

Génétique

Transferts horizontaux et endosymbiose

Réf : 117 149

Kit PCR Transfert de gènes chloroplastiques (20 x PCR)

Français – p 1

2 annexes

Fiche de paillasse

Version : 1203

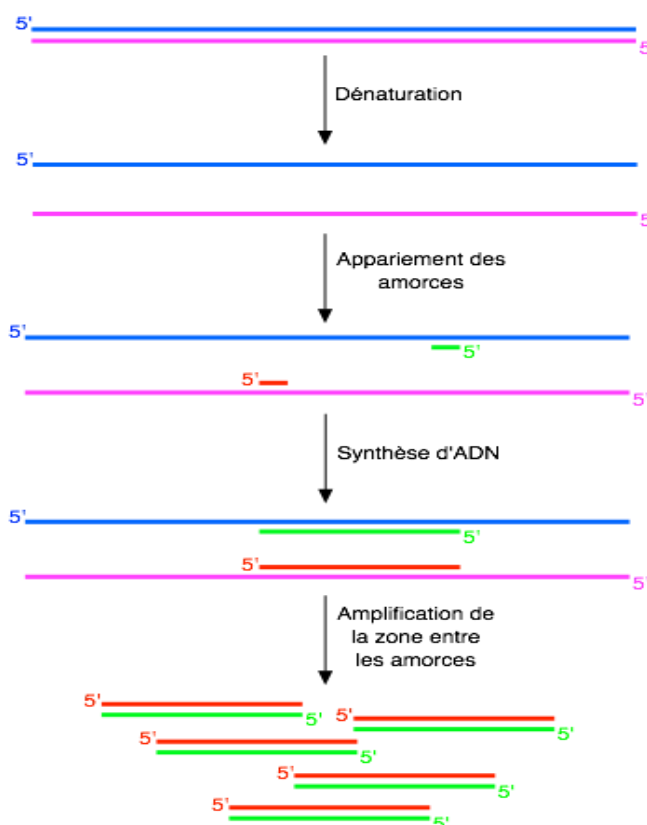
1. Amplification par PCR de gènes chloroplastiques

1.1 Principe général d'une réaction PCR (Polymerase Chain Réaction)

L'ADN est synthétisé dans la nature grâce à un type d'enzyme appelé ADN polymérase. Pour fonctionner, cette enzyme a besoin d'une matrice d'ADN simple brin à répliquer, d'une amorce ADN complémentaire à l'ADN à répliquer et de désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). La découverte d'organismes thermophiles a permis de trouver des ADN polymérases ayant deux caractéristiques essentielles à savoir une température de fonctionnement élevée (typiquement vers 72°C) et surtout la capacité à ne pas être dénaturées définitivement par des températures supérieures à 90°C. Ces caractéristiques ont permis d'inventer la réaction PCR ou réaction de polymérisation en chaîne qui consiste à synthétiser *in vitro* de l'ADN de façon exponentielle.

La première étape de cette réaction (Figure 1) consiste en la dénaturation de l'ADN double brin qui sert de matrice. Pour se faire, la solution d'ADN est chauffée à une température proche de l'ébullition ce qui permet de séparer les deux brins d'ADN par fusion thermique. La seconde étape consiste à apparier, de part et d'autre de la zone à amplifier, des amorces d'ADN simple brin synthétique. Cette opération est simplement réalisée en abaissant suffisamment la température pour que cet appariement puisse être stable. La troisième et dernière étape consiste à se placer à la température optimale pour la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase (typiquement 72°C) pendant le temps nécessaire pour que cette dernière ait le temps de synthétiser la longueur d'ADN souhaitée.

Figure 1



Ces trois étapes vont être répétées autant de fois que nécessaire pour amplifier de façon exponentielle l'ADN recherché ou amplicon (Figure 2 et 3). Typiquement, la molécule d'origine va pouvoir ainsi être multipliée par des facteurs de 10^6 à 10^9 la rendant détectable par électrophorèse sur un gel d'agarose.

Figure 2

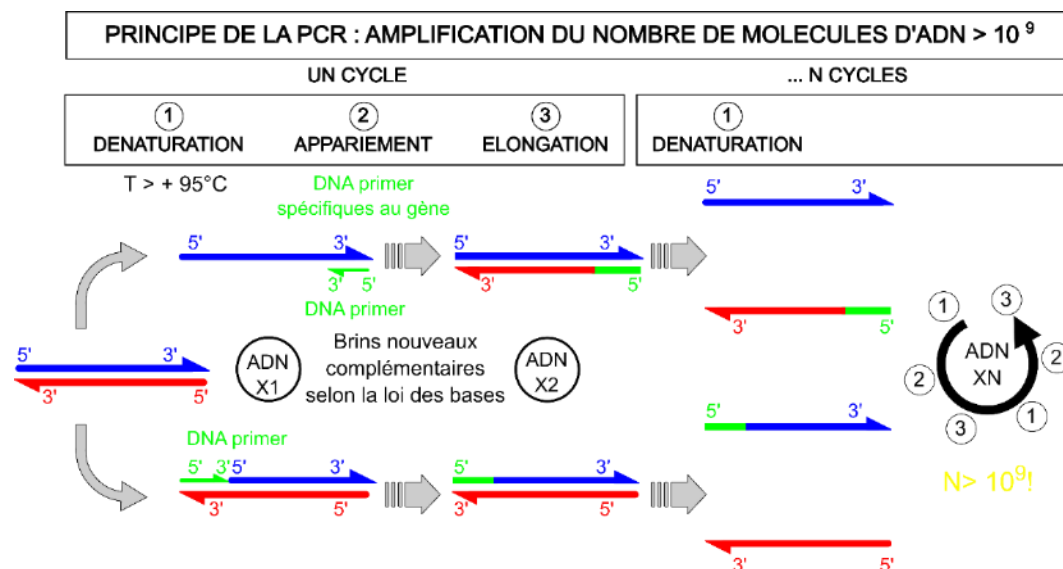
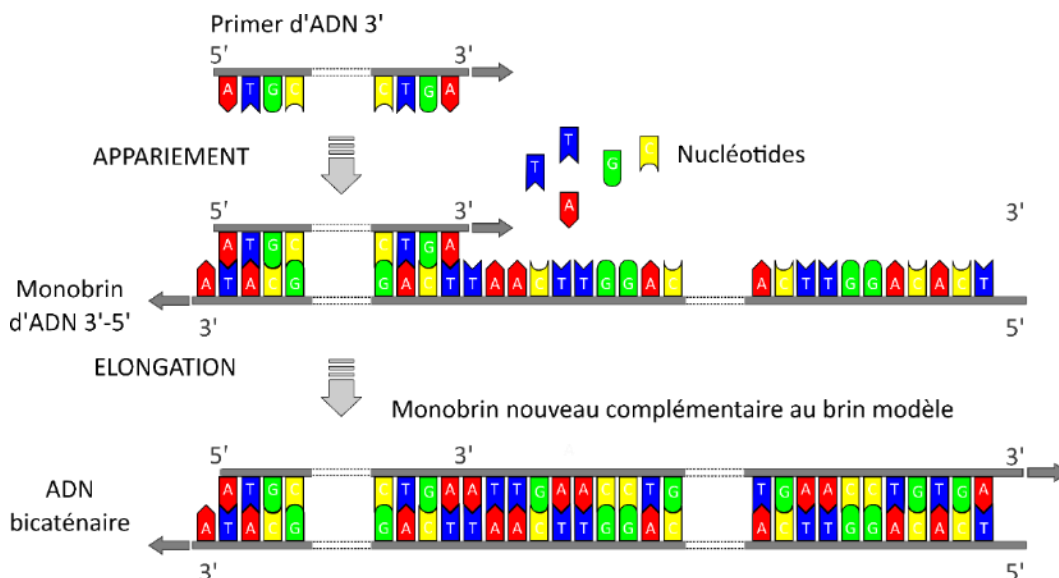


Figure 3



Primer = amorces

1.2 Contexte pédagogique

Extrait du programme de Terminale, Spécialité Science de la Vie et de la Terre BO spécial n° 8 du 25 juillet 2019

« .. Des échanges de matériel génétique, hors de la reproduction sexuée, constituent des transferts horizontaux. Ils se font par des processus variés (vecteurs viraux, conjugaison bactérienne...).

...transmises entre générations, fréquentes dans l'histoire des eucaryotes, jouent un rôle important dans leur évolution. Le génome de la cellule (bactérie ou eucaryote) intégré dans une cellule hôte régresse au cours des générations, certains de ses gènes étant transférés dans le noyau de l'hôte. Ce processus est à l'origine des mitochondries et des chloroplastes, organites contenant de l'ADN. »

1.3 Principe

De nombreux éléments scientifiques, étayent la théorie endosymbiotique indiquant que les chloroplastes sont dérivés d'une cyanobactérie intégrée dans une cellule eucaryote ancestrale.

Ainsi les chloroplastes, tout comme les mitochondries :

- présentent une taille similaire à une bactérie (1µm),
- possèdent une membrane externe qui comporte des protéines et lipides que l'on trouve exclusivement chez les bactéries,
- mettent en œuvre des processus biochimiques propres aux procaryotes,
- contiennent un patrimoine génétique propre.

Cependant, on note que ce génome est fortement réduit, la plupart des protéines des organites sont codées dans le noyau. Les gènes de la bactérie endosymbiotique ont été transférés en grandes parties dans le génome de la cellule eucaryote, ce qui constitue un exemple de transfert horizontal.

Peut-on mettre en évidence par PCR, une preuve de ce transfert de matériel génétique du génome chloroplastique vers génome nucléaire de la cellule végétale ?

On se propose de rechercher par la technique d'amplification par PCR, la présence des gènes codant les sous-unités S et L de la RuBisCo chez des plantes comme le radis (*Raphanus sativus*) ou le chou-fleur (*Brassica oleracea* variété *botrytis*)

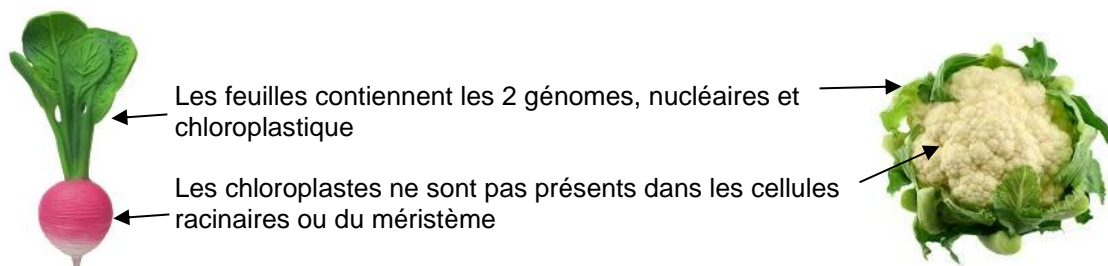
Pourquoi l'enzyme RuBisCo ?

1 - La RuBisCo est l'enzyme clé de la Photosynthèse.

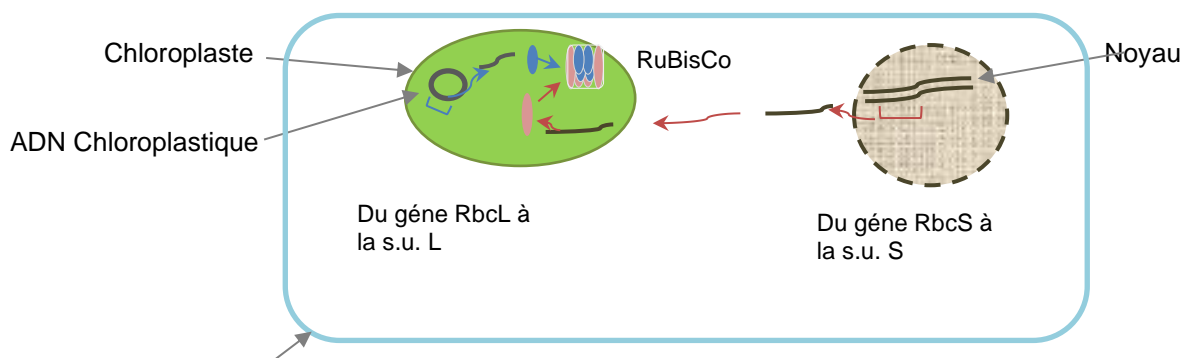
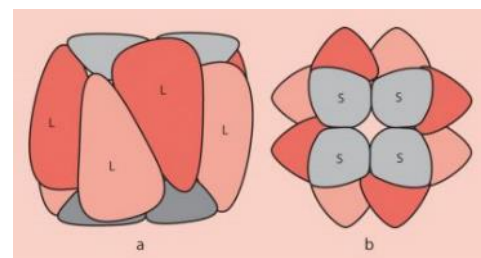
- La RuBisCo, de son nom complet ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase, elle est la protéine la plus abondante dans la biomasse végétale et même dans la biomasse totale sur Terre
- La RuBisCo porte deux activités enzymatiques :
 - une activité carboxylase, où la RuBisCo fixe un CO₂ sur le D-ribulose-1,5-diphosphate
 - une activité oxygénase, où la RuBisCo fixe une molécule d'O₂ sur le D-ribulose-1,5-diphosphate
 - La RuBisCo participe donc activement au cycle du carbone.

2 - Impliquée dans la photorespiration, la RuBisCo est consubstantielle au chloroplaste. Les gènes codant pour RuBisCo sont des vestiges du génome hérité d'une cyanobactérie endosymbiotique.


On va travailler en parallèle sur deux types cellulaires : **des cellules chlorophylliennes** qui contiennent à la fois le génome nucléaire et l'ADN chloroplastique et **des cellules non-chlorophylliennes** qui contiennent essentiellement le génome nucléaire.



- Caractéristiques de la RuBisCo
- La RuBisCO comporte deux sous-unités :
 - une grande (L)
 - une petite (S),
- Chaque sous-unité est codée par un gène différent.



Cellule végétale chlorophyllienne

Le tube d'amorces  contient 2 couples d'amorces, un premier couple ciblé sur une portion du gène RbcL et un second ciblé sur gène RbcS
Le résultat attendu est une amplification d'un fragment d'ADN de 1184 pb pour la sous-unité L et un fragment de 553 pb pour la sous-unité S.

Dossier d'expériences à retrouver sur plateformenum.jeulin.fr

Dossier complet : scientifique et technique avec un **TP pas à pas**.

2. Mise en œuvre d'une amplification

2.1 Le matériel pour 2 x 10 amplifications

Le format du kit est adapté pour 2 demi-classes.

Les 20 réactions du kit sont réparties en 2 lots, soit 2 x 10 amplifications.

Le contenu du kit :

- 2 tubes d'amorces (tube à pastille bleue ■)
- 2 tubes PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte ■)
- 1 tube DNA release (tube à pastille rouge ■)
- 1 tube Marqueur de poids moléculaire (tube à pastille jaune ■), pour l'électrophorèse
- 1 tube Tampon d'extraction (tube à pastille blanche ■)
- 2x10 microtubes PCR 0,2 mL
- 2 micro-pilons pour microtube 1,5 mL (lavables et réutilisables)



Stockage : plusieurs mois à - 20°C (> 1an pour un kit neuf)

Les réactifs entamés peuvent également être remis à - 20°C, cependant le risque de contamination (par Dnase) est très important si le tube a été ouvert longtemps, et/ou a subi plusieurs prélèvements par pipetage.

Matériel complémentaire nécessaire :

Microtubes 1,5 mL pour chaque échantillon végétal

Thermocycleur

Micropipette 0,5 – 10 µl + cônes stériles

Micropipette 2 – 20 µl + cônes stériles

Micropipette 10 – 100 µl + cônes stériles

Gants

Feutre à pointe fine

Blouse



Conseils de manipulation

Il est généralement recommandé de placer les tubes sur la glace pendant les manipulations. Toutefois, ceci n'est pas absolument indispensable, surtout si les consommables sont utilisés dans leur intégralité et les réactions préparées dans un temps raisonnablement court.



Les produits obtenus par PCR (ADN) sont sans danger et s'éliminent avec les déchets normaux.

Quelques règles de bases pour éviter les contaminations des tubes :

- La paillasse est propre et dégagée.
- L'utilisation de gants est préconisée mais n'est pas obligatoire. Toutefois, on veillera à bien se laver les mains au savon avant les manipulations des différents composants du kit.
- Être vigilant lors de la manipulation des tubes de réactifs et du tube PCR, limiter le temps d'ouverture, éviter les mouvements brusques et les brassages d'air au-dessus des tubes ouverts.

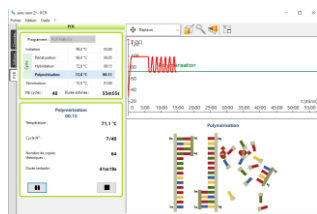
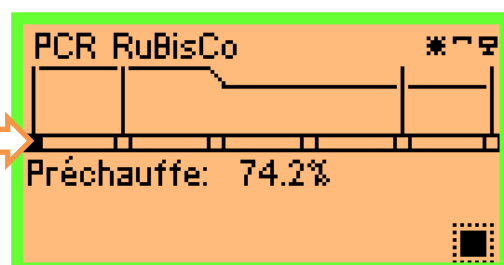
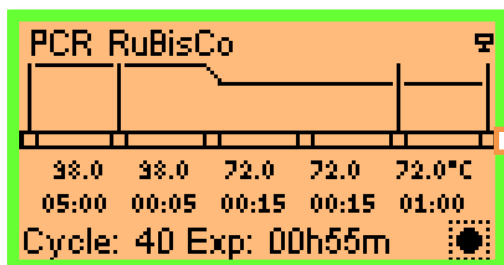
3. Mode opératoire

3.1 Paramétrage du thermocycleur

Allumer et programmer le thermocycleur

Principe : une amplification de 40 cycles sur 55 minutes environ.

Thermocycleur didactique **Jeulin** appuyer sur  →  (=cycle en cours)



Ou utiliser le logiciel de pilotage PCR sur PC ou tablette



En fin de cycle, les échantillons peuvent être maintenus plusieurs heures à une température de conservation < 8°C. Ainsi, l'électrophorèse peut avoir lieu juste après l'amplification ou ultérieurement.

Les microtubes peuvent être entreposés directement au congélateur -18 °C, ils se conserveront alors plusieurs semaines.



Paramétrage

Exécuter le programme suivant : Rusbisco |



Etape	Action	Température	Temps
Initiation	Dénaturation	98°C	300 secondes
Cycle de base x 40	Dénaturation	98°C	5 secondes
	Hybridation (1)	72°C	15 secondes
	Polymérisation	72°C	15 secondes
Terminaison		72°C	60 secondes
Attente (2)		<8°C	

- (1) La température d'appariement (72°C) des oligonucléotides a été choisie pour être proche de la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase. Ceci permet de simplifier les cycles et d'accélérer ainsi le processus. Hybridation et polymérisation sont donc confondues, la phase à 56°C n'étant pas nécessaire.
- (2) Non nécessaire si l'analyse sur gel est menée immédiatement

3.2 Préparation du gel d'électrophorèse

Un **gel d'agarose à 1%** en tampon TAE est nécessaire pour la migration des échantillon ADN amplifié par PCR.

Les gels peuvent être préparés plusieurs heures avant ou la veille de la manipulation. Les gels se conservent 24 h au réfrigérateur dans un sachet plastique hermétique, pour la préparation voir l'**annexe 1**.

3.3 Déroulement de l'expérience

3.3.1 Matériel biologique

2 tissus d'organismes eucaryotes ont été testés, pour lesquels des modes opératoires de préparation des échantillons sont proposés.

<ul style="list-style-type: none">- Chou-fleur- Radis rose	Ces 2 plantes appartiennent à la famille des brassicacées tout comme <i>Arabidopsis thaliana</i> ou arabette des dames.
---	---

Quelques recommandations :

- Attention, il faut éviter les contaminations, en particulier lors de la préparation des extraits cellulaires donc le port des gants et de la blouse est indispensable.
- Si l'extraction se fait à partir d'échantillons congelés : faire dégeler rapidement à couvert près d'une source de chaleur
- Peser les différents échantillons dans une coupelle de pesée différente pour chaque échantillon. *Très peu de matériel cellulaire sont nécessaire, un excès de tissus peut au contraire nuire au processus d'amplification.*
- Les extractions cellulaires sont réalisées en même temps que la préparation des tubes à PCR.
- Pour fermer les microtubes PCR, on privilégiera une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.

3.3.2 Lavage des végétaux


Rincer délicatement sous l'eau du robinet et **sécher** en tamponnant au papier essuie-tout les végétaux ou partie de végétaux qui serviront au prélèvement des échantillons.

Conserver les végétaux lavés et séchés entre 2 feuilles de papier essuie -tout.




3.3.3 Préparation des extraits végétaux

⇒ Préparation des extraits végétaux

- Radis et/ou chou-fleur
- Tubes type Eppendorf de 1,5 mL (non fournis)
- Tampon d'extraction (tube à pastille blanche )
- Pions adaptés au tube Eppendorf (2 exemplaires fournis avec le kit)
- Scalpels stériles
- Boîtes de Pétri stériles
- Règle graduée



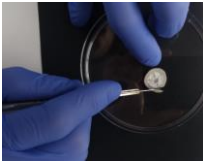



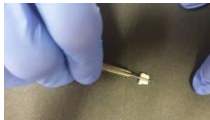
⇒ Préparation des tubes d'extraction

- **Mettre** les gants
- **Identifier** les tubes Eppendorf destinés à recevoir les échantillons **chlorophylliens** et les **non-chlorophylliens**
- **Introduire** dans chaque tube Eppendorf 100µL de tampon d'extraction (tube à pastille blanche ) avec la micropipette 10-100 µL
- **Laisser** sur la glace ou le support réfrigéré, le temps de la découpe du végétal.

⇒ Préparation des échantillons

Prélever des échantillons **d'une taille de 2x4 mm** avec un scalpel neuf et différent pour chacun, dans un fond de boîte de Pétri stérile.

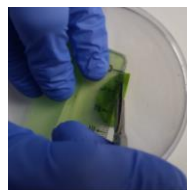
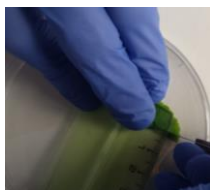
Echantillons non-chlorophylliens

Radis	Chou-fleur
<ul style="list-style-type: none"> • Couper une tranche d'environ 1 à 2mm d'épaisseur <u>à la limite rouge/blanc</u> de la racine tubérisée.    <ul style="list-style-type: none"> • Éliminer la peau du radis 	<ul style="list-style-type: none"> • Prélever le sommet d'une fleur.  <ul style="list-style-type: none"> • Dans ce sommet floral, couper l'échantillon et le placer dans le tube Eppendorf « échantillon non-chlorophyllien ».  

 <ul style="list-style-type: none"> • Dans cette tranche et plutôt sur le bord, prélever l'échantillon et le placer dans le tube Eppendorf « échantillon non-chlorophyllien ». 	
---	--

Echantillons chlorophylliens (radis ou chou-fleur)

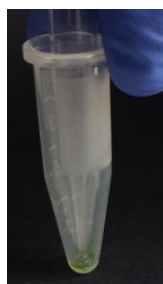
- Sur un morceau de feuille bien verte non flétrie, **découper** l'échantillon au scalpel et le **placer** dans le tube Eppendorf « échantillon chlorophyllien ».



⇒ Extraction du matériel génétique à partir des échantillons découpés (broyage)

Avec le micro-pilon adapté et propre, **écraser** les tissus dans leurs tubes respectifs (contenant le tampon d'extraction), en pressant et en tournant. Faire la manœuvre autant de fois que nécessaire. La racine étant plus coriace, on sera plus insistant pour cette dernière. Une fois les tissus écrasés, **laisser** les tubes sur la glace.

Attention : si utilisation du même pilon pour plusieurs extractions, réaliser un lavage du pilon eau/savon puis passage à l'éthanol entre chaque extraction.



Chlorophyllien

non chlorophyllien

Le kit permet de réaliser un maximum de 12 extractions (1,2 mL de tampon d'extraction). Les 2 pilons pour microtubes, fournis sont lavables et réutilisables. Entre chaque broyage, laver au détergent et désinfecter le pilon à l'alcool.

Les extraits de végétaux une fois réalisés se conservent congelés sans problème, donc pour vos tests, vous pouvez en préparer à l'avance si nécessaire.

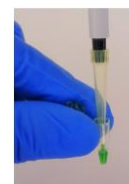
3.3.6 Préparation des micro-tubes PCR d'amplification



Les échantillons biologiques sont à disposition sur la paillasse, maintenus sur de la glace ou sur le support réfrigéré.

Les étapes :

1. **Identifier** les micro-tubes PCR de la même façon que les Eppendorf, et repérer les microtubes PCR pour identifier l'expérimentateur.
2. Prélever 20 μ L du "PCR Mix polymérase" () et les placer dans le microtube PCR. Changer de pointe de micropipette.
3. Prélever 20 μ L du "Mix Amorces" () et les placer dans le microtube PCR. Mélanger par pipetage doux. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever dans les tubes Eppendorf 1 μ L de chaque broyat et l'introduire dans le tube PCR correspondant. Mélanger par pipetage doux
5. Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme (§ paramétrage).




Programme RuBisCo = 56 minutes environ (Thermocycleur jeulin)



Etape	Action	Température	Temps
Initiation	Dénaturation	98°C	300 secondes
Cycle de base x 40	Dénaturation	98°C	5 secondes
	Hybridation (1)	72°C	15 secondes
	Polymérisation	72°C	15 secondes
Terminaison		72°C	60 secondes
Attente (2)		<8°C	

4. Séparation par électrophorèse

4.1 Préparation de l'ADN amplifié

- Retirer les microtubes du thermocycleur après la fin complète de l'amplification.
- A ce stade, les tubes peuvent être stockés à 4 °C pendant 48 H.
- Ouvrir délicatement chaque microtube et y ajouter 2 µL de la solution "DNA-Release" (tube à pastille ). Mélanger par pipetage doux.

Le mélange réactionnel ne nécessite pas d'ajout de tampon de charge avant dépôt.

4.2 Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un **gel d'agarose à 1% en tampon TAE**.

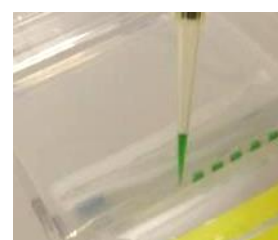
→ Voir **Annexe 2**

4.3 Dépôts et migration

→ Voir **Annexe 2**

4.4 Révélation

→ Voir **Annexe 2**

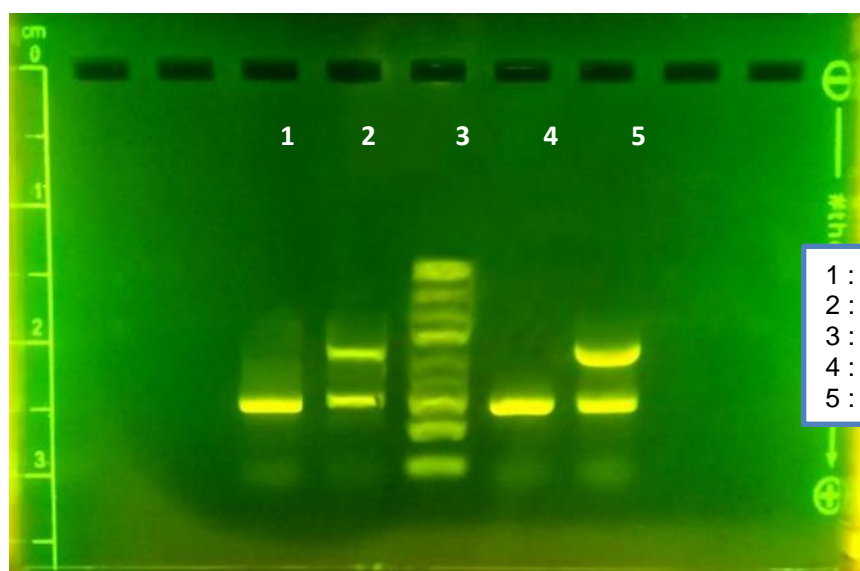


5. Résultats

L'électrophorèse révèle deux bandes pour les cellules chlorophylliennes et une seule bande (celle correspondant au gène de la sous-unité S) pour les cellules non chlorophylliennes (photo ci-dessous).

La partie amplifiée du gène de la sous-unité S a une longueur de 533pb, celle de la sous-unité L a une longueur de 1184pb.

Résultat de l'électrophorèse après amplification des deux gènes de la RubiSCO



1 : racine tubérisée de radis
2 : feuille de radis
3 : témoin poids moléculaire
4 : fleur de chou-fleur
5 : feuille de chou-fleur

Les résultats obtenus permettront aux élèves de conclure que chez le radis et le chou-fleur le gène de la sous-unité L est révélé uniquement dans les cellules chlorophylliennes. Il appartient donc au génome chloroplastique. En revanche, le gène de la sous-unité S est révélé aussi bien dans les cellules chlorophylliennes que les non-chlorophylliennes. Ce gène est donc présent dans le génome nucléaire (mais rien ne permet de conclure ici qu'il est absent du génome chloroplastique). Cette conclusion peut être généralisée à l'ensemble des Eucaryotes du groupe des Chlorobiontes (algues vertes et plantes terrestres).

L'activité peut être complétée par l'apport de la notion de **transfert horizontal du gène de la sous-unité S de la RuBisCo du chloroplaste vers le noyau** : les chloroplastes sont nés par endosymbiose d'une bactérie photosynthétique. Chez l'ancêtre commun des plantes et des algues vertes, le gène de la petite sous-unité de la RuBisCo, initialement présent dans le génome du chloroplaste, a été transféré de manière horizontale vers le génome nucléaire. Ce gène n'est plus présent dans le génome du chloroplaste.

L'activité peut être complétée par la recherche du type de bactéries qui s'est associé à une cellule eucaryote et a donné naissance aux chloroplastes des plantes et algues vertes.

L'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques de la RuBisCo chez différentes espèces permet de reconstruire en partie l'histoire évolutive de ces espèces.

Référent scientifique

Dr Jean-Luc Evrard, Responsable du système d'information, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg.

Un grand merci pour sa disponibilité et pour les réponses toujours rapides à nos nombreuses interrogations.

Dossier d'expériences à retrouver sur plateformenum.jeulin.fr

Dossier complet : scientifique et technique avec un TP pas à pas ainsi que de nombreuses ressources, dont les fichiers .edi et .pdb, fiche de paillasse personnalisable en téléchargement → Onglet **Ressources**

Nom des fichiers	contenu	Extension	Logiciels de lecture
algue_brune_Thalassiosira_hyalina_rubisco	Structure 3D de la Rubisco chez l'algue brune Thalassiosira hyalina	.pdb	Libmol, Rastop, Rasmol
arabette_rubisco_substratRUBP_partiel	Structure 3D de la Rubisco chez l'Arabette Arabidopsis thaliana (2 sous-unités L et 2 S visibles) + substrat RuBP		
epinard_rubisco_substratRUBP_complexe	Structure 3D de la Rubisco chez l'épinard + substrat RuBP		
synechococcus_sp_rubisco	Structure 3D de la Rubisco chez une cyanobactérie		
Arabette_rubisco_AD N	Séquences nucléotidiques des gènes des sous-unités S et L chez l'Arabette	.edi	Anagène, Phylogène
Especies_rubisco_prot	Séquences protéiques des sous-unités S et L chez les espèces de l'arbre de la figure 4		

Bibliographie – Sitographie

- *Classification phylogénétique du vivant*, Lecointre – Le Guyader, éditions Belin, tomes 1 et 2
- *L'évolution des génomes endosymbiotiques : de l'avantage d'être petit ?* Marc-André Selosse.
<https://isyeb.mnhn.fr/sites/isyeb/files/documents/selosse2009biofutur.pdf>
- Logiciel Libmol : <https://libmol.org/>
- Logiciels Anagène et Phylogène : <http://accres.ens-lyon.fr/accres>
- La théorie endosymbiotique, Université de Jussieu.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/endosymbiose.htm>
- Rampant horizontal gene transfer and duplication of RuBisCO genes in eubacteria and plastids
https://www.researchgate.net/publication/14448806_Rampant_horizontal_gene_transfer_and_duplication_of_RuBisCO_genes_in_eubacteria_and_plastids

ANNEXE 1 : Préparation du gel d'électrophorèse (voir 3.2)

(A préparer avant l'expérimentation)

La méthode retenue ici est une électrophorèse en **gel d'agarose à 1 %** en tampon TAE avec une révélation par fluorescence gel green en l'éclairant à l'aide du transilluminateur.

[Il est tout aussi possible d'utiliser un autre tampon (TBE) ou d'autres colorants standard type Azure A.]

Durées :

	Temps	Remarques
Préparation du gel, coulage	30 min	
Migration	25 min	140 V en TAE
Révélation Solution 1 : pré coloration du gel (3µl/ 40 ml de gel)	10 min	Solution rapide Les bandes d'ADN sont moins résolues
Solution 2 (alternative) : post coloration 30 minutes de trempage	40 min	Les bandes d'ADN ont une résolution plus fine

Appareillage	Verrerie et petit matériel	Produits
<ul style="list-style-type: none"> - Balance à 0,01g - Cuve à électrophorèse + alimentation - Système de chauffage - Thermomètre 	<ul style="list-style-type: none"> - Éprouvette 100 ml - Éprouvette de 500 ml - Fiole de 250 ml - Erlenmeyer 250 ml - Cristalliseur (ou récipient équivalent) - Ruban adhésif pour peintre 	<ul style="list-style-type: none"> - TAE 10X (25 ml) - Agarose (0,6 g) - Gelgreen - Marqueur de poids moléculaire (Microtube à pastille jaune) - Produits de PCR

Préparation du tampon TAE 1X : (se conserve quelques jours au réfrigérateur)

- * Dans une fiole de 250 ml :
- Verser 25 ml de TAE 10X dans la fiole
- Rincer 3x le flacon à l'eau distillée, verser cette eau de rinçage directement dans la fiole
- Compléter la fiole en eau distillée jusqu'au trait de jauge (250 ml)

Préparation et coulage du gel d'agarose à 1 % : peut être réalisé pendant, ou 1 ou 2 jours avant, la PCR. Le cas échéant, conserver au réfrigérateur dans un sachet hermétique

Préparation :

- * Dans un erlenmeyer de 100 ml, verser :
- 40 ml de TAE 1X (mesurés à l'aide d'une éprouvette de 100 ml)
- 0,40 g d'agarose (pesés sur une balance à 0,01g)

* Chauffer la solution en agitant régulièrement, idéalement avec un agitateur magnétique.
2 possibilités pré coloration (rapide et moins résolu) ou post coloration (plus long mais plus résolu)

- 1- **Pré coloration** : Le gel est prêt lorsque l'agarose est totalement dissoute, le liquide doit être parfaitement translucide. En fin de dissolution ajouter 3 µl de Gelgreen (le colorant est rouge !), continuer l'agitation et le chauffage jusqu'à ce que le liquide translucide soit coloré de façon homogène.
- 2- **Post coloration** : aucune intégration de gel green dans le gel à ce stade.

* Laisser refroidir le gel dans l'ermeneyer jusqu'à ce qu'il atteigne une température de 50°C – 60°C environ.

Astuce, utiliser le Colorant Gelgreen jusqu'au dernier µg : Des dépôts solides dans le bouchon, indiquent un début de déshydratation du colorant. Ceux-ci peuvent être repris facilement dans quelques microlitres d'eau distillée puis intégrés de suite dans le gel.

Coulage :

* Préparer le support du gel en bouchant ses extrémités à l'aide de ruban adhésif pour peintre (ou tout autre système adéquat). Posez-le sur une surface parfaitement horizontale.

* Couler le gel à 50°C dans le support sur une épaisseur de 0,5 cm environ.

Astuce : Si des bulles apparaissent, vous pouvez les faire éclater à l'aide d'un cône pour micropipette avant la solidification du gel.

* Poser le peigne à sa place, pour former les puits lors du refroidissement du gel.

* Laisser le gel refroidir (15 – 20 min), en le mettant au réfrigérateur si nécessaire (ne transporter le support avec le gel que si celui-ci est déjà bien figé).

* Une fois le gel complètement solidifié :

- Retirer le ruban adhésif et retirer doucement le peigne dans un mouvement vertical, pour ne pas percer ou fêler les puits.

Astuce : Il est plus facile de retirer le peigne si le gel est immergé dans du tampon (mise en place dans la cuve avant de retirer le peigne).

Le gel peut être utilisé immédiatement ou conservé quelques jours au réfrigérateur.

Gel pré-coloré au Gelgreen peut être conservé au réfrigérateur dans un sachet hermétique ou 1 ou 2 jours avant l'électrophorèse.

Un gel sans colorant peut être stocké plusieurs jours dans du tampon de migration TAE 1X (une fois ôté du support).

ANNEXE 2 : Electrophorèse des fragments ADN amplifiés (voir 4.2)

Principe de l'électrophorèse

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un **gel d'agarose à 1%**.

L'ADN est chargé négativement par les groupements phosphates. Dans une cuve à électrophorèse, on place un gel d'agarose, les solutions d'ADN amplifié sont déposées du côté de la cathode (pôle négatif – noir).

L'ADN migre en fonction de son poids moléculaire : plus le fragment d'ADN est long plus il va migrer lentement vers l'anode (pôle positif + rouge), à l'inverse un fragment plus court se déplacera plus rapidement.

Préparation du dispositif pour électrophorèse

- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale.
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative).
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres.

Quel volume d'ADN amplifié déposer dans les puits à l'aide de la micropipette ?

Révélation utilisant un colorant fluorescence Gelgreen : déposer 8 µl de solution amplifiée d'ADN par puits

Révélation par coloration Azure A ou autre colorant : 10 à 12 µl de solution amplifiée d'ADN par puits


Pour le choix du colorant, tampon et la mise en œuvre de la technique de coloration (pré-coloration, post coloration) se référer aux différents protocoles.

Dépôts et migration (voir 4.3)

Avant tout, s'assurer que le DNA release a bien été ajouté aux produits de PCR dans les tubes.

Astuce : Pour rendre les puits plus visibles et faciliter les dépôts, il est utile de glisser un morceau de papier noir sous la cuve.

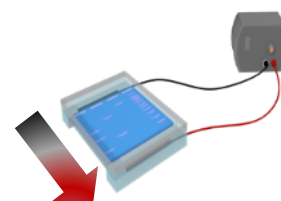
Les puits sont situés du côté du pôle négatif (noir) de la cuve à électrophorèse

- Déposer 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - )
- ADN amplifié : Déposer 10 µl d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)

Astuce : Pour éviter les fuites de produits hors des puits et les bulles d'air dans lors des dépôts, déposer très lentement à mi-hauteur dans les puits et arrêter avant que le cône ne soit entièrement vide (ne pas dépasser la 1^e butée du piston de la micropipette).



- Poser le couvercle sur la cuve.
- Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité.
- Poser le couvercle, ce qui ferme le circuit, régler l'alimentation en fonction du tampon utiliser (ex TAE 100 à 150 V maxi)



Astuce : Si votre alimentation dispose d'un sélecteur de tensions, vous pouvez améliorer le rendu en fractionnant l'électrophorèse en 2 étapes. D'abord **5 minutes** à basse tension (**70** à **110 V** suivant les modèles) puis **15 minutes** entre **140** et **160 V** (au-delà de **160 V**, l'ADN est endommagé). A base tension, les sels et autres impuretés chargées électriquement sont rapidement éliminés.

- Lancer la migration en mettant l'alimentation sous tension.

Astuce : Surveiller l'apparition de petites bulles sur les électrodes de la cuve, si elles n'apparaissent pas, c'est que le courant ne circule pas.

Surveiller le départ du colorant témoin de migration. S'il part dans le mauvais sens (vers l'arrière du gel, au risque de sortir de celui-ci) mettre immédiatement hors tension et inverser les branchements sur l'alimentation avant de relancer la migration.

- Une fois le front de migration (visible grâce au colorant) arrivé aux 2/3 ou 3/4 du gel (environ 20 à 30 min à 150V), mettre le circuit hors tension pour stopper la migration et sortir le gel de la cuve pour le colorer.

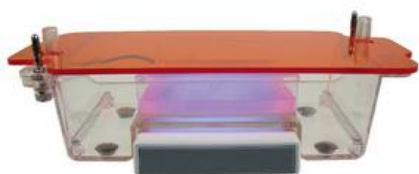
Révélation (voir 4.4)

A - Pré-coloration du gel

Le Gelgreen intégré à l'agarose va révéler par fluorescence les bandes d'ADN en l'éclairant à l'aide du transilluminateur.

Attendre 5 minutes avant de manipuler le support du gel, le gel étant encore chaud il n'est pas très stable.

- Placer le transilluminateur directement sous le support du gel (ou sous la cuve si celle-ci est refroidie afin d'éviter les phénomènes de buée) ou transporter délicatement le support de gel sur le transilluminateur.
- Placer le filtre orange dessus
- Mettre sous tension le transilluminateur, il faut patienter environ 10 minutes pour que l'excitation soit maximale. La révélation est améliorée en se plaçant à l'obscurité ou en utilisant la chambre noire.



Cuve électrophorèse
et Transilluminateur



Transilluminateur
réf. 527004



Chambre noire
réf. 527010.
Visualisation et des prises de vues
en toutes conditions de luminosité

B - Post coloration

Préparer la solution du bain :

- 4,5 µl de Gelgreen pour 25 ml d'eau distillée.
- Une fois préparé, protéger votre bécher de la lumière à l'aide d'un aluminium.
- Dans une petite cuve pour limiter au maximum les volumes morts, faire tremper le gel 30 minutes, en couvrant d'un aluminium ou protéger de la lumière sous la chambre noire.
- On peut réutiliser le même bain au moins 2 fois au cours de la même journée (protéger la solution de la lumière)
- La lecture s'effectue sur le transilluminateur

Astuce : pour économiser du colorant ou si on ne dispose pas de petit récipient adapté au gel, après l'électrophorèse il suffit d'entourer le gel et son support d'un film étirable type parafilm pour l'étanchéifier les côtés ouverts puis on dépose 10 ml de solution additionnée de 2 µl gelgreen pendant 30 à 45 minutes à l'obscurité.

Kit PCR Transfert de gènes chloroplastiques (RuBisCo)



Le matériel

- 1 tube d'amorces (tube à pastille bleue ■)
- 1 tube PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte ■)
- 1 tube DNA release [bloqueur de réaction] (tube à pastille rouge ■)
- 1 tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ■) pour l'électrophorèse
- 1 tube tampon d'extraction (tube à pastille blanche ■)
- 2 micro-pilons pour l'extraction des végétaux
- 2 microtubes type Eppendorf 1,5 mL
- 2 microtubes PCR 0,2 mL
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Feutre à pointe fine
- Gants et blouse



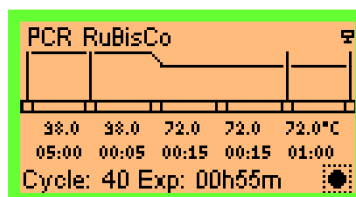
PHASE 1 : EXTRACTION et AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

- Allumer et programmer le thermocycleur
- Principe : une amplification PCR de 40 cycles

[ou utiliser le logiciel pour PC ou tablette]



Préparation des extraits végétaux

Préparer pour chaque extrait végétal, un tube 1,5 mL avec 100µL de tampon d'extraction (tube à pastille blanche ■) avec la micro-pipette 10-100 µL

Cellules non chlorophylliennes

- Racine de radis**
- Couper une tranche d'environ 1 à 2 mm d'épaisseur à la limite rouge/blanc de la racine tubérisée.
- Eliminer la peau du radis
- Dans cette tranche et plutôt sur le bord, prélever l'échantillon et le placer dans le tube Eppendorf « échantillon non-chlorophyllien ».

Méristème de Chou-fleur

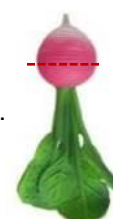
- Dans ce sommet floral, couper l'échantillon et le placer dans le tube Eppendorf « échantillon non-chlorophyllien ».

Cellules chlorophylliennes : feuilles

Sur un morceau de feuille bien verte non flétrie, découper l'échantillon au scalpel et le placer dans le tube Eppendorf « échantillon chlorophyllien ».



- Extraction du matériel génétique :
Avec le micro-pilon adapté et propre, écraser les tissus dans leurs tubes respectifs en pressant et en tournant. Faire la manœuvre autant de fois que nécessaire. Une fois les tissus écrasés, laisser les tubes sur la glace.

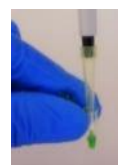




Préparation des tubes réactionnels PCR

Repérer les microtubes PCR pour identifier les échantillons et/ou l'expérimentateur.

- Dès que les extraits sont prêts, préparer les mélanges PCR Mix polymérase + amorces pour chaque tube :
 - 1.1 Prélever 20 μL du "PCR Mix polymérase" (■) et les placer dans le microtube PCR. Changer de pointe de micropipette.
 - 1.2 Prélever 20 μL du "Mix Amorces" (■) et les placer dans le microtube PCR. Mélanger par pipetage doux.
 - 1.3 Changer de pointe de micropipette
- Prélever dans les tubes Eppendorf 1 μL de chaque broyat et l'introduire dans le tube PCR correspondant. Mélanger par pipetage doux
- Placer les tubes dans le thermocycleur



Sélectionner le programme et lancer le programme (55 mn environ)



[Ecran thermocycleur : **Placer** le curseur sur ■ puis **appuyer** OK

→ ■ = cycle en cours]

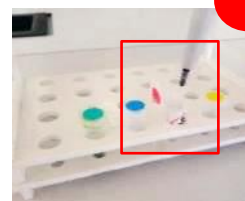
PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse

Préparation de l'ADN amplifié

- A faire pour chaque microtube : ouvrir délicatement le microtube et y ajouter 2 μL de la solution "DNA-Release" (tube à pastille ■) Mélanger par pipetage doux



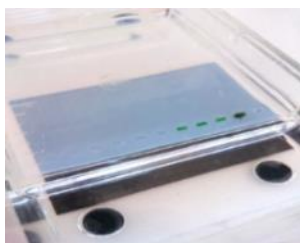
Préparation du dispositif pour électrophorèse

- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres

Dépôts et migration

Les puits sont situés du côté du pôle négatif (noir) de la cuve à électrophorèse

- Déposer 10 μL du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - ■)
- ADN amplifié : Déposer 10 μL d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)
- Poser le couvercle sur la cuve
- Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité. Allumer et régler.



Dépôt ADN

Un revêtement noir glissé sous la cuve, permet de mieux voir la position des puits



Lecture

- Utiliser le transilluminateur pour révéler les bandes d'ADN



Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France
métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE,
composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr



Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediatly to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France
Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr
International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr
SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux