

Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 233

Kit Détection d'OGM (électrophorèse d'ADN)

Français – p 1

Version : 3211

1 Introduction

L'objectif de cette activité expérimentale est de mettre en évidence par électrophorèse les segments ADN spécifiques du vecteur de transgénèse (plasmide), signature génétique des techniques utilisées pour créer des plantes OGM.

❖ Qu'est-ce qu'un organisme génétiquement modifié (OGM) ?

Définition

<https://www.ecologie.gouv.fr/organismes-genetiquement-modifies-ogm-0>

« L'acronyme OGM signifie : Organisme Génétiquement Modifié.

Sur le plan scientifique, il n'existe pas de définition unique, mais le terme est généralement associé à un organisme (animal, végétal, bactérie) qui a été modifié par des techniques de génie génétique. Ces techniques, réalisées en laboratoire, permettent d'ajouter de nouveaux gènes, ou de supprimer ou modifier des gènes déjà présents dans l'organisme, afin, généralement, de lui faire acquérir de nouvelles caractéristiques.

D'un point de vue réglementaire, les textes européens (et en particulier la directive européenne 2001/18/CE) définissent un OGM comme un « organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle ».

Le champ d'application des techniques OGM est large, allant de l'agriculture à l'industrie, en passant par le domaine médical. »

❖ Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de tailles différentes migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

2 Présentation du TP

L'électrophorèse va permettre de mettre en évidence la présence ou l'absence de matériel génétique étranger à l'aliment végétal testé. Ici le scénario propose de prendre le maïs comme plante de référence.

Les éléments étrangers recherchés sont :

- le promoteur CAMV 35S du virus de la mosaïque du chou
- le terminateur NOS 3' du gène de nopaline synthétase, gène issu d'*agrobacterium tumefaciens*

Ces 2 fragments spécifiques du vecteur de transgénèse (plasmide), sont caractéristiques des techniques de fabrication des OGM. Ils permettent au fragment exogène inséré dans le génome de la plante, d'être exprimé par la plante. On les retrouve dans plus de 85 % des plantes OGM produites par l'industrie agroalimentaire.

Il est possible par PCR d'amplifier ces fragments, faisant respectivement 203 pb et 225 pb. Les amplifications par PCR se font en simultané sur les 2 séquences. En raison de leurs tailles très similaires, leur visualisation sur le gel d'électrophorèse sera donc confondue.

Une plante OGM+ présentera une seule bande située entre 200 – 220 pb.

En complément de la recherche de séquences « OGM », on va contrôler l'intégrité de l'ADN extrait des aliments. Pour cela, on recherche un gène commun à toutes plantes supérieures, du complexe enzymatique PSII, présent dans le chloroplaste et qui participe à la photosynthèse. La présence de ce fragment d'ADN de 485 pb indique que l'ADN a correctement été extrait de l'échantillon alimentaire puis amplifié par PCR.

Que la plante soit OGM ou non OGM, l'extrait de l'ADN végétal de l'aliment testé, doit présenter une bande de 485 pb.

Les solutions ADN de ce kit, correspondent aux résultats (fictifs) de l'amplification par PCR de l'ADN extrait d'aliments végétaux à tester. **Les solutions d'ADN sont calibrées et ne nécessitent aucune préparation.**

Format 40 élèves (20 binômes) :
20 tests complets soit 80 dépôts à analyser

- 1 test correspond à :
- 1 dépôt Aliment 1 OGM +
- 1 dépôt Aliment 1 PSII
- 1 dépôt Aliment 2 OGM -
- 1 dépôt Aliment 2 PSII

+ 10 dépôts Echelle de poids moléculaire (jusqu'à 10 gels)
1 dépôt échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes
Dont migration électrophorèse : 20 minutes
Gel d'agarose à 2%

3 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

- Tube 1 Aliment 1 (ou témoin positif) OGM + 175 µL
- Tube 2 Aliment 1 (ou témoin positif) PSII 175 µL
- Tube 3 Aliment 2 OGM - 175 µL
- Tube 4 Aliment 2 PSII 175 µL
- • Marqueur de taille 90 µL
- Sachet de 10 microtubes

Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose
Tampon TAE
Colorant GelGreen

Réf. 107 646 : cette référence regroupe tous les consommables indispensables pour réaliser 10 mini gels d'agarose pour système compact avec fluorescence (Agarose 4 g / TAE 10 x 200 mL / colorant GelGreen 30 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

4 Mode opératoire

4.1 Préparation des solutions

❖ Préparation du tampon TAE 1X pour 1L :

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL (tampon migration).

Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger.

** En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TAE 1 X à préparer doit être adapté.*

Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 2% :

Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.

Peser 0,30 g d'agarose de type II dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.

Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète).

- S'assurer que la solution est parfaitement translucide
- Ajouter 2 µl de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erlenmeyer
- Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.

❖ Préparation de l'ADN

- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.
- Avant la séance, décongeler les tubes Eppendorf.

Idéalement décongeler les contenants environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis les plonger dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau et d'autre part d'éviter la nouvelle formation de bouts collés.

Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

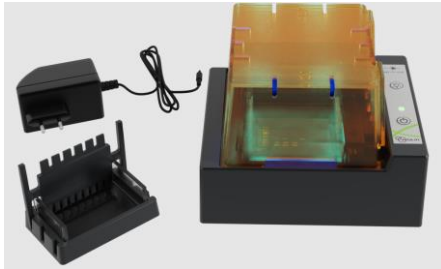
4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 µl d'ADN Tubes PCR à analyser
- 8 µl pour l'échelle de poids moléculaire

Durée de migration environ 20 minutes pour les systèmes compacts

phorEasy



Dispositif électrophorèse
Tout-en-un

5 Résultats et exploitations

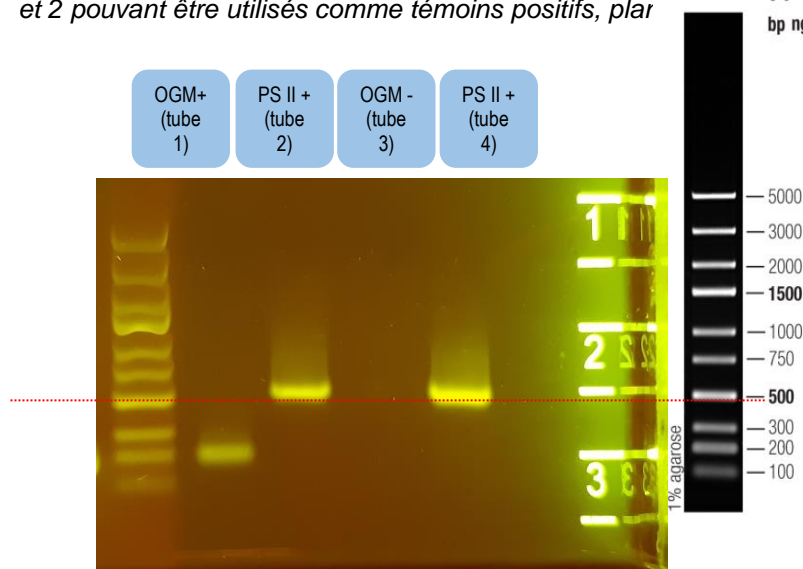
Contextualisation :

L'ADN a été extrait de 2 aliments du commerce à base de maïs.

A partir de ces échantillons, les deux fragments d'ADN marqueurs, PSII et OGM, ont été amplifiés.

La taille du fragment d'ADN amplifié indique la présence ou l'absence d'OGM dans les aliments.

[A partir des tubes fournis, il est possible de construire différents scénarii. Les tube 1 et 2 pouvant être utilisés comme témoins positifs, pour la détection d'OGM...]



Résultats :

Tube 1 et 2 : On observe une bande entre 200 et 225 pb sur l'échantillon extrait de l'aliment 1 et une bande à 485pb. L'ADN n'est pas dégradé et les éléments marqueurs d'un OGM sont bien visible dans l'aliment 1.

Tube 3 et 4 : On observe uniquement la bande à 485pb sur l'échantillon extrait de l'aliment 2. L'ADN n'est pas dégradé et les éléments marqueurs d'un OGM sont absents dans l'aliment 2.

L'aliment 1 contient du maïs OGM alors que l'aliment 2 n'en contient pas.

6 Assistance Technique

Support Technique au 09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé).