

Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 229

Kit Sensibilité au PTC (électrophorèse d'ADN)

Français – p 1

Version : 2211

1 Introduction

❖ Historique

En 1931, le chimiste Arthur Fox travaille sur le PhénylThioCarbamide (PTC), il constate que ce composé pour certaines personnes est très amer alors que lui-même ne sent rien.

Il est ainsi le premier à mettre en évidence la différence de sensibilité au PTC au sein de la population. Quelques années plus tard, une étude menée par Albert Blakeslee (PNAS, 1935) a montré que l'incapacité à sentir le PTC est un trait génétique récessif. Il est ainsi établi que la sensibilité au PTC dépend d'un gène à 2 allèles : un allèle dominant qui confère la sensibilité et un allèle récessif correspond au phénotype non sensible.

On estime que 75 % de la population est sensible à l'amertume du PTC, ce composé organique amer est présent dans certains végétaux comme le chou de Bruxelles ou le brocoli.

❖ Caractérisation de la sensibilité au PTC

L'objectif de ce TP est de proposer aux élèves d'établir la relation entre phénotype et génotype.

Le phénotype est caractérisé facilement à l'aide des bandelettes tests. Le génotype est déterminé par amplification génique d'une portion du gène TAS2R38 à partir de deux fragments d'ADN fournis :

- Un plasmide contient la version du gène TAS2R38 qui confère la sensibilité au PTC.
- Un plasmide contient la version du gène TAS2R38 qui confère la non sensibilité au PTC.

Le gène TAS2R38, localisé sur le chromosome 7, code pour le récepteur membranaire qui peut être sensible au PTC.

TAS2R38 est constitué d'un exon unique de 1002 paires de bases, la variation allélique entre individu repose sur la mutation de 3 nucléotides (SNP = Single Nucleotide Polymorphisme). L'amplification va permettre d'identifier un des 3 SNP, car ce polymorphisme correspond à un site de restriction.

3 SNPs en position :	Changement de nucléotide	Modification du codon	Acide aminé	Acide aminé
145	C par G	CCA -> GCA	Proline	Alanine
785	G par T	GCT -> GTT	Alanine	Valine
886	G par A	GTC -> ATC	Valine	Isoleucine
			PAV	AVI
			Combinaison d'un récepteur membranaire sensible à la PTC	Combinaison d'un récepteur membranaire non sensible à PTC

PAV / AVI sont les 2 allèles les plus communs et les majoritaires dans la population (75% / 25 %)

La PCR est suivie d'une digestion enzymatique par BsuRI et d'une séparation par électrophorèse.

❖ **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).

Le kit se présente sous la forme de solutions d'ADN prêt à déposer dans le gel : **les solutions d'ADN sont calibrées et ne nécessitent aucune préparation**. Ces solutions contiennent le tampon de charge et les colorants témoins de migration.

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

1 test correspond à :

- 1 dépôt PAV/PAV (8 µl)
- 1 dépôt AVI/AVI (8 µl)
- 1 dépôt PAV/AVI (8 µl)

+ 10 dépôts Echelle de poids moléculaire (jusqu'à 10 gels)

1 dépôt (8 µl) échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes

Dont migration électrophorèse : 15 - 20 minutes

2 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

- Tube 1 PAV/PAV 230 µL
- Tube 2 AVI/AVI 230 µL
- Tube 3 PAV/AVI 230 µL
- Marqueur de taille 90 µL

[Volume supplémentaire « Droit à l'erreur » : 20 dépôts de 8 µl par tube = 160 µl soit un 15 µl pour compenser les erreurs de pipetage]

Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose

Tampon TAE

Colorant

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 150mL / colorant GelGreen 33 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

3 Principe de l'expérience

Ce kit contient uniquement les produits d'amplification par PCR et de digestion par l'enzyme BsuRI comparables à ceux obtenus avec le kit PCR transfert de gènes chloroplastiques (réf. 117149).

Les résultats attendus sont :

- l'individu sensible homozygote PAV/PAV aura 1 bande correspondant aux fragments de 177 pb
- l'individu non sensible homozygote AVI/AVI un seul fragment de taille 221 pb
- l'individu sensible hétérozygote PAV/AVI aura 2 bandes correspondant aux fragments 177 pb et 221 pb

4 Mode opératoire

4.1 Préparation des solutions

❖ **Préparation du tampon TAE 1X :**

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL
- Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 1350 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 1X à préparer doit être adapté*

❖ **Préparation et coulage du gel d'agarose à 1,7 % (optimale) ou à 2 % :**

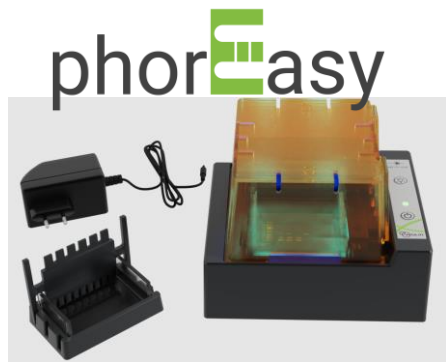
- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,25 g (1,7 %) ou 0,3 g (2 %) d'agarose dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (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.



Dispositif électrophorèse
Tout-en-un

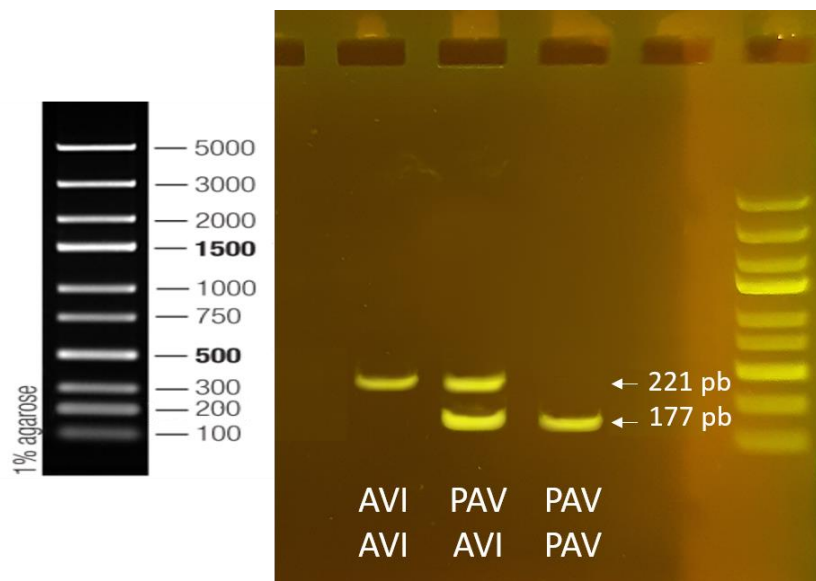
4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 µl d'ADN Tubes 1, 2 et 3 à déposer
- 8 µl pour l'échelle de poids moléculaire

Durée de migration environ 15-20 minutes pour les systèmes compacts

5 Résultats



- l'individu sensible homozygote PAV/PAV aura 1 bande correspondant aux fragments de 177 pb
- l'individu sensible hétérozygote PAV/AVI aura 2 bandes correspondant aux fragments 177 pb et 221 pb
- l'individu non sensible homozygote AVI/AVI un seul fragment de taille 221 pb

6 Assistance Technique

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique** au **09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé)**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

09 69 32 02 10*

** prix d'un appel local, non surtaxé*