

Biotechnology Explorer™ Kit GMO Investigator™

Référence 166-2500EDU

<http://explorer.bio-rad.fr>

Remarque : Ce kit contient des réactifs sensibles à la température.
A l'arrivée, ouvrez immédiatement et
stockez les composants à -20°C ou à 4°C comme il est indiqué.

La duplication de toute partie de ce document
n'est autorisée que pour l'usage en classe.

BIO-RAD

Pour le service technique, composez le 01.47.95.69.64

10002155

A l'attention de l'enseignant

Vos aliments préférés sont-ils génétiquement modifiés?

Actuellement, les aliments génétiquement modifiés (GM) n'ont pas à être étiquetés en tant que tels aux Etats-Unis et les aliments avec une teneur génétiquement modifiée inférieure à 5 % peuvent être étiquetés "sans OGM". En Europe et en Asie, les aliments génétiquement modifiés ne nécessitent un étiquetage que s'ils contiennent une teneur GM > 1 %.

L'objectif de ce kit est que les élèves testent leurs produits alimentaires préférés achetés en magasin (par exemple, des chips de maïs et des sandwiches aux légumes) pour la présence d'organismes génétiquement modifiés (OGM). En outre, les élèves s'engagent dans une expérience de recherche scientifique où ils regroupent des aliments provenant d'un magasin, extraient l'ADN des aliments, amplifient l'ADN en utilisant la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et utilisent l'électrophorèse sur gel pour identifier la présence ou l'absence de séquences d'OGM amplifiées.

Dans cette activité, les élèves emploient des techniques de biologie moléculaire à la pointe de l'art pour tester des aliments familiers. Le kit fonctionnera mieux avec des élèves qui ont une certaine compréhension de base de la biologie moléculaire et une expérience préalable avec certaines des techniques impliquées. L'exercice couvre une large diversité de domaines, y compris : le génie et les transformations génétiques, la transcription et la traduction de l'ADN, la régulation génique, la réplication de l'ADN et la PCR, le développement et la physiologie des végétaux, la science de l'agriculture et de l'environnement.

Stratégie d'enseignement : Etude guidée fondée sur des recherches

Le kit GMO Investigator permet une approche de cet exercice par des recherches guidées. Les élèves conduisent des procédures scientifiques sophistiquées qui ont des niveaux multiples de contrôles. Ceci leur permet d'estimer la validité de leurs résultats. Ainsi, non seulement ils déterminent la présence ou l'absence de séquences d'OGM dans les aliments qu'ils testent, mais ils se posent les questions suivantes et y répondent : avons-nous réussi à extraire l'ADN ; est-ce que notre PCR a fonctionné comme on s'y attendait et sommes-nous en présence d'une contamination?

Les récoltes GM sont-elles une bonne chose?

De nombreuses personnes s'opposent à l'utilisation de plantes GM. Ils soutiennent qu'il existe un potentiel de créer des super-mauvaises herbes par l'intermédiaire d'une pollinisation croisée avec des récoltes résistantes aux herbicides ou que des super-insectes évolueront et ne seront plus résistants aux toxines contenues dans les récoltes résistantes aux parasites. De nombreuses personnes sont concernées par les réactions allergiques potentielles aux nouvelles protéines ou par la résistance aux antibiotiques surgissant des marqueurs sélectionnables utilisés pour développer les récoltes ou par d'autres effets imprévus sur la santé publique. Les partisans des aliments génétiquement modifiés soutiennent que ces récoltes sont vraiment meilleures pour l'environnement. Moins de produits chimiques toxiques sont répandus dans l'environnement et ainsi moins de produits chimiques toxiques peuvent nuire à l'environnement et à la santé de l'homme. En outre, ces récoltes peuvent protéger des terres arables en réduisant le stress sur les terres, améliorer la valeur nutritionnelle des aliments dans les pays en développement et permettre aux récoltes de se développer sur des terres précédemment inexploitable.

Ce manuel peut être téléchargé sur Internet. Visitez-nous sur le Web à <http://explorer.bio-rad.fr> ou appelez-nous.

Nous nous efforçons d'améliorer continuellement nos cours et nos produits et vos histoires, idées et suggestions sont les bienvenues.

L'équipe Bio-Education
Bio-Rad division Bio-Recherche
3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette

Sommaire

	Page
Généralités sur le kit	1
Liste de contrôle de la composition du kit	2
Conformité au programme	4
Contexte pour les enseignants	6
Préparation préalable par l'enseignant	12
Cours 1 : Extraction de l'ADN des échantillons d'aliments	14
Cours 2 : Préparation des réactions de PCR	15
Cours 3 : Electrophorèse des produits de PCR	17
Cours 4 : Séchage des gels et analyse des résultats	23
Résultats typiques de classe	24
Conseils et questions fréquemment posées	26
Mode opératoire	30

Liste de contrôle de la composition du kit

Cette section liste les composants fournis dans le kit GMO Investigator. Elle liste également les accessoires nécessaires. Chaque kit contient suffisamment de matériaux pour 32 élèves répartis en 8 postes de travail, avec 4 élèves à chaque poste. Dès que votre kit arrive, ouvrez-le et vérifiez le contenu en cochant la liste pour vous familiariser avec le kit. **Placez immédiatement le sachet contenant la solution d'amplification et les amorces dans le congélateur (-20°C) et le flacon d'InstaGene dans le réfrigérateur (4°C).** Le nombre de cuves et de pipettes dont vous aurez besoin dépend du nombre d'élèves travaillant à chaque poste.

Composants du kit	Nombre/Kit	(4)
Aliment contrôle certifié sans OGM par Bio-Rad	1 paquet	<input type="checkbox"/>
ADN de contrôle OGM positif, 0,5 ml	1 tube	<input type="checkbox"/>
Solution d'amplification, 1,2 ml	1 tube	<input type="checkbox"/>
Amorces d'OGM (rouges), 15 µl	1 tube	<input type="checkbox"/>
Amorces de PSII de plante (vertes), 15 µl	1 tube	<input type="checkbox"/>
Marqueurs de poids moléculaire de PCR, 200 µl	1 tube	<input type="checkbox"/>
Tampon de charge orange G, 1 ml	1 tube	<input type="checkbox"/>
Matrice InstaGene™, 20 ml	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Pipettes de transfert en plastique jetables	2 paquets	<input type="checkbox"/>
Tubes avec bouchons attachés, 1,5 ml	2 paquets	<input type="checkbox"/>
Tubes avec bouchons à vis, 1,5 ml	1 paquet	<input type="checkbox"/>
Tubes de PCR, 0,2 ml	1 paquet	<input type="checkbox"/>
Adaptateurs de tubes de PCR sans bouchon, 1,5 ml	1 paquet	<input type="checkbox"/>
Supports de microtubes à essai en mousse	8	<input type="checkbox"/>
Manuel	1	<input type="checkbox"/>
Accessoires requis	Nombre/Kit	(4)
Micropipettes à volume ajustable de 2 à 20 µl (réf.166-0506 EDU) ou pipettes à volume fixe de 10 µl et 20 µl (réf.166-0512EDU et 166-0513EDU)	8	<input type="checkbox"/>
Micropipette à volume ajustable de 20 à 200 µl (réf. 166-0507EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Micropipette à volume ajustable de 200 à 10000 µl (réf. 166-0508EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Cônes de 2 à 20 µl, à filtre (réf. 211-2006EDU)	8 portoirs	<input type="checkbox"/>
Cônes de 20 à 200 µl, à filtre (réf. 211-2016EDU)	1 portoir	<input type="checkbox"/>
Cônes de 200 à 1000 µl, à filtre (réf. 211-2021EDU)	1 portoir	<input type="checkbox"/>
Mortier et pilon	8	<input type="checkbox"/>
Marqueurs	8	<input type="checkbox"/>
Aliment à tester provenant d'un magasin	1 à 8	<input type="checkbox"/>
Eau distillée	3,5 l	<input type="checkbox"/>
Bain-marie (réf. 166-0524EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Microcentrifugeuse (réf. 166-0612EDU) ou minicentrifugeuse (réf. 166-0613EDU)	1 à 4	<input type="checkbox"/>
Balance avec une plage de 0,5 à 2 g et poids ou papier de pesée	1	<input type="checkbox"/>
Thermocycler (MyCycler réf. 170-9703EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Alimentation électrique (PowerPac Basic réf. 164-5050EDU)	2 à 4	<input type="checkbox"/>

Si vous utilisez une électrophorèse sur gel d'agarose :

<u>Accessoires requis</u>	<u>Nombre/Kit</u>	<u>(4)</u>
Chambres horizontales d'électrophorèse avec plateaux de coulage de gel et peignes (réf. 166-4000EDU)	4 à 8	<input type="checkbox"/>
Mini-module d'électrophorèse sur gel d'agarose (réf. 166-0450EDU) contenant 25 g d'agarose, 100 ml de TAE 50X, 100 ml de colorant d'ADN Fast Blast	1	<input type="checkbox"/>

Si vous utilisez une électrophorèse sur gel de polyacrylamide :

<u>Accessoires requis</u>	<u>Nombre/Kit</u>	<u>(4)</u>
3 chambres verticales d'électrophorèse Mini-PROTEAN (réf. 165-3302EDU)	4	<input type="checkbox"/>
Gels précoulés à 10% de TBE ReadyGel (réf. 161-1110EDU)*	8	<input type="checkbox"/>
Tampon Tris-borate-EDTA 10X (TBE 10X) (réf. 161-0733)	1 l	<input type="checkbox"/>
Colorant d'ADN Fast Blast (réf. 166-0420)	100 ml	<input type="checkbox"/>
Cônes Prot/Elec™	8 portoirs	<input type="checkbox"/>

*Remarque: les gels de polyacrylamide ont une durée de conservation de 3 mois, ainsi ne commandez les gels que lorsque les TP sont programmés.

<u>Accessoires facultatifs</u>	<u>Nombre/Kit</u>	<u>(4)</u>
Système de séchage GelAir™ (réf. 165-1771EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Cellophane (si vous n'utilisez pas le système de séchage Gel Air) (réf. 165-1779EDU)	1	<input type="checkbox"/>

Composants disponibles séparément

Matrice InstaGene (réf. 732-6030EDU)

Sachet de réactifs contenant la solution d'amplification, les amorces d'OGM, les amorces de PSII de plante, les marqueurs de poids moléculaire de PCR, le tampon de charge orange G (réf. 166-2501EDU)

Midi-module d'électrophorèse sur agarose, comprend 125 g d'agarose, 1 l de TAE 50X, 100 ml de colorant d'ADN Fast Blast (réf. 166-0455)

Maxi-module d'électrophorèse sur agarose, comprend 500 g d'agarose, 5 l de TAE 50X, 100 ml de colorant d'ADN Fast Blast (réf. 166-0460)

Tubes de PCR de 200 µl à paroi fine, 1000 (réf. 223-9473EDU)

Conformité au programme

En 1996, la US National Academy of Sciences et ses groupes de travail, conjointement avec la National Research Council, ont publié les National Science Education Standards. Ces standards réclament un changement par rapport à l'enseignement scientifique traditionnel qui comprend la mémorisation de faits et d'informations scientifiques, couvrant de nombreux domaines, et la conclusion des recherches avec le résultat d'une expérience. A la place, les enseignants sont encouragés à impliquer les élèves dans des études sur de longues périodes de temps, d'apprendre le sujet dans le contexte de la recherche et d'appliquer les résultats des expériences à des arguments et des explications scientifiques. Le kit Biotechnology Explorer GMO Investigator suit cette approche. Il fournit une étude guidée dans laquelle les élèves réunissent des aliments courants, extraient l'ADN de l'échantillon, amplifient des séquences génétiques en utilisant la PCR et utilisent l'électrophorèse sur gel pour identifier la présence ou l'absence des séquences marqueurs amplifiées. Les élèves sont encouragés à analyser leurs résultats dans le contexte des contrôles expérimentaux pour estimer s'ils peuvent déterminer si les aliments qu'ils consomment couramment ont été génétiquement modifiés (GM). Le kit peut être utilisé pour couvrir les domaines suivants.

Recherche scientifique

- Utilisation de techniques sophistiquées pour détecter des OGM
- Utilisation de contrôles expérimentaux positifs et négatifs multiples
- Analyse et interprétation des résultats expérimentaux

Biochimie

- Propriétés chimiques des composants cellulaires
- Techniques d'extraction de l'ADN
- Réplication de l'ADN et PCR
- Electrophorèse sur gel de l'ADN

Hérédité et biologie moléculaire

- Transformation génétique pour créer des OGM
- Contrôle de l'expression génique
- Techniques de profilage de l'ADN
- Cultures : traditionnelles par rapport à GM
- Expression et régulation des gènes dans des hôtes étrangers

Structure et fonction des organismes

- Transformation et régénération des végétaux
- Structure cellulaire

Biologie de l'évolution

- Implications des manipulations génétiques
- Implications de l'altération de la biodiversité végétale et des écosystèmes
- Evolution des races entre les parasites et les végétaux

Sciences de l'environnement et de la santé

- Pesticides et herbicides
- Croissance des populations, qualité de l'environnement et défis globaux
- Rôle, place, limites et possibilités de la science et des technologies

Plus spécifiquement, aux USA le kit couvre les standards suivants :

Standards	Conformité au standard
Standard A Les élèves développeront des aptitudes à réaliser des recherches scientifiques Les élèves développeront une compréhension des recherches scientifiques	Les élèves réaliseront une expérience en utilisant des procédures sophistiquées et des contrôles multiples Les élèves appliqueront les résultats de cette expérience à des arguments scientifiques
Standard B Les élèves développeront une compréhension de la cellule Les élèves développeront une compréhension de la base moléculaire de l'hérédité Les élèves développeront une compréhension de l'évolution biologique Les élèves développeront une compréhension de l'interdépendance des organismes	Les élèves comprendront comment la structure cellulaire affecte l'extraction de l'ADN et pourquoi la compréhension de la réplication de l'ADN est nécessaire pour comprendre la PCR Les élèves comprendront comment le génie génétique supplémente les méthodes traditionnelles des cultures pour générer de nouveaux traits dans les plantes des récoltes Les élèves réfléchiront à comment le changement du génome d'un organisme peut affecter son aptitude à survivre dans des environnements différents Les élèves réfléchiront à comment des récoltes GM interagissent avec d'autres végétaux et insectes dans l'environnement
Standard F Les élèves développeront une compréhension de la croissance des populations, de la qualité environnementale et des défis nationaux et globaux	Les élèves comprendront comment la technologie des aliments GM est proposée comme une solution aux problèmes de croissance des populations et d'endommagement de l'environnement

Contexte pour les enseignants

Depuis la sortie de la première récolte génétiquement modifiée (GM) aux Etats-Unis en 1996, les scientifiques ont débattu sur l'utilisation de ces récoltes à cause des risques potentiels sur la santé et l'environnement. Les aliments GM sont des aliments qui contiennent des composants de récoltes GM, des végétaux qui ont été génétiquement modifiés par l'insertion de matériel génétique étranger. Le matériel génétique modifié ne provient pas seulement d'une autre plante mais éventuellement d'une espèce d'un autre règne (par exemple, animal, fongique, bactérien). Le matériel génétique étranger est habituellement un gène qui code pour une protéine qui procure à la plante un avantage sur des plantes similaires. Les exemples de traits conférés comprennent la résistance aux parasites, la tolérance aux herbicides, une maturation retardée des fruits, une production améliorée des fruits, une teneur nutritionnelle accrue, etc.

Comment modifier génétiquement une récolte?

La première étape du procédé de modification génétique est d'identifier une protéine qui a le potentiel d'améliorer une récolte. Une classe populaire de récoltes GM a un gène provenant de la bactérie du sol *Bacillus thuringiensis* (Bt) inséré dans leurs génomes. Les récoltes Bt produisent une protéine appelée la delta-endotoxine qui est létale pour la pyrale du maïs, un parasite courant des plants de maïs. Les fermiers qui plantent des récoltes Bt n'ont pas à appliquer de pesticides parce que les plantes produisent la protéine toxique dans leurs cellules. La toxine Bt a été d'abord identifiée dans les magnaneries comme une toxine qui tue les vers à soie (qui sont du même genre que la pyrale du maïs).

La deuxième étape est d'isoler (cloner) le gène qui code pour la protéine. Le gène entier doit être d'abord localisé au sein du génome d'un organisme ; puis il doit être copié de manière à pouvoir l'isoler ou le cloner à partir de l'organisme. Bien qu'une région codante d'un gène puisse avoir une longueur de juste quelques centaines ou milliers de paires de bases, le gène lui-même peut avoir une longueur de dizaines de milliers de paires de bases, à cause de ses introns (séquences non codantes). Le clonage d'un gène entier peut être très laborieux et peut prendre plusieurs années.

Les gènes contiennent des signaux qui régulent leur expression dans les cellules de l'hôte, mais ces signaux ne sont souvent pas compris par les cellules d'un autre organisme. Ainsi, la troisième étape consiste à modifier le gène de manière à ce que les cellules de la plante le lisent correctement et fabriquent la protéine qui nous intéresse. Ceci est réalisé en rationalisant le gène pour éliminer les introns qui ne sont pas nécessaires et en ajoutant ou en modifiant des séquences qui permettront au gène d'être exprimé au sein des cellules de la plante, y compris un promoteur et un terminateur (voir la Figure 1). Le promoteur sert de site d'arrimage pour l'ARN polymérase et de signal pour où démarrer la transcription d'un gène. Le terminateur est le signal pour stopper la transcription. Les promoteurs et les terminateurs natifs des gènes non modifiés interagissent avec d'autres composants d'une cellule hôte pour activer ou désactiver des gènes selon le type cellulaire et la situation, mais les scientifiques peuvent modifier les produits de construction pour les OGM de manière à ce que le gène étranger soit continuellement transcrit et que la protéine étrangère soit produite dans toute la plante. Le promoteur le plus courant utilisé dans les récoltes GM est le promoteur 35S à partir du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S). Ce promoteur est choisi parce qu'il est déjà conçu par nature pour activer la transcription dans tous les types de cellules végétales. Le terminateur le plus courant utilisé dans les récoltes GM est le terminateur de la nopaline synthase (NOS) provenant de *Agrobacterium tumefaciens*. Le kit GMO Investigator peut identifier ces deux modifications génétiques dans des produits alimentaires vendus en magasin. L'un ou les deux de ces éléments génétiques sont présents dans ~ 85 % de toutes les récoltes GM actuellement approuvées dans le monde entier.

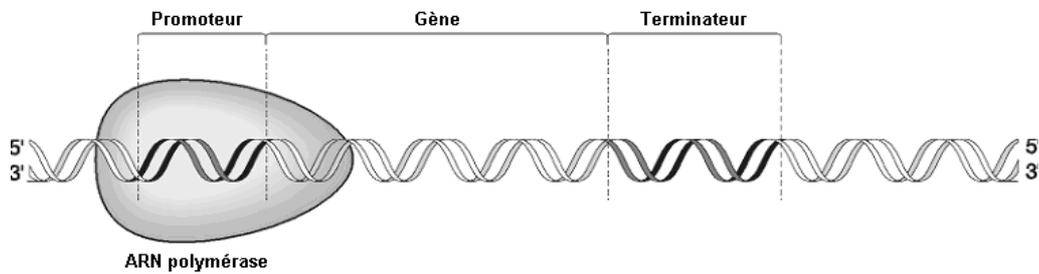


Fig. 1. Structure d'un gène.

Une fois que le gène est modifié avec le promoteur et le terminateur appropriés, il doit être introduit dans la plante (voir la Figure 2). Le gène ne peut pas être inséré dans toutes les cellules d'une plante existante ; à la place, des cellules végétales individuelles sont transformées avec le gène modifié et ensuite de nouvelles plantes sont développées à partir de ces cellules uniques. Les cellules sont d'abord prélevées de la plante mère, puis cultivées sur un milieu spécial qui fait qu'elles vont former un agrégat de cellules indifférenciées appelé callus. Le gène modifié est ensuite transféré dans les cellules du callus par toute une diversité de méthodes, dont chacune doit faire que l'ADN passe la paroi cellulaire, la membrane plasmatique et les membranes nucléaires de la plante. Une méthode consiste à utiliser une version GM de la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie provoque la gale du collet en insérant une partie de son ADN dans le génome de la plante hôte ; cette propriété naturelle inhabituelle est exploitée pour transférer le gène modifié dans le génome de la plante. Une deuxième méthode est l'électroporation, dans laquelle un courant électrique crée des pores dans les membranes cellulaires et permet l'entrée de l'ADN modifié. Une troisième méthode utilise un dispositif appelé "canon à gènes" qui tire physiquement des particules d'or revêtues de l'ADN modifié dans les cellules végétales. Aucune de ces méthodes n'est très efficace et les quelques cellules qui ont été transformées doivent être identifiées et sélectionnées parmi celles qui ne l'ont pas été. Pour aider ce processus, des marqueurs sélectionnables sont insérés dans les cellules avec le gène modifié. Ceux-ci peuvent être des marqueurs de résistance à un antibiotique ou des marqueurs visuels comme le gène de la Green Fluorescent Protein. Une fois que les cellules transformées ont été isolées, elles sont induites avec des hormones végétales pour se différencier et se développer en plantes complètes. L'insertion viable du gène modifié dans le génome d'une plante est appelé "événement".

Le processus de transformation est très délicat, aussi les souches végétales qui ont été optimisées pour la transformation sont rarement les mêmes souches végétales que celles utilisées dans les champs. La cinquième et dernière étape de la fabrication de récolte GM est de récroiser la récolte génétiquement modifiée dans les souches végétales produisant actuellement les rendements les plus élevés qui sont utilisées dans les champs. Ceci peut prendre des années puisque seulement 50 % du génome de la récolte à haut rendement est transféré dans la récolte génétiquement modifiée à chaque croisement.

Le processus de modification génétique est très inefficace, coûteux et prend du temps, il n'y a habituellement qu'une poignée "d'événements" qui réussissent pour chaque récolte GM et cela nécessite des millions de dollars et six à quinze ans pour amener chaque récolte sur le marché.

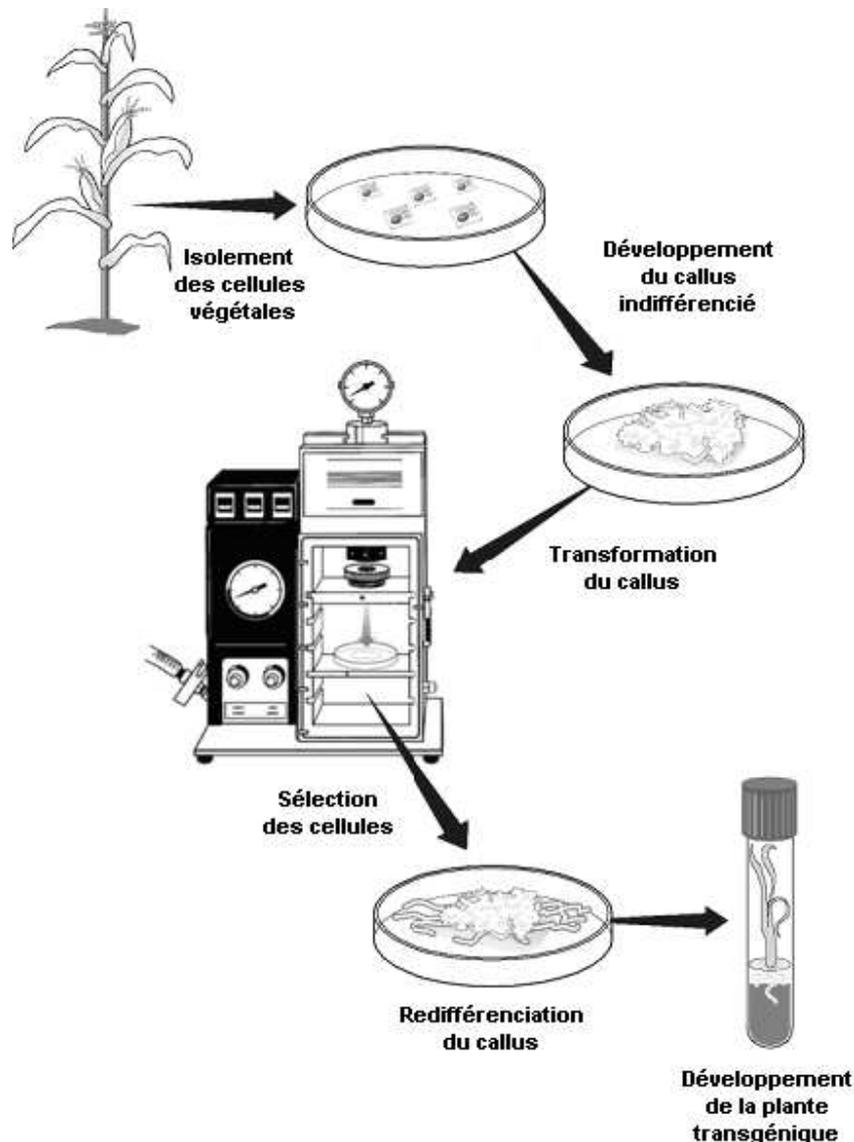


Fig. 2. Comment fabriquer une récolte GM.

Les récoltes GM sont-elles une bonne chose?

De nombreuses personnes s'opposent à l'utilisation de plantes GM. Ils soutiennent qu'il existe un potentiel que des "super-mauvaises herbes" apparaissent par l'intermédiaire d'une pollinisation croisée d'espèces de mauvaises herbes naturelles avec des récoltes résistantes aux herbicides ou que des "super-insectes" évolueront et ne seront plus sensibles aux toxines contenues dans les récoltes résistantes aux parasites. De nombreuses personnes sont concernées par les réactions allergiques potentielles aux nouvelles protéines ou par la résistance aux antibiotiques surgissant des marqueurs sélectionnables utilisés pour développer les récoltes ou par d'autres effets imprévus sur la santé publique. D'autres expriment des inquiétudes quant à l'insuffisance de recherche pour parfaitement comprendre les implications de l'altération de toute une diversité de végétaux. Certaines personnes expriment également leurs inquiétudes sur le manque d'exigences de la part du gouvernement quant à l'étiquetage des aliments aux Etats-Unis.

Les partisans des aliments GM soutiennent que ces récoltes sont bénéfiques pour l'environnement, parce qu'elles réduisent l'utilisation d'herbicides, de pesticides et de produits chimiques qui sont potentiellement toxiques pour l'environnement et la santé de l'homme. En outre, ces récoltes peuvent protéger des terres arables en réduisant le stress sur les terres, améliorer la valeur nutritionnelle des aliments dans les pays en développement et permettre aux récoltes de se développer sur des terres précédemment inexploitées.

Identification des récoltes GM

Comment tester des aliments et des récoltes pour identifier ceux qui contiennent des génomes GM (voir la Figure 3)? Deux méthodes sont actuellement utilisées. La première, la technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) identifie les protéines. Il s'agit d'un test basé sur des anticorps et il identifie les protéines spécifiques produites par les plantes GM. La technique ELISA ne peut tester que des produits frais à cause de la dégradation des protéines survenant au cours du traitement des aliments. En outre, puisque la technique ELISA identifie les protéines produites dans les récoltes d'OGM, les tests doivent être individualisés selon le type de récolte. Par exemple, un test ELISA Bt ne peut détecter que du maïs Bt et non pas du maïs GM résistant aux herbicides. Toutefois, la technique ELISA est peu coûteuse et exacte et elle peut être réalisée sur le terrain avec peu de savoir-faire.

Le second test, utilisant la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), identifie des séquences d'ADN qui ont été insérées dans la plante GM. Au contraire des protéines, l'ADN est une molécule relativement stable, ainsi des fragments d'ADN peuvent être isolés à partir d'aliments hautement traités et ils sont suffisamment intacts pour être amplifiés par PCR. Une version modifiée de la PCR, la PCR en temps réel, peut également quantifier le pourcentage de matériau GM dans l'échantillon d'aliment. Au contraire d'un test ELISA qui est spécifique d'une récolte unique, un simple test de PCR comme celui-ci peut détecter 85 % de la totalité des récoltes. Ceci parce que les ingénieurs du génie génétique n'utilisent qu'un petit nombre de séquences régulatrices (séquences promoteurs et terminateurs) pour contrôler l'expression des gènes insérés et ainsi ces séquences sont communes à la majorité des récoltes GM. Deux des séquences régulatrices les plus courantes sont le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et le terminateur de la nopaline synthase (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*, qui sont les séquences détectées par ce kit.

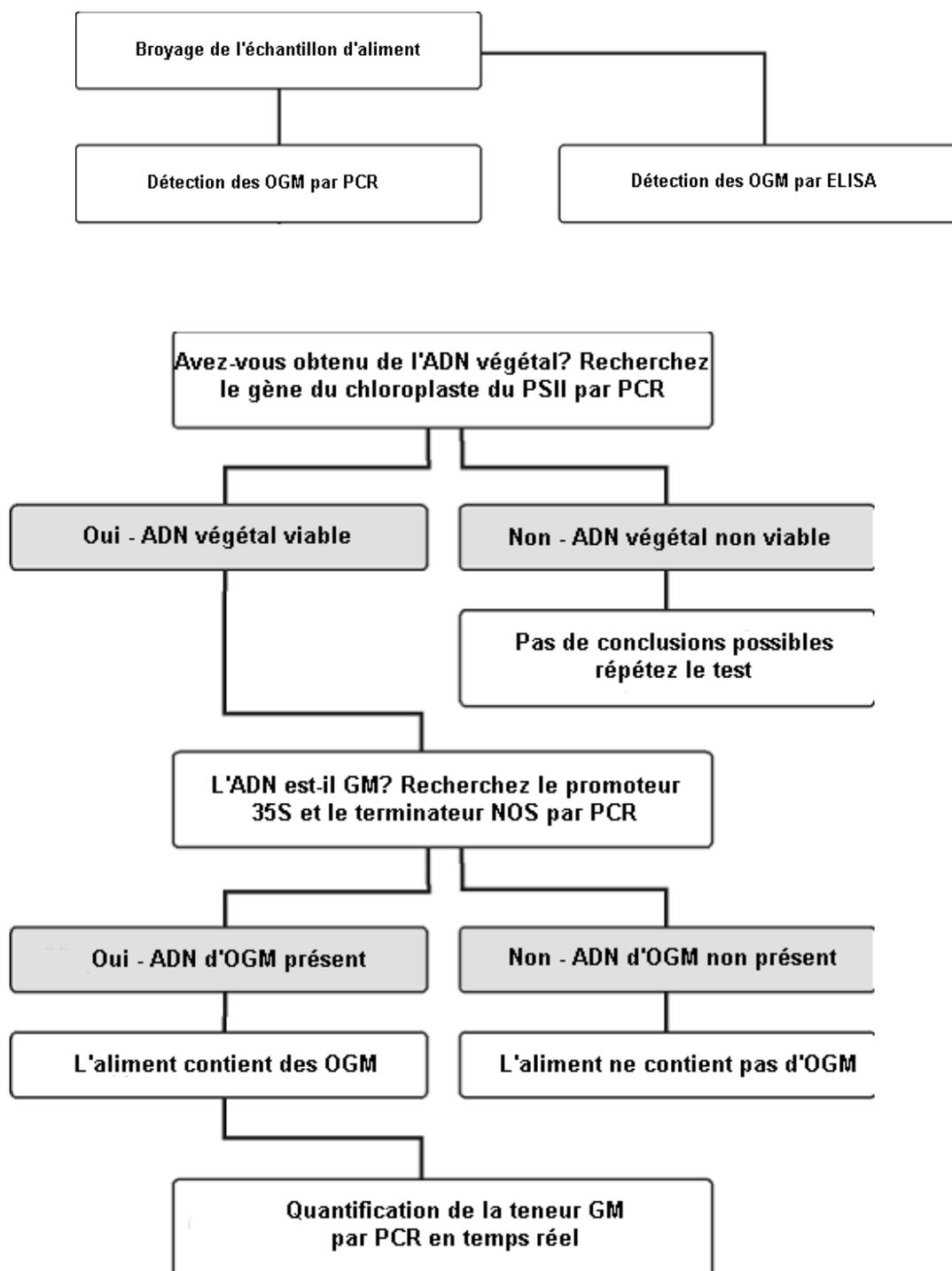


Fig. 3. Comment détecter des OGM dans un aliment.

Expérience de recherche guidée

Ce kit est un TP avancé à cause de son utilisation de contrôles multiples. Vos élèves doivent savoir que ceux-ci sont les types de contrôles utilisés par les scientifiques dans les vrais laboratoires et que si des erreurs se produisent, que ces contrôles identifient, alors les scientifiques répèteront le test. Ces contrôles permettent aux élèves de :

Vérifier que l'extraction de l'ADN est réussie

Le kit contient un jeu d'amorces (de couleur rouge) pour détecter des séquences spécifiques des OGM, mais il contient également un second jeu d'amorces (de couleur verte) qui identifient l'ADN végétal qu'il soit ou non dérivé d'OGM. Le second jeu d'amorces vous permet de dire si un résultat négatif pour les OGM est dû au manque de matériau d'OGM ou simplement à une extraction d'ADN ratée. Ces amorces amplifient une région de 455 pb du gène du chloroplaste du photosystème II (PSII) qui est commun à la plupart des végétaux. Veuillez noter que de l'ADN viable n'est pas toujours extrait de tous les aliments. Nous fournissons une liste à la page 26 des aliments recommandés qui donnent de l'ADN végétal viable. Le kit a été optimisé pour tester des aliments à base de maïs et de soja.

Se garantir contre toute contamination

Le kit contient un échantillon d'aliment certifié non OGM par Bio-Rad qui doit être traité comme l'échantillon d'aliment à tester que vous avez choisi. Cet échantillon sert de contrôle contre les résultats faux positifs. Si cet échantillon donne un résultat OGM positif, cela indique une contamination de la réaction. Si votre aliment à tester donne également un résultat OGM positif, vous ne pouvez pas faire confiance à ce résultat. Veuillez noter qu'une contamination est très courante en PCR à cause de sa sensibilité très élevée et des garanties doivent être prises pour éviter toute contamination.

S'assurer que la réaction de PCR fonctionne comme attendu

Le kit contient également de l'ADN matrice qui code pour les séquences de la plante et de l'OGM. Celui-ci sert de contrôle contre des faux négatifs. Si ces séquences contrôles ne sont pas amplifiées, il y a un problème avec la réaction de PCR et vous ne pouvez pas faire confiance à un résultat OGM négatif de votre aliment à tester. Ceci vous donne également de bandes de référence pour celles produites par les échantillons à tester.

Tester un large éventail d'aliments GM

Ce kit utilise la PCR "duplex", ce qui signifie que deux séquences cibles sont amplifiées simultanément. Les deux paires d'amorces dans la réaction de PCR amplifieront deux séquences d'ADN, un fragment de 203 pb du promoteur CaMV 35S et un fragment de 225 pb du terminateur NOS. Ces amorces ont été incluses de manière à pouvoir détecter un plus large éventail d'aliments GM, puisque certains aliments contiennent juste le promoteur CaMV 35S, certains juste le terminateur NOS et certains les deux. En utilisant ces deux séquences, environ 85 % des aliments GM actuellement disponibles sont détectables avec ce kit, alors que les amorces CaMV 35S seules ne détectent que ~ 70 % des aliments GM.

Il n'est pas nécessaire que vos élèves comprennent la PCR duplex pour parfaitement comprendre les principes de ces travaux pratiques et, dans le manuel des élèves, le texte fait référence à l'amplification de "séquences d'OGM", sans explication détaillée de ces différentes séquences. Toutefois, si un aliment contient les deux séquences CaMV 35S et NOS, tel qu'une papaye GM, une bande double peut apparaître dans le couloir des OGM, où les deux produits de PCR de 203 et de 225 pb ont été générés. Ceci sera spécialement visible sur un gel de polyacrylamide.

Préparation préalable par l'enseignant

Cette section décrit la préparation qui doit être réalisée par l'enseignant avant chaque période de travaux pratiques. Si des périodes en bloc sont programmées, préparez pour les cours 1 – 2 et les cours 3 – 4 en même temps. Une estimation du temps de préparation est incluse.

Emploi du temps

L'étude entière nécessite un minimum de quatre périodes de travaux pratiques de 50 minutes ou deux blocs de cours de 90 minutes. Soyez conscient qu'il faut 4 heures supplémentaires pour les cycles en dehors des heures de cours. Nous recommandons également 2 à 3 jours de révision du contexte et d'exposés pour préparer vos élèves à l'exercice.

Avant les TP

- Lire le manuel (2 h)
- Acheter des échantillons d'aliments en magasin (selon les besoins)
- Inventorier les accessoires nécessaires (1 h)
- Effectuer la préparation préalable par l'enseignant (30 min – 3 h pour chaque TP)
- Préparer les postes de travail des élèves (30 min – 1 h pour chaque TP)

Cours de 50 minutes

- Cours 1 : Extraction de l'ADN (50 min)
- Cours 2 : Préparation des réactions de PCR (50 min)
- Exécution des réactions de PCR (4 h) – généralement la nuit
- Cours 3 : Electrophorèse de l'ADN et coloration des gels (50 min)
- Cours 4 : Analyse des résultats (50 min)

Blocs de cours de 90 minutes

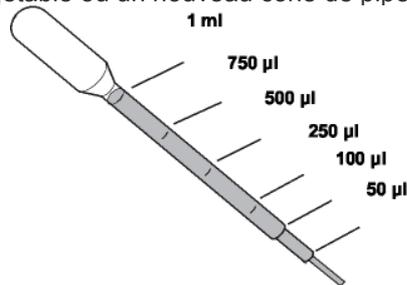
- Cours 1 – 2 : Extraction de l'ADN et préparation des réactions de PCR (90 min)
- Exécution des réactions de PCR (4 h)
- Cours 3 – 4 : Electrophorèse de l'ADN, coloration des gels et analyse des résultats (90 min)

Problèmes de sécurité

Il est interdit de manger, boire, fumer et de s'appliquer des cosmétiques dans la zone de travail. Le port de lunettes et de gants de protection est fortement recommandé. Les élèves doivent se laver les mains avec du savon avant et après cet exercice. Si un élève reçoit une solution quelconque dans les yeux, rincez avec de l'eau pendant 15 minutes. Bien que le colorant d'ADN Fast Blast ne soit pas toxique, vous devez porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation du colorant pour éviter que vos mains soient colorées. Il faut porter des blouses de laboratoire ou d'autres vêtements protecteurs pour éviter la coloration des vêtements.

Mesures des volumes

La préparation avancée de l'enseignant nécessite une pipette à volume ajustable de 2 à 20 μl , de 20 à 200 μl et de 100 à 1000 μl et des cônes à filtre (des cônes à filtre sont nécessaires pour empêcher la contamination des réactifs et de vos pipettes). Des pipettes de transfert en plastique jetables graduées stériles sont fournies et peuvent être utilisées pour des volumes de 50, 100, 250, 500, 750 et 1000 μl . L'illustration montre les marques sur la pipette de transfert en plastique jetable correspondant aux volumes à mesurer. Les volumes supérieurs à 1 ml nécessiteront des additions multiples. Pour chaque étape de la préparation des travaux pratiques, utilisez une nouvelle pipette de transfert en plastique jetable ou un nouveau cône de pipette.



Mortiers et pilons

Ces travaux pratiques nécessitent que les aliments soient broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Veuillez vous assurer qu'ils ont été bien lavés afin d'éliminer tous les produits chimiques résiduels qui peuvent interférer avec les réactions de PCR. En outre, rincez les mortiers et les pilons avec de l'eau de Javel à 10 % qui détruit tout ADN résiduel et ensuite rincez avec de l'eau pour éliminer l'eau de Javel. Le mode opératoire demande aux élèves de préparer un échantillon d'aliment non OGM puis de laver le mortier et le pilon avec du détergent et ensuite de préparer leur échantillon d'aliment à tester. Puisque l'aliment non OGM est préparé en premier, il ne devrait pas y avoir de risque de contamination de l'aliment à tester. C'est à vous de décider si vos élèves utilisent de l'eau de Javel entre les échantillons. Toutefois, les mortiers et les pilons doivent être rincés avec de l'eau de Javel à 10 % entre les différentes classes.

Cours 1 : Extraction de l'ADN des échantillons d'aliments

Le cœur de ce TP est la qualité et la quantité d'ADN extrait de votre aliment. Le tableau page 26 liste la fiabilité de différents aliments en ce qui concerne l'extraction d'ADN et les résultats de PCR ; les aliments les moins fiables peuvent produire des bandes plus faibles. Si vous souhaitez que vos élèves découvrent des aliments contenant des OGM, vous pouvez vouloir éviter les produits à base de blé et de riz, les fruits et les légumes frais qui sont presque certainement OGM négatifs et choisir des produits à base de papaye, de soja et de maïs.

<u>Matériaux nécessaire pour la préparation avancée</u>	<u>Quantité</u>
Tubes avec bouchons à vis	16
Béchers ou récipients pour eau distillée	8
Matrice InstaGene	1 bouteille
Pipettes de transfert en plastique jetables	8 à 16
Bain-marie réglé sur 95–100°C	1

Mode opératoire (temps estimé : 35 min)

1. Ajoutez 500 µl de matrice InstaGene dans chacun des 16 tubes avec bouchons à vis en utilisant une pipette de transfert ou une micropipette à volume ajustable de 200 à 1000 µl.

Remarque : La matrice requiert un mélange constant pour distribuer uniformément les billes microscopiques. Ceci est facilement réalisé par aspiration et rejet avec la pipette entre chaque aliquot.

2. Versez au moins 25 ml d'eau distillée dans les béchers ou récipients propres et étiquetez-les "eau distillée".
3. Réglez le bain-marie à 95–100°C au moins 30 min avant les TP.
4. (Facultatif) Préparez le contrôle d'aliment certifié non OGM par Bio-Rad. Pour gagner du temps, vous pouvez souhaiter préparer le contrôle d'aliment non OGM à l'avance : si c'est le cas, nous recommandons de préparer l'échantillon avant l'étape de centrifugation (voir le mode opératoire des élèves).
5. Préparez les postes de travail des élèves.
6. Préparez le poste de travail en commun.

<u>Matériel des postes de travail des élèves</u>	<u>Quantité</u>
Tube avec bouchon à vis avec 500 µl de matrice InstaGene	2
Bécher d'eau distillée	1
Pipettes de transfert	2
Mortier et pilon	1
Aliments à tester*	1 à 8
Marqueur	1

* Se reporter au tableau page 26 pour des suggestions d'aliments à utiliser

<u>Matériel du poste de travail en commun</u>	<u>Quantité</u>
Bain-marie réglé à 95–100°C	1
Microcentrifugeuse ou minicentrifugeuses	1 3 à 4
Balance et poids	1

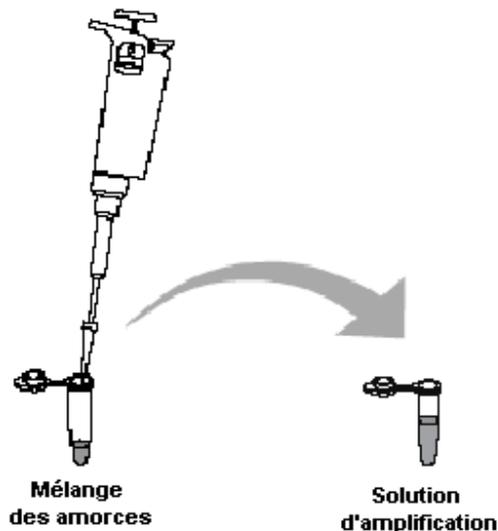
Cours 2 : Préparation des réactions de PCR

<u>Matériaux nécessaires pour la préparation élaborée</u>	<u>Quantité</u>
Tubes avec bouchons à vis	26
Tubes de PCR	48
Adaptateurs de tubes de PCR	48
Solution d'amplification	1 flacon
Amorces d'OGM (rouges)	1 flacon
Amorces de PSII de plante (vertes)	1 flacon
ADN matrice OGM positif	1 flacon
Echantillons d'élèves de TP précédents	16 tubes
Micropipettes à volume ajustable de 2 à 20 µl ou micropipettes à volume fixe de 20 µl	8
Cônes de 2 à 20 µl à filtre	8 portoirs
Béchers avec de la glace ou bains de glace	8
Supports de microtubes en mousse	8
Marqueurs	8

Mode opératoire (temps estimé : 45 min)

Remarque : ajoutez seulement les amorces à la solution d'amplification et distribuez 30 min avant le début du cours et stockez la solution d'amplification préparée sur de la glace.

- Décongelez l'ADN matrice OGM positif et centrifugez les tubes dans une centrifugeuse pour entraîner tous les composants vers le fond. Ajoutez 50 µl d'ADN matrice OGM positif dans les 8 tubes avec bouchons à vis étiquetés OGM (+). Ceci peut être préparé à l'avance et stocké à -20°C pendant 1 à 2 mois si nécessaire.
- Réalisez cette étape 30 min à 1 h avant les TP.** Décongelez la solution d'amplification et les amorces et centrifugez les tubes dans une centrifugeuse pour entraîner tous les composants vers le fond. **Gardez les tubes sur de la glace.**
- Étiquetez les tubes avec bouchons à vis :
 - Étiquetez 9 tubes avec bouchons à vis "SAP" (solution d'amplification de plante).
 - Étiquetez 9 tubes avec bouchons à vis "SAO" (solution d'amplification d'OGM).
- Ajoutez 600 µl de solution d'amplification à un tube SAP et à un tube SAO.
Avant de distribuer les amorces dans les étapes 5 et 6, centrifugez de nouveau les tubes des amorces, si nécessaire, pour vous assurer que les composants ne sont pas piégés dans le bouchon du tube.
- Ajoutez 12 µl des amorces vertes à la solution d'amplification dans le tube SAP et mélangez. **Stockez sur glace.**



6. Ajoutez 12 µl des amorces rouges à la solution d'amplification dans le tube SAO et mélangez. **Stockez sur glace.**
7. Ajoutez 70 µl de solution d'amplification de plante aux amorces nouvellement ajoutées dans chacun des 8 tubes restants étiquetés SAP.
8. Ajoutez 70 µl de solution d'amplification d'OGM aux amorces nouvellement ajoutées dans chacun des 8 tubes restants étiquetés SAO.
9. Déposez un tube SAP, un tube SAO et un tube OGM (+) dans un bain de glace pour chaque poste de travail.
10. Préparez les postes de travail des élèves.

Postes de travail des élèves

<u>Matériel</u>	<u>Quantité</u>
Bain de glace contenant des échantillons d'ADN et des tubes SAO, SAP et OGM (+)	1
Tubes de PCR	6
Adaptateurs de PCR	6
Support de microtubes en mousse	1
Marqueur	1
Micropipette à volume ajustable de 2 à 20 µl ou micropipette à volume fixe de 20 µl	1
Cônes de 2 à 20 µl à filtre	1 portoir

11. Programmez le thermocycler

Etape	Fonction	Température	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	Dénaturation	94°C	2 min	1
Amplification par PCR	Dénaturation	94°C	1 min	40
	Hybridation	59°C	1 min	
	Élongation	72°C	2 min	
Élongation finale	Élongation	72°C	10 min	1
*Maintien	Maintien	4°C	Indéfinie	1

* L'option de maintenir la température à 4°C n'est pas disponible avec certains thermocyclers.

Cours 3 : Electrophorèse des produits de PCR

Les fragments d'ADN amplifiés à partir du promoteur 35S et du terminateur NOS sont, respectivement, de 203 et 225 paires de bases (pb). Le produit de PCR généré à partir du gène du photosystème II est de 455 pb. La séparation des bandes dans cette plage de tailles nécessite soit un gel d'agarose à 3 % soit un gel de polyacrylamide à 10 %. Les deux techniques de gel donnent des résultats excellents. Votre choix de la technique sur gel dépendra des instruments dont vous disposez et des techniques que vous souhaitez enseigner à vos élèves. Les gels de polyacrylamide sont beaucoup plus fragiles que les gels d'agarose à 3 % et, par conséquent, ils peuvent n'être appropriés que pour des élèves plus expérimentés. Toutefois, les gels de polyacrylamide séparent les bandes à un degré supérieur, ce qui permet la séparation des bandes d'ADN de taille similaire générées à partir d'un aliment à tester qui contient à la fois le promoteur CaMV 35S et le terminateur NOS, tel que la papaye génétiquement modifiée. Des directions séparées sont fournies ci-dessous pour chaque méthode d'électrophorèse après les directions communes aux deux.

Matériaux nécessaires	Quantité
Tampon de charge orange G	1 flacon
Marqueurs de poids moléculaires pour la PCR	1 flacon
Microtubes à essai avec bouchons attachés	16 tubes
Micropipette à volume ajustable de 20 à 200 µl	1
Micropipettes à volume ajustable de 2 à 20 µl ou micropipettes à volume fixe de 20 µl	8
Cônes de 20 à 200 µl à filtre ou standards	1 portoir
Cônes de 2 à 20 µl à filtre	8 portoir
Alimentation électrique	2 à 4
Colorant d'ADN Fast Blast	1 bouteille
Ballon ou bouteille de 500 ml pour stocker le colorant Fast Blast dilué	1
Eau distillée	3,5 l
Plateaux de coloration des gels	1 à 8
Matériaux et instrument pour l'électrophorèse	Voir ci-dessous

Mode opératoire (temps estimé : 1 à 3 h)

1. Décongelez le tampon de charge Orange G et les marqueurs de poids moléculaires pour la PCR et centrifugez les tubes pour entraîner les composants au fond.
2. Ajoutez 40 µl de tampon de charge Orange G au flacon des marqueurs de poids moléculaires pour PCR. Mélangez bien et centrifugez.
3. Étiquetez les microtubes à essai avec bouchons attachés :
 - Étiquetez 8 tubes "TC"
 - Étiquetez 8 tubes "MPM"
4. Ajoutez 70 µl de tampon de charge Orange G à chacun des 8 tubes marqués "TC". Ceci peut être préparé à l'avance et stocké à 4°C pendant 1 à 2 mois.
5. Ajoutez 25 µl de marqueurs de poids moléculaires pour PCR à chacun des 8 tubes marqués "MPM". Ceci peut être préparé à l'avance et stocké à 4°C pendant 1 à 2 mois.
6. Préparez les gels, le tampon de migration et l'appareil d'électrophorèse. Reportez-vous aux instructions ci-dessous pour les gels d'agarose ou les gels de polyacrylamide.
7. Préparez le colorant d'ADN Fast Blast. Reportez-vous aux instructions ci-dessous pour la technique de coloration que vous choisissez.
8. Préparez les postes de travail des élèves.

Postes de travail des élèves

<u>Matériaux</u>	<u>Quantité</u>
Gel (voir ci-dessous)	1
Echantillons de TP précédents	6
Tampon de migration (voir ci-dessous)	300 à 350 ml
Tampon de charge Orange	1 flacon
Marqueurs de poids moléculaire pour PCR	1 flacon
Pipette à volume ajustable de 2 à 20 µl ou micropipette à volume fixe de 20 µl	1
Cônes de 1 à 20 µl à filtre	1 portoir
Chambre d'électrophorèse sur gel (peut être partagée par 2 postes de travail)	1
Alimentation électrique (peut être partagée par plusieurs postes de travail)	1
Colorant d'ADN Fast Blast (au poste de travail en commun)	1
Plateau de coloration des gels	1

Electrophorèse sur gel d'agarose

Préparation des gels d'agarose et du tampon de migration TAE

Ces procédures peuvent être réalisées 1 à 2 jours à l'avance par l'enseignant ou pendant le cours par des équipes individuelles d'élèves. Remarque : des gels d'agarose à 3 % pré-coulés pratiques (réf. 161-3017EDU) sont disponibles chez Bio-Rad.

<u>Matériaux (nécessaires en plus de ceux indiqués pour le cours 3)</u>	<u>Quantité</u>
Agarose	10,5 g
TAE 50X	60 ml
Eprouvettes graduées, 3 l et 500 ml	2
Micro-ondes ou plaque brûlante magnétique et bâton d'agitation	1
Bouteille ou ballon d'Erlenmeyer, 1 l	1
Ballon, 50 ml (facultatif)	1
Bain-marie à 60°C (facultatif)	1
Plateaux de coulage des gels	4 à 8
Peignes pour les gels	8
Scotch à autoclave (facultatif)	1 rouleau
Chambre horizontale d'électrophorèse	4 à 8

1. Préparez le tampon d'électrophorèse. Le tampon d'électrophorèse est fourni concentré à 50X. Du tampon TAE 1X est nécessaire pour fabriquer le gel d'agarose et il est également nécessaire pour chaque chambre d'électrophorèse. Trois litres de tampon TAE 1X suffiront pour faire fonctionner 8 chambres d'électrophorèse et pour 8 gels d'agarose. Pour fabriquer 3 l de TAE 1X à partir de concentré de TAE 50 X, ajoutez 60 ml de concentré 50X à 2,94 l d'eau distillée.

2. Fabriquez la solution d'agarose. La concentration du gel recommandée pour cette application est de 3 % en agarose. Cette concentration d'agarose fournit une excellente résolution et minimise le temps de migration pour la séparation électrophorétique des fragments de PCR. Pour fabriquer une solution à 3 %, ajoutez 3 g d'agarose en poudre à 100 ml de tampon d'électrophorèse TAE 1X dans un récipient approprié résistant à la chaleur qui est assez grand pour permettre une ébullition vigoureuse (par exemple, un ballon d'Erlenmeyer de 1000 ml, une bouteille de Wheaton, etc.). Pour 8 gels, vous aurez besoin d'approximativement de 350 ml d'agarose fondu (10,5 g d'agarose plus 350 ml de tampon TAE 1X). L'agarose doit être fabriqué en utilisant du tampon d'électrophorèse, **pas** de l'eau. Faites tourner pour mettre l'agarose en poudre en suspension dans le tampon. Si vous utilisez un ballon d'Erlenmeyer, retourner une fiole d'Erlenmeyer de 50 ml dans l'extrémité ouverte du ballon d'Erlenmeyer de 1000 ml contenant l'agarose. La petite fiole agit comme une chambre de reflux, permettant une ébullition sans trop de perte de volume de tampon par évaporation. L'agarose peut être fondu pour le coulage des gels sur une plaque brûlante magnétique ou dans un four micro-ondes.
Précaution: Utilisez des gants de protection, des gants à four, des lunettes et des blouses de laboratoire comme il est approprié lors de la préparation et du coulage des gels d'agarose. Un contact avec de l'agarose fondu en ébullition ou avec les récipients contenant de l'agarose brûlant peut provoquer des brûlures sévères.

Méthode de la plaque brûlante magnétique. Ajoutez un barreau aimanté dans le ballon contenant l'agarose et le tampon. Chauffez le mélange jusqu'à ébullition tout en agitant sur une plaque brûlante magnétique. Les bulles ou la mousse doivent se rompre avant de s'élever vers le col du ballon. Portez la solution à ébullition jusqu'à la dissolution de toutes les petites particules transparentes d'agarose. Avec la petite fiole toujours en place, mettez l'agarose de côté pour refroidir à 60°C avant de couler les gels (un bain-marie réglé à 60°C est utile pour cette étape).

Méthode du four à micro-ondes. Placez le ballon ou la bouteille contenant la solution d'agarose dans le four à micro-ondes. Desserrez le bouchon de la bouteille s'il y en a un. Utilisez une puissance moyenne et réglez sur 3 minutes. Arrêtez le four à micro-ondes toutes les 30 secondes et faites tourner le ballon pour mettre en suspension l'agarose non dissous. Cette technique est le moyen le plus efficace pour dissoudre l'agarose. Alternez l'ébullition et les rotations de la solution jusqu'à la dissolution de toutes les petites particules transparentes d'agarose. Avec la petite fiole toujours en place, mettez l'agarose de côté pour refroidir à 60°C avant de couler les gels (un bain-marie réglé à 60°C est utile pour cette étape).

Coulage des gels d'agarose

En utilisant le système Mini-Sub[®] Cell GT de Bio-Rad, les gels peuvent être coulés directement dans la cuve en utilisant des barrières de coulées avec le plateau de gels. Si vous ne disposez pas de barrières de coulées, utilisez la méthode avec du scotch à autoclave pour le coulage des gels, telle que présentée ci-dessous. D'autres méthodes sont détaillées dans le manuel d'instructions du Bio-Rad Sub-Cell GT. Les plateaux de gel de 7 x 7 cm permettent de couler un seul gel. Les plateaux de gel de 7 x 10 cm permettent de couler un gel "double", c'est-à-dire un gel avec deux rangées de puits qui peuvent être chargés avec les échantillons de deux équipes d'élèves. Ces gels plus longs ne s'adaptent pas aux barrières de coulées et doivent être traités par la méthode du scotch à autoclave.

1. Scellez bien les extrémités du plateau de gels avec des morceaux de scotch à autoclave. Pressez fermement sur le scotch à autoclave aux bords du plateau de gels pour former un joint étanche aux liquides et laissez le plateau de gels à plat.
2. Préparez une solution d'agarose de la concentration et de la quantité souhaitées dans du tampon d'électrophorèse TAE 1X.
3. Refroidissez l'agarose à au moins 60°C avant de verser (un bain-marie est utile pour cette étape).
4. Alors que l'agarose refroidit à 60°C, placez le peigne dans les fentes appropriées du plateau de gels. Les peignes de gel doivent être placés à ~ 2 cm de l'extrémité du plateau de coulage des gels.
5. Versez 30 à 50 ml d'agarose fondu dans le plateau sur une épaisseur d'approximativement 0,5 cm.
6. Laissez le gel se solidifier à température ambiante pendant 10 à 20 minutes — il est translucide lorsqu'il est prêt à l'emploi.

7. Retirez le peigne avec précaution du gel solidifié. Retirez le scotch à autoclave des bords du plateau de gels. Les gels d'agarose peuvent être stockés enveloppés dans un film de plastique, scellés dans des sachets en plastique ou immergés dans du tampon TAE 1X pendant 2 semaines à 4°C.

Charge et migration des gels d'agarose

1. Placez le plateau de gel sur une chambre d'électrophorèse d'ADN uniformisée de manière à ce que les puits des échantillons soient à l'extrémité de la cathode (noire) de la base. Les échantillons d'ADN migreront vers l'extrémité de l'anode (rouge) de la base au cours de l'électrophorèse.
2. Remplissez la chambre d'électrophorèse avec du tampon de migration TAE 1X jusqu'à environ 2 mm au-dessus de la surface du gel.
3. Chargez les gels comme il est indiqué dans le mode opératoire de l'élève.
4. Faites migrer les gels à 100 V pendant 30 min. On peut obtenir une plus grande résolution en utilisant un temps de migration plus long (par exemple, 45 min), mais si vous utilisez des gels doubles, ne faites migrer les gels qu'à 100 V pendant 30 min parce que l'ADN du gel supérieur pourrait migrer dans le gel inférieur. Ne laissez pas le colorant orange migrer hors du gel.
5. Colorez les gels dans du colorant d'ADN Fast Blast — voir ci-dessous.

Préparation pour colorer les gels d'agarose

Le colorant d'ADN Fast Blast est fourni sous la forme d'un concentré 500X qui doit être dilué avant utilisation. Le colorant peut être utilisé comme un colorant rapide lorsqu'il est dilué à 100X pour permettre la visualisation de l'ADN en 12 à 15 minutes ou il peut être utilisé comme un colorant pendant une nuit lorsqu'il est dilué à 1X. Le colorant d'ADN Fast Blast est une alternative pratique, sans risque et non toxique au bromure d'éthidium pour la détection de l'ADN. Fast Blast contient un composé cationique qui appartient à la famille de colorants des thiazines. Les molécules de colorant chargées positivement sont attirées par et se lient aux groupes phosphates chargés négativement sur l'ADN. La formule déposée du colorant colore l'ADN en bleu profond dans les gels d'agarose et fournit des résultats très nets et cohérents.

AVERTISSEMENT

Bien que le colorant d'ADN Fast Blast soit non toxique et non cancérigène, vous devez porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation du colorant ou des gels colorés pour empêcher vos mains de devenir bleues. Vous devez porter des blouses de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour éviter de colorer vos vêtements. Éliminez les solutions colorantes selon les modes opératoires suivis sur votre site. Utilisez soit de l'eau de Javel à 10 % soit une solution d'alcool à 70 % pour éliminer le Fast Blast de la plupart des surfaces. Vérifiez que ces solutions ne sont pas nocives pour la surface avant de les utiliser.

Préparation pour le mode opératoire de la coloration pendant une nuit (Recommandé)

Pour préparer du colorant 1X (pour la coloration pendant une nuit), diluez 1 ml de Fast Blast 500X avec 499 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans un ballon ou une bouteille de taille appropriée et mélangez. Couvrez le ballon et stockez-le à température ambiante jusqu'à ce que vous soyez prêt à l'utiliser.

Préparation pour le mode opératoire de coloration rapide

Pour préparer du colorant 100X (pour la coloration rapide), diluez 100 ml de Fast Blast 500X avec 400 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans un ballon ou une bouteille de taille appropriée et mélangez. Couvrez le ballon et stockez-le à température ambiante jusqu'à ce que vous soyez prêt à l'utiliser.

La décoloration (pour le mode opératoire de la coloration rapide) nécessite l'utilisation d'au moins un récipient de grand volume, pouvant contenir au moins 500 ml, à chaque poste de travail des élèves. Le Fast Blast 100X peut être réutilisé au moins 7 fois. Veuillez noter qu'au contraire des gels d'agarose à 1 %, les gels d'agarose à 3 % nécessitent 5 min de coloration, avant la décoloration dans de l'eau chaude. À cause du pourcentage élevé d'agarose, les gels colorés par cette méthode rapide prennent plus de temps pour se décolorer à un niveau satisfaisant que les gels d'agarose à 1 %. Des lavages multiples avec de l'eau du robinet chaude aideront la décoloration de ces gels.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Préparation des gels de polyacrylamide et du tampon de migration TBE

<u>Matériaux nécessaires en plus de ceux indiqués pour le cours 3</u>	<u>Quantité</u>
Gels précolés avec TBE à 10 % Ready Gel (réf. 161-1110EDU)	8
TBE 10X (réf. 161-0733EDU)	300 ml
Eprouvette graduée, 3 l	1
Chambre verticale d'électrophorèse Mini-PROTEAN® 3	4 à 8
Cônes Prot/Elec	8 portoirs
Couteau aiguisé ou rasoir	1

Gels de polyacrylamide précolés avec TBE à 10 % Ready Gel

Les gels de polyacrylamide doivent être conservés dans un réfrigérateur jusqu'au moment de l'utilisation. Ne commandez les gels que 2 à 3 semaines avant les TP pour obtenir des résultats optimaux. **Ne les congelez pas.** Pour préparer les gels pour les travaux pratiques, ouvrez les emballages des gels en les découpant au-dessus d'un évier ou d'un récipient, laissez l'excès de tampon s'égoutter et jetez le papier filtre et l'emballage en plastique. Retirez le peigne placé entre les plaques en poussant doucement dessus du bout des doigts vers le haut. Utilisez une lame de rasoir pour découper le long de la ligne noire imprimée sur la bande située au bas devant la cassette de gel et décollez la bandelette de plastique couvrant le bas devant le gel, comme il est indiqué sur la cassette de gel. Assurez-vous que toute la bande est entièrement retirée pour permettre à la longueur entière du bas du gel d'être exposée au courant électrique. Pour de meilleurs résultats, utilisez une pipette de transfert et du tampon de migration TBE 1X pour rincer les puits de tous débris.

Remarque : Les gels TBE Ready Gel® utilisés pour l'électrophorèse de l'ADN pour ces travaux pratiques sont différents des gels contenant du SDS à 15 % utilisés pour les protéines dans les travaux pratiques des empreintes protéiques et les deux types ne doivent pas être substitués l'un à l'autre.

Remarque : Les enseignants peuvent choisir d'assembler les cuves 1 heure avant les travaux pratiques.

Préparez les chambres d'électrophorèse Mini-PROTEAN 3

1. Retirez le peigne du gel précolé Ready Gel et coupez et enlevez la bande le long du bas de la cassette comme il a été décrit ci-dessus.
2. Si deux gels doivent être traités dans une chambre d'électrophorèse, placez une cassette de chaque côté de l'assemblage des électrodes, avec les plaques courtes tournées vers l'intérieur de l'assemblage. Si vous ne traitez qu'un seul gel, placez une cassette Ready Gel sur un côté de l'assemblage des électrodes et un barrage de tampon de l'autre côté. Assurez-vous de placer le côté du barrage de tampon sur lequel est inscrit "BUFFER DAM" dirigé vers l'intérieur.
3. Ouvrez les barrières (cames) sur le devant du cadre d'immobilisation. Maintenez les deux cassettes Ready Gel ou le gel Ready Gel et le barrage de tampon, contre l'assemblage des électrodes et glissez l'assemblage des électrodes dans le cadre d'immobilisation.
4. Appuyez sur le bord externe de l'assemblage des électrodes, pas sur les gels, tout en fermant les cames du cadre d'immobilisation pour assurer un joint sur le bord inférieur de chaque cassette.
5. Placez le cadre d'immobilisation assemblé contenant le(s) gel(s) dans le réservoir de la cuve. Remplir la chambre supérieure de tampon, l'espace entre les deux gels, avec ~ 150 ml de tampon de migration TBE 1X de sorte que le niveau du tampon soit au-dessus des plaques courtes internes. Vérifiez l'absence de fuites. Si l'assemblage fuit, retirez le cadre d'immobilisation assemblé, videz le tampon, rouvrez les cames, et appuyez de nouveau sur l'assemblage des électrodes tout en fermant les cames avant de remplir à nouveau avec du tampon.

6. Versez ~ 200 ml de tampon de migration TBE 1X dans la chambre inférieure de tampon ou réservoir. Vérifiez par deux fois le niveau de remplissage du tampon dans la chambre supérieure de tampon, le niveau du tampon doit être au-dessus des plaques courtes internes. Si les fuites de la chambre supérieure de tampon ne peuvent pas être corrigées en réassemblant le cadre d'immobilisation dans l'étape 5, il est possible de remplir la chambre inférieure (réservoir) au-dessus des petites plaques internes pour égaliser les niveaux de tampon dans les deux réservoirs. Ceci nécessite approximativement 900 ml de tampon de migration TBE 1X.

Charge et migration des gels de polyacrylamide

1. Si disponible, placez un guide jaune de charge des échantillons sur le haut de l'assemblage des électrodes. Le guide dirigera le cône de la pipette vers la position correcte pour charger chaque échantillon dans un puits.
2. Utilisez des cônes Prot/Elec pour charger les échantillons dans les puits. Ces cônes très étroits peuvent passer entre les deux plaques de gel et délivrer les échantillons directement dans les puits. Si vous ne disposez pas de cônes Prot/Elec ou similaires, placez le cône directement au-dessus du puits et entre les deux plaques de gel et laissez l'échantillon tomber doucement dans le puits.
3. Après le dépôt, réalisez la migration des gels de polyacrylamide à 200 V pendant 30 min. Il est acceptable que le front du colorant orange migre en dehors mais stoppez l'électrophorèse si le colorant rouge arrive à 2 cm du bas du gel.
4. Lorsque les gels ont fini de migrer, éteignez l'alimentation électrique et débranchez les câbles. Retirez le couvercle et sortez l'assemblage des électrodes et le cadre d'immobilisation.
5. Déversez le tampon de migration de l'assemblage des électrodes. Ouvrez les cames et retirez les cassettes de gel.
6. Pour que le gel ne soit pas contaminé par vos doigts, portez des gants pour manipuler les gels à partir de maintenant. Posez une cassette de gel à plat sur la pailasse avec la plaque courte tournée vers le haut. Coupez la bande le long des bords de la cassette de gel. Séparez soigneusement les plaques de gel avec une spatule ou vos doigts. Normalement, le gel adhère à l'une des plaques. Transférez la plaque avec le gel qui lui adhère dans un plateau contenant du colorant Fast Blast 1X (voir ci-dessous), en laissant le liquide détacher le gel de la plaque. Le gel peut être soulevé directement (très doucement!) de la plaque et placé dans le colorant.

Préparation pour la coloration des gels de polyacrylamide

Le colorant d'ADN Fast Blast est fourni sous la forme d'un concentré 500X qui doit être dilué 1X avant utilisation et qui colore l'ADN dans le polyacrylamide en environ 30 minutes. C'est une alternative pratique, sans risque et non toxique au bromure d'éthidium pour la détection de l'ADN. Fast Blast contient un composé cationique qui appartient à la famille de colorants des thiazines. Les molécules de colorant chargées positivement sont attirées par et se lient aux groupes phosphates chargés négativement sur l'ADN. La formule déposée du colorant colore l'ADN en bleu profond dans les gels d'agarose et fournit des résultats très nets et cohérents.

WARNING

Bien que le colorant d'ADN Fast Blast soit non toxique et non cancérigène, vous devez porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation du colorant ou des gels colorés pour empêcher vos mains de devenir bleues. Vous devez porter des blouses de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour éviter de colorer vos vêtements. Éliminez les solutions colorantes selon les modes opératoires suivis sur votre site. Utilisez soit de l'eau de Javel à 10 % soit une solution d'alcool à 70 % pour éliminer le Fast Blast de la plupart des surfaces. Vérifiez que ces solutions ne sont pas nocives pour la surface avant de les utiliser.

Préparation pour le mode opératoire de la coloration

Pour préparer du colorant 1X, diluez 1 ml de Fast Blast 500X avec 499 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans un ballon ou une bouteille de taille appropriée et mélangez. Couvrez le ballon et stockez-le à température ambiante jusqu'à ce que vous soyez prêt à l'utiliser.

Cours 4 : Séchage des gels et analyse des résultats

Pour un enregistrement permanent de l'expérience, les gels peuvent être séchés entre des feuilles de cellophane et incorporés dans les cahiers de TP ; voir ci-dessous les modes opératoires pour ces deux méthodes de séchage.

Pour documenter les gels humides, ils peuvent être scannés, photocopiés (un fond jaune fournit un contraste optimal) ou tracés sur un film d'acétate. Remarque : les gels d'agarose à 3 % n'adhèrent pas bien au film de support des gels d'agarose.

Méthode de séchage GelAir™ :

Matériaux nécessaires pour sécher 8 Gels

<u>En utilisant le système de séchage de gel</u> (réf. 165-1771EDU)	<u>Quantité</u>
Cellophane GelAir (réf. 165-1779EDU)	4 feuilles
Table d'assemblage GelAir (réf. 165-1776EDU)	1
Cadres de séchage GelAir (réf. 165-1775EDU)	2
Attaches GelAir (réf. 165-1780EDU)	16
Four de séchage GelAir (facultatif) (réf. 165-1777EDU)	1
Eau distillée	500 ml

En variante, vous pouvez utiliser la méthode avec un sandwich de cellophane et un récipient en plastique :

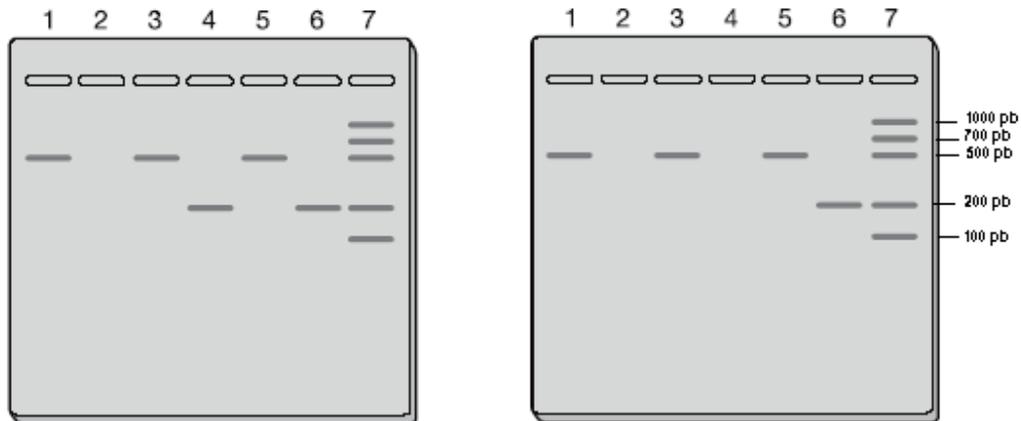
Matériaux nécessaires pour sécher 8 Gels

<u>en utilisant des récipients en plastique</u>	<u>Quantité</u>
Cellophane GelAir (réf. 165-1779EDU)	16 feuilles
Récipient en plastique	8
Elastiques	16
Eau distillée	500 ml

Procédure

1. Pré-humidifiez 2 feuilles de cellophane dans un récipient d'eau pendant 15 à 20 secondes.
2. Placez une feuille de cellophane sur un récipient en plastique. Tendez la cellophane de manière à ce qu'elle forme une surface plane sur le dessus du récipient et utilisez un élastique pour maintenir la feuille en place.
3. Placez un gel sur la cellophane. L'inondation de la surface de la cellophane autour du gel avec de l'eau aidera à éliminer les bulles.
4. Placez la seconde feuille de cellophane humidifiée sur le gel. A cause de leur épaisseur, vous ne pouvez pas éviter les bulles sur les bords des gels d'agarose, mais évitez les bulles entre la cellophane et le gel. Sécurisez la seconde feuille sur la boîte avec un second élastique.
5. Laissez le gel sécher pendant plusieurs jours dans une zone bien ventilée.
6. Le contraste sur les gels d'agarose peut être amélioré en enlevant la cellophane une fois que les gels d'agarose ont séché. Ceci n'est pas possible avec les gels de polyacrylamide.

Résultats typiques de classe



Résultat pour aliment OGM positif

La présence ou l'absence d'une bande de 200 pb dans le couloir 5 indique si l'aliment à tester contient ou non des OGM. Toutefois, la validité de ce résultat dépend des résultats des autres réactions de PCR. Les amorces de plante déterminent si l'ADN végétal a été extrait avec succès de l'échantillon. L'aliment contrôle non OGM est un indicateur de résultats faux positifs, s'il y en a. Si l'aliment contrôle non OGM sort en OGM positif (montrant une bande dans le couloir 2), cela signifie que la PCR a été contaminée à un moment quelconque au cours du traitement. Si votre aliment à tester est également OGM positif, vous ne pouvez pas faire confiance à ce résultat. Le contrôle matrice OGM positif est un indicateur de faux négatifs. Si le contrôle matrice OGM positif ne s'amplifie pas, il y a un problème avec la réaction de PCR et vous ne pouvez pas faire confiance à un résultat OGM négatif pour votre aliment à tester. L'organigramme sur la page suivante montre comment évaluer ces contrôles étape par étape.

Résultat pour aliment OGM négatif

Echantillon de PCR

Taille de bande

Couloir 1 : Aliment non OGM avec amorces de plante	455 pb
Couloir 2 : Aliment non OGM avec amorces d'OGM	Aucune bande
Couloir 3 : Aliment à tester avec amorces de plante	455 pb
Couloir 4 : Aliment à tester avec amorces d'OGM	200 pb ou aucune bande
Couloir 5 : Matrice OGM positive avec amorces de plante	455 pb
Couloir 6 : Matrice OGM positive avec amorces d'OGM	200 pb
Couloir 7 : Marqueurs de poids moléculaires de PCR	1000, 700, 500, 200, 100 pb

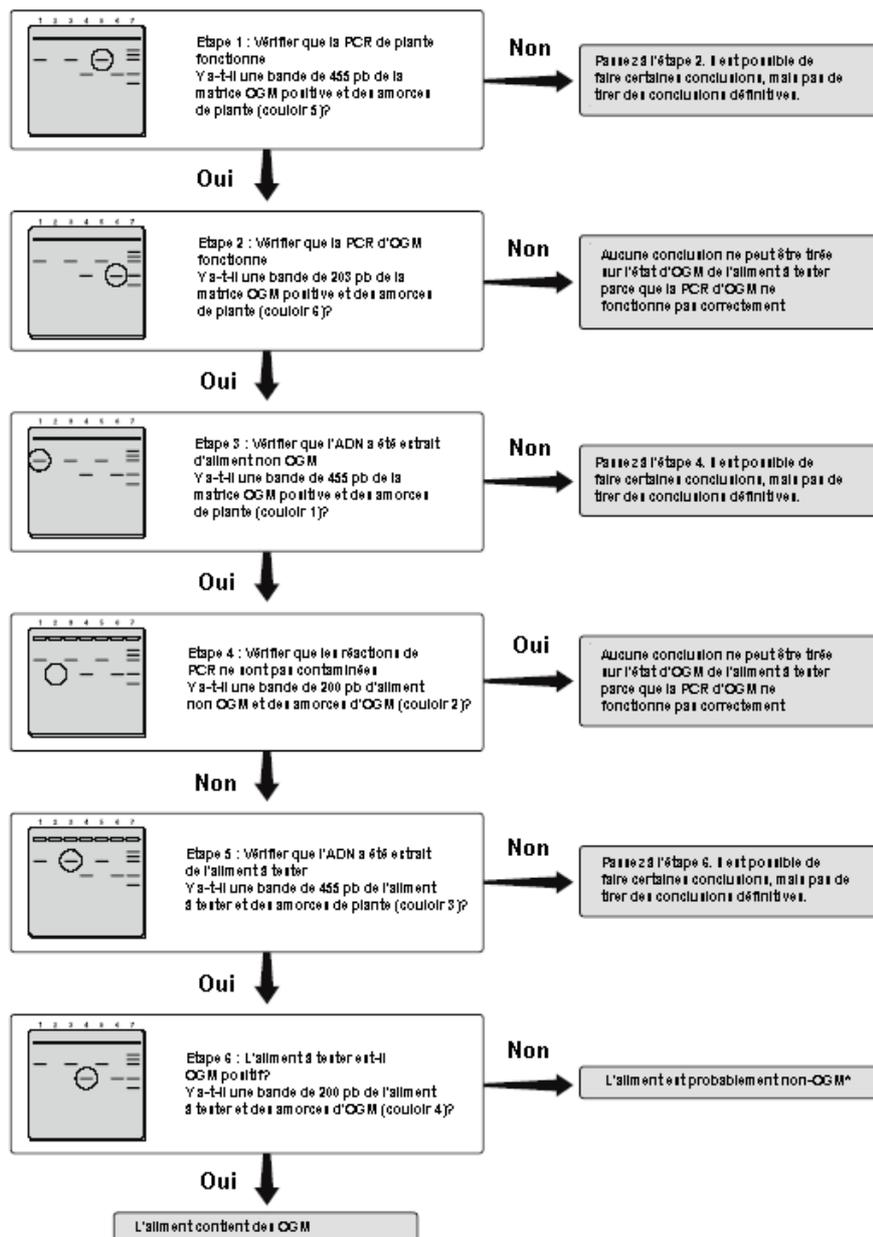


Fig. 4. Guide étape par étape de l'analyse des résultats

* Remarque : ce kit détecte approximativement 85 % des aliments GM. Par conséquent, vous ne pouvez pas conclure de manière définitive qu'un aliment est non OGM.

Conseils et questions fréquemment posées

Cours 1 : Extraction de l'ADN d'échantillons d'aliments

Aliment de contrôle non OGM certifié par Bio-Rad :

- Le broyage des graines entières prend un peu de temps mais un broyage total n'est pas nécessaire. Vous découvrirez que l'eau aidera à ramollir les graines et facilitera le broyage.
- Il est important de traiter l'échantillon non OGM certifié par Bio-Rad en premier, parce que la PCR est très sensible et tout ADN OGM positif peut contaminer votre équipement.
- Pour réduire le risque de contamination ou pour gagner du temps, vous pouvez souhaiter préparer ceci à l'avance et faire que vos élèves ne préparent que leurs échantillons à tester.

Quels aliments dois-je choisir pour les TP?

Les aliments OGM actuellement approuvés pour la vente aux Etats-Unis comprennent le maïs, le soja, la papaye, la pomme de terre, le colza, le riz, la courge, la betterave à sucre, la tomate (pour plus d'informations, voir www.agbios.com). Toutefois, l'approbation ne signifie pas nécessairement que ces aliments sont distribués. Les principales récoltes d'aliments OGM distribuées aux Etats-Unis sont le maïs, le soja et la papaye.

Le cœur de ce TP est la qualité et la quantité d'ADN extrait de votre aliment. Le tableau ci-dessous liste la fiabilité de différents aliments en ce qui concerne l'extraction d'ADN et les résultats de PCR ; les aliments les moins fiables peuvent produire des bandes plus faibles. Si vous souhaitez que vos élèves découvrent des aliments contenant des OGM, vous pouvez vouloir éviter les produits à base de blé et de riz, les fruits et les légumes frais qui sont presque certainement OGM négatifs et choisir des produits à base de papaye, de soja et de maïs.

Très fiables	Fiabiles	Moins fiables	Très difficiles/ Impossibles
Maïs frais	Saucisses aux légumes	Burgers aux légumes	Huile
Papaye fraîche	Chips de maïs	Bâtonnets de maïs	Sauce salade
Mélange de pain/gâteau au maïs	Chips de maïs aromatisées	Popcorn	Céréales (ex. : cornflakes)
Plat au maïs	Beignets de maïs	Frites	Farine de froment
Farine de soja	Boulettes de viande et burgers contenant des protéines de soja	Chips de pomme de terre	
	Boissons/poudres de protéines de soja		

Prévention de contamination

Une partie de ce TP implique la recherche d'un résultat négatif (c'est-à-dire que l'ADN extrait de l'aliment de contrôle non OGM n'est pas amplifié avec les amorces d'OGM). Si cet échantillon est contaminé avec de l'ADN OGM positif, en produisant une bande sur le gel, les résultats de tout le TP ne seront pas concluants parce que tous les échantillons ont pu aussi être contaminés et vous ne pouvez pas faire confiance à un résultat OGM positif pour vos échantillons d'aliments à tester. Par conséquent, il est impératif que vous et vos élèves preniez les bonnes mesures pour vous sauvegarder de toute contamination. Souvenez-vous que l'ADN peut être transformé en aérosol, se trouver dans les cônes des pipettes et flotter dans l'air. Le maintien des tubes bouchés sauf pendant l'utilisation immédiate, l'utilisation de cônes à filtre à tous les stades du TP, le nettoyage des surfaces de travail et des instruments et le rinçage cônes des pipettes avec de l'eau de Javel à 10 % (pour détruire l'ADN) vous aideront à réduire le risque de contamination.

Matrice InstaGene™ : Quelle est sa fonction?

La matrice InstaGene est constituée d'une suspension de billes microscopiques chargées négativement qui fixent les cations bivalents comme le magnésium (Mg^{2+}). Il est important d'éliminer les cations bivalents des échantillons d'ADN extrait parce que les cations aident les enzymes qui dégradent l'ADN matrice. Lorsque des cellules végétales sont lysées et portées à ébullition en présence de matrice InstaGene, les cations bivalents libérés des cellules se fixent aux billes et la chaleur inactive les enzymes de dégradation de l'ADN. Les billes sont ensuite transformées en culot par centrifugation. Le surnageant, qui contient l'ADN génomique intact propre, peut être utilisé comme matrice dans les réactions de PCR.

Les billes de la matrice InstaGene se déposent rapidement dans la solution. Il est extrêmement important que le flacon de matrice soit parfaitement homogénéisé avant de pipeter des aliquots pour chaque poste de travail des élèves, de manière à ce que les aliquots contiennent des quantités équivalentes de billes.

Si les échantillons d'ADN ne sont pas amplifiés dans les 24 heures, vous pouvez les stocker dans le réfrigérateur dans la matrice InstaGene pendant 1 semaine. Pour un stockage plus long, déposez les échantillons dans le congélateur pour empêcher la dégradation de l'ADN. Avant d'utiliser les échantillons dans la PCR, les billes doivent être remises en culot par centrifugation juste avant de constituer les réactions de PCR.

Cours 2 : Préparation des réactions de PCR

De nouveau, les élèves doivent se souvenir de se préserver contre une contamination, d'utiliser des nouveaux cônes qui filtrent les aérosols à chaque étape et de garder les tubes bouchés sauf lorsqu'ils y ajoutent immédiatement un réactif.

Dois-je retirer la matrice InstaGene avant la PCR?

Il est extrêmement important de transformer en culot les billes de InstaGene complètement au fond du tube avant de prélever un aliquot du lysat pour la réaction de PCR. Les billes se fixent aux cations bivalents tels que Mg^{2+} , qui sont essentiels à la fonction de la *Taq* polymérase. Ainsi, si des billes sont transportées dans la réaction de PCR, celle-ci pourrait être inhibée. La matrice InstaGene peut être transformée en culot de manière efficace par centrifugation (6000 x g pendant 5 min). Lorsque vous transférez les échantillons d'ADN des échantillons d'InstaGene, prélevez soigneusement 20 µl du surnageant au-dessus des billes (qui contient l'ADN génomique).

Solution d'amplification : Qu'est-ce que c'est?

La solution d'amplification contient un mélange de nucléotides ou dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), du tampon et de la *Taq* ADN polymérase. La solution d'amplification complète est préparée en ajoutant des amorces à la solution d'amplification juste avant la période de travaux pratiques. Ainsi, lorsque 20 µl de l'ADN matrice sont ajoutés à 20 µl de solution d'amplification complète, tous les composants nécessaires pour une réaction de PCR de 40 µl sont présents.

Remarque : Une fois que la solution d'amplification et les amorces ont été mélangées, elles doivent être conservées sur de la glace et utilisées dans les 30 minutes à 1 h. Ces réactifs sont extrêmement sensibles.

Pourquoi les amorces sont-elles rouges et vertes?

Les mélanges des amorces contiennent un colorant compatible avec la PCR qui permettent de visualiser facilement et de distinguer les différentes solutions d'amplifications. Les colorants migrent également dans le gel en mettant en évidence visuellement l'électrophorèse.

La PCR dans un thermocycler

L'amplification par PCR a lieu dans un thermocycler qui effectue des cycles d'étapes de chauffage et de refroidissement en alternance. Ces TP utilisent un cycle à trois étapes : l'ADN subit une dénaturation à 94°C pendant 1 minute, une hybridation à 59°C pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 2 minutes. Ce cycle est répété 40 fois au cours de la progression de l'amplification par PCR. Au cours de la dénaturation, les deux brins de l'ADN matrice sont séparés pour donner accès aux amorces de la PCR. Au cours de l'étape d'hybridation, les amorces de la PCR reconnaissent et se lient à l'ADN matrice. Une fois que les amorces sont liées, la *Taq* ADN polymérase étend les amorces pour répliquer le segment d'ADN au cours de l'étape d'élongation. La réaction de PCR prendra approximativement 3,5 heures pour être complète.

Les tubes de PCR sont très petits et demandent des précautions lorsqu'ils sont manipulés. Il est important de boucher soigneusement et complètement les tubes avant de les déposer dans le thermocycler. Si les tubes ne sont pas complètement fermés, une évaporation substantielle peut avoir lieu et l'amplification par PCR sera inhibée. Les thermocyclers de Bio-Rad ont été développés pour fonctionner sans huile. De l'huile n'est pas nécessaire dans les puits des blocs thermiques ou dans les tubes des échantillons. Les puits des échantillons ont une certaine forme permettant un contact uniforme avec la plupart des tubes de PCR à paroi fine de 200 µl. **N'utilisez pas des microtubes à essai à paroi fine de 500 µl avec ces thermocyclers.** Le couvercle chauffé du bloc des échantillons maintient une température supérieure au bloc des échantillons à tout moment au cours d'un programme de cycles thermiques. Ceci empêche la vapeur d'eau de se condenser sous le bouchon du tube à échantillon, réduisant de cette manière l'évaporation des échantillons et éliminant le besoin de surcouches d'huile dans les tubes.

Quelle est la stabilité des réactions de PCR nouvellement préparées?

Une incubation étendue de la solution d'amplification et de l'ADN génomique diminue l'efficacité de l'amplification. Ainsi, si vous souhaitez déposer deux classes dans une machine de PCR ou si vous avez plus de réactions de PCR que d'espace dans votre thermocycler, nous vous suggérons de ne pas incuber les réactions pendant plus d'une heure avant les cycles.

La PCR manuelle

Il est possible de réaliser manuellement la PCR sans un thermocycler automatisé, bien que la PCR ne soit pas aussi efficace. Pour une amplification par PCR manuelle, les réactions doivent être réalisées dans des tubes avec des bouchons à vis et surmontés d'une goutte d'huile minérale pour empêcher l'évaporation. Les tubes sont déposés dans un bloc thermique ou dans un bain-marie réglé à 95°C pendant 1 minute, puis ils sont transférés manuellement dans un bloc thermique ou un bain-marie réglé à 59°C pendant 1 minute et finalement ils sont transférés dans un bloc thermique ou dans un bain-marie réglé à 72°C pendant 2 minutes. Quarante cycles de PCR manuelle doivent prendre ~ 3 heures. C'est fastidieux mais cela fonctionne. Bonne chance !

Cours 3 : Electrophorèse des produits de PCR

Electrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide?

Les fragments d'ADN amplifiés à partir du promoteur 35S et du terminateur NOS sont, respectivement, de 203 et 225 paires de bases (pb). Le produit de PCR généré à partir du gène du photosystème II est de 455 pb. La séparation des bandes dans cette plage de tailles nécessite soit un gel d'agarose à 3 % soit un gel de polyacrylamide à 10 %. Les deux techniques sur gel donnent d'excellents résultats. Votre choix de la technique sur gel dépendra des instruments dont vous disposez et des techniques que vous souhaitez enseigner à vos élèves. Les gels de polyacrylamide sont beaucoup plus fragiles que les gels d'agarose à 3 % et, par conséquent, ils peuvent n'être appropriés que pour des élèves plus expérimentés. Toutefois, les gels de polyacrylamide séparent les bandes à un degré supérieur, ce qui permet la séparation de bandes d'ADN de taille similaire générées à partir d'un aliment à tester qui contient à la fois le promoteur CaMV 35S (203 pb) et le terminateur NOS (225 pb), tels que la papaye génétiquement modifiée. Reportez-vous à la page 3 pour les accessoires dont vous aurez besoin selon si vous choisissez l'électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide.

Tampon de charge orange G

Avant l'électrophorèse des échantillons amplifiés, les élèves doivent ajouter 10 µl de tampon de charge orange G 5X dans chacun de leurs tubes de PCR. Le tampon de charge contient du glycérol qui augmente la densité de l'échantillon et assure qu'il sombre dans le puits du gel d'agarose. En outre, le tampon de charge contient un colorant appelé orange G qui co-migre avec l'ADN de ~ 50 pb dans un gel d'agarose à 3 % ou avec ~ 20 pb dans un gel d'acrylamide à 10 %.

Migration du colorant

Gels d'agarose — Il ne faut pas laisser le colorant orange du tampon de charge migrer hors du gel d'agarose, autrement certains échantillons peuvent être perdus.

Gels de polyacrylamide — Le front du colorant orange peut migrer hors du gel de polyacrylamide. Il ne faut pas laisser le colorant rouge de l'amorce d'OGM migrer hors des gels de polyacrylamide.

En outre, les différents colorants utilisés pour colorer les amorces migrent à des vitesses différentes à cause de différences de charges et ils fournissent une démonstration visible utile de l'électrophorèse.

Puis-je utiliser du bromure d'éthidium pour colorer mes gels ?

Ce TP a été optimisé pour l'utilisation de colorant d'ADN Fast Blast, un colorant d'ADN sans risque et non toxique. Le bromure d'éthidium (EtBr) est le colorant traditionnel utilisé pour visualiser l'ADN et il est plus sensible que le Fast Blast et il fonctionnera bien pour colorer les gels pour ce TP. Toutefois, EtBr est un agent mutagène connu et on le suspecte d'être cancérigène et il nécessite l'utilisation de lumière UV pour visualiser l'ADN. Un désavantage de l'utilisation d'EtBr est que, à cause de sa sensibilité supérieure, les bandes de dimères des amorces peuvent être plus visibles avec l'EtBr qu'avec le Fast Blast et cela peut entraîner une certaine confusion au niveau de l'interprétation des résultats par les élèves moins expérimentés. Si de l'EtBr est utilisé comme colorant pour les gels d'agarose, les gels doivent contenir 0,05 µg/ml d'EtBr dans l'agarose. Cette concentration produit un contraste maximal de bandes amplifiées. Remarque : le colorant d'ADN Fast Blast stoppe la coloration de l'EtBr, aussi visualisez avec l'EtBr avant le colorant Fast Blast. Les gels de polyacrylamide doivent être colorés après l'électrophorèse. Colorez les gels dans 0,05 µg/ml d'EtBr et décolorez dans de l'eau au moins 2 fois pendant 20 min.

Cours 4 : Analyse des résultats

Pourquoi les aliments étiquetés "non OGM" ou "organiques" se révèlent-ils OGM positifs?

D'abord, vérifiez vos contrôles. Est-ce que le résultat de votre aliment de contrôle non OGM pour ce test est négatif pour les OGM? Si la réponse est oui, vous pouvez encore avoir une contamination dans juste cet échantillon, plutôt que dans toutes les réactions, aussi le meilleur moyen de confirmer votre résultat est de répéter le test. Toutefois, il peut bien y avoir des OGM dans l'aliment étiqueté "non OGM". Différents pays ont des réglementations différentes pour l'étiquetage des aliments. La plupart des pays permettent d'étiqueter les aliments "non OGM" (ou en variante, non étiquetés "OGM") lorsque le pourcentage de substances dérivées d'OGM dans l'aliment est inférieur à un taux légiféré (généralement 1 à 5 %). Le test par PCR est assez sensible pour détecter ces taux bas. Des tests quantitatifs de détection du pourcentage d'OGM dans des aliments peuvent être réalisés par un laboratoire d'analyse des OGM utilisant la PCR en temps réel.

Pourquoi mes contrôles non OGM sont-ils OGM positifs?

A un certain point du traitement, les échantillons ont été contaminés avec de l'ADN OGM positif.

Pourquoi n'ai-je pas obtenu de l'ADN végétal viable?

Des erreurs peuvent être faites au cours de l'extraction de l'ADN, lesquelles peuvent être vérifiées en répétant le test. Toutefois, certains aliments ne produisent pas de l'ADN pouvant être amplifié par PCR. Ce kit a été optimisé pour tester des aliments à base de maïs, de soja et de papaye. Reportez-vous au tableau de la page 26 pour les aliments fiables recommandés.

Mode opératoire

Jour un : Extraction de l'ADN des échantillons d'aliments

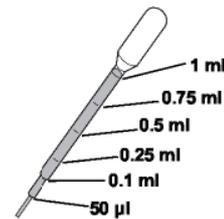
1. Prenez vos tubes avec bouchons à vis et étiquetez-en un "non OGM" et un "test".
2. Pesez 0,5 à 2 g d'aliment certifié non OGM et déposez-les dans le mortier.



3. Ajoutez 5 ml d'eau distillée par gramme d'aliment. Pour calculer les volumes d'eau dont vous avez besoin, multipliez la masse en grammes de l'aliment pesé par 5 et ajoutez ces millilitres.

Masse d'aliment = g x 5 = _____ ml

4. Broyez avec le pilon pendant au moins 2 min pour former une suspension épaisse.
5. Ajoutez de nouveau 5 volumes d'eau et mélangez ou broyez encore pour obtenir un mélange assez lisse pour la pipette.

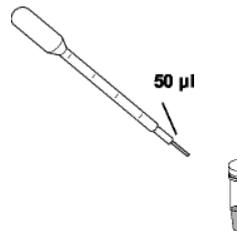


6. Pipetez 50 µl de suspension broyée dans le tube avec bouchon à vis contenant 500 µl d'InstaGene étiqueté "non OGM" en utilisant la marque 50 µl sur une pipette graduée. Rebouchez le tube.



7. Répétez les étapes 2 à 5 pour préparer l'échantillon d'aliment à tester.

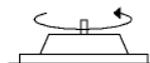
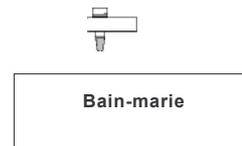
8. Pipetez 50 µl de la suspension épaisse d'aliment à tester broyé dans le tube avec bouchon à vis étiqueté "test". Rebouchez le tube.



9. Agitez ou tapotez les tubes d'InstaGene d'aliment non OGM et d'aliment à tester et placez les tubes dans un bain-marie à 95°C pendant 5 min.

10. Placez les tubes dans une centrifugeuse de manière équilibrée et centrifugez pendant 5 min à vitesse maximale.

11. Stockez les tubes dans un réfrigérateur jusqu'au cours suivant.

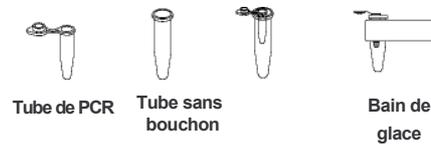


Jour 2 : Préparation des réactions de PCR

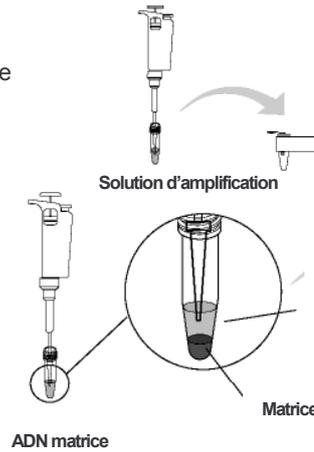
1. Numérotez les tubes de PCR de 1 à 6 et apposez vos initiales. Les numéros doivent correspondre à la teneur de tube suivante :

Numéro de tube	Solution d'amplification	ADN
1	20 µl de SA de plante (vert)	20 µl d'ADN d'aliment de contrôle non OGM
2	20 µl de SA d'OGM (rouge)	20 µl d'ADN d'aliment de contrôle non OGM
3	20 µl de SA de plante (vert)	20 µl d'ADN d'aliment à tester
4	20 µl de SA d'OGM (rouge)	20 µl d'ADN d'aliment à tester
5	20 µl de SA de plante (vert)	20 µl d'ADN de contrôle OGM positif
6	20 µl de SA d'OGM (rouge)	20 µl d'ADN de contrôle OGM positif

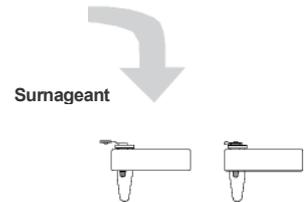
2. Placez chaque tube dans un adaptateur de microtube sans bouchon, sur le support en mousse, sur la glace.



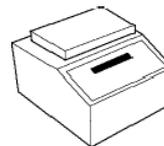
3. En vous reportant au tableau et en utilisant un cône neuf pour chaque addition, ajoutez 20 µl de solution d'amplification indiquée dans chaque tube de PCR, bouchez les tubes.



4. En vous reportant au tableau et en utilisant un cône neuf pour chaque tube, ajoutez 20 µl de l'ADN indiqué, assurez-vous d'éviter le culot d'InstaGene au fond des tubes. Mélangez par pipetage ; rebouchez les tubes.



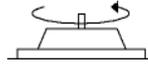
5. Lorsqu'on vous le demande, placez les tubes de PCR dans le thermocycler.



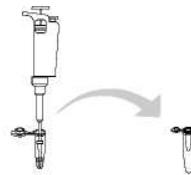
Jour 3 : Electrophorèse des produits de PCR

1. Préparez votre appareil d'électrophorèse sur gel selon les instructions.

2. Reprenez votre tube de PCR du thermocycler et placez-le dans l'adaptateur de microtube sans bouchon. Centrifugez le tube pendant ~ 3 secondes.

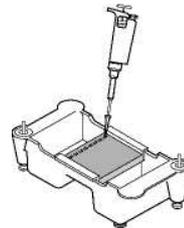


3. En utilisant un cône neuf à chaque fois, ajoutez 10 µl de tampon de charge Orange G (TC) à chaque échantillon et mélangez bien.

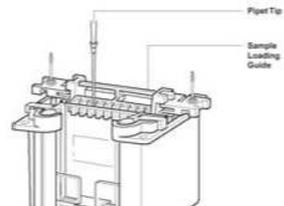


4. Chargez 20 µl de marqueur de poids moléculaire et 20 µl de chaque échantillon dans votre gel comme indiqué ci-dessous :

Couloir	Echantillon	Volume chargé
1	Echantillon 1 : Aliment de contrôle non OGM avec amorces de plante	20 µl
2	Echantillon 2 : Aliment de contrôle non OGM avec amorces d'OGM	20 µl
3	Echantillon 3 : Aliment à tester avec amorces de plante	20 µl
4	Echantillon 4 : Aliment à tester avec amorces d'OGM	20 µl
5	Echantillon 5 : ADN OGM positif avec amorces de plante	20 µl
6	Echantillon 6 : ADN OGM positif avec amorces d'OGM	20 µl
7	Marqueur de poids moléculaire pour PCR	20 µl
8	Laissez vide	

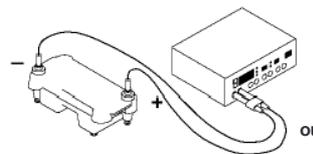


Gel d'agarose

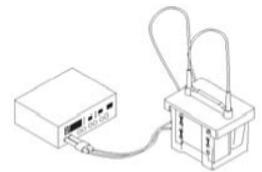


Gel de polyacrylamide
Polyacrylamide Gel

5. Le temps de migration et le voltage dépendront du type de gel que vous utilisez. Traitez un gel d'agarose pendant 30 min à 100 V et un gel de polyacrylamide à 200 V pendant 20 min.



Electrophorèse du gel d'agarose



Electrophorèse du gel de polyacrylamide

6. Colorez dans du colorant d'ADN Fast Blast. Reportez-vous aux instructions spécifiques selon le type de gel.

