migre vite à travers les mailles du gel d'agarose.

Ainsi, les bandes hautes correspondent à des ADN de grande taille qui ont migrés lentement, telles que les séquences drépanocytaires. Les bandes plus basses correspondent à des ADN de plus petite taille qui ont migrés plus rapidement, telles que les séquences saines.

Voici un exemple de résultats obtenus avec ce kit :

Suite à la migration sur gel, on peut identifier les ADN comme suit :



III. Scénario 3 : ADN du suspect

Le génome humain possède environ 3 milliards de paires de bases et la plupart sont identiques chez deux individus. Cela représente une quantité d'ADN trop importante pour être simplement analysé en coupant avec des enzymes de restriction et en faisant migrer sur un gel. Heureusement, les différences dans la séquence d'ADN entre deux personnes sont concentrées à certains endroits sur les chromosomes. Pour réaliser une identification génétique, les scientifiques étudient ces séquences divergentes grâce à différentes techniques dont la PCR.

L'ADN humain contient des séquences répétées (de 3 à 30 paires de bases) dispersées à différents endroits sur les chromosomes. Bien que la localisation de ces séquences répétées et la composition en nucléotides soient identiques chez tout le monde, le nombre de ces répétitions à un endroit donné varie d'une personne à une autre. Le nombre de ces séquences répétées permet donc de réaliser une identification génétique et cela peut être réalisé grâce à la PCR. Pour cela, de courtes séquences d'ADN (couples d'amorces), spécifiques de ces séquences répétées que l'on souhaite amplifier, sont utilisées lors de la réaction de PCR. Ces amorces sont façonnées afin d'être spécifiques de ces séquences pour chaque chromosome. Lors de la PCR, ces couples d'amorces s'apparient de part et d'autre de la séquence ADN qui doit être amplifiée et spécifiquement à celle-ci. Le produit de cette PCR sera donc le fragment d'ADN d'intérêt situé entre ces deux courtes séquences d'ADN et répété en très grande quantité, produisant ainsi une épaisse bande d'ADN de taille fixe lors de la migration sur gel d'agarose. Le nombre de répétitions des séquences spécifiques, et donc la taille du fragment obtenu par PCR, étant unique pour chaque chromosome de chaque individu, il est donc possible de déterminer à qui appartient l'ADN étudié en comparant le profil de migration du produit de PCR de l'individu X avec celui de suspects connus.

L'ADN présent dans ce kit et utilisé pour la migration sur gel a été purifié de façon à simuler des produits de PCR à partir de l'ADN de deux suspects et de deux paires d'amorces spécifiques de ces individus.

Chaque élève déterminera s'il a l'échantillon correspondant à l'ADN trouvé sur la scène du crime ou pas.

MANIPULATIONS PAR LES ELEVES

7) PCR :

Il y a deux séries d'amplifications différentes à faire ; une avec l'ADN et les amorces A (9 tests), l'autre avec l'ADN et les amorces B (9 tests). **Voir fiche élève PCR.**

NB : Ajouter l'amplification d'un échantillon avec amorces A+B ou C+D pour faire office de témoin.

8) Mise en œuvre de l'électrophorèse (voir fiche de préparation), mise en place du gel :

- Enlever délicatement les peignes.
- Placer le moule à gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Le détrompeur garantit que le gel sera bien positionné dans la cuve.
- Verser le tampon TBE 1X sur le gel pour remplir les puits, puis de part et d'autre du gel jusqu'à l'affleurement (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- Pulvériser une dose de produit anti-condensation dans le couvercle orange de la cuve, puis l'essuyer avec le petit chiffon bleu prévu. A refaire entre chaque migration.

9) Dépôt et migration des ADN : Voir fiche élève électrophorèse.

RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

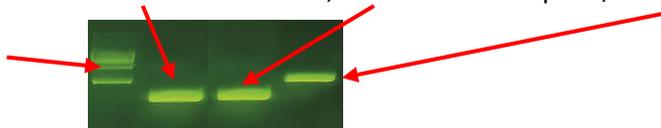
La hauteur de migration des bandes d'ADN correspond à la taille des fragments d'ADN contenu dans chaque échantillon. Cette taille peut être quantifiée grâce à l'échelle de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue. En effet, un fragment d'une taille donnée migre toujours à la même vitesse et plus le fragment est court, plus il migre vite à travers les mailles du gel d'agarose.

Voici un exemple de résultats obtenus avec ce kit :

Suite à la migration sur gel, on peut identifier les ADN comme suit :

ADN n°1 : Scène du crime ; ADN n°2 : Suspect ; ADN 3 : innocent

Marqueur de poids moléculaire, bande à 1Kb

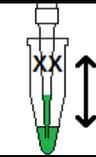


PCR (Polymerase chain reaction) : Amplification de l'ADN

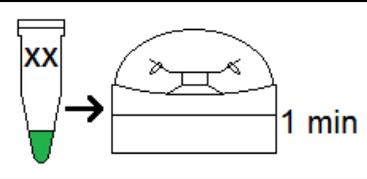
Notez vos initiales sur le côté d'un microtube PCR propre.

Ajoutez les réactifs suivants :	Mix (M) 10 µL Mix d'amorces A+ B ou C+D: 10 µL Echantillon d'ADN 4 µL	
---------------------------------	---	--

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).

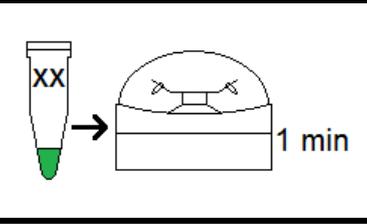
Programmez le thermocycleur (étape commune) :

CYCLE	T (°C)	t (s)
Dénaturation initiale	94°C	60 s
Dénaturation	94°C	15 s
Hybridation	58°C	15 s
Elongation	72°C	30 s
Elongation finale	72°C	30 s
Nombre de cycles	10	

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 !



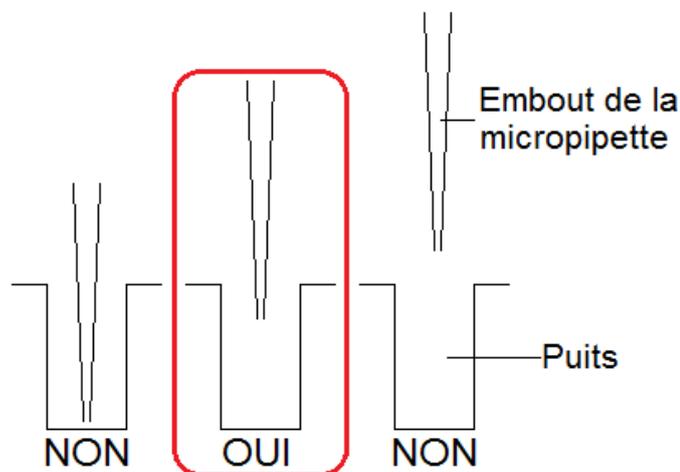
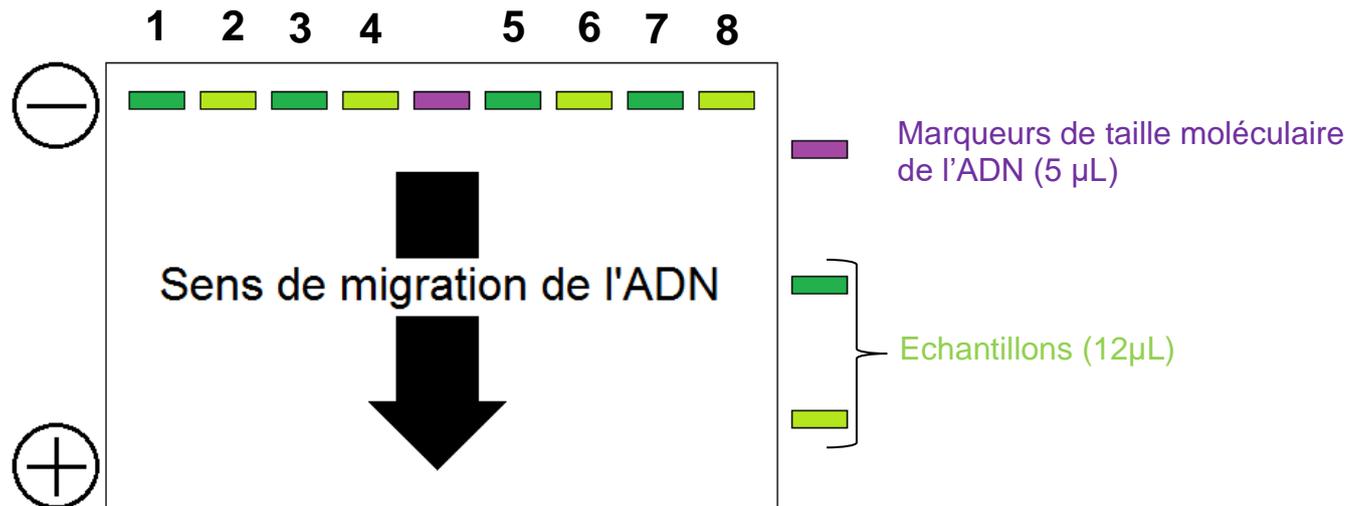
ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

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 8 individus.

Pour connaître la taille des fragments d'ADN, vous disposez également d'un microtube contenant **un marqueur de poids 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 puits 1 est le témoin, les autres, sont les amplifications à identifier



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

Préparation des échantillons contenus dans le sachet AU :

- Centrifuger les produits afin de faire descendre la totalité des réactifs dans le fond des tubes.
- Le mélange de tous les réactifs en vu de la réaction de PCR est à effectuer au moment du TP
- Le MIX est prêt à l'emploi

PCR

Préparation de l'ADN

- Ajouter 60 µL d'eau distillée dans le tube contenant l'ADN (tube à bouchon marron)

Préparation du Mix d'amorces A+B : Attention une fois préparé, le mix ne se conserve pas

- Pipetez 178 µL d'eau distillée (dH₂O) dans un microtube Eppendorf.
- Pipetez 16 µL de chaque amorce A et B (tube à bouchon jaune et orange) à 20 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 identifiés AB

Préparation du Mix d'amorces C+D : Attention une fois préparé, le mix ne se conserve pas

- Pipetez 178 µL d'eau distillée (dH₂O) dans un microtube Eppendorf.
- Pipetez 16 µL de chaque amorce C et D (tube à bouchon vert et bleu) à 20 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 identifiés CD.

Préparation du Mix PCR

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

ELECTROPHORESE :

Ce protocole s'adapte à l'utilisation des cuves d'électrophorèse BLUEGEL. Pour tout autre matériel, ajuster les quantités de gel d'agarose à préparer et le procédé de mise en œuvre de l'électrophorèse aux recommandations du constructeur (voir notices de vos cuves à électrophorèse)

Préparation du GEL d'agarose à 2 %

- Mélanger les 4 g d'agarose avec 250 ml de TBE 1X préparé précédemment.
- Faire chauffer pendant 2-3 minutes au micro-onde jusqu'à ce que la solution soit complètement homogène et transparente (ne pas couvrir la solution).
- Utiliser des gants anti-chaleur ou des maniques de préhension pour saisir et manipuler le flacon chaud.
- Laisser refroidir jusqu'à une température d'environ 60°C.
- Ajouter 2µL de GELGREEN pour 20 ml de gel d'agarose.
- Fermer hermétiquement les moules à gel aux extrémités avec les butoirs en caoutchouc ou avec du ruban adhésif et placer le peigne 8 puits.
- A l'aide de gants anti-chaleur ou de moufle de préhension, couler l'agarose dans les moules jusqu'à une hauteur correspondant environ à la moitié de la hauteur des dents du peigne.
- Laisser durcir à température ambiante sur une surface plane et horizontale (le gel doit devenir trouble). Ce gel se conserve une heure à sec ou 24 heures au réfrigérateur en immersion dans du TBE 1X

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.