

Génétique

Kit PCR sensibilité au PTC – élève

Réf :117 241

Français – p 1

Version : 2210

Kit PCR sensibilité au PTC – élève

1. Amplification par PCR

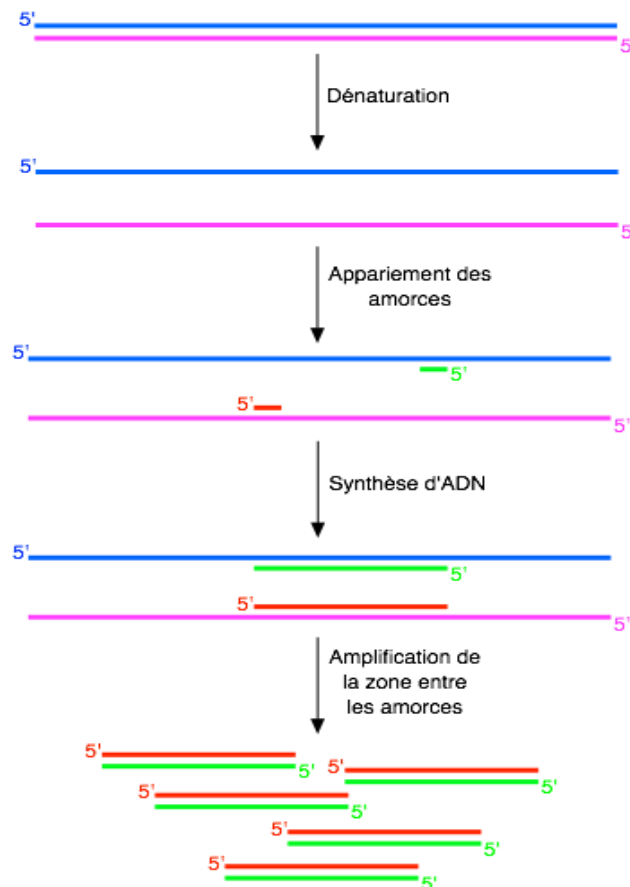
1.1 Principe générale d'une réaction PCR (Polymerase Chain Réaction)

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 appairer, 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

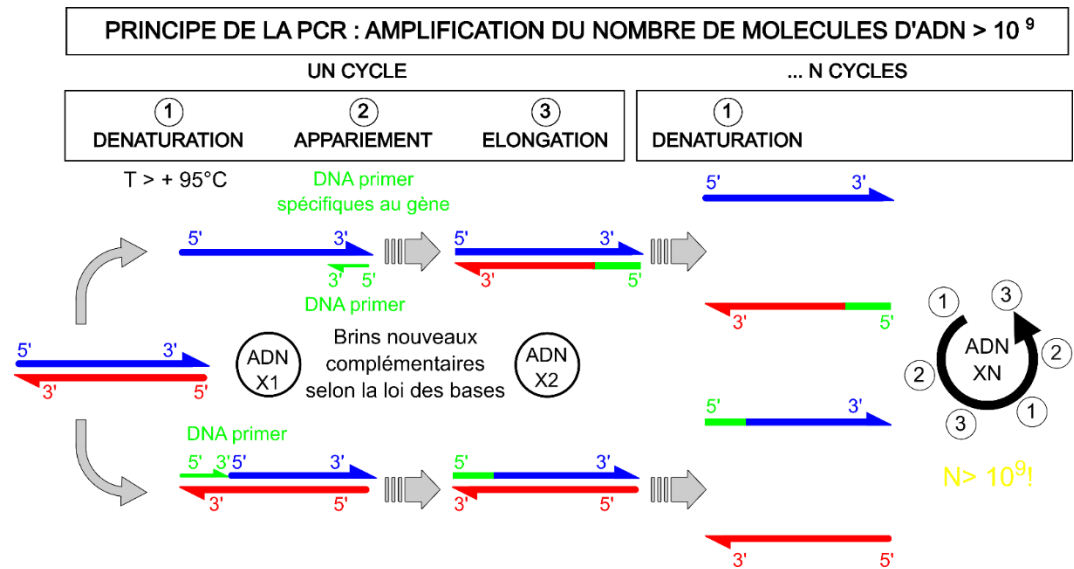
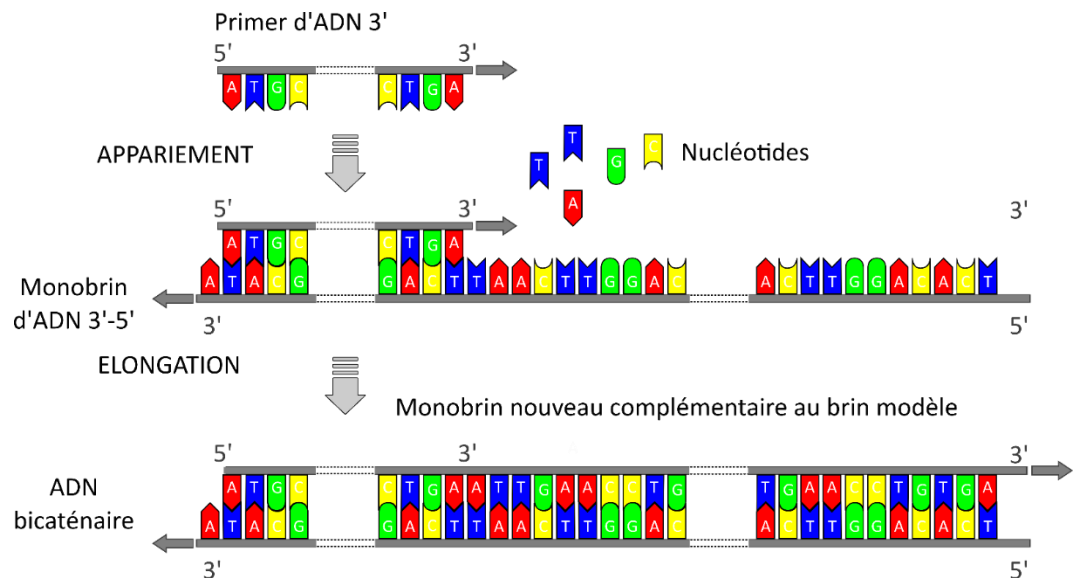


Figure 3



Primer = amorces

2. Sensibilité à l'amertume du PhénylThioCarbamide (PTC)

2.1 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.

2.2 Objectif de l'expérience

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 (plasmides bactériens) :

- 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 %)

Ce protocole inédit permet de réaliser l'expérience sur un véritable gène synthétique sans prélèvement sur l'humain.

Plusieurs scénarios s'offrent à vous !

Réalisez une amplification uniquement sur l'ADN sensible ou non sensible (homozygote) ou alors sur un mélange d'ADN sensible/non sensible (hétérozygote).

La PCR est suivie d'une digestion enzymatique par BsuRI*, après séparation par électrophorèse les résultats attendus sont :

- l'individu sensible homozygote PAV/ PAV aura deux bandes correspondant aux fragments de 177 pb/ 44 pb
- l'individu sensible hétérozygote PAV/ AVI aura trois bandes correspondant aux fragments 177 pb/ 44 pb/ 221 pb
- l'individu non sensible homozygote AVI/AVI un seul fragment de taille 221 pb

* Digestion enzymatique par BsuRI :

Une des amorces a été conçue pour apporter le site de restriction pour BsuRI en amont du nucléotide 145. Le site de restriction enzymatique est donc créé par la réaction PCR. Pour un individu sensible, la séquence 5'GGCC 3' va apparaître.

	143	144	145	146
Gène TASR38	A	G	C ou G	C

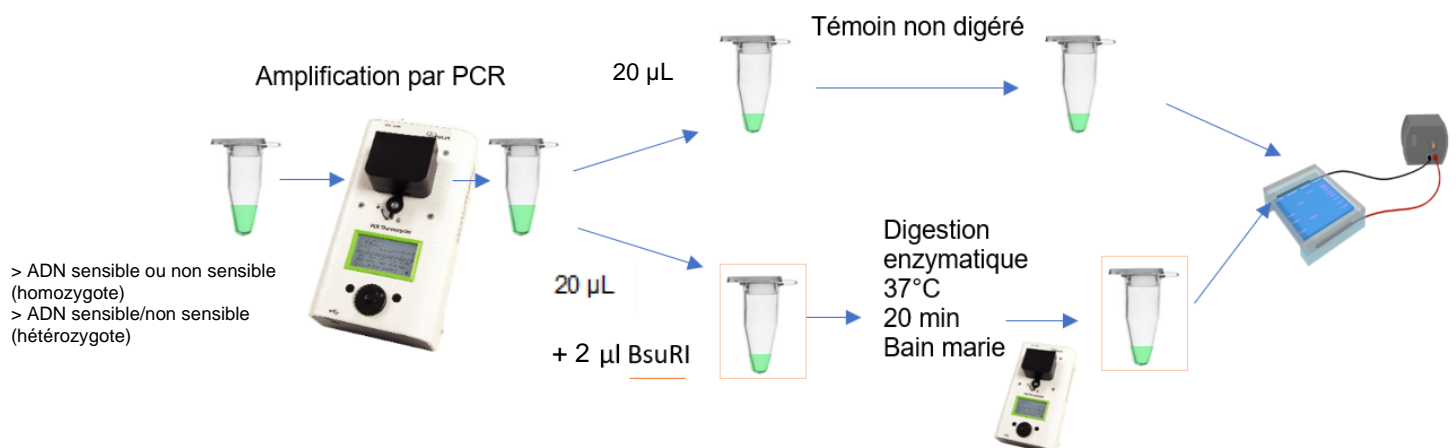
Modification apportée par l'amorce

Sensible PTC (PAV)	G	G	C	C	Reconnu par BsuRI
Non sensible PTC (AVI)	G	G	G	C	Non reconnu

3. Mise en œuvre d'une amplification

3.1 Principe général de l'expérience

- 1 - Détermination du phénotype à l'aide de bandelettes tests PTC
- 2 - Amplification par PCR à partir d'un des deux fragments d'ADN fournis (plasmides)
- 3 - Séparation de l'échantillon en 2 moitiés dans 2 tubes :
 - 1 tube témoin
 - 1 tube où l'on ajoute 2 µl l'enzyme BsuRI pour digestion par l'enzyme de restriction



L'enzyme de restriction est uniquement présent chez les individus sensibles à l'amertume de la PTC.

4 - **Résultats** : l'électrophorèse permet de comparer avant et après la digestion.

* Pour les sujets homozygote (AVI/AVI), les deux migrations (avant et après digestion) présentent le même profil soit une bande unique 221pb.

* Pour les sujets sensibles homozygote (PAV/PAV), les deux migrations (avant et après digestion) présentent deux profils différents :

- Avant digestion (référence) présente une bande unique bien visible à 221pb
- L'ADN digéré présente 2 bandes à 177 pb et 44 pb







* Pour les sujets sensibles hétérozygote (PAV/AVI), les deux migrations (avant et après digestion) présentent deux profils différents :

- Avant digestion (référence) présente une bande unique bien visible à 221pb
- L'ADN digéré présente 3 bandes à 221 pb, 177 pb et 44 pb

3.2 Le matériel pour 2x9 amplifications

Le format du kit est adapté pour 2 demi-classes. Les 18 réactions du kit sont réparties en 2 lots, soit 2 x 9 amplifications.

Le contenu du kit :

- 2 Tubes d'amorces PTC (tube à pastille bleue )
- 2 Tubes PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte )
- 1 Tube enzyme de restriction BsuRI (HaeIII), (tube à pastille rose  + E)
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ) pour l'électrophorèse
- 1 Tube ADN PTC sensible (tube à pastille rouge )
- 1 Tube ADN PTC non sensible (tube à pastille blanche )
- 4 x 10 microtubes PCR 0,2 mL



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

Les réactifs entamés peuvent également être remis à - 20°C, cependant pour les tubes d'amorces (pastille bleue) et pour les tubes de mix PCR (pastille verte) le risque de contamination (par DNase) est très important, si ces tubes sont restés ouverts longtemps, et/ou ont subi plusieurs prélèvements par pipetage.

Matériel complémentaire nécessaire :

Thermocycleur

Micropipette 2 – 20µl + cônes stériles

Gants

Feutre à pointe fine

Blouse

Centrifugeuse de paillasse, peut être utile pour la récupération des petits volumes au fond des tubes d'enzyme ou DNA release faible volume.

Système d'électrophorèse



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.

3.3 Mode opératoire

3.3.1 Paramétrage du thermocycleur

Allumer et programmer le thermocycleur

Principe : une amplification de 40 cycles (35 cycles pouvant être suffisant).

Etape	Action	Température	Temps
Initiation	Dénaturation	95°C	3 minutes
Cycle de base x 40	Dénaturation	95°C	5 secondes
	Hybridation (1)	64°C	15 secondes
	Polymérisation	72°C	25 secondes
Terminaison		72°C	1 minute
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

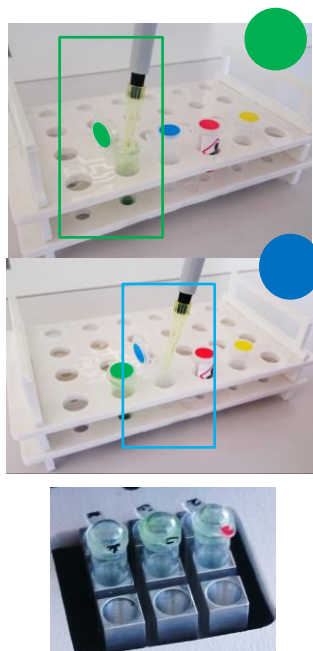
3.3.2 Préparation des tubes réactionnels et lancement de la PCR

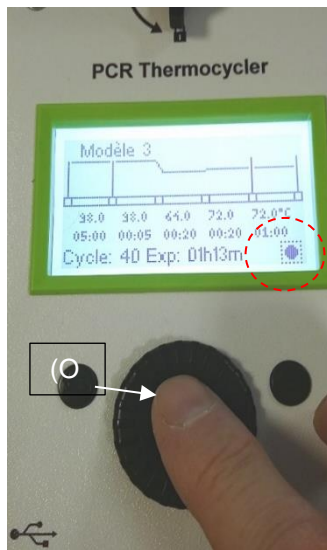
La manipulation est très simple, elle nécessite uniquement l'utilisation de micropipette et de cônes stériles.

Dans un microtube PCR 0.2mL, on prépare :



20µl de PCR mix + 20µl d'amorces PTC + 2 µl d'ADN sensible ou non sensible

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL
2. Prélever 20 µL du "PCR Master Mix" (vert) et les placer dans le microtube PCR.
3. Changer de pointe de micropipette.
4. Prélever 20 µL du "Primer Mix" (bleu) et les placer dans le microtube PCR.
5. Changer de pointe de micropipette.
6. Prélever 2 µL d'ADN (rouge ou blanche) et les placer dans le microtube PCR. Mélanger par pipetage doux.
7. Fermer le microtube PCR. On utilisera plutôt une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.
8. Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme





Thermocycleur didactique **Jeulin**,

- Sélectionner le programme Modèle 3 et modifier les paramètres du programme (voir 3.3.1)
- Placer le curseur sur  puis appuyer OK
→  =cycle en cours (1h08 environ)

En fin de cycle, les échantillons peuvent être maintenus plusieurs heures à une température de conservation < 8°C. Ainsi, la digestion enzymatique 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.

3.3.3 Digestion enzymatique

- Après l'amplification, chaque tube est séparé en 2.
- Prélever 20 µl et déposer dans un nouveau microtube PCR 0.2 ml, (le microtube est identifié).
- ➔ 1 tube va recevoir l'enzyme de restriction
- ➔ 1 tube est mis au réfrigérateur le temps de la digestion, il servira de témoin
- Prélever 2 µl d'enzyme BsuRI (HaeIII) déposer dans le microtube PCR, mélanger par pipetage doux.
- Placer le tube dans le thermocycleur,
- Sélectionner le programme « Bain marie » du thermocycleur (programme disponible uniquement sur les thermocycleurs 9 tubes / version 2019)
- Régler une plage de 20 min à 37°C



Astuce pour faciliter le pipetage de l'enzyme : le volume présent dans le tube est très faible, il est préférable de centrifuger au préalable ce tube à l'aide d'une petite centrifugeuse de paillasse.



Après digestion sortir les tubes et réaliser la préparation de l'électrophorèse (§4) ou si besoin l'électrophorèse peut donc se dérouler ultérieurement lors d'une autre séance.

Les tubes peuvent être stockés à – 18 °C plusieurs semaines, après décongélation des tubes procéder comme indiqué (§4).

4. Préparation du gel d'électrophorèse (A préparer avant l'expérimentation)

La méthode retenue ici est une électrophorèse en gel d'agarose à 2 % en tampon TAE 1X avec une révélation par fluorescence Gelgreen sur un système d'électrophorèse compact PhorEasy (708150) ou MiniOne.

[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	20 min	
Révélation : pré-coloration du gel (3µl gel green / 15 ml de gel)	10 min	Visualisation en temps réel

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 50 ml - Éprouvette de 200 ml - Fiole de 250 ml - Erlenmeyer 50 ml - Plaque de coulage de gel (inclus dans les système compact) 	<ul style="list-style-type: none"> - TAE 10X (20 ml) - Agarose (0,3 g) - Gelgreen (3 µl) - Marqueur de poids moléculaire (Microtube à pastille jaune - 8µl) - Produits de PCR (8 µl)

Préparation du tampon TAE 1X : (se conserve un jour au réfrigérateur)

* Dans une fiole de 250 ml :

- Verser 20 ml de TAE 10X dans la fiole
- Compléter la fiole avec 180 ml eau distillée jusqu'au trait de jauge (2 ml) (15 ml seront nécessaires pour réaliser le gel, les 185 ml restant pourront servir à la migration du gel dans la cuve).

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

(Peut être réalisé pendant, ou 1 ou 2 jours avant, la PCR. Le cas échéant, conserver au réfrigérateur dans un sachet hermétique)

Préparation et coloration du gel :

* Dans un erlenmeyer de 50 ml, verser :

- 15 ml de TAE 1X (mesurés à l'aide d'une éprouvette de 50 ml)
- 0,3 g d'agarose (pesés sur une balance à 0,01g)
- * Chauffer la solution en agitant régulièrement jusqu'à obtenir une solution transparente.
- * Laisser refroidir le gel dans l'erlenmeyer jusqu'à ce qu'il atteigne une température de 50°C - 60°C environ (2 à 3 min environ).
- Ajoutez 3 µl de gel green non dilué et remuer pour répartir la solution dans le gel

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 :

* Couler le gel à 50°C dans le support sur une épaisseur de 0,5 - 0.6 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 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 pré-coloré au Gelgreen peut être utilisé immédiatement ou être conservé 1 jour au réfrigérateur dans un sachet hermétique ou 1 ou 2 jours avant l'électrophorèse.

5. Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

5.1 Principe de l'électrophorèse

Pour chaque individu, nous avons 2 tubes (le témoin, le tube digéré par l'enzyme).

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans un gel d'agarose à 2 %.

L'ADN est chargé négativement par les groupements phosphates. Dans une cuve à électrophorèse, on place le gel d'agarose, les solutions d'ADN + marqueur de poids moléculaire sont déposées dans les puits.

L'ADN migre en fonction de son poids moléculaire : plus le fragment d'ADN est long plus il va migrer lentement, à l'inverse un fragment plus court se déplacera plus rapidement.

5.2 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 le haut de l'appareil
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres (environ 150 ml).

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 et 8 µl de marqueur de poids moléculaire.

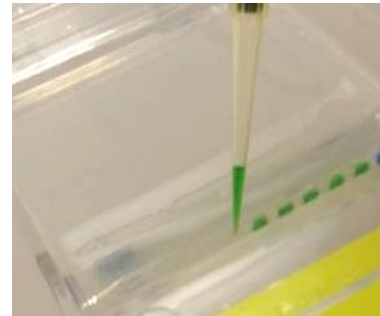
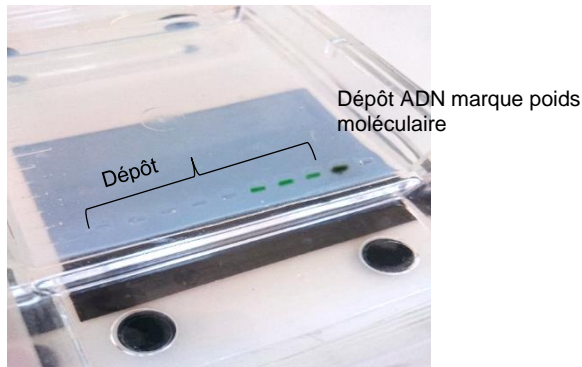
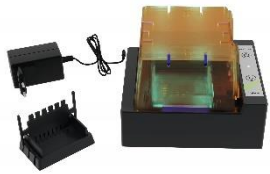
5.3 Dépôts et migration

PCR



- Déposer 8 μ l du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - **jaune**)
- ADN amplifié : Déposer 8 μ l 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 1ère butée du piston de la micropipette).



- Poser le couvercle (ou filtre orange) sur la cuve pour lancer la migration.
- Une fois le front de migration (visible grâce au colorant) arrivé aux 2/3 ou 3/4 du gel (environ 20 min), mettre le circuit hors tension pour stopper la migration et observer le gel. Le Gelgreen intégré à l'agarose va révéler par fluorescence les bandes d'ADN
- Avec le système d'électrophorèse compact PhorEasy ou MiniOne, la révélation est disponible en temps réel.

6. Résultats

Toutes les bandes fluorescentes correspondent à des fragments d'ADN de même taille, comme nous le montre le marqueur de poids moléculaires (PM).

Exemple de résultat :

