

Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf : 117 231

Kit RuBisCO gènes RbcL RbcS (électrophorèse d'ADN)

Français – p 1

Version : 2211

1 Introduction

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...).

Les endosymbioses 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. »

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

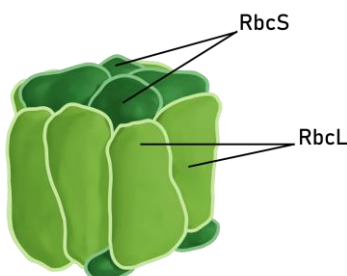
Ainsi les chloroplastes, tout comme les mitochondries :

- 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

Ces données indiquent également que ce génome est fortement réduit et que la plupart des protéines des organites sont codées dans le noyau. Les gènes de la bactérie endosymbiotique ont été transférés en grande partie dans le génome de la cellule eucaryote, ce qui constitue un exemple de transfert horizontal. C'est le cas de la RuBisCO, enzyme clé de la photosynthèse, impliquée dans la photorespiration au niveau du chloroplaste. Les gènes codant pour RuBisCo sont des vestiges du génome hérité d'une cyanobactérie endosymbiotique. Ceux-ci sont répartis dans le génome chloroplastique et dans le génome cellulaire.

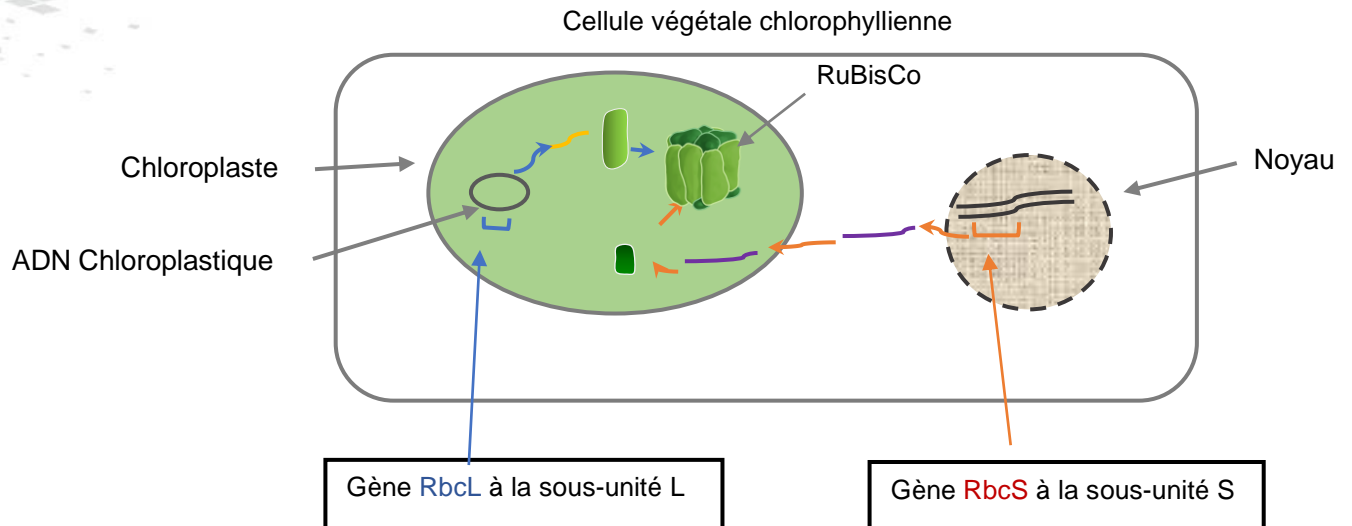
❖ Caractéristiques de la RuBisCo

- La RuBisCO comporte deux sous-unités :
 - une grande (L) codée par le génome chloroplastique
 - une petite (S), codée par le génome nucléaire



La RuBisCo est l'enzyme clé de la Photosynthèse :

- La RuBisCo, de son nom complet ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase, est la protéine la plus abondante dans la biomasse végétale et même dans la biomasse totale sur Terre
- Elle 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.



A travers ce TP, nous allons mettre en évidence, par amplification par PCR, une preuve de transfert de matériel génétique du génome chloroplastique vers le génome nucléaire de la cellule végétale.

❖ 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 feuille de radis (8 µl)
- 1 dépôt racine tubérisée de radis (8 µl)
- 1 dépôt feuille de choux fleur (8 µl)
- 1 dépôt méristème de choux fleur (8 µl)

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

1 dépôt (8µl) de l'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 pl1 (feuille radis) 175 µL
- tube 2 pl1 (racine radis) 175 µL
- tube 3 pl2 (feuille choux fleur) 175 µL
- tube 4 pl2 (méristème choux fleur) 175 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 10x 200 mL / colorant GelGreen 30 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

3 Principe de l'expérience

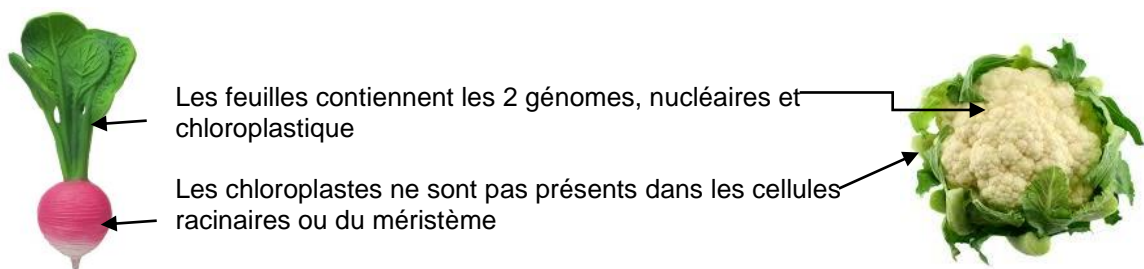
Ce kit contient uniquement les produits d'amplification par PCR comparables à ceux obtenus avec le kit PCR transfert de gènes chloroplastiques (réf. 117149).

L'étape d'amplification par PCR n'est pas l'objet du TP mais est indispensable pour la compréhension et l'interprétation des résultats. Un premier couple d'amorces va cibler une portion du gène RbcL et un second couple d'amorces va cibler une portion du gène RbcS.

Le résultat attendu est une amplification d'un fragment d'ADN de

- 1184 pb pour la sous-unité L (chloroplastique)
- 553 pb pour la sous-unité S (nucléaire)

La recherche PCR a été réalisée 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.



L'électrophorèse va révéler où se situent les gènes codant pour les deux sous-unités de la RuBisCo et valider l'hypothèse selon laquelle la présence de chloroplaste dans les cellules végétales résulte d'une endosymbiose ancestrale.

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 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 1X à préparer doit être adapté.*

❖ Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1% :

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,15 g 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.

4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une micropipette, déposer :

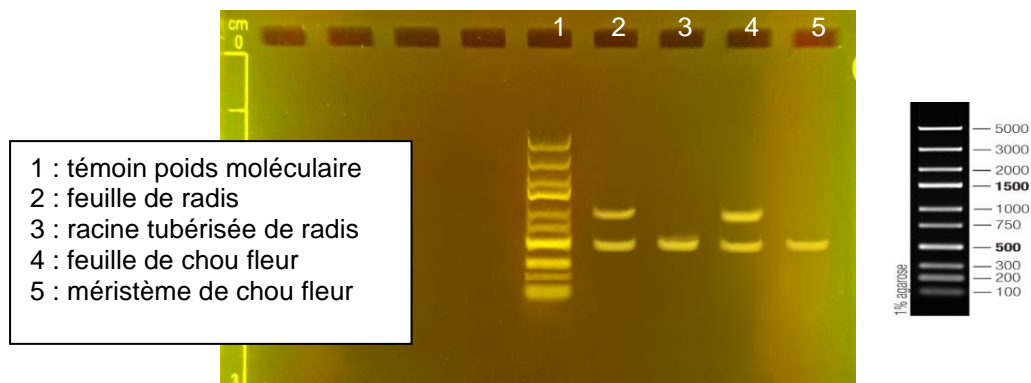
- 8 µL d'ADN de plantes (PCR) à déposer
- 8 µl pour l'échelle de poids moléculaire

Durée de migration environ 20 minutes pour les systèmes compacts



Dispositif électrophorèse
Tout-en-un

5 Résultats et exploitations



Résultats attendus :

- Fragments de 1184 pb correspondant à la portion du gène de la grande sous-unité L
- Fragments de 553 pb correspondant à la portion du gène de la petite sous-unité S

Les résultats 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 permet d'aborder 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.

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.

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*