



Mini Laboratoire de
génétique
Guide de l'élève

Cat# M6010TAE

Version 081721-FR



Table des matières

Sécurité au laboratoire	2
Introduction	3
Jour 1 : Test de goût PTC et Extraction ADN	8
Jour 2 : Configurez et exécutez votre Amplification PCR	13
Jour 3 : Digestion par enzymes de restriction et Electrophorèse sur gel	19
Fiche d'analyse du gel	25
Annexe A - Glossaire	28
Annexe B - Réaction en chaîne de la polymérase	30
Annexe C - Qu'est-ce que l'électrophorèse sub gel ?	32
Annexe D - Bibliographie	33

Ce kit contient suffisamment de produits pour permettre à **10 groupes de** réaliser des expériences.

Sécurité des laboratoires

1. Portez des blouses de laboratoire, des gants et des lunettes de protection chaque fois que cela est possible.
2. Faites preuve de prudence avec tous les équipements électriques tels que les appareils PCR et les appareils d'électrophorèse.
3. L'appareil PCR a des surfaces qui peuvent être extrêmement chaudes. Faites preuve de prudence lorsque vous ouvrez et fermez le couvercle et lorsque vous placez et retirez les tubes.
4. Chauffer et verser de l'agarose fondu peut causer des risque d'éclaboussures. Faites attention lorsque vous manipulez des liquides chauds. Portez une protection oculaire et des gants pour éviter les brûlures.
5. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir manipulé du matériel biologique et des produits chimiques.
6. Jetez tous les matériaux dans un sac pour déchets biologiques ou dans un récipient contenant une solution d'eau de javel à 10 %.

Introduction

Chaque être humain perçoit le monde d'une manière légèrement différente. Certaines différences découlent de nos expériences passées et d'autres sont liées à notre patrimoine génétique. 99,9 % du génome humain est identique entre les individus, tandis que le 0,1 % restant nous rend biologiquement uniques. Les différences génétiques s'étendent à nos systèmes sensoriels et affectent notre façon de voir, d'entendre et de goûter le monde. Dans quelques cas, nous connaissons les gènes et les protéines spécifiques qui sous-tendent les différences de perception. Dans ce TP, nous allons explorer la génétique moléculaire du goût. Vous déterminerez votre propre génotype pour un récepteur chimique impliqué dans la perception des composés amers.

Historique :

La sensibilité au phénylthiocarbamide (PTC ; figure 1) est l'un des exemples les plus étudiés de variation héréditaire de la capacité de dégustation. À la fin des années 1920, Arthur L. Fox travaillait comme chimiste chez DuPont. Alors qu'il versait de la poudre de PTC dans une bouteille, son collègue, C.R. Noller, se plaignait que la poussière avait un goût extrêmement amer. Cependant, Fox ne pouvait rien goûter. Les deux hommes se sont relayés pour prélever la poudre avec les mêmes résultats ; Fox n'a rien senti tandis que Noller a ressenti un goût amer. Curieux, Fox a commencé à tester d'autres personnes et a découvert que la plupart des gens avaient de fortes réactions au goût amer, même à de faibles concentrations, ou ne goûtaient rien du tout.

Ces résultats ont suscité un intérêt immédiat chez les scientifiques qui étudient l'héritage mendélien et les variations sensorielles humaines. Laurence H. Snyder a confirmé les résultats de Fox et a étudié le trait dans plusieurs familles. Il a conclu que la capacité de dégustation du PTC était héréditaire. Albert Blakeslee, célèbre pour ses travaux sur la génétique des plantes, a mené la première enquête à grande échelle impliquant des familles et a découvert que la sensibilisation au PTC suit un modèle d'héritage mendélien, mais que la sensibilité peut varier en ampleur. Sur la base de ces résultats, Blakeslee a suggéré que d'autres gènes pourraient être impliqués, rendant la base génétique de la dégustation PTC plus compliquée qu'on ne le pensait au départ. Pour cette leçon, nous allons traiter le test PTC comme un simple trait mendélien présentant une dominance simple ou complète.

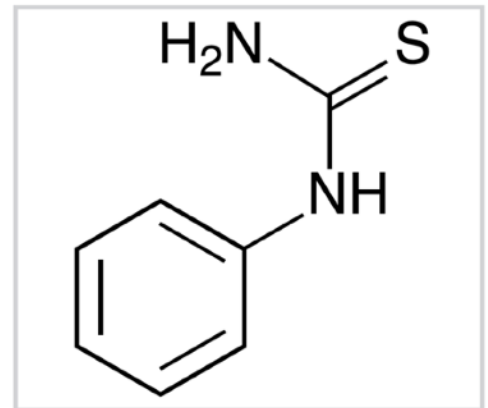


Figure 1. La structure chimique du phénylthiocarbamide (PTC).

Physiologie du goût humain

Le goût humain est un phénomène complexe qui résulte des interactions entre les substances contenues dans notre alimentation et les récepteurs chimiques de notre bouche et de notre nez, ainsi que du traitement des signaux dans le cerveau. La langue est recouverte de minuscules bosses appelées papilles (figure 2). Chaque papille contient des bourgeons gustatifs remplis de cellules gustatives. Chaque cellule gustative porte à sa surface des protéines dont les formes sont spécialisées pour se lier aux substances chimiques associées aux différentes

saveurs (sucré, salé, aigre, amer et umami). Lorsqu'un produit chimique se lie à son récepteur à la surface d'une cellule gustative, une réponse est déclenchée à l'intérieur de la cellule. Si la réponse est suffisamment forte, la cellule gustative libère des neurotransmetteurs sur les dendrites des neurones sensoriels. Les neurones sensoriels envoient un signal au cerveau qui est traité comme la perception de la saveur.

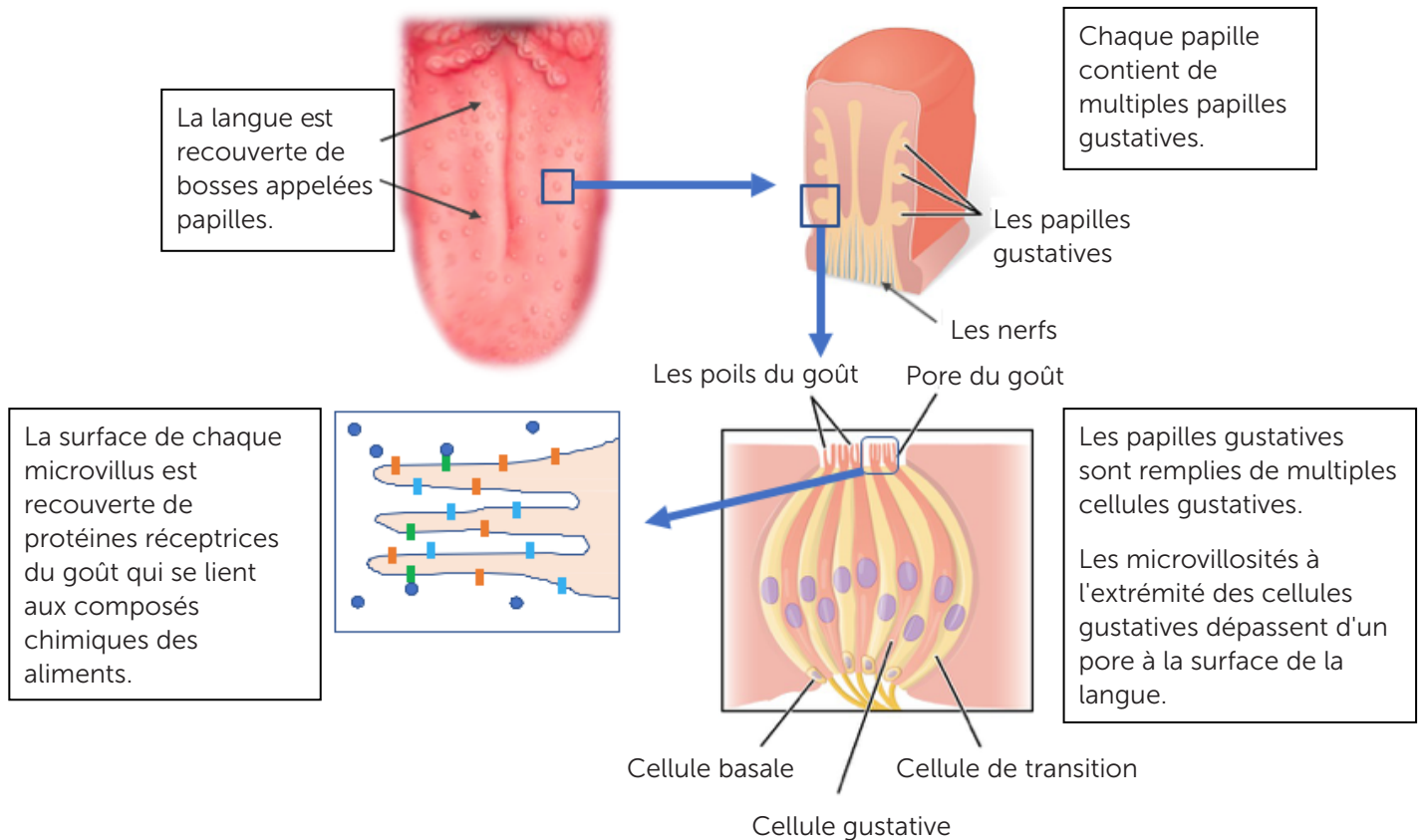


Figure 2. Physiologie du goût humain. Les papilles de la langue contiennent des bourgeons gustatifs, qui sont remplis de cellules gustatives. Chaque cellule gustative possède à sa surface des protéines réceptrices du goût, qui peuvent se lier à des molécules associées à différents saveurs.

Crédits d'image : Image de la langue : Par gabymichel [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>) ou GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], tiré de Wikimedia Commons, Papillae and taste bud images : Par OpenStax [CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)], de Wikimedia Commons.

Génétique moléculaire de la sensibilité au PTC

Dans les études génétiques, un trait observable, tel que la capacité à goûter le PTC, est appelé phénotype. Un génotype est la base génétique d'un trait, l'information génétique qui code pour le phénotype. Un allèle est l'une des deux ou plusieurs formes distinctes d'un gène situé à une position spécifique sur un chromosome. Comme vous avez deux ensembles de chromosomes homologues, l'un hérité de votre mère et l'autre de votre père, vous avez deux copies de chaque gène. Les deux copies peuvent être le même allèle ou des allèles différents. Dans les études de base, la capacité à goûter le PTC est héritée comme un simple trait mendélien. Comme pour d'autres traits mendéliens simples, tels que la fente du menton ou la crête en V des cheveux, le gène associé à la capacité de goûter la PTC existe sous deux formes alléliques, dominante (T) et récessive (t). Les recherches sur le phénotype PTC dans les familles ont conclu

que la capacité à goûter le PTC est un trait dominant. Comme un allèle dominant masque la présence de l'allèle récessif, le génotype d'un goûteur peut être soit homozygote dominant (TT), soit hétérozygote (Tt). Si une personne n'est pas goûteuse, son génotype est homozygote récessif (tt).

Le gène TAS2R38 a été identifié et séquencé en 2003 par Un-kyung Kim et ses collègues. Ce gène code pour une protéine de surface cellulaire qui se lie au PTC et initie une cascade de signalisation intracellulaire. Le gène est long de 1143 paires de bases nucléotidiques (pb) et situé sur le bras long du chromosome 7 avec neuf autres gènes pour les récepteurs du goût amer. En comparant les séquences d'ADN entre les goûteurs et les non goûteurs, les scientifiques ont déterminé qu'il existe trois polymorphismes nucléotidiques uniques (SNP) qui différencient l'allèle goûteur (T) de l'allèle non goûteur (t). Un SNP est un type de variation génétique où le nucléotide à une seule position diffère d'un individu à l'autre. Pour être considérée comme un SNP plutôt que comme une mutation, la variante doit exister chez au moins 1 % de la population générale. Le génome humain contient environ 10 millions de SNP et le génome de chaque individu présente un modèle de SNP unique. Comme ils se trouvent à des positions connues dans le génome, les SNP sont utiles comme marqueurs moléculaires pour les maladies dont la cause génétique précise est inconnue.

Le tableau 1 énumère les trois SNP associés aux allèles goûteurs et non goûteurs du gène TAS2R38 et la position du nucléotide dans le gène où le SNP apparaît. Notez que ces SNP sont associés à des changements de codons qui modifient la séquence d'acides aminés de la protéine, altérant ainsi la fonction de la protéine. Il existe huit combinaisons possibles de ces trois SNP. Cependant, les SNP sont génétiquement liés, ce qui signifie qu'ils sont hérités ensemble, et donc toutes les combinaisons ne sont pas également probables.

Votre génome personnel

L'analyse des variations génétiques entre les individus donne des indices sur les causes de maladies complexes comme le diabète, le cancer et les maladies cardiaques, et peut révéler l'histoire et le patrimoine familial d'un individu. Avec l'accumulation rapide de données génétiques, la médecine personnalisée, l'adaptation des traitements médicaux au bagage génétique unique d'un individu, pourrait bientôt devenir un élément standard des soins de santé.

Tableau 1 : Trois SNP dans le gène TAS2R38 contrôlent la capacité à goûter le PTC. AVI est la variante non goûteuse (récessive) et PAV est la variante goûteuse (dominante).

Position des nucléotides (pb)	Changement de nucléotides		Changement de codon		Modification des acides aminés	
	Non-Goûteur	Goûteur	Non-Goûteur	Goûteur	Non-Goûteur (AVI)	Goûteur (PAV)
145	G	C	GCA	CCA	Alanine (A)	Proline (P)
785	T	C	GTT	GCT	Valine (V)	Alanine (A)
886	A	G	ATC	GTC	Isoleucine (I)	Valine (V)

L'objectif de la génétique moléculaire est de relier un phénotype observable, comme une maladie ou une caractéristique physique, à la séquence génétique qui détermine ce phénotype. Dans ce TP, vous aurez l'occasion d'observer si vous pouvez goûter le composé PTC. Vous analyserez ensuite votre ADN pour déterminer si vous êtes un homozygote non goûteur (tt : AVI/AVI), homozygote goûteur (TT : PAV/PAV) ou hétérozygote goûteur (Tt : PAV/AVI). Avant l'identification du gène *TAS2R38*, il était impossible de connaître le génotype d'un goûteur sans analyser les phénotypes de ses proches parents. Maintenant que nous connaissons la séquence génétique, nous pouvons découvrir votre génotype avec quelques outils simples. La figure 3 illustre l'héritage mendélien du trait de sensibilisation au PTC.

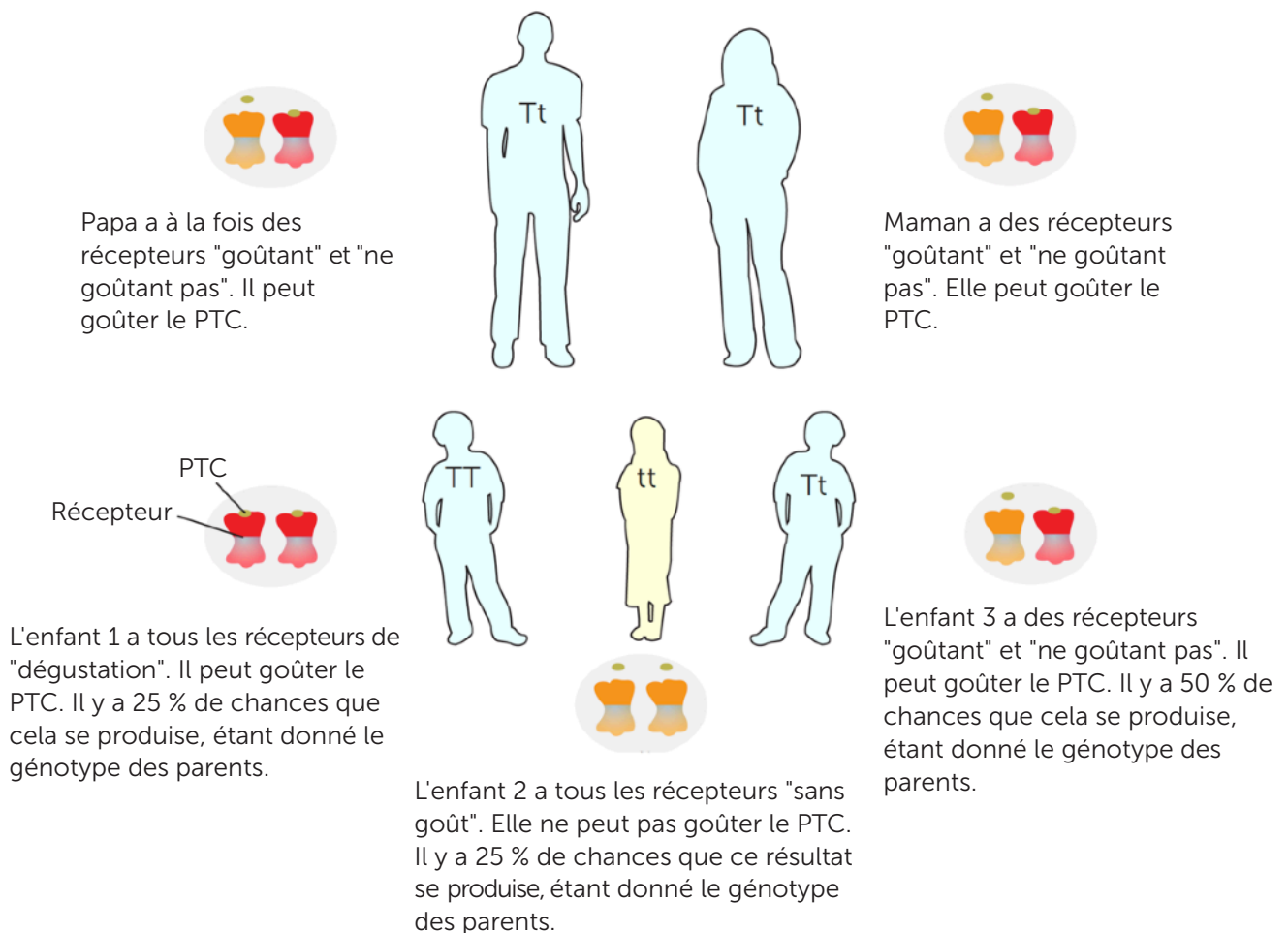


Figure 3. Héritage mendélien du trait de sensibilisation au PTC dans une famille.

Génotypage par digestion enzymatique

La figure 4 donne un aperçu des méthodes que vous utiliserez pour déterminer votre génotype. La première étape consiste à extraire l'ADN génomique de vos propres cellules de joues. Comme cet extrait contient des chromosomes complets et bien trop peu de copies du gène à analyser, vous utiliserez la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) pour faire des milliards de copies d'une région de 221 pb du gène *TAS2R38* qui contient le SNP à la position 145 du nucléotide. Pour plus de détails sur le fonctionnement de la PCR, voir l'annexe B.

Les allèles T et t peuvent être distingués grâce à un test de digestion enzymatique. Les enzymes de restriction sont connues sous le nom de "ciseaux moléculaires" car elles coupent l'ADN à une séquence nucléotidique spécifique, appelée site de restriction. La coupure de l'ADN par une enzyme de restriction est appelée "digestion par restriction". Ces enzymes sont fabriquées naturellement par les bactéries comme défense contre les virus envahisseurs.

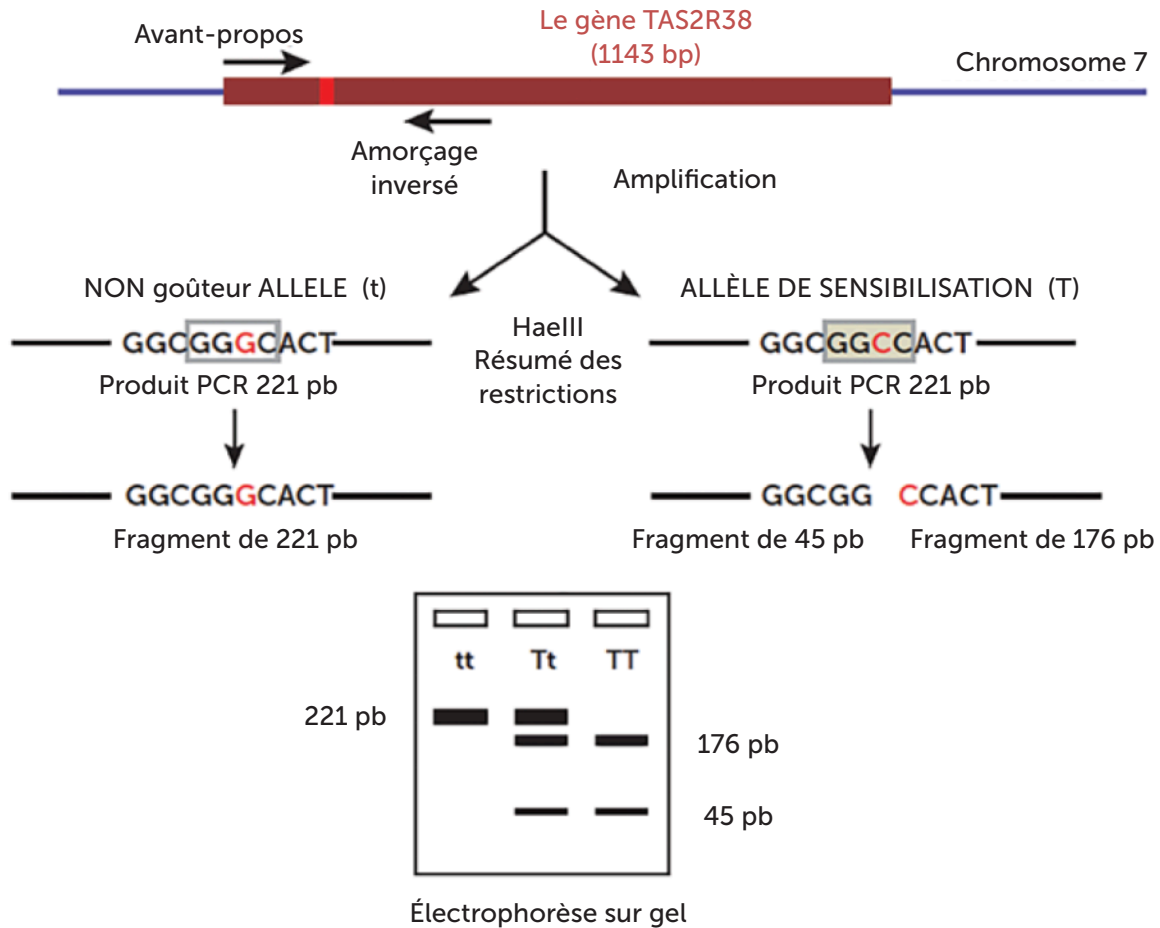


Figure 4. Vue d'ensemble du génotypage des goûteurs PTC à l'aide de la PCR, de l'analyse de restriction HaeIII et de l'électrophorèse sur gel.

Dans ce TP, nous utiliserons une enzyme de restriction appelée HaeIII, qui reconnaît la séquence GGCC. Lorsque l'enzyme HaeIII rencontrera cette séquence de reconnaissance, elle coupera les deux brins d'ADN entre les nucléotides G et C, ce qui donnera deux fragments d'ADN. Les fragments qui sont coupés donnent deux bandes sur un gel d'agarose et les fragments qui ne sont pas coupés donnent une bande. Cela conduit à un modèle unique de bandes pour chaque génotype. Le produit de la PCR des non- goûteurs n'aura qu'une seule bande. Le produit de la PCR des goûteurs homozygotes dominants aura deux bandes et les goûteurs hétérozygotes auront trois bandes (figure 4). Pour plus de détails sur la manière dont l'électrophorèse sur gel est utilisée pour séparer des fragments d'ADN de tailles différentes, voir l'annexe C.

1er jour : Test de goût PTC et extraction d'ADN

Une extraction produisant un ADN de haute qualité est la première étape essentielle pour l'analyse de votre séquence d'ADN. Aujourd'hui, vous allez prélever vos propres cellules puis utiliser la chaleur et une solution à pH élevé pour briser les cellules et libérer l'ADN génomique dans la solution. Vous amplifierez un segment de cet ADN pendant le reste du TP pour déterminer votre génotype TAS2R38.

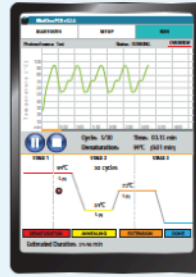
Postes de travail communs



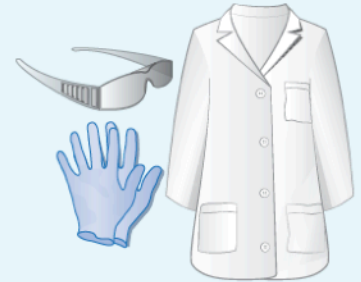
Microcentrifugeuse de paillasse



Thermocycleur MiniOne® PCR



Tablette avec l'application

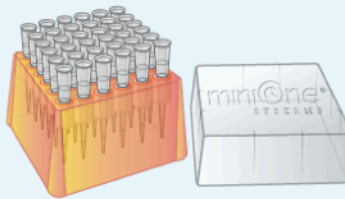


Gants, lunettes, blouses de laboratoire

Chaque groupe d'élèves et chaque poste de travail



MiniOne 2-20 µL micropipette



2-200 µL Embouts universels pour micropipettes



3 ml de solution saline (1 becher par)



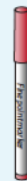
Solution d'extraction (250 µL)



Bandelettes sur le contrôle du goût et le goût PTC



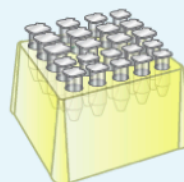
Tubes PCR de 0,2 mL (2 par étudiant)



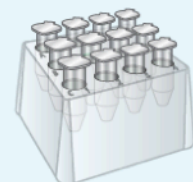
Marqueur permanent à pointe fine



Poubelle à déchets pour embouts et tubes de pipettes



Portoirtubes PCR



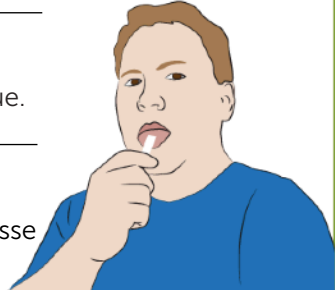
Portoir pour tubes de microcentrifugeuse

Jour 1 Procédure expérimentale

1 Placez la bandelette contrôle du goût sur votre langue.
Que s'est-il passé ? _____
(observation)

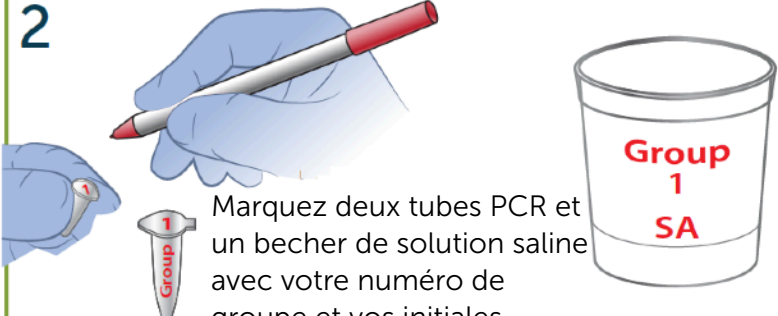
Placez la bandelette PTC sur votre langue.
Que s'est-il passé ? _____
(observation)

Pourquoi certains de vos camarades de classe ont-ils un goût amer et d'autres pas ?



Travailler en groupes de 4 : Vérifiez votre poste de travail pour vous assurer que vous avez tout le matériel nécessaire.

2



Marquez deux tubes PCR et un becher de solution saline avec votre numéro de groupe et vos initiales.

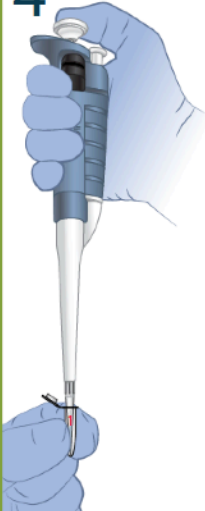
3 Bain de bouche vigoureux pendant 2 minutes

Versez la solution saline dans votre bouche



Expulser soigneusement la solution saline dans la tasse

4



Pipettez 200 μ L de votre crachat dans l'un des tubes PCR étiquetés.

Si vous ne disposez pas d'une micropipette de 20-200 μ l, vous pouvez utiliser une pipette de 2-20 μ l pour pipeter 10 x 20 μ l de crachat dans le tube PCR.

Jeter les bandelettes PTC comme des déchets biologiques

Jour 1 Procédure expérimentale (suite)

5 Fermez bien le tube PCR mais ne pressez pas sur la paroi fine, sinon, des fissures peuvent se produire.

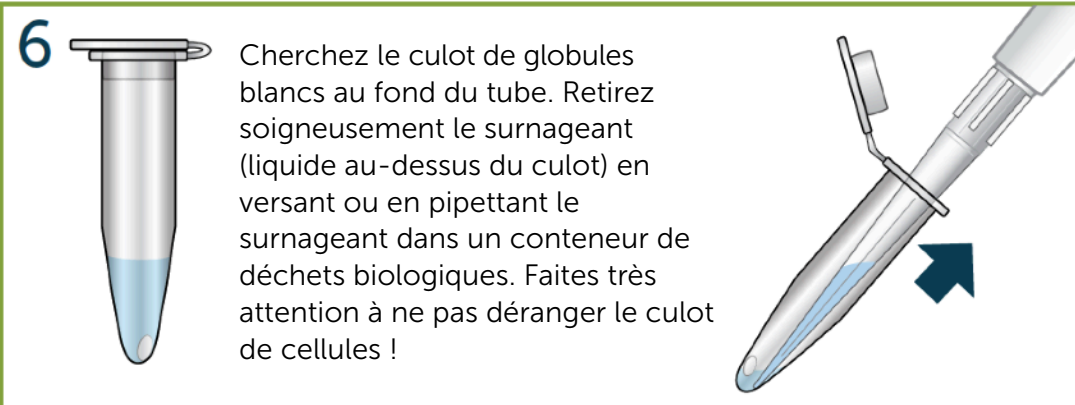
3 min.
8000 RPM

Assurez-vous que la centrifugeuse est équilibrée et que les tubes PCR sont placés dans les plus petits trous. Utilisez un adaptateur si nécessaire.
** Astuce : souvenez-vous quel côté du tube est tourné vers l'extérieur de la centrifugeuse pour faciliter la recherche du culot.*



The illustration shows a hand in a blue glove holding a PCR tube. To the right is a white centrifuge with a blue lid, labeled 'miniOne'. Below it is a black rotor with several PCR tubes in the outermost holes. A blue arrow points from the hand to the centrifuge, and another blue arrow points from the centrifuge to the rotor.

6 Cherchez le culot de globules blancs au fond du tube. Retirez soigneusement le surnageant (liquide au-dessus du culot) en versant ou en pipettant le surnageant dans un conteneur de déchets biologiques. Faites très attention à ne pas déranger le culot de cellules !

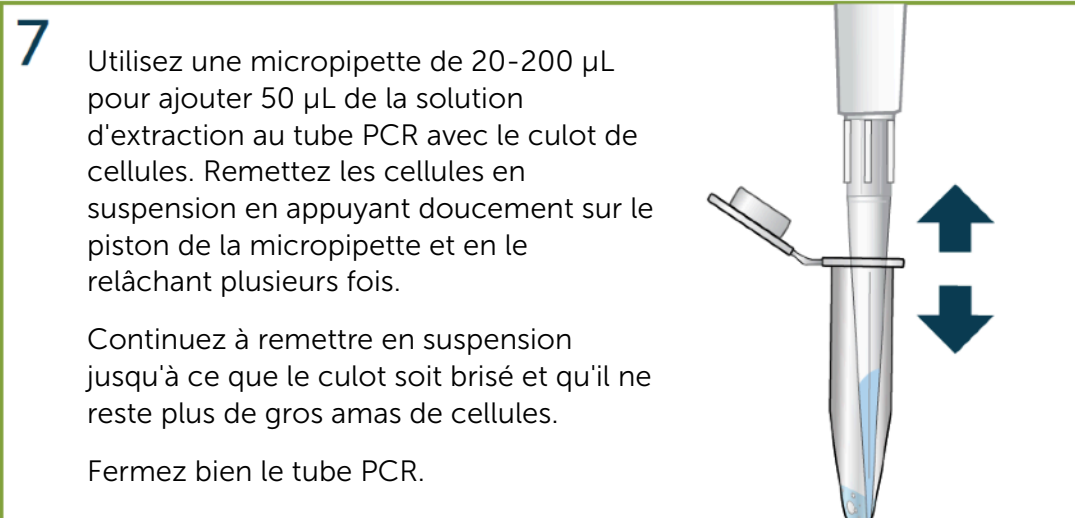


The illustration shows a PCR tube with a blue liquid at the bottom. To the right is a pipette with a blue arrow pointing towards the tip of the tube, indicating the removal of the supernatant.

7 Utilisez une micropipette de 20-200 μL pour ajouter 50 μL de la solution d'extraction au tube PCR avec le culot de cellules. Remettez les cellules en suspension en appuyant doucement sur le piston de la micropipette et en le relâchant plusieurs fois.

Continuez à remettre en suspension jusqu'à ce que le culot soit brisé et qu'il ne reste plus de gros amas de cellules.

Fermez bien le tube PCR.



The illustration shows a micropipette with a blue arrow pointing down into a PCR tube. To the right of the tube are two blue arrows, one pointing up and one pointing down, indicating the resuspension of the pellet.

Jour 1 Procédure expérimentale (suite)

8 Placez le tube dans l'appareil PCR



9 En utilisant votre tablette avec l'application mobile PCR MiniOne®, programmez l'appareil de PCR en utilisant le mode de température constante pour incuber les échantillons à 95°C pendant 300 secondes (5 minutes) afin de briser les cellules et de libérer l'ADN dans la solution. Entrez 4°C pour la température d'incubation finale. Cela permettra de conserver vos échantillons au froid jusqu'à ce que vous puissiez les récupérer.

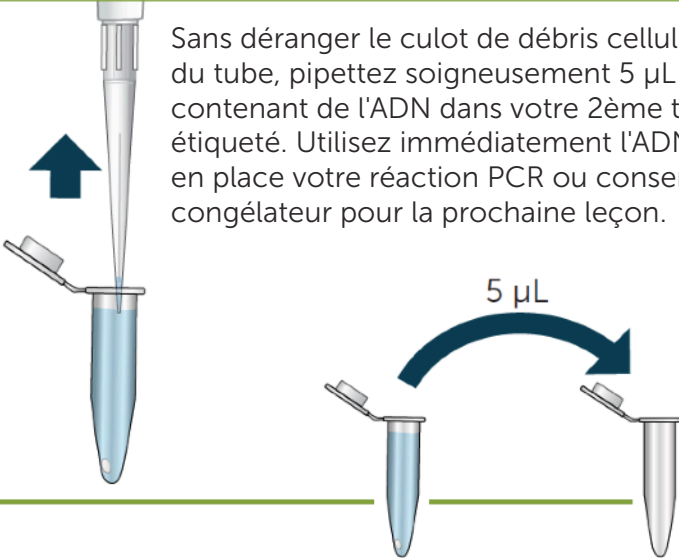


10



Retirez votre tube de l'appareil PCR et centrifugez le tube pendant 1 minute à 8 000 tours/minute au minimum dans une centrifugeuse de paillasse pour recueillir les débris cellulaires au fond du tube.

11



Sans déranger le culot de débris cellulaires au fond du tube, pipettez soigneusement 5 µL du surnageant contenant de l'ADN dans votre 2ème tube PCR étiqueté. Utilisez immédiatement l'ADN pour mettre en place votre réaction PCR ou conservez l'ADN au congélateur pour la prochaine leçon.





Questions

1. Le papier PTC avait-il un goût amer ? En fonction de votre capacité à goûter le PTC, quels génotypes possibles pourriez-vous avoir ?
2. Si une personne est sensible au PTC, quels sont ses génotypes possibles ?
3. Dessinez un organigramme ou un diagramme de ce qui arrive à votre échantillon d'ADN à la suite des étapes suivantes du protocole d'extraction. Pour chaque étape, expliquez ce qui se passe au niveau cellulaire/moléculaire.
 - Faire couler une solution saline dans la bouche. Quel est l'effet du processus d'agitation ? À quoi sert le sel ?
 - Chauffage de l'échantillon
 - Centrifugation de l'échantillon après chauffage
4. Lorsque vous extrayez votre ADN en utilisant le protocole ci-dessus, qu'est-ce qui est extrait des cellules à part l'ADN ?
5. Outre l'étude du gène TAS2R38, décrivez deux questions scientifiques qui pourraient être explorées en étudiant votre échantillon d'ADN.


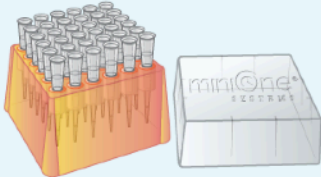






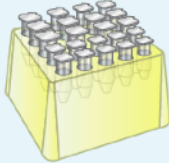
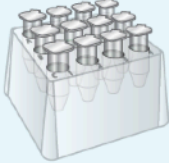
Jour 2 : Mise en Oeuvre amplification PCR

Le premier jour, nous avons extrait l'ADN génomique total des cellules de vos joues. Aujourd'hui, nous allons utiliser la PCR pour faire des milliards de copies d'une petite région du gène TAS2R38 avec un SNP qui nous permettra de distinguer les variantes goûteuses des autres avec une enzyme de restriction.

Postes de travail communs

			
Microcentrifugeuse de paillasse	Thermocycleur MiniOne® PCR	Tablette avec l'application MiniOne® PCR	Gants, lunettes, blouses de laboratoire

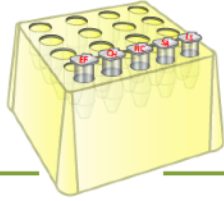
Chaque groupe d'élèves et chaque poste de travail

			
MiniOne 2-20 µL micropipette	2-200 µL Embouts universels pour micropipettes	1 tube PCR par élève	
			
45 µL Taq PCR MasterMix (2X)	25 µL PCR Primer Mix	Échantillon d'ADN prélevé le premier jour (pour chaque élève)	Marqueur permanent à pointe fine
			
Poubelle à déchets pour embouts et tubes de pipettes	Portoirtubes PCR	Portoir pour tubes de microcentrifugeuse	

Deuxième jour

Jour 2 Protocole expérimental

1 Récupérez votre échantillon d'ADN



2

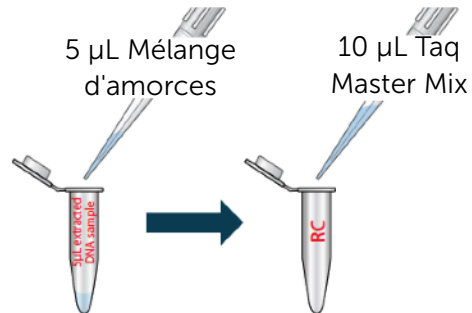


Mise en place de la réaction PCR (un tube pour chaque élève)

Reagent	Volume
Échantillon d'ADN extrait	5 μ L
Mélange d'amorces	5 μ L
Taq PCR Master Mix (2X)	10 μ L
Total	20 μ L

Ajouter les 2 composants suivants à un nouveau tube PCR :

*Astuce - ajoutez de petits volumes directement au fond du tube PCR pour éviter que des bulles ne soient piégées au fond du tube.



3 Boucher le tube et centrifuger doucement pour mélanger les réactifs



N'appuyez pas sur la paroi fine!

15 sec.
8000 RPM



Assurez-vous que la centrifugeuse est équilibrée

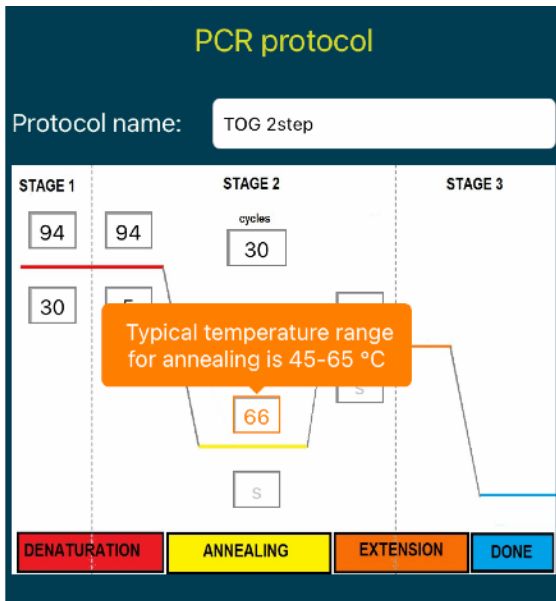
Jour 2 Protocole expérimental (suite)



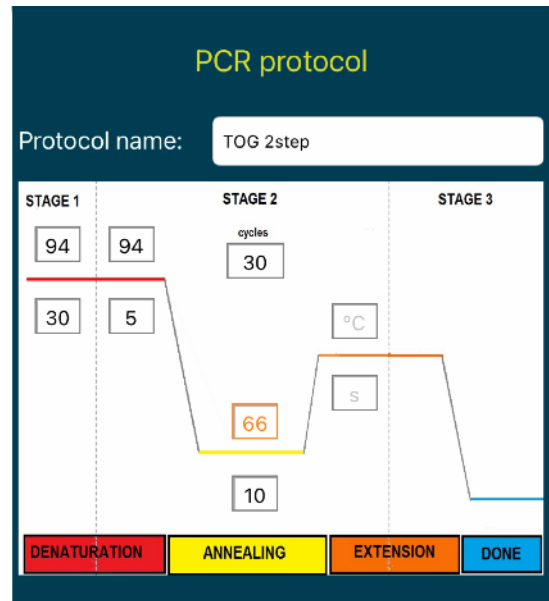
Protocole pour l'amplification des fragments :

Nom de l'étape	Heure	Température	Cycles
Dénaturation initiale	30 sec	94°C	
Dénaturation	5 sec	94°C	30
Hybridation	10 sec	66°C	
Elongation	15 sec	66°C	
Incubation finale	∞	4°C	

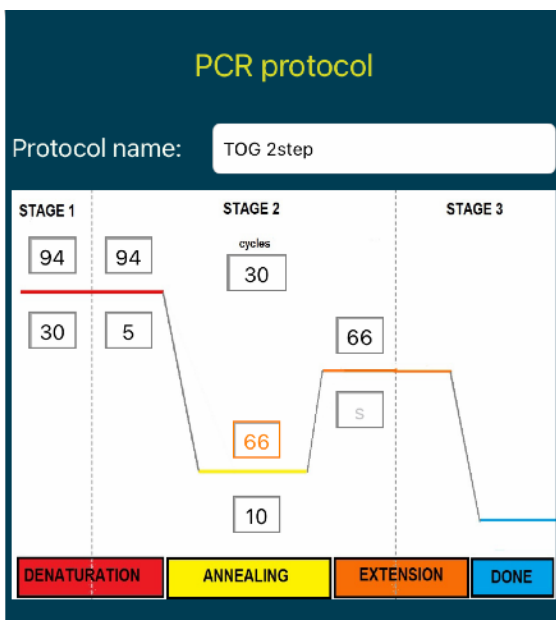
Programmation des étapes d'hybridation et d'extension



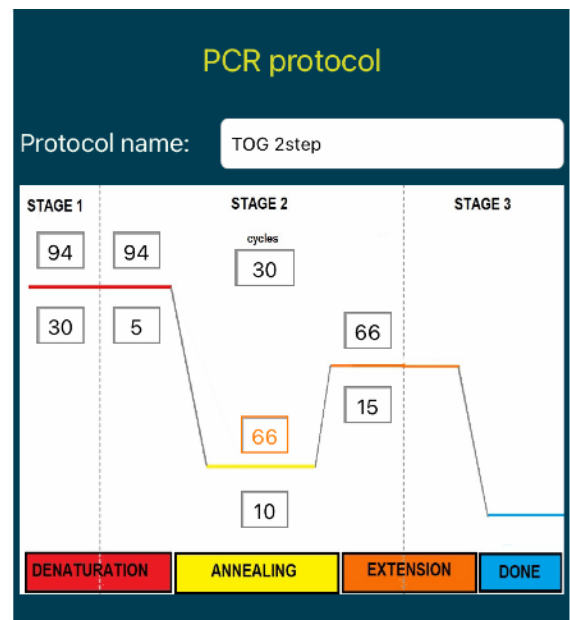
Étape 1 : Entrez 66°C pour la température d'hybridation. Lorsque vous voyez un message indiquant que la plage de température typique pour d'hybridation est de 45°-65°C, vous pouvez ignorer ce message et passer à l'entrée suivante.



Étape 2 : Entrez "10" pour la durée de la température d'hybridation



Étape 3 : Entrez 66°C pour la température d'extension. Si vous voyez un message concernant la plage de température typique, vous pouvez ignorer ce message et passer à l'étape suivante.

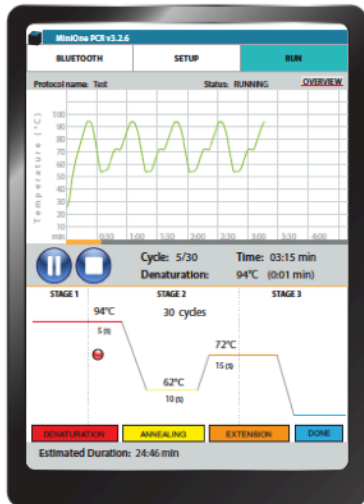


Étape 4 : Entrez "15" pour la durée de la température d'extension.

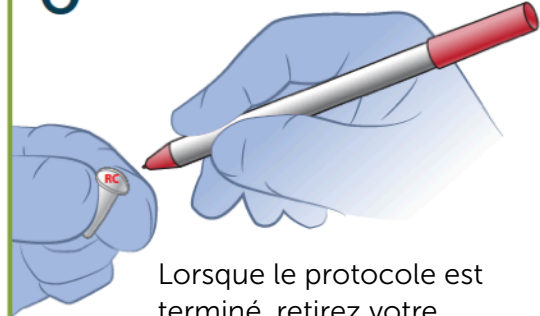
Jour 2 Protocole expérimental (suite)

5

Utilisez la tablette PCR MiniOne® pour suivre l'évolution de la réaction.



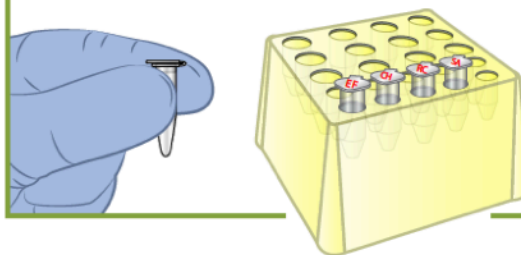
6



Lorsque le protocole est terminé, retirez votre échantillon du système PCR MiniOne®. Réétiqueter le tube si nécessaire.

7

Donnez votre échantillon d'ADN amplifié à votre professeur pour qu'il le conserve jusqu'à la prochaine leçon.



Questions

1. Quel est l'objectif de la PCR ? Décrivez trois situations dans lesquelles les scientifiques utiliseraient la PCR.
2. Quel est le réactif qui rend la réaction PCR spécifique au gène TAS2R38 ? Décrivez la fonction de ce réactif PCR.
3. Pourquoi l'étape de PCR est-elle nécessaire ? Pourquoi ne pouvons-nous pas passer directement de l'extraction de l'ADN à l'analyse ?
4. Parfois, pendant la PCR, les amorces avant et arrière se collent l'une à l'autre, formant un "dimère d'amorces" qui est ensuite copié dans les cycles suivants et peut apparaître comme une bande supplémentaire sur votre gel. Est-il plus ou moins probable qu'un "primer-dimer" se produise dans une réaction PCR qui utilise des amorces longues ? Pourquoi ?

Jour 3 : Digestion par enzymes de restriction et électrophorèse sur gel

Aujourd'hui, vous allez faire une digestion de restriction de votre ADN amplifié et analyser les produits par électrophorèse sur gel d'agarose. Vous ferez passer les produits PCR digérés et non digérés l'un à côté de l'autre sur le gel. Le motif des bandes de l'échantillon digéré indiquera votre génotype pour le gène de sensibilisation au PTC. Réfléchissez bien au motif de bandes que vous vous attendez à voir pour chaque génotype. L'exécution du produit PCR non digéré confirmera le succès de votre réaction PCR, montrera quelles bandes sont des artefacts PCR et fournira un repère visuel pour la taille du produit PCR de 221 pb.

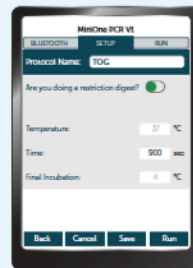
Postes de travail communs



Microcentrifugeuse
de paillasse



Thermocycleur
MiniOne® PCR



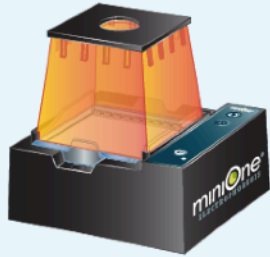
Tablette avec
l'application
MiniOne® PCR



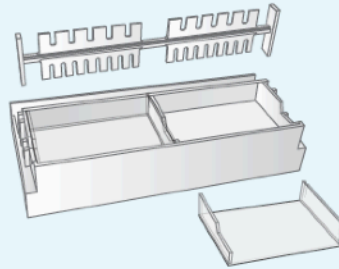
Gants, lunettes,
blouses de laboratoire

Jour 3 : Préparation pour l'enseignant (suite)

Chaque groupe d'élèves et chaque poste de travail



Système d'électrophorèse MiniOne



Système de coulage MiniOne



1X TAE tampon de migration (135 mL)



Cupelle 2% d'agarose GreenGel™, TAE



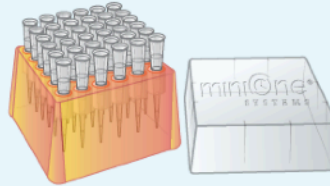
Poubelle à déchets pour embouts et tubes de pipettes



12 µL Marqueur ADN MiniOne



MiniOne 2-20 µL micropipette



2-200 µL Embouts universels pour micropipettes



Un tube PCR propre par élève



25 µL tampon de dilution enzymatique



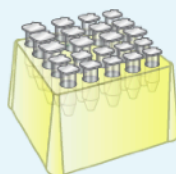
Dilué 25 µL Enzyme de restriction HaellI



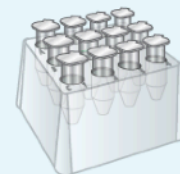
30 µL tampon de charge colorant (5X)



Marqueur permanent à pointe fine



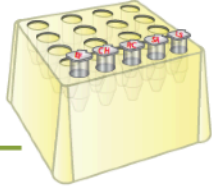
Portoirtubes PCR




Portoir pour tubes de microcentrifugeuse

3ème jour Protocole expérimental

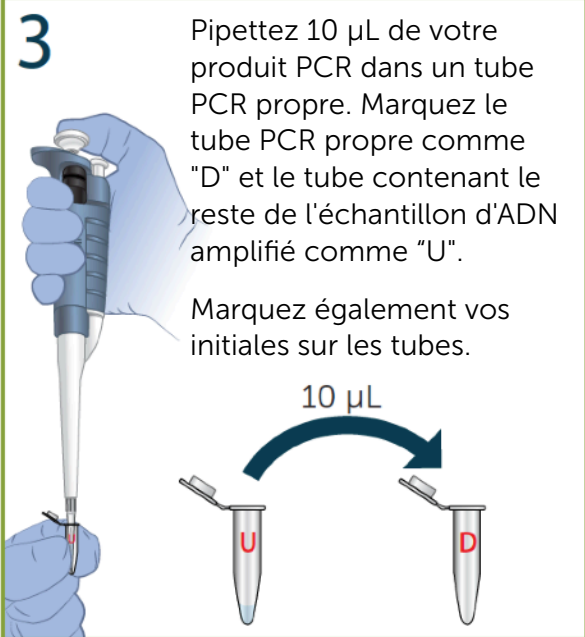
1 Récupérez votre échantillon d'ADN amplifié.



2 Centrifugez brièvement

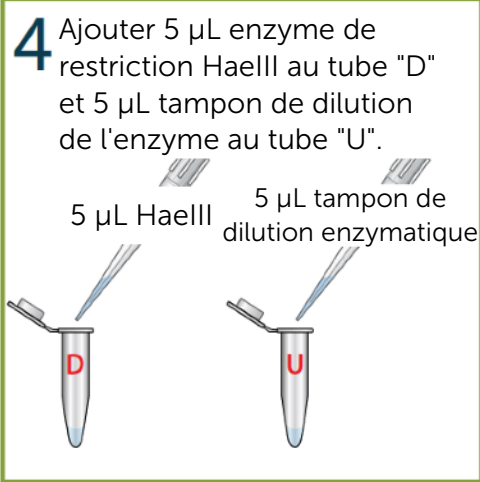


3 Pipettez 10 μ L de votre produit PCR dans un tube PCR propre. Marquez le tube PCR propre comme "D" et le tube contenant le reste de l'échantillon d'ADN amplifié comme "U". Marquez également vos initiales sur les tubes.



10 μ L

4 Ajouter 5 μ L enzyme de restriction HaeIII au tube "D" et 5 μ L tampon de dilution de l'enzyme au tube "U".

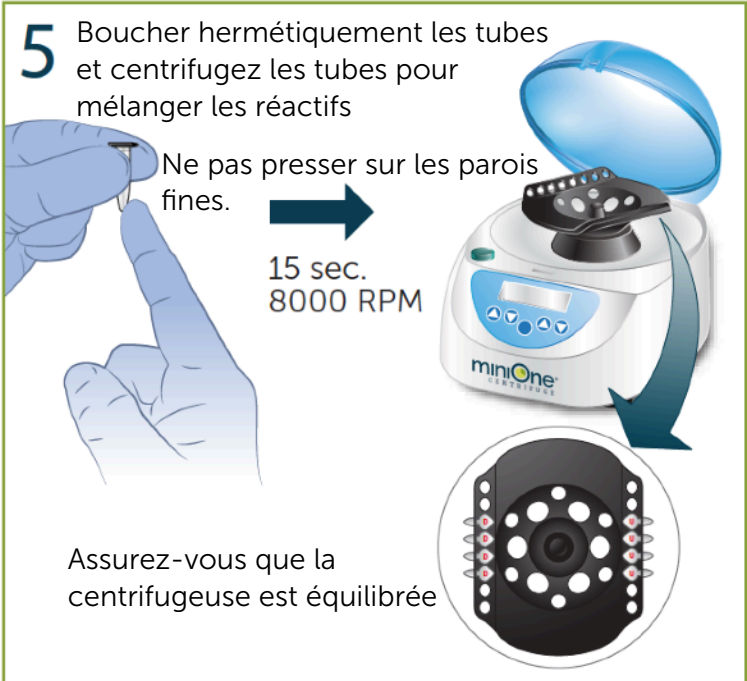


5 μ L HaeIII 5 μ L tampon de dilution enzymatique

5 Boucher hermétiquement les tubes et centrifugez les tubes pour mélanger les réactifs

Ne pas presser sur les parois fines.

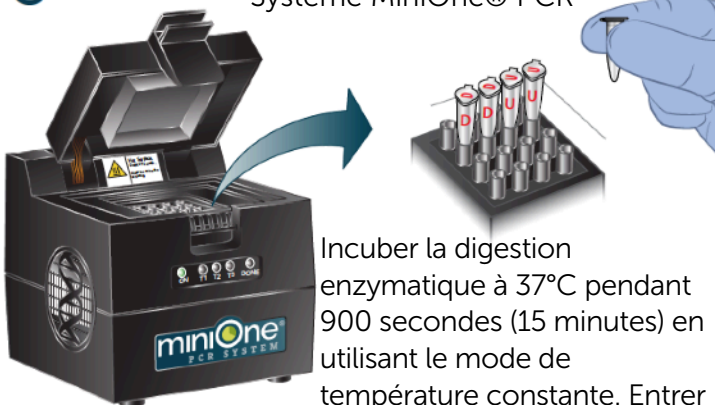
15 sec.
8000 RPM



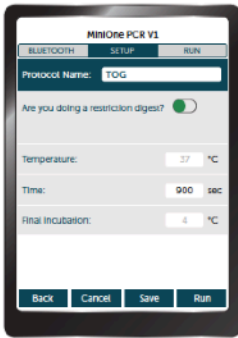
Assurez-vous que la centrifugeuse est équilibrée

3ème jour Protocole expérimental (suite)

6 Placer les tubes PCR dans Système MiniOne® PCR




Incuber la digestion enzymatique à 37°C pendant 900 secondes (15 minutes) en utilisant le mode de température constante. Entrer 4°C pour la température d'incubation finale.



En attendant votre digestion, préparez le gel d'agarose MiniOne

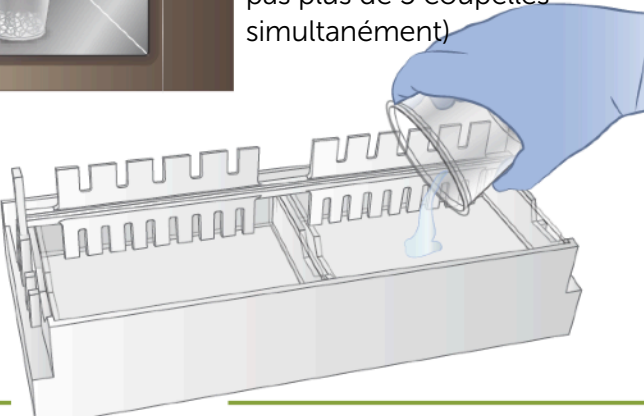
7 Dégazer la coupelle de gel en la décollant légèrement avant de la mettre au micro-ondes



Utiliser le côté 9 puits du peigne

Laisser le gel se solidifier pendant 10-15 min.

Préparer un gel d'agarose à 2% en utilisant le système de coulage MiniOne® (micro-ondes pendant 20 secondes, pas plus de 5 coupelles simultanément)



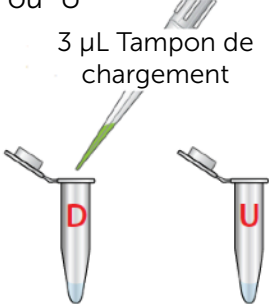
8 Lorsque l'incubation est terminée, retirez votre échantillon.



3ème jour Protocole expérimental (suite)

9 Ajoutez 3 μ L LD à chaque tube contenant votre "D" ou "U"

3 μ L Tampon de chargement



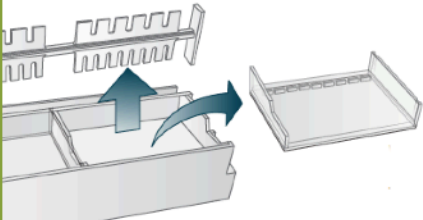
10 Boucher hermétiquement les tubes et centrifugez les tubes pour mélanger les réactifs

15 sec.
8000 RPM



Assurez-vous que la centrifugeuse est équilibrée

11 Retirez soigneusement le peigne du gel.

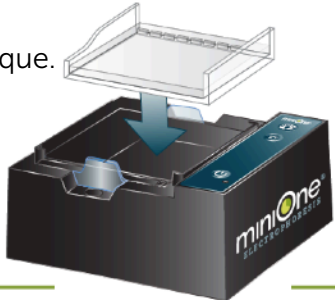


Retirer le plateau de gel avec le gel solidifié.

Essuyer l'excès d'agarose du fond du plateau


12 Branchez l'alimentation électrique à l'arrière de la cuve d'électrophorèse MiniOne®. Branchez l'alimentation électrique. Placez le gel et le plateau de gel dans le réservoir.

Assurez-vous que les puits sont alignés avec les marques de la plate-forme d'observation noire à l'extrémité négative.



13 Versez 135 mL de tampon TAE dans un côté du réservoir, permettant au liquide de pousser l'air hors du plateau de gel, créant un fond régulier sans bulles d'air emprisonnées pour une imagerie claire des résultats.

Versez le reste du tampon dans l'autre côté de la cuve.



Troisième jour

3ème jour Protocole expérimental (suite)

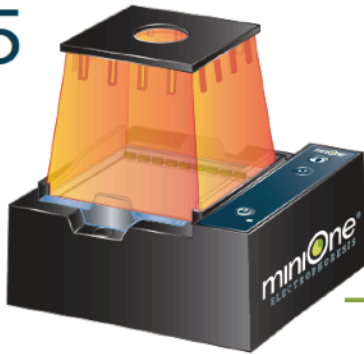
- 14** Allumez la lumière bleue de faible intensité
- Chargez 10 μL du marqueur ADN MiniOne® dans un puits du gel
- Chargez 10 μL de votre échantillon non digéré "U" et 10 μL de votre échantillon digéré "D" dans deux puits adjacents
- Utilisez le tableau 5 pour savoir dans quel puit chaque membre du groupe charge son échantillon.



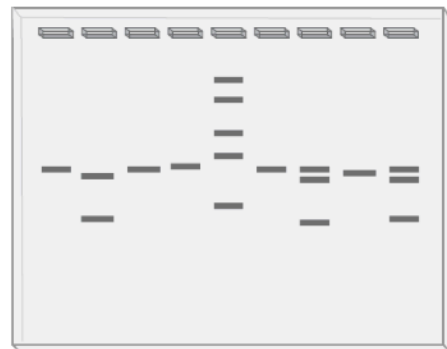
Tableau 5. Enregistrement de l'échantillon chargé dans chaque voie

Puit	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Exemple									

- 15** Allumez la lumière bleue, placez le capot photo sur le chariot et appuyez sur le bouton d'alimentation.
- Faites fonctionner le système d'électrophorèse MiniOne® pendant 25 minutes ou jusqu'à ce que les bandes se soient clairement séparées.



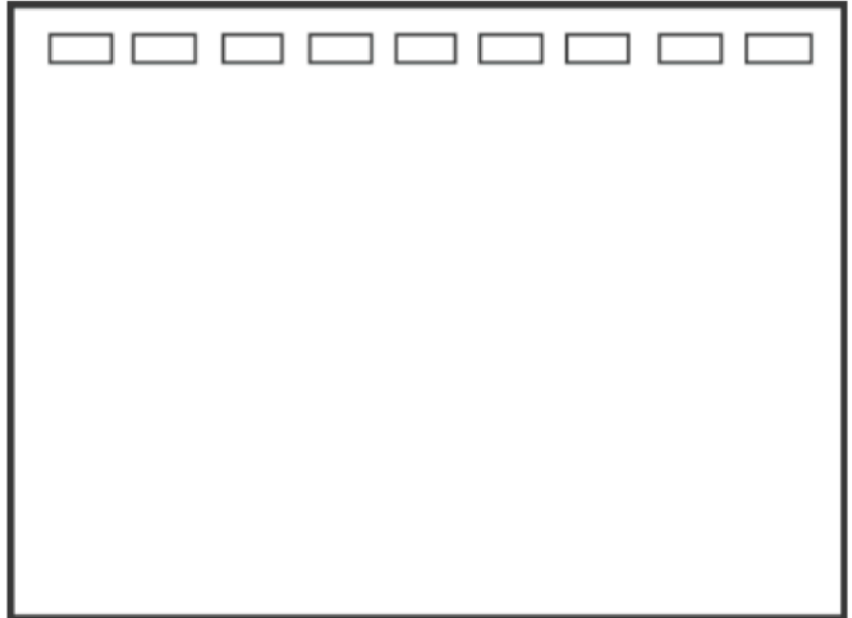
- 16** À la fin de la migration, allumez la lumière bleue à haute intensité.
- Utilisez votre téléphone ou votre appareil photo pour prendre une photo de votre gel.
- Dessinez ou collez une image de votre gel sur la feuille d'analyse du gel ou sur le carnet de laboratoire.



Fiche d'analyse du gel

Itinéraire : Après avoir terminé l'électrophorèse sur gel, enregistrez une image de votre gel et dessinez les résultats sur le modèle ci-dessous.

Puit	Elève
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	



Questions sur le TP

1. Expliquer comment l'électrophorèse sur gel est utilisée pour séparer les fragments d'ADN et créer un motif de bandes distinct pour chaque génotype PTC.
2. Les tailles des bandes du marqueur de poids moléculaire sont de 100, 300, 500, 1000 et 2000 pb. Estimez la taille des bandes de vos pistes PCR en comparant la piste du marqueur de poids moléculaire. Vos estimations sont-elles cohérentes avec les tailles attendues par la digestion ? Si ce n'est pas le cas, comment expliquez-vous la différence ?
3. Tous les échantillons de votre équipe ont-ils donné lieu à un produit PCR ? Si ce n'est pas le cas, expliquez ce qui a pu se passer.
4. Avez-vous observé d'autres bandes sur le gel en plus des produits PCR attendus ? Si oui, expliquez ce qui a pu provoquer ces bandes inattendues ?
5. Quel est votre génotype TAS2R38 basé sur les résultats de votre électrophorèse sur gel ? Cela correspond-il à ce que vous avez prédit sur la base de votre capacité à goûter le papier PTC ?

6. Selon votre compréhension de la génétique mendélienne, est-il possible pour deux parents qui ne peuvent pas tous deux goûter au PTC d'avoir un enfant goûteur au PTC ?

7. Si un parent est homozygote pour la variante non goûteur du TAS2R38 et que l'autre parent est hétérozygote, quelle est la probabilité que son prochain enfant soit goûteur ?

8. Le PTC est un composé qui n'existe pas dans la nature. Pensez-vous qu'il y a un avantage évolutif à posséder l'allèle de dégustation ? Pourrait-il y avoir un avantage à ne pas avoir l'allèle de sensibilisation ?

9. Outre la génétique, quelles autres raisons pourraient expliquer pourquoi une personne est capable de goûter à la PTC alors qu'une autre ne le peut pas ?

10. le plus souvent, les trois SNP du gène TAS2R38 sont hérités ensemble. Décrivez une situation où un enfant pourrait hériter d'un ensemble de SNP de sa mère qui est différent de l'ensemble de SNP sur l'un ou l'autre des chromosomes de sa mère.

Annexe A - Glossaire PCR

Terme	Définition
Allele	Une des deux ou plusieurs formes distinctes d'un gène situé à la même position sur les chromosomes homologues.
Amorces	De courts morceaux d'ADN avec des séquences complémentaires aux séquences flanquant la région à copier. Les amorces sont conçues spécifiquement pour chaque réaction PCR en tenant compte de nombreuses variables, notamment la longueur, la teneur en nucléotides et les caractéristiques structurales. De nombreux outils informatiques sont disponibles pour aider à la conception des amorces.
Cycle	Un cycle se réfère à une série d'étapes de dénaturation, de recuit et d'extension de la réaction PCR. Le nombre de cycles nécessaires pour une réaction particulière dépend de la quantité d'ADN avec laquelle vous commencez et de la quantité d'ADN que vous essayez de produire. Avec une concentration de départ élevée, 20 à 25 cycles suffisent pour produire suffisamment d'ADN à visualiser sur un gel. Lorsque la concentration de départ est faible ou que de grandes quantités de produit sont nécessaires, 35 à 40 cycles peuvent être utilisés.
Cycle thermiques	Également appelé appareil PCR, un thermocycleur est un instrument qui modifie automatiquement la température de la réaction PCR selon un programme défini par l'utilisateur. Il chauffe et refroidit la réaction entre les températures de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sur un nombre de cycles déterminé.
Dénaturation	La dénaturation utilise une température élevée pour rompre les liens entre les bases sur les brins opposés. L'ADN double brin est divisé en ADN simple brin, exposant les bases afin qu'elles puissent être copiées. Les paramètres typiques sont de 90-98°C pendant 5-30 secondes par cycle. Denaturation
Dénaturation initiale	Lors de la copie d'un morceau d'ADN génomique, une étape initiale de dénaturation est souvent utilisée pour s'assurer que les longs brins d'ADN sont entièrement séparés et libérés des protéines liées avant le début du cycle thermique. Les réglages typiques sont de 90-96°C pendant 30 secondes à 10 minutes.
dNTPs	Les nucléotides, les éléments moléculaires de l'ADN.
Enzyme	Une enzyme est un catalyseur biologique qui accélère une réaction chimique sans changer les produits ou être consommé par la réaction. La plupart des enzymes sont des protéines et elles contrôlent un large éventail de réactions dans les cellules, de la copie de l'ADN à l'extraction de l'énergie des aliments.
Elongation	À environ 70 °C, la polymérase se met au travail et commence à ajouter des nucléotides (dNTP) à l'extrémité 3' des amorces recuites, copiant le brin complémentaire. Les réglages typiques sont de 72°C pendant 5 secondes - 5 minutes par cycle.
Elongation finale	Dans certains protocoles, une étape d'extension supplémentaire est utilisée. Celle-ci permet à la polymérase d'ajouter les paires de bases finales à l'extrémité des brins, ce qui est nécessaire dans certaines applications. La durée typique est de 2 à 10 minutes.
Enzyme de restriction	Enzyme produite par une bactérie qui peut couper un brin d'ADN selon une séquence spécifique.
Genotype	La composition génétique d'un organisme individuel.
Hybridation	Lorsque la température d'une réaction PCR est abaissée, de courts morceaux d'ADN, appelés amorces, se lient à des séquences spécifiques du génome ciblant cette région à copier. La température d'hybridation est spécifique aux amorces utilisées dans votre réaction - la température typique est de 45 à 65°C pendant 5 à 30 secondes par cycle.

Annexe A - Glossaire PCR (suite)

Terme	Définition
Matrice	ADN contenant la séquence qui sera copiée dans une réaction PCR. Il peut s'agir d'un court fragment ou d'un génome entier.
Monomère	Une molécule qui peut être liée à d'autres molécules similaires pour former un polymère.
Phénotype	L'ensemble des caractéristiques observables d'un organisme individuel découlant du génotype et de l'environnement.
Polymère	Molécule constituée de nombreuses unités similaires liées entre elles.
Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)	Type de variation génétique où la séquence du génome de deux individus diffère à une seule position du nucléotide. Les SNP sont la forme la plus courante de variation génétique chez l'homme, se produisant en moyenne une fois toutes les 300 paires de bases.
Site de reconnaissance	Séquence d'ADN spécifique qu'une enzyme de restriction reconnaît et à laquelle elle se lie.
Tampon	Un sel ajouté à une solution aqueuse qui aide à maintenir un pH constant. Les tampons sont essentiels dans la PCR car la fonction de l'Buffer
Thermocycleur	Également appelé appareil PCR, un thermocycleur est un instrument qui modifie automatiquement la température de la réaction PCR selon un programme défini par l'utilisateur. Il chauffe et refroidit la réaction entre les températures de dénaturation, de recuit et d'extension sur un nombre de cycles déterminé.

Annexe B - Réaction en chaîne de la polymérase

La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) relève deux défis majeurs de la biologie moléculaire : produire des quantités d'ADN utilisables pour l'analyse et isoler une région spécifique du génome. Premièrement, l'ADN que les scientifiques veulent analyser est souvent prélevé en quantités extrêmement faibles (par exemple, une seule goutte de sang sur une scène de crime). Pour disposer de quantités d'ADN utilisables, nous devons faire de nombreuses copies en utilisant l'ADN original comme matrice. Ensuite, parmi l'ensemble du génome, nous devons trouver uniquement la partie que nous voulons analyser, qu'il s'agisse d'un gène qui provoque une maladie ou d'une séquence qui peut aider à identifier une espèce. Ce n'est pas une mince affaire puisque le génome humain compte plus de 3 milliards de paires de bases (pb) et que nous nous intéressons souvent à des régions de moins de 300 pb de long.

L'histoire de la PCR

Comme pour de nombreuses idées en biotechnologie, la nature nous fournit la plupart des outils dont nous avons besoin. Chaque fois qu'une cellule se divise, elle fabrique deux répliques de son génome entier à l'aide d'enzymes spécialisées. Le phénomène d'appariement des bases complémentaires devrait vous donner une idée de la manière dont une région spécifique peut être ciblée. À la fin des années 1970, Frederick Sanger a mis au point une méthode de copie de l'ADN in vitro qui utilise de courts morceaux d'ADN, appelés amorces, pour initier la réplication par une ADN polymérase, similaire aux amorces d'ARN de votre modèle de réplication cellulaire de l'ADN. Une amorce artificielle utilisée dans la méthode Sanger a une séquence qui lui permet de se lier à un seul endroit dans la séquence d'ADN cible.

En utilisant une seule amorce d'ADN, la méthode Sanger ne peut produire qu'une seule copie de la cible à la fois. En 1983, Kary Mullis a proposé une modification de cette méthode qui consiste à utiliser une deuxième amorce pour amorcer la réplication en utilisant la première copie comme matrice. Rappelons que l'ADN a une structure antiparallèle où un brin va dans la direction opposée par rapport au second brin. Pour utiliser la première copie comme cible de réplication, la deuxième amorce que Mullis a ajoutée devait amorcer la réplication dans la direction opposée, c'est pourquoi une amorce est appelée amorce avant et l'autre amorce est appelée amorce arrière. Avec la séquence originale et sa copie servant de modèle, deux copies sont produites au lieu d'une. De plus, ces deux copies peuvent être utilisées comme modèles lors d'une deuxième série de copies, qui produit quatre copies. Après chaque tour, ou cycle, le nombre de copies a doublé. Sur plusieurs cycles, des milliards de copies de la séquence d'ADN entre les deux amorces sont générées. Cette méthode est appelée réaction en chaîne de la polymérase (PCR) - polymérase en raison de l'enzyme utilisée pour copier l'ADN et réaction en chaîne parce que les produits d'un cycle servent de matrices pour le cycle de copie suivant. Cette technologie rapide et efficace pour générer des quantités utilisables d'ADN a valu à Mullis le prix Nobel de chimie. La première application de la PCR a été un test pour l'anémie falciforme.

Comment fonctionne la PCR

Au lieu d'essayer de recréer la machinerie biochimique complexe de la cellule dans un tube à essai, les scientifiques comptent sur la chaleur pour contrôler les différentes étapes de la réaction PCR. Pour que l'ADN puisse être copié, les bases nucléotidiques doivent être exposées, ce qui signifie que l'ADN double brin doit être séparé en brins simples. Tout comme la chaleur appliquée à un glaçon affaiblit les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et provoque une

transition de phase vers l'eau liquide, la chaleur appliquée à l'ADN double brin affaiblit les liaisons hydrogène entre les bases, ce qui entraîne la séparation des brins en ADN simple brin. Comme pour la glace, on appelle parfois cela la fonte, mais on parle communément de dénaturation. Dans un cycle PCR, la dénaturation est effectuée à 90-98°C pendant 5-30 secondes. Cette température est juste en dessous du point d'ébullition de l'eau.

Une fois que l'ADN matrice a été séparé en brins individuels, la température est abaissée pour encourager les amorces à se lier à leurs séquences cibles. Tout comme dans l'analogie avec l'eau, une température plus basse favorise la formation de liaisons hydrogène entre les molécules, dans ce cas l'amorce et la matrice ADN. Cette étape, appelée anelage, se déroule généralement entre 45 et 65 °C pendant 5 à 30 secondes. La température idéale et la durée de l'étape d'hybridation dépendent des séquences des amorces utilisées. Elle doit être suffisamment basse pour que des liaisons hydrogène puissent se former entre l'amorce et la séquence complémentaire spécifique, mais pas trop basse pour qu'une liaison non spécifique, ou aléatoire, se produise entre l'amorce et la matrice.

L'ADN polymérase se lie au complexe amorce-matrice et commence à ajouter des nucléotides (dNTP) à l'extrémité 3' de l'amorce. Cette étape, appelée élongation, donne lieu à une nouvelle copie attachée à la matrice sous forme d'ADN double brin. La durée de l'étape d'élongation dépend de la longueur du segment d'ADN copié et peut aller de 5 secondes à 5 minutes.

À ce stade, vous avez peut-être remarqué un problème : l'ADN polymérase, sur laquelle repose tout le processus de PCR, est une enzyme protéique qui a besoin d'une structure tridimensionnelle très spécifique pour copier l'ADN. Avant d'arriver à l'étape d'extension, tout le mélange PCR, y compris la polymérase, est déjà passé par l'étape de dénaturation où la réaction a été chauffée presque jusqu'à ébullition. Quiconque a déjà cassé un œuf dans une poêle à frire sait ce que la chaleur élevée fait aux protéines! Dans les premiers temps de la PCR, une polymérase fraîche était ajoutée au tube de réaction à chaque cycle pour remplacer la polymérase qui avait été détruite par l'étape de dénaturation. Le fait de devoir ouvrir le tube et ajouter une nouvelle enzyme pendant 30 cycles était coûteux, inefficace et augmentait les risques de contamination de la réaction. L'innovation qui permettrait de lever ces obstacles est venue d'une source inhabituelle : le parc national de Yellowstone.

Dans les années 1970, des scientifiques avaient isolé une espèce de bactérie appelée *Thermus aquaticus* dans une source chaude de Yellowstone. *T. aquaticus* se développe à 75-80°C et peut survivre à des températures beaucoup plus élevées. Ses enzymes sont tout aussi tolérantes à la chaleur. *E. coli*, la source originale de la polymérase utilisée dans la PCR, se développe à 37,5°C, la même température que l'intestin des mammifères.

Comme la biochimie de l'ADN est similaire dans l'arbre de vie, la polymérase de *T. aquaticus* (appelée Taq Polymerase) peut remplacer la polymérase d'*E. coli* dans la PCR, avec la modification que l'étape d'élongation est effectuée à 70-75°C.

Cette innovation a permis à la PCR de devenir l'outil omniprésent, peu coûteux et efficace qu'elle est aujourd'hui. Les réactions peuvent être mises en place une seule fois, scellées à l'intérieur d'un tube et placées dans un thermocycleur automatisé. Le thermocycleur (ou appareil PCR) est un instrument spécialisé qui modifie précisément et rapidement la température du tube entre la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Après 20 à 40 cycles de ces trois températures, des milliards de copies du produit d'ADN désiré peuvent être produites. L'ADN amplifié peut être analysé par électrophorèse sur gel à la fin de l'expérience ou détecté au fur et à mesure de sa formation grâce à un appareil spécialisé (QPCR).

Annexe C - Qu'est-ce que l'électrophorèse sub gel ?

L'électrophorèse sur gel est une technique utilisée dans de nombreux domaines scientifiques pour analyser les composants de mélanges chimiques complexes. Les mélanges d'ADN, d'ARN, de protéines ou de colorants peuvent être séparés en leurs composants individuels sur la base de la taille moléculaire et de la charge électrique en utilisant une matrice de séparation dans un champ électrique.

Le gel utilisé dans l'électrophorèse sur gel est un enchevêtrement de polymères formant une matrice tridimensionnelle avec des pores remplis d'eau à travers lesquels les molécules migrent. Une densité plus élevée de polymères crée des pores plus petits. Comme les trous d'un tamis ou d'une passoire, la taille des pores doit être adaptée à la taille des molécules à séparer. Les gels peuvent être fabriqués à partir de différentes substances selon l'application. L'un des matériaux les plus couramment utilisés et les plus efficaces est l'agarose, un polymère extrait d'algues marines. Les gels d'agarose sont formés (ou coulés) en versant de l'agarose fondu dans un plateau où il se solidifie en refroidissant pour prendre la forme souhaitée. Un peigne est placé pendant que l'agarose est fondu, puis retiré après sa solidification pour créer des puits où les échantillons sont chargés.

Après solidification du gel, celui-ci est placé dans un tampon électriquement conducteur entre des électrodes parallèles positives ((+) anode) et négatives ((-) cathode) Une tension est appliquée entre les électrodes, ce qui crée un champ électrique uniforme dans le gel. Les molécules dans les puits commencent à se déplacer sous l'influence du champ électrique : les molécules chargées positivement migrent vers la cathode (-) et les molécules chargées négativement migrent vers l'anode (+).

La vitesse de déplacement d'une molécule dans un champ électrique est déterminée par la force de sa charge électrique par rapport à son poids moléculaire. Cette force est quantifiée comme le rapport entre la charge et la masse. La vitesse de mouvement à l'intérieur d'un gel est également influencée par la taille de la molécule par rapport aux pores du gel. Les polymères dans le gel sont comme une course d'obstacles : les petites molécules se déplacent facilement à travers les pores, voyageant plus vite et plus loin que les grosses molécules volumineuses. Cependant, une grosse molécule peut se déplacer plus rapidement dans un gel qu'une petite molécule lorsque la force de sa charge par rapport à sa masse est nettement plus élevée. La forme peut également affecter la façon dont une molécule se déplace à travers le gel. Les longues molécules de type spaghetti se déplacent plus lentement que les molécules compactes, qui se glissent facilement à travers les pores. Les molécules de même taille, de même forme et de même charge se déplacent ensemble et forment une bande distincte. Si plusieurs types ou tailles de molécules sont présents dans l'échantillon, ils se sépareront les uns des autres et chacun d'eux formera une bande distincte.

Annexe D - Bibliographie

Bozeman Biologie : Vidéo dans laquelle Paul Anderson explique la digestion par restriction, l'électrophorèse sur gel et la PCR.

<http://www.bozemanscience.com/molecule-biology/>

Chargement de l'échantillon par électrophorèse de l'ADN : Courte Vidéo pour montrer comment charger un gel d'électrophorèse horizontale d'ADN. Elle montre la bonne technique et quelques erreurs courantes.

<https://www.youtube.com/watch?v=tTj8p05jAFM>

PBS Learning Media : Ce site propose plusieurs vidéos détaillant les techniques et l'importance de la biotechnologie.

https://kcts9.pbslearningmedia.org/collection/biot/?topic_id=354

Apprendre.la génétique : Simulation virtuelle du protocole d'extraction de l'ADN

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/>

Apprendre.la génétique : De nombreuses activités interactives pour en savoir plus sur l'hérédité et la génétique moléculaire

<http://learn.genetics.utah.edu/content/basics/>

Jouez à l'ADN - le jeu de la double hélice : Dans ce jeu, votre travail consiste d'abord à faire des copies exactes d'une molécule d'ADN double brin en faisant correspondre correctement les paires de bases à chaque brin, puis à déterminer à quel organisme appartient l'ADN.

http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna_double_helix/index.html

DNAi : Chronologie des événements importants de l'histoire de l'ADN

<http://www.dnai.org/timeline/index.html>



Designed for Embi Tec by Science Lab Studios, Inc.



 theminione.eu

 +32 475 36 68 34

 info@theminione.eu

FastTaq, GreenGel et PrepOne sont des marques commerciales d'Embi Tec. GelGreen est une marque de commerce de Biotium. MiniOne est une marque déposée de C.C. IMEX. Brevets en instance.