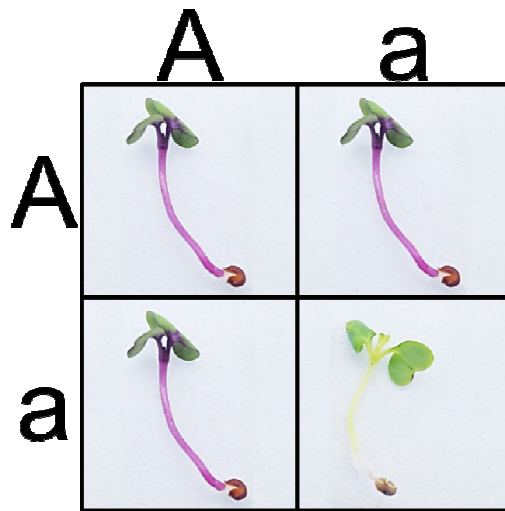


Traduction et adaptation de la notice de MINIPCR



A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :

Ouvrir le carton, ⚠ Placer les éléments suivants au congélateur à - 20°C ⚠

- Mélange miniPCR MASTER MIX 5X, Load-Ready™ comprenant :
 - La Taq polymérase
 - dNTP
 - Tampon PCR avec Mg2 +
 - Colorant de chargement sur gel
- Plant Genetics Lab Primers : Mix cotenant les amorces
- DPX DNA extraction buffer: tampon d'extraction de l'ADN
- 100 bp DNA Ladder, Load-Ready™ : marqueur de taille 100 pB avec bleu de charge

Les réactifs doivent être utilisés dans les 2 mois suivant leur réception.

Tous les composants de ce kit sont sans danger. Les règles de manipulations en kit s'appliquent toutefois (le port de gants, lunettes et blouse est conseillé). Tous les résidus peuvent être jetés à l'évier.

MATERIEL ET CONSOMMABLES NECESSAIRES

Graines FASTPLANT

Agarose 2 %

Tampon TBE 1X

Agent révélateur de l'ADN : **GELGREEN (2µL par gel)**

Thermocycleur MINIPCR ou autre marque

Cuve à électrophorèse d'ADN, idéalement BLUEGEL ou autre cuve avec transilluminateur pour une visualisation en temps réels de la migration

Micropipettes : 2-20 et 20-200 µL

1. Objectifs cognitifs

Les élèves testeront les génotypes à partir d'échantillons de plantes et associeront ces génotypes à un phénotype visible : une couleur de tige violette ou verte. Les enseignants peuvent utiliser ce kit comme une recherche autonome sur la génétique mendélienne ou comme point culminant d'un programme de sélection génétique mendélienne de *Brassica rapa* à cycle rapide.

- Techniques utilisées : Extraction d'ADN, PCR, électrophorèse sur gel et visualisation de l'ADN
- Temps nécessaire : Deux périodes de 45 minutes ou une seule séance de 120 minutes
- Réactifs nécessaires : kit de réactifs du kit, réactifs d'électrophorèse sur gel, semences Wisconsin Fast Plants® (non incluses) disponibles sous la référence FASTPLANT

2. Contexte et signification

Dans ce kit, les étudiants étudieront les bases génotypiques d'un phénotype observable en utilisant les *Brassica rapa* (RCBr) à cycle rapide, également connues sous le nom de marque Wisconsin Fast Plants®. Les plantes de type sauvage poussent avec une tige violette caractéristique, **que l'on observe le mieux dans les premiers jours suivant la germination.**

Cette couleur violette est due à la présence d'anthocyanine, un pigment végétal commun. Dans certaines plantes RCBr, cependant, une mutation perturbe la voie de production de l'anthocyanine et conduit à des tiges vertes sans couleur violette. Le gène responsable de la couleur violette par rapport à la couleur verte est appelé 'sans anthocyanine' parce que la forme mutante entraîne une diminution de la production du pigment anthocyanine.

Il existe deux allèles pour le gène sans anthocyanine :

- **A**, qui donne des tiges violettes,
- **a**, qui donne des tiges vertes.

Pour ce trait, la couleur violette (production d'anthocyanine) est dominante par rapport au vert (absence de production d'anthocyanine).

Pour cette raison :

- les homozygotes **AA** et les hétérozygotes **Aa** auront des tiges violettes,
- alors que seuls les homozygotes **aa** auront des tiges vertes.

Grâce aux techniques classiques de croisement, ces allèles peuvent être suivis sur plusieurs générations avec des résultats prévisibles. Dans ce kit, les élèves testeront le gène sans anthocyanine de différentes plantes pour détecter la présence de la mutation qui différencie les deux allèles. De cette façon, les élèves pourront relier directement le phénotype d'un organisme à son génotype.



A wild-type anthocyanin producing seedling beside an anthocyaninless aa homozygote

3. La génétique mendélienne devient moléculaire

En 1865, Gregor Mendel a décrit son travail en étudiant l'héritage dans les plants de pois. Son travail, à l'époque, a été largement négligé. Cependant, au tournant du XXe siècle, d'autres scientifiques étudiant l'héritage ont redécouvert les manuscrits de Mendel et la profondeur de ses découvertes a été reconnue. Les lois de la génétique mendélienne ont d'abord été observées dans les plants de pois, mais on a vite compris que ces lois s'appliquaient largement aux eucaryotes se reproduisant sexuellement en général. Non seulement Mendel a expliqué comment les traits sont transmis, mais ce faisant, il a fourni une base mécaniste pour de nombreux autres domaines de la biologie, en particulier l'évolution.

Les observations minutieuses de Mendel l'ont amené à proposer deux règles de base : la loi de la ségrégation et la loi de l'assortiment indépendant.

- La loi de la ségrégation stipule que pour tout gène, un individu possède deux copies, ou allèles. Lorsqu'un individu fabrique des gamètes (cellules sexuelles), chaque gamète ne contient qu'un seul des deux allèles. En d'autres termes, les allèles sont séparés en différents gamètes, et un seul de ces deux allèles sera transmis à chaque progéniture.
- La loi de l'assortiment indépendant stipule que la ségrégation des allèles responsables d'un trait se fera indépendamment de la ségrégation des autres allèles. En d'autres termes, chez les plants de pois, connaître l'allèle de la couleur de la fleur ne vous dira rien sur l'allèle de la couleur de la cosse du pois.

Les lois de Mendel et les techniques de croisement de base ont contribué à ouvrir le champ de la génétique dans de nombreux organismes. En croisant des organismes et en suivant les différents phénotypes de leur progéniture, les scientifiques ont pu créer des cartes génétiques des chromosomes environ 30 ans avant que l'ADN ne soit confirmé comme étant le matériel génétique. En d'autres termes, les gens avaient établi des cartes génétiques précises avant de savoir que c'était l'ADN qu'ils cartographiaient.

Aujourd'hui, nous savons que les lois de Mendel fonctionnent parce que ce qui est hérité, ce sont des séquences d'ADN sur les chromosomes. Nous savons que lorsque nous voyons un trait qui est hérité à la manière mendélienne, c'est parce qu'il y a un endroit physique dans l'ADN qui entraîne des différences entre les deux traits. En utilisant des techniques moléculaires, telles que la PCR et l'électrophorèse sur gel, nous pouvons scruter l'intérieur des phénotypes et des rapports mendéliens pour déterminer leur base moléculaire.

Par exemple, nous savons que la progéniture de deux hétérozygotes (la génération F2 d'un croisement monohybride) devrait donner un rapport phénotypique de 3:1 et un rapport génotypique de 1:2:1. Avec la sélection classique, nous pouvons observer les rapports phénotypiques 3:1 dans la descendance, mais maintenant avec les techniques moléculaires, nous pouvons aller plus loin, en déterminant les génotypes qui ont conduit à ce rapport 3:1.

4. L'anthocyanine

L'anthocyanine est un pigment végétal commun qui est généralement violet mais qui peut apparaître de rouge à violet ou bleu selon l'endroit où il se trouve. C'est la raison pour laquelle les myrtilles et le maïs bleu sont bleus, et les aubergines et le chou sont violets. Dans le *Brassica rapa* à cycle rapide, l'anthocyanine peut être observée dans les tiges des plantes, et elle est mieux observée dans les premiers jours après la germination.



Variétés d'aubergines Image courtesy of J. E. Fee

Lorsque la production d'anthocyanine est perturbée pour une raison quelconque, la couleur pourpre est absente. Les mutants classiques sont nommés d'après ce qui arrive à un phénotype lorsqu'un gène est muté. Quelque peu paradoxalement, cela conduit à nommer les gènes d'après ce qui se passe lorsqu'ils ne fonctionnent pas correctement.

Le gène 'sans anthocyanine' est nommé ainsi parce que, s'il subit une mutation, l'anthocyanine ne sera plus produite. Cela signifie que le rôle normal du gène sans anthocyanine est probablement dans une voie qui produit le pigment d'anthocyanine. Les gènes sont nommés ainsi en fonction de résultats observables parce que, historiquement, les phénotypes mutants étaient reconnus bien avant que la séquence d'ADN réelle responsable de ces traits ne puisse être identifiée. Ce n'est que plus récemment que les scientifiques ont pu faire correspondre la cause d'un phénotype à une cause moléculaire réelle.

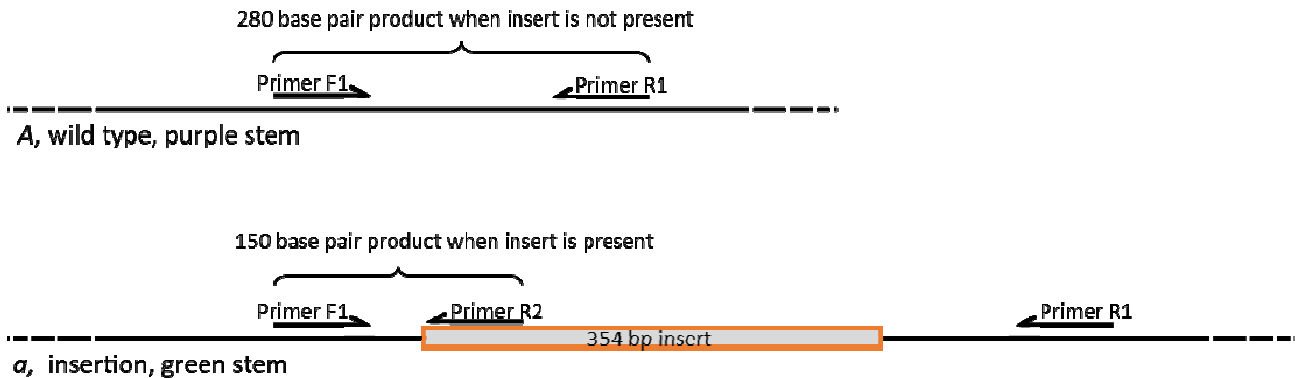
En 2016, les scientifiques ont identifié l'emplacement et la séquence génétique de l'absence d'anthocyanine, une séquence qui code pour l'enzyme dihydroflavonol 4-réductase, ou DFR . La DFR est une enzyme connue pour fonctionner dans la voie de production de l'anthocyanine et l'arrêt de la production de la protéine DFR conduirait presque certainement à la perte de la production d'anthocyanine.

Après avoir séquencé le gène DFR à partir de RCBv violet et non violet, les scientifiques ont identifié la présence d'une séquence de 354 paires de bases qui était présente dans l'allèle vert (**a**), mais absente de l'allèle violet (**A**). En analysant la séquence d'ADN, ils ont émis l'hypothèse que cette différence de 354 paires de bases est le résultat d'une insertion d'un élément transposable dans la séquence codante du gène DFR. Cette insertion introduit un codon stop prématuré dans la séquence codante du DFR, rendant la protéine résultante tronquée et non fonctionnelle.

Les traits mendéliens classiques font référence aux traits individuels causés par un seul gène avec des allèles dominants ou récessifs. En l'absence d'anthocyanine, cela s'explique par le fait qu'un allèle a été rendu complètement non fonctionnel, mais que la production d'anthocyanine peut être maintenue avec un seul allèle fonctionnel. Alors que la plupart des variations observables sont causées par des allèles qui sont hérités de manière mendélienne, il est assez rare que la variation naturelle soit due à un allèle produisant une forme non fonctionnelle de la protéine. La plupart des variations phénotypiques sont basées sur l'héritage de nombreux gènes comportant de multiples allèles et des interactions complexes entre eux. Par exemple, le DFR est l'un des nombreux gènes impliqués dans la production d'anthocyanine, et les modifications apportées à l'un d'entre eux ont le potentiel de modifier un phénotype lié à l'anthocyanine. Le lien entre le DFR et l'absence d'anthocyanine est un excellent modèle pour démontrer comment les allèles sont hérités et relier cet héritage aux changements réels de séquence sur le chromosome. Mais il ne faut pas oublier que la plupart des caractères ont des bases plus complexes que celles que l'on voit dans cet exemple.

Dans ce kit, vous utiliserez la PCR pour amplifier (faire des copies) la région spécifique de la séquence codante du DFR qui est responsable de la production des allèles sans anthocyanine violet (dominant) et vert (récessif). La réaction utilisera trois amorces, une amorce directe et deux amorces inverses différentes, pour déterminer si l'insertion qui perturbe le gène DFR est présente. La première amorce avant de ce modèle (F1) se liera aux deux allèles, que l'insertion sans anthocyanine soit présente ou non. Une amorce inverse (R1) se liera à 280 paires de bases en aval de l'amorce F1 dans l'allèle de type sauvage (A). Ensemble, ces amorces formeront un produit PCR de 280 paires de bases dans les plantes qui produisent le pigment anthocyanique. Une deuxième amorce inverse (R2) ne se liera que lorsque l'insertion est présente. Dans l'allèle vert (**a**), avec l'amorce F1, l'amorce R2 produira un fragment de 150 paires de bases. R2 ne se liera pas dans l'allèle violet (**A**) parce que l'insertion n'est pas présente, et donc

aucun produit de 150 paires de bases ne se formera. Pour être clair, les deux amorces R1 et R2 se lieront à l'allèle a, mais en raison des différences d'efficacité relative de la PCR dues à la taille et aux contraintes structurales de l'ADN, seul l'amplicon de 150 paires de bases sera produit.



Segment du gène DFR présentant des amorces conçues pour identifier les allèles spécifiques responsables des phénotypes violets ou verts 'sans anthocyanine'. Dans l'allèle DFR A (type sauvage), aucune insertion n'est présente et les amorces F1 et R1 produiront un produit d'environ 280 paires de base. Dans l'allèle DFR de type a (insertion), les amorces F1 et R2 produiront un produit d'environ 150 paires de base. L'amorce R1 se liera aux deux séquences, mais ne produira qu'un produit dans la séquence de DFR de type sauvage A.

Cette expérience comporte 5 étapes :

- A. Mise en culture des plantes
- B. Extraction de l'ADN
- C. Mise en place de la PCR
- D. Programmation et suivi du PCR
- E. Séparation des produits de la PCR par électrophorèse
- F. Détermination de la taille des produits PCR et interprétation

Ce kit est conçu pour être réalisé en deux périodes de 45 minutes. Un aperçu du plan expérimental est présenté ci-contre :

Activités préparatoires

Faire germer les graines


- 5 à 10 jours à l'avance

Distribuer les réactifs et préparer le matériel :

- 15 min

Manipulation

- A Extraction de l'ADN**
 - 20 min
- B Mise en place de la PCR**
 - 10 min
- C Programmation de la PCR**
 - 5 min de programmation
 - 10 min de suivi et discussion



STOP Point d'arrêt possible. Le *miniPCR* fonctionnera pendant environ 70-80 minutes. Conserver le produit PCR au réfrigérateur (jusqu'à 1 semaine) ou au congélateur (à plus long terme)

Préparation des gels

- 20 min

- D Electrophorèse**
 - 10 min de dépôts des échantillons
 - 25 min de migration
- E Observation et interprétation**
 - 5 min visualisation
 - 5 min discussion

A. Germination des semences

- Commencez à faire germer les graines une semaine avant de procéder à l'extraction de l'ADN. L'utilisation de plantules trop jeunes entraînera une diminution des performances de la PCR. La veille du TP, placer les plantules sous une forte intensité lumineuse (5 à 10 cm de distance de la lampe. Faites attention si vous utilisez des lampes qui chauffent à ne pas brûler les plantules)

B. Extraction de l'ADN et mise en place de la PCR (1 extraction + PCR par élève)

- Chaque binôme peut traiter deux échantillons de plantes, ou un échantillon de plantes et un contrôle négatif à blanc.
- Décongelez les tubes contenant le tampon DPX, le Master Mix EZ PCR et les amorces de kit de génétique végétale en les plaçant sur un portoir ou dans un bain-marie à température ambiante.
- Pour chaque binôme, étiqueter et distribuer dans des microtubes :
 - **Tampon DPX Tampon d'extraction d'ADN 100 µL**
 - **EZ PCR Master Mix, 5X 10 µL**
 - **Amorces de kit pour la génétique végétale 36 µL**
- Chaque binôme aura en outre besoin des fournitures suivantes :
 - Micropipettes, une pipette de 2 à 20 µl par groupe.
 - Si disponible, une pipette supplémentaire de 200 µl à utiliser pour l'étape d'extraction de l'ADN.
 - Des cônes de micropipette jetables et un petit gobelet ou une tasse pour les éliminer.
 - **4 tubes PCR** (microtubes de 200 µl) : 2 tubes pour l'extraction de l'ADN et 2 tubes supplémentaires pour la PCR.
 - Marqueur permanent (à pointe fine).
 - Dans le cadre du processus d'extraction, les tubes doivent être chauffés à 95° C :
 - Fournir aux groupes un accès à un thermocycleur miniPCR™ pour l'utilisation comme bloc chauffant.
 - Si vous n'utilisez pas miniPCR™, disposez d'un autre bloc chauffant ou d'un bain-marie et réglez-le à 95° C.

C. Programmation et surveillance de la PCR

- Veillez à ce que les paillasse soient équipées d'une machine miniPCR™ et d'une alimentation électrique.
- Assurez-vous que les machines miniPCR™ sont connectées à un ordinateur ou à un smartphone/tablette compatible.

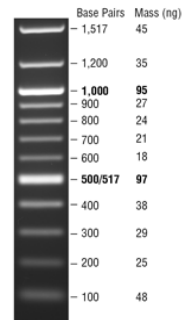
D. Électrophorèse sur gel

- Chaque binôme effectuera 2 dépôts sur un gel plus le marqueur de poids d'ADN.
- Les gels peuvent être coulés avant la deuxième séance
- Les gels pré-coulés peuvent être conservés dans un récipient scellé ou enveloppés dans du film plastique, et protégés de la lumière.
- Si le gel est utilisé un autre jour que la PCR, les tubes de réaction PCR terminés peuvent être conservés au réfrigérateur pendant une semaine au maximum jusqu'à leur utilisation, ou au congélateur pour une conservation à plus long terme.

E. Détermination de la taille et interprétation

- Ayez à portée de main le modèle de l'échelle d'ADN 100bp pour vous aider à interpréter les résultats de l'électrophorèse

Échelle d'ADN de 100 pb visualisée par coloration au bromure d'éthidium sur un gel d'agarose TAE à 1,3 %. Les valeurs de masse sont pour 0,5 µg/ligne. Source : Biolabs de la Nouvelle-Angleterre



I. Mise en culture

Les semences de tige non violettes F2 sont le produit d'un croisement entre deux hétérozygotes et devraient présenter les rapports phénotypiques 3:1 et génotypiques 1:2:1 mendéliens classiques. Les étudiants peuvent faire germer les graines et tester si le rapport 3:1 attendu entre les tiges violettes et vertes s'ensuit. Les élèves peuvent ensuite tester des plantes individuelles pour déterminer leur génotype. Toutes les plantes vertes devront être homozygotes pour l'allèle vert, tandis que les plantes à tige violette devraient se trouver dans un rapport de 1:2 entre les homozygotes et les hétérozygotes.

Dans ce kit, les élèves testeront probablement les génotypes de moins de plantes que celles qui ont germé. Si vous déterminez les rapports génotypiques pour voir s'ils sont conformes aux prédictions mendéliennes, il est important de choisir au hasard les plantes F2 que vous testez. Cela est particulièrement vrai si vous testez la signification statistique en utilisant le test du chi carré comme dans le lien de biologie AP.

1. Instructions de germination :

Il existe de nombreuses instructions de culture et de germination pour la culture en classe, et les enseignants peuvent utiliser l'approche qui leur convient le mieux. Nous avons choisi l'usage d'une mini-serre qui permet d'avoir une humidité constante et une bonne lumière, même en étant simplement placée devant une fenêtre.

Placez un papier absorbant dans une mini-serre. Ajoutez suffisamment d'eau pour qu'il soit uniformément humide, mais qu'il n'y ait pas d'excès d'eau dans le bac. Placez les graines sur une seule ligne en travers de l'essuie-tout, chacune étant séparée d'environ un demi-centimètre, à peu près au milieu du papier. La serre peut ensuite être placée devant une fenêtre (évités les fenêtres froides). La lumière n'est pas nécessaire à la germination, mais la couleur de la tige est plus prononcée chez les plantes qui ont été exposées à la lumière. Ainsi, il est recommandé de placer une lampe 5 à 10 cm au dessus de la serre 24H avant le TP.

L'ADN peut être extrait sept jours après le début de la germination par cette méthode. L'utilisation de tissus provenant de plantes trop jeunes aura une performance PCR réduite, probablement en raison des molécules inhibitrices présentes dans les tissus de la plante. Le phénotype s'observe dès 36H après la mise en culture.

	Nb de graines germées
Violettes	
Vertes	
Total	

Identifiez combien de plantes germées sont violettes et combien sont vertes et notez le nombre total de plantes qui présentent les phénotypes violet et vert dans votre classe.

II. Extraction de l'ADN

Remarque : l'ADN utilisable peut être extrait de nombreux tissus végétaux différents en utilisant la procédure de base suivante. Nous recommandons d'utiliser des tissus foliaires, soit du cotylédon des semis, soit des tissus foliaires matures s'ils sont présents. Si vous utilisez des plantules, attendez au moins 5 jours après le début de la germination avant d'extraire l'ADN pour obtenir les meilleurs résultats de PCR.

1. Choisissez deux plantes que votre binôme va génotyper. Votre professeur vous indiquera les plantes à choisir. Si vous testez l'adhésion aux rapports mendéliens prévus, il est important de choisir les plantes au hasard.

- Notez le phénotype de l'échantillon de plantes que vous testez (violet ou vert.)

- Notez toutes les autres informations que vous connaissez sur l'échantillon de plantes selon les instructions de votre enseignant. Par exemple, s'agit-il d'une plante de reproduction pure, d'une plante F2

Echantillon	Phénotype	Commentaire
1		
2		
3		
4 (témoin)		

2. Étiqueter quatre tubes PCR à paroi mince de 200 µl par groupe de kit sur le côté, et non sur le bouchon, du tube

- Étiquetez les tubes 1-2 pour qu'ils correspondent à vos échantillons de plantes.

- Étiquetez également chaque tube en inscrivant le nom du groupe sur la paroi latérale.

3. Ajoutez 50 µl de tampon DPX à chaque tube

4. Utilisez des tubes PCR numérotés pour recueillir une partie de la feuille

- Pour éviter toute contamination, essayez de ne pas toucher la partie de la plante que vous utiliserez pour votre échantillon d'ADN.

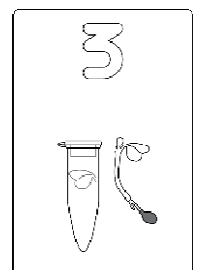
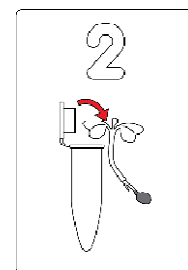
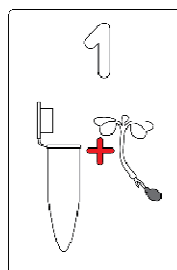
- Tenez la plante de manière à ce que la feuille soit au-dessus de l'ouverture de votre tube.

- Fermez le bouchon du tube, en utilisant le bouchon comme un poinçon pour couper un échantillon de la plante.

- Une fois le tube fermé, jetez tout tissu végétal qui ne se trouve pas dans le tube.

- L'échantillon de plante restant dans le tube sera utilisé pour isoler l'ADN.

- Si vous utilisez des plantes matures, fermez le tube sur une feuille mature en utilisant le bouchon comme poinçon.



5. Ouvrez soigneusement le tube pour éviter de perdre l'échantillon de plante puis utilisez une pince à embouts fins pour broyer les tissus végétaux pour l'extraction de l'ADN dans la solution tampon DPX afin de briser les parois cellulaires.

- Les tissus doivent être clairement brisés, laissant la solution verdâtre et/ou trouble.
- bien nettoyer la pince entre chaque tube afin d'éviter toute contamination.

6. Boucher hermétiquement les tubes de 200 µl contenant le tampon DPX et l'échantillon de plante macéré

- Veillez à ce que les fragments de plantes soient bien mélangés dans le tampon DPX.
- Évitez de toucher l'intérieur des bouchons des tubes PCR pour éviter la contamination.

7. Incuber l'échantillon de plante macéré dans le tampon DPX pendant 10 minutes à 95°C

- Utilisez un appareil MINIPCR en mode Bloc thermique, ou utilisez un bloc thermique ou un bain-marie à 95°C.

8. Après 10 minutes, retirez les tubes de la chaleur

- **Cette solution est votre extrait d'ADN.**

- L'extrait d'ADN peut être conservé congelé pendant au moins deux semaines.

III. Mise en place de la PCR

1. Identifiez 2 tubes PCR propres de 200 µl à paroi mince par binôme sur la paroi latérale : notez les initiales + le numéro du tube (1-2) pour qu'ils correspondent à votre extrait d'ADN.

2. Ajoutez les réactifs PCR à chaque tube PCR de 200 µl

	Tube 1	Tube 2
Plant Lab Primers	18 µL	18 µL
EZ PCR Master Mix	5 µL	5 µL



Utilisez une micropipette pour ajouter chacun des réactifs.

N'oubliez pas de changer de cône à chaque étape !

3. Déposez les échantillons d'ADN dans chaque tube, en utilisant un embout propre pour chaque échantillon



Ajoutez 2 µl d'extrait d'ADN en évitant les grosses particules de plantes, car celles-ci boucheraient le cône de votre pipette. En cas de colmatage, pipeter de haut en bas pour déboucher.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
Template DNA	2	2	2	2
FINAL VOLUME	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

4. Boucher les tubes

- Assurez-vous que tout le volume de liquide s'accumule au fond du tube.
- **Si nécessaire, faites tourner les tubes brièvement à l'aide d'une microcentrifugeuse.**

5. Placez les tubes à l'intérieur de l'appareil de PCR

- Appuyez fermement sur les bouchons des tubes pour assurer un ajustement serré.
- Fermez le couvercle de l'appareil PCR et serrez doucement le couvercle.

IV. Programmation et surveillance de la PCR (illustrée à l'aide du logiciel MINIPCR)

1. Ouvrez l'application logicielle miniPCR et restez sur l'onglet "Bibliothèque".
2. Cliquez sur le bouton dans le coin supérieur droit.
3. Sélectionnez le PCR dans le menu déroulant du haut.
4. Entrez un nom pour le protocole ; par exemple, "Groupe 1 - Kit MENDEL".
5. Saisissez les paramètres du protocole PCR :

- Dénaturation initiale 94°C, 60 sec

- Dénaturation 94°C, 15 sec

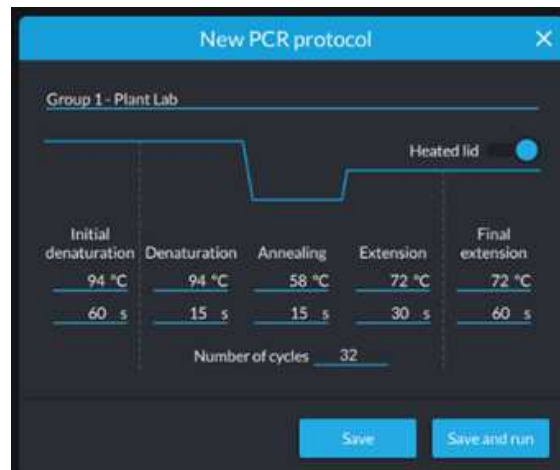
- Recuit 58°C, 15 sec

- Extension 72°C, 30 sec

- Nombre de cycles 32

- Extension finale 72°C, 60 sec

- Couvercle chauffant ON



6. Cliquez sur "Save" pour enregistrer le protocole ou sur "Save and Run" pour lancer le protocole.
7. Si vous y êtes invité, choisissez le numéro de série du miniPCR que vous utilisez dans la liste.
- Le numéro de série se trouve sur l'autocollant blanc sous l'interrupteur.
8. Assurez-vous que l'interrupteur d'alimentation à l'arrière du miniPCR est en position ON.
9. Pour surveiller la réaction de la PCR en temps réel, choisissez l'onglet "Now running" sur la gauche ("Monitor" sur un smartphone ou une tablette.) Si plusieurs miniPCR sont connectés au même appareil, choisissez la machine que vous souhaitez surveiller à l'aide des onglets en haut de la fenêtre.
Le logiciel miniPCR™ permet à chaque groupe de kit de surveiller les paramètres de réaction en temps réel et d'exporter les données de réaction pour analyse sous forme de feuille de calcul.

Une fois la PCR terminée (environ 70-80 min), l'écran s'affiche :

"Status : Terminé". Toutes les LED de la machine miniPCR s'allument.

Vous pouvez maintenant ouvrir le couvercle du miniPCR et retirer vos tubes PCR.

o Faites attention en ouvrant le miniPCR, le couvercle et le bloc chauffant peuvent être encore chauds

Les produits PCR peuvent être conservés jusqu'à une semaine au réfrigérateur ou un an au congélateur.

V. Électrophorèse sur gel - préparation des gels d'agarose (Activité préparatoire)

-Si le kit doit être achevé en une seule séance de temps, des gels d'agarose doivent être préparés pendant l'analyse PCR pour permettre aux gels de se solidifier.

-Si le kit doit être réalisé en deux périodes, les gels peuvent être préparés jusqu'à un jour avant la deuxième période et stockés couverts dans un film plastique ou dans un sac à fermeture éclair, à l'abri de la lumière.

1. Préparer un plateau de coulée de gel d'agarose propre et sec
 - Placez un peigne de formation de puits au sommet du gel (5 voies ou plus).
2. Pour chaque binôme, préparez un gel d'agarose à 2 % en utilisant un tampon d'électrophorèse
 - Par exemple, ajoutez 0,4 g d'agarose à 20 ml de tampon TBE (pour blueGel™).
 - Mélangez les réactifs dans un flacon de verre ou un bécher et faites tourner pour mélanger.
 - Ajustez les volumes et les poids en fonction de la taille de votre plateau de gel.
 - Mélangez les réactifs dans un flacon de verre ou un bécher et faites tourner pour mélanger.
3. Chauffez le mélange à l'aide d'un micro-ondes ou d'une plaque chauffante.
 - Chauffer jusqu'à ce que la poudre d'agarose soit dissoute et que la solution devienne claire.
 - Faites attention, car le mélange a tendance à faire des bulles sur le dessus et est très chaud.
4. Laissez la solution d'agarose refroidir pendant environ 2-3 min à température ambiante.
 - Faites tourner le flacon par intermittence.
5. Ajoutez le colorant de coloration du gel (par exemple GelGreen™).
 - Suivre les instructions du fabricant du colorant.
 - Par exemple, 2 µl de GelGreen 10 000 X par 20 ml de gel d'agarose.
6. Versez la solution d'agarose dans le plateau de coulée du gel à l'aide d'un peigne.
7. Laissez le gel se solidifier complètement (jusqu'à ce qu'il soit ferme au toucher) et retirez le peigne.
 - En général, ~10 minutes pour les gels blueGel™.

VI. Électrophorèse du gel

1. Placer le gel dans la chambre d'électrophorèse et le recouvrir d'un **tampon TBE 1X**.
 - Ajoutez juste assez de tampon pour remplir les puits aux deux extrémités du gel et pour couvrir à peine le gel.
2. Assurez-vous que le gel est complètement submergé dans le tampon d'électrophorèse.
 - Assurez-vous qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits (secouez doucement le gel si des bulles doivent être délogées).
3. Chargez les échantillons d'ADN sur le gel dans l'ordre suivant
 - Voie 1 : échelle d'ADN de 7 µL.
 - Voie 2 : 15µL de produit PCR du tube 1 (ou deux dépôts de 12 µL, ce qui permet de s'entraîner au geste)
 - Voie 3 : 15µL de produit PCR du tube 2 (ou deux dépôts de 12 µL)
 - Voie 4 : 15µL de produit PCR provenant du tube 1 d'un autre binôme.
 - Voie 5 : 15µL de produit PCR provenant du tube 2 d'un autre binôme.

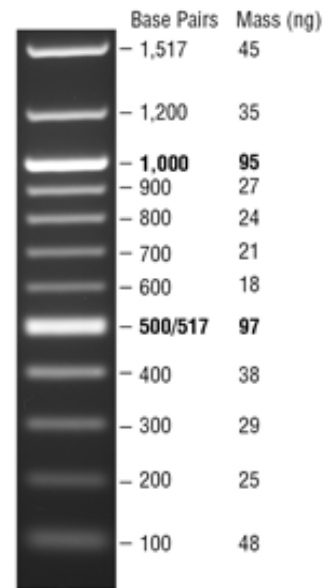
Note : il n'est pas nécessaire d'ajouter de colorant de chargement de gel à vos échantillons.

Le miniPCR EZ PCR Master Mix et l'échelle d'ADN 100 bp sont livrés pré-mélangés avec le colorant de chargement, et prêt à être chargés sur votre gel.

4. Placez le couvercle sur la boîte d'électrophorèse sur gel.
5. **Faire migrer pendant environ 25 minutes, ou jusqu'à ce que le colorant ait atteint au moins la moitié de la longueur du gel.**
 - Vérifiez que de petites bulles se forment près des bornes dans la boîte.
 - Un temps d'électrophorèse plus long permet d'obtenir une meilleure résolution de la taille.
 - Des tensions plus faibles entraînent des temps d'électrophorèse plus longs.

VII. Détermination de la taille et interprétation

1. Allumez l'illuminateur de lumière bleue blueGel™.
- Ou placez le gel sur un transilluminateur si vous n'utilisez pas blueGel™.
2. Vérifiez la présence de produit PCR.
3. Assurez-vous que la résolution de la bande d'ADN est suffisante dans la plage 100-300 pb de l'échelle d'ADN de 100 pb.
- Faites tourner le gel plus longtemps si nécessaire pour augmenter la résolution.
- L'échelle d'ADN devrait ressembler à peu près à celle illustrée.



Échelle d'ADN de 100 pb visualisée par coloration au bromure d'éthidium sur un gel d'agarose TAE à 1,3 %.

Source : Biolabs de la Nouvelle-Angleterre

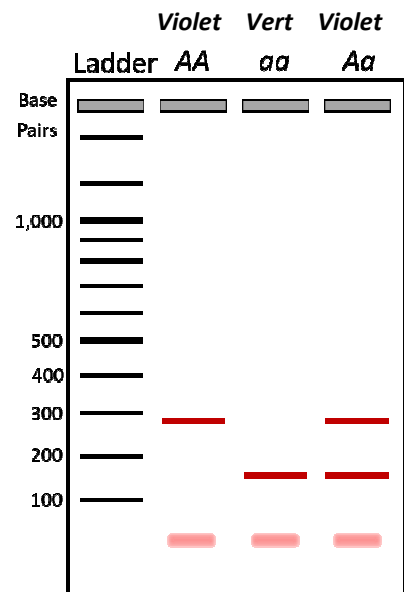
4. Documenter la taille des fragments d'ADN amplifiés par PCR en comparant les produits de la PCR au marqueur de référence de poids moléculaire (échelle d'ADN de 100 pb).
- Capturez une image à l'aide d'un appareil photo.

VIII. Résultats expérimentaux escomptés

Cette image schématique montre des résultats idéalisés de résultats expérimentaux possibles :

- bande 280 : Produit de l'amplification du type sauvage, allèle A violet.
- Bande 150 : Produit de l'amplification des mutants, non violet, un allèle.
- Bande <100 : dimère d'amorce.

Amplification non spécifique, résultant du recuit des amorces entre elles.



Remarque importante : vous pouvez remarquer des bandes faibles supplémentaires d'environ 260 paires de bases, en particulier chez les plantes vertes homozygotes **aa**. D'autres bandes faibles de plus de 300 paires de base peuvent également être visibles. Ces bandes faibles sont le produit d'un amorçage non spécifique, ce qui n'est pas rare en PCR lorsque l'on utilise plus de deux amorces et/ou lorsque l'on amplifie des régions à structure séquentielle complexe, comme l'allèle récessif ciblé dans cette expérience.

Ces bandes représentent l'amplification de séquences non ciblées et peuvent être ignorées aux fins de l'interprétation des génotypes.

Questions d'étude

Questions avant la mise en place de l'expérimentation

1. Quels sont les deux allèles que nous utilisons pour étudier les lois de Mendel dans cette expérience ? Veuillez les décrire de manière phénotypique.
2. Dans ce kit, nous suivons l'héritage de deux allèles du même gène à travers différentes générations. S'agit-il d'une meilleure étude de la loi de l'assortiment indépendant ou de la loi de la ségrégation ? Expliquez.
3. Dans les organismes utilisés pour la génétique, il arrive très souvent que les gènes se retrouvent avec deux noms. Des noms comme "sans anthocyanine" reflètent le phénotype mutant, tandis que des noms comme "DFR" font référence à la protéine produite par le gène. Pourquoi ne pas n'avoir qu'un seul nom ?
4. Si les phénotypes sont causés par des génotypes, pouvez-vous expliquer pourquoi les rapports génotypiques et phénotypiques des traits mendéliens sont différents ? Comment se fait-il qu'un rapport phénotypique de 3:1 puisse être causé par un rapport génotypique de 1:2:1 ?
5. Ce kit démontre comment le gène sans anthocyanine affecte la couleur de la tige chez *Brassica rapa* . Pensez à un autre trait qui vous est familier, par exemple la taille humaine. De quelle manière pensez-vous que l'absence d'anthocyanine est un bon modèle pour étudier l'héritage des phénotypes ? En quoi ne serait-il pas le meilleur modèle ?

Annexe 1: Exploration de la mutation sans anthocyanine

Dans le *Brassica rapa* à cycle rapide, l'absence de production d'anthocyanine est due à la forme récessive du gène sans anthocyanine. Cette caractéristique est due au fait que le gène sans anthocyanine code pour l'enzyme dihydroflavonol 4-réductase, ou DFR, une enzyme centrale dans la production d'anthocyanine. Dans l'allèle a, la version de la protéine produite par la cellule est non fonctionnelle.

La DFR est une protéine de 385 acides aminés et la séquence d'ADN qui code pour la DFR est divisée en six exons. La différence entre l'allèle A et un allèle sans anthocyanine réside dans l'exon 4 - dans l'allèle a, l'exon 4 est plus long de 354 paires de bases que dans l'allèle A. Dans ces 354 paires de base supplémentaires se trouve un codon stop, qui met prématurément fin à la traduction, rendant la protéine non fonctionnelle.

Ces 354 paires de base supplémentaires portent les marques d'un événement d'insertion d'élément transposable. Les éléments transposables, également appelés transposons, sont des séquences d'ADN qui semblent n'exister que pour s'enrichir dans le génome, et sont parfois considérés comme des "parasites génétiques". Il existe plusieurs variantes du fonctionnement des éléments transposables, mais le principe de base est le suivant : un élément transposable est une séquence d'ADN présente dans un génome qui, de temps en temps, va se copier ou se couper du génome, et cette copie ou cet ADN excisé sera ensuite inséré ailleurs dans le génome. La capacité de ces séquences d'ADN à se déplacer d'un endroit à l'autre du génome leur a valu d'être surnommées "gènes sauteurs". Ce mouvement de l'ADN est très rare chez un individu ; il est peu probable que les éléments transposables chez vous aient bougé au cours de votre vie. Mais sur des périodes de plusieurs générations, leur mouvement est assez régulier. Au fil du temps, leur mouvement et leur copie les font se propager, occupant une part de plus en plus importante du génome. On estime qu'environ 45 % du génome humain est constitué d'éléments transposables ou d'éléments transposables comme les répétitions, dont la plupart sont aujourd'hui inactifs.

Lorsque des éléments transposables s'insèrent dans un segment d'ADN, ils laissent un signe révélateur, une répétition directe à chaque extrémité de l'insertion. À une extrémité de l'insertion se trouve un segment d'ADN qui était présent avant l'insertion, et à l'autre extrémité se trouve exactement la même séquence répétée à nouveau. Dans l'allèle a sans anthocyanine, il y a des séquences identiques de 10 pb séparées par 344 paires de bases. Ces 10 paires de bases sont présentes dans l'allèle A, mais une seule fois, et les 344 paires de bases entre elles ne sont pas du tout présentes - exactement ce qui est attendu si un élément transposable s'est inséré dans le gène.

Comme les éléments transposables font des copies et se propagent dans les génomes au fil du temps, on s'attendrait à trouver de nombreuses copies de cet élément transposable présumé dans tout le génome de *Brassica rapa*, ce qui montre l'historique de ses transpositions. Mais lorsque les scientifiques ont cherché, il n'y avait pas de séquence de 344 paires de bases aussi commune. En revanche, en l'absence d'anthocyanine, les 340 paires de bases du milieu des 344 paires de bases présentent un schéma inhabituel ; il s'agit d'une répétition inversée parfaite. En d'autres termes, la séquence des 170 premières paires de bases est exactement la même que celle des 170 secondes paires de bases, mais orientée dans la direction opposée. Lorsque les scientifiques ont cherché une séquence de 170 paires de bases qui correspondait à la moitié de la répétition inversée, ils ont trouvé ce qu'ils cherchaient - elle était présente plus de 100 fois dans le génome de *Brassica rapa*. L'hypothèse est que cette répétition de 170 paires de bases représente l'élément transposable. Dans le cas particulier de l'absence d'anthocyanine, un événement rare s'est produit qui a fait qu'elle a été fondamentalement insérée deux fois dos à dos dans des orientations opposées. On ignore comment ou pourquoi cela s'est produit.

Les séquences de ce type sont appelées palindromes. Un palindrome est un mot ou une phrase qui se lit dans les deux sens, comme "Madame, je suis Adam". En génétique, une séquence palindromique se lit de la même manière lorsque chaque brin d'ADN est lu dans le sens 5' à 3'. Les séquences palindromiques sont importantes pour différents

processus biologiques. Les enzymes de restriction reconnaissent généralement les séquences palindromiques. Des séquences palindromiques plus longues peuvent être à la base de structures secondaires dans les acides nucléiques, comme vous le verrez dans les questions suivantes.

Lorsqu'un élément transposable s'insère dans le génome, il peut avoir différents effets. S'il atterrit dans une région non codante, l'élément nouvellement inséré peut n'avoir aucun effet sur le phénotype global de l'organisme. S'il s'insère dans une région codante, comme cela s'est produit avec les éléments sans anthocyanine, il peut perturber la fonction de ce gène. L'insertion dans des régions régulatrices de l'ADN peut avoir des effets plus subtils. Et dans certains cas, si l'élément inséré se transpose à nouveau, la fonction peut revenir. Les transposons peuvent eux-mêmes subir une mutation, les rendant incapables de transposer à nouveau, laissant les séquences du génome à transmettre comme n'importe quel autre ADN. Et bien qu'elles soient souvent considérées comme des déchets ou des parasites, certaines séquences d'éléments transposables ont clairement été conservées sur des centaines de mètres.

La structure de la mutation sans anthocyanine : Questions

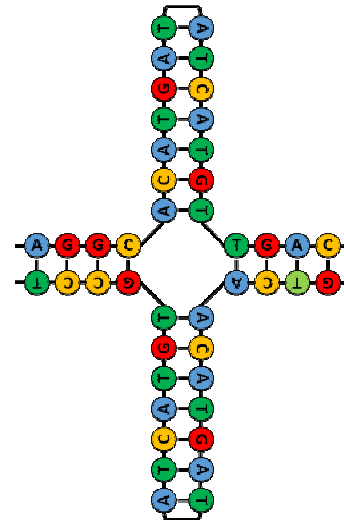
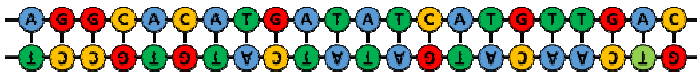
**TACGCGAAGGAAAAAGGAATGAGAATTCGGCCAAAAAACCTCAACTTAAGTTGAGGTTTTTTTTGGCCGAAATCCCAAAAAGGAATAGATTTT
ATGCGCTTCCTTTTTCCTTACTCTTAAGCCGGTTTTTTTTGGAGTTGAATTCACCTCCAAAAAACCGGC TTAAGGGTTTTTCCTTATCTAAAG**

La séquence ci-dessus est tirée de l'allèle a (non violet) sans anthocyanine et montre les deux brins d'ADN de la séquence d'insertion, les répétitions directes flanquantes et plusieurs paires de bases de chaque côté des répétitions directes. Dans cet exemple, une partie importante de la séquence insérée a été retirée pour rendre l'exercice plus facile à gérer, mais la structure de base reste la même.

1. Sur la séquence ci-dessus, identifiez les répétitions directes de flanc. Il doit y avoir deux séquences, séparées par une certaine distance, qui sont identiques et orientées dans la même direction. Dessinez un cadre autour des deux séquences.
2. Entre les répétitions directes, il y a une seule répétition inversée longue. Tracez une ligne verticale marquant le centre de la répétition inversée
3. A partir de la ligne que vous avez tracée, comparez les bases du brin supérieur allant vers la droite avec celles du brin inférieur allant vers la gauche. Que remarquez-vous ?
4. La séquence à droite est le brin supérieur de la séquence d'ADN, se terminant au milieu de la répétition inversée. Continuez à copier la ligne supérieure de l'ADN, mais en descendant la page au lieu de la remonter. Alignez les paires de bases que vous écrivez avec les lettres déjà présentes sur la page.
5. Lorsque vous avez fini de copier, regardez quelles bases sont l'une à côté de l'autre. Dessinez un cadre autour de la partie de la séquence qui est parfaitement complémentaire (chaque lettre correspond à sa base complémentaire).

TACGCGAAGGAAAAAGGAATGAGAATTCGGCCAAAAAACCTCAACTT

La structure autour de laquelle vous avez dessiné la boîte s'appelle une "épingle à cheveux" ou une "tige et boucle". Des structures comme celle-ci peuvent se former chaque fois que l'on laisse des molécules d'ADN ou d'ARN simple brin qui ont des sections répétées inversées s'hybrider. Les parties en dehors de la boîte que vous avez dessinée ne s'hybrideront généralement pas parce qu'il n'y a pas assez de complémentarité. Vous trouverez ci-dessous un autre exemple de la façon dont l'ADN contenant une répétition inversée peut former une épingle à cheveux. Les séquences d'ADN des deux structures sont identiques.



6. Les deux structures ci-dessus obéissent aux règles d'appariement des bases. Qu'est-ce que vous vous attendez à trouver dans la cellule ? Expliquez pourquoi vous pensez cela.
7. Pensez-vous qu'une structure en épingle à cheveux comme celle-ci est plus susceptible de se former dans l'ADN ou l'ARN de la cellule ? Expliquez votre raisonnement.
8. Pensez aux étapes d'une réaction PCR. Pour une séquence d'ADN comme celle-ci, pourquoi la structure en épingle à cheveux est-elle beaucoup plus susceptible de se former lors d'une réaction PCR ?

Annexe 2 : Focus sur les femmes dans les sciences

Barbara McClintock - la découvreuse d'éléments transposables

Lorsque Barbara McClintock est née en 1902, ses parents l'ont en fait appelée Eleanor. Cependant, lorsqu'ils étaient jeunes, ils ont estimé qu'Eleanor était un nom trop doux pour la personnalité indépendante et extravertie de leur fille, et ils ont donc commencé à l'appeler Barbara. Lorsque Barbara décide de s'inscrire comme étudiante à Cornell en 1919, sa mère s'y oppose, estimant qu'il lui serait trop difficile de trouver un mari.

Un mari n'était manifestement pas la principale préoccupation de Barbara. McClintock excellait à Cornell et, impressionné par ses performances dans sa classe de génétique végétale, C.B. Hutchinson lui téléphona pour l'inviter à rejoindre le programme d'amélioration des plantes de Cornell en tant qu'étudiante diplômée. En 1925, elle obtient sa maîtrise ; deux ans plus tard, elle reçoit son doctorat.

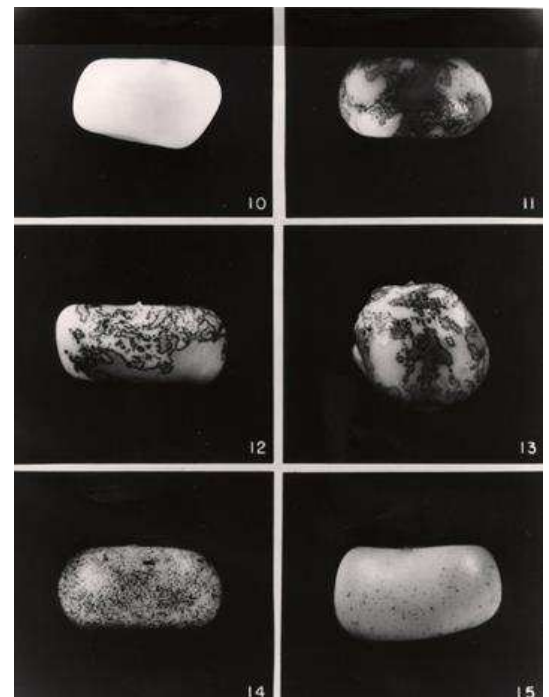
McClintock a étudié la cytogénétique, la relation entre l'hérédité et la structure des chromosomes, dans le maïs. En tant que jeune chercheuse, McClintock a été la première à décrire la structure des chromosomes du maïs et a pu montrer que les traits et les chromosomes étaient hérités selon les mêmes schémas, reliant définitivement les chromosomes à l'héritage génétique.

En 1930, McClintock a été le premier à décrire comment, lors de la méiose, les chromosomes homologues forment des structures croisées - la base structurelle de la recombinaison génétique. L'année suivante, elle a démontré que ce croisement entre chromosomes était responsable de la recombinaison génétique entre des traits liés. En 1931, elle a également décrit l'emplacement de trois gènes sur le neuvième chromosome du maïs, la première carte génétique du maïs. Tout cela a été accompli avant que la structure de l'ADN ne soit connue et avant même qu'il ne soit définitivement établi que l'ADN était le matériel génétique.

En 1930, McClintock a été le premier à décrire comment, lors de la méiose, les chromosomes homologues forment des structures croisées - la base structurelle de la recombinaison génétique. L'année suivante, elle a démontré que ce croisement entre chromosomes était responsable de la recombinaison génétique entre des traits liés. En 1931, elle a également décrit l'emplacement de trois gènes sur le neuvième chromosome du maïs, la première carte génétique du maïs. Tout cela a été accompli avant que la structure de l'ADN ne soit connue et avant même qu'il ne soit définitivement établi que l'ADN était le matériel génétique.

Au cours des dix années suivantes, Mme McClintock a travaillé dans plusieurs institutions, d'abord en Allemagne, qu'elle a quittée en raison de la montée du nazisme, puis à Cornell et à l'université du Missouri. À Cornell et au Missouri, bien qu'elle se soit fait un nom dans son domaine et qu'elle ait contribué à d'importantes découvertes dans l'étude de la structure chromosomique du maïs, elle a rencontré des obstacles considérables pour devenir professeur titulaire. Elle pensait que cela était dû en grande partie au fait qu'elle était une femme.

En 1941, Mme McClintock a accepté un poste de recherche à temps plein au prestigieux Cold Spring Harbor Laboratory. C'est là qu'elle a commencé le travail auquel elle est le plus étroitement associée aujourd'hui. McClintock



Différents niveaux de mosaïcisme dans les grains de maïs en raison de l'interaction des Ac et Ds. Tiré de Cold Spring Harbor Symposiums on Quantitative Biology, 1951

s'est intéressée à la raison pour laquelle certains grains de maïs présentent un mosaïcisme, c'est-à-dire qu'ils sont multicolores. Non seulement ces différents grains produisent des quantités différentes d'anthocyanine, mais dans certains types de maïs, des niveaux différents d'anthocyanine sont produits dans différentes parties de chaque grain individuel. De plus, ce mosaïcisme n'a pas été hérité dans des proportions mendéliennes prévisibles.

En 1948, elle a fait l'une de ses plus grandes découvertes : son système était composé de deux gènes, l'un contrôlant l'autre. Le premier gène, appelé Dissociateur (Ds), semblait être responsable de la couleur du noyau, et le second, appelé Activateur (Ac), semblait activer et désactiver le gène Ds. Mais lorsque McClintock a essayé de cartographier les gènes, elle a trouvé que c'était impossible. Ils se sont littéralement déplacés d'un endroit à l'autre du chromosome. Barbara McClintock avait découvert des éléments transposables.

McClintock a passé les années suivantes à documenter méticuleusement le système Ac et Ds et un autre système similaire appelé Suppressor-mutator (Spm). En 1953, elle a publié ses travaux dans la revue Genetics. Les travaux de McClintock n'ont pas été largement acceptés. Le système avec lequel elle travaillait était complexe et traitait de plusieurs concepts nouveaux dans le domaine de la génétique. Consciente de la réaction négative à son travail et craignant que ses idées ne soient trop radicales et ne la poussent hors du courant scientifique dominant, elle a largement cessé de publier ou de donner des conférences sur le sujet.

Il a fallu environ vingt ans pour que la science rattrape les découvertes de McClintock à la fin des années 1940 et au début des années 1950. À partir de la fin des années 1960 et du début des années 1970, en utilisant des technologies plus avancées, les scientifiques ont commencé à découvrir des éléments transposables dans d'autres organismes. Et au début des années 1970, les scientifiques ont montré de façon concluante que les gènes Ac et D, que McClintock avait caractérisés deux décennies auparavant, étaient ce que l'on appelle aujourd'hui des éléments transposables de classe II.

McClintock était largement reconnue comme une scientifique éminente à son époque, bien avant ses travaux sur les éléments transposables ; en 1944, elle a été la première femme à devenir présidente de la Genetics Society of America, et la même année, elle a rejoint l'Académie nationale des sciences, la troisième femme seulement à être élue. Ce n'est cependant qu'après sa retraite et le réexamen de son travail à la lumière de découvertes plus récentes que ses contributions ont pu être pleinement appréciées. En 1983, elle a reçu le prix Nobel de physiologie et de médecine pour ses travaux sur les éléments transposables. Elle a été la première femme à remporter le prix sans partage, et aujourd'hui Barbara McClintock est largement considérée comme l'un des grands esprits de la biologie du 20^{ème} siècle.