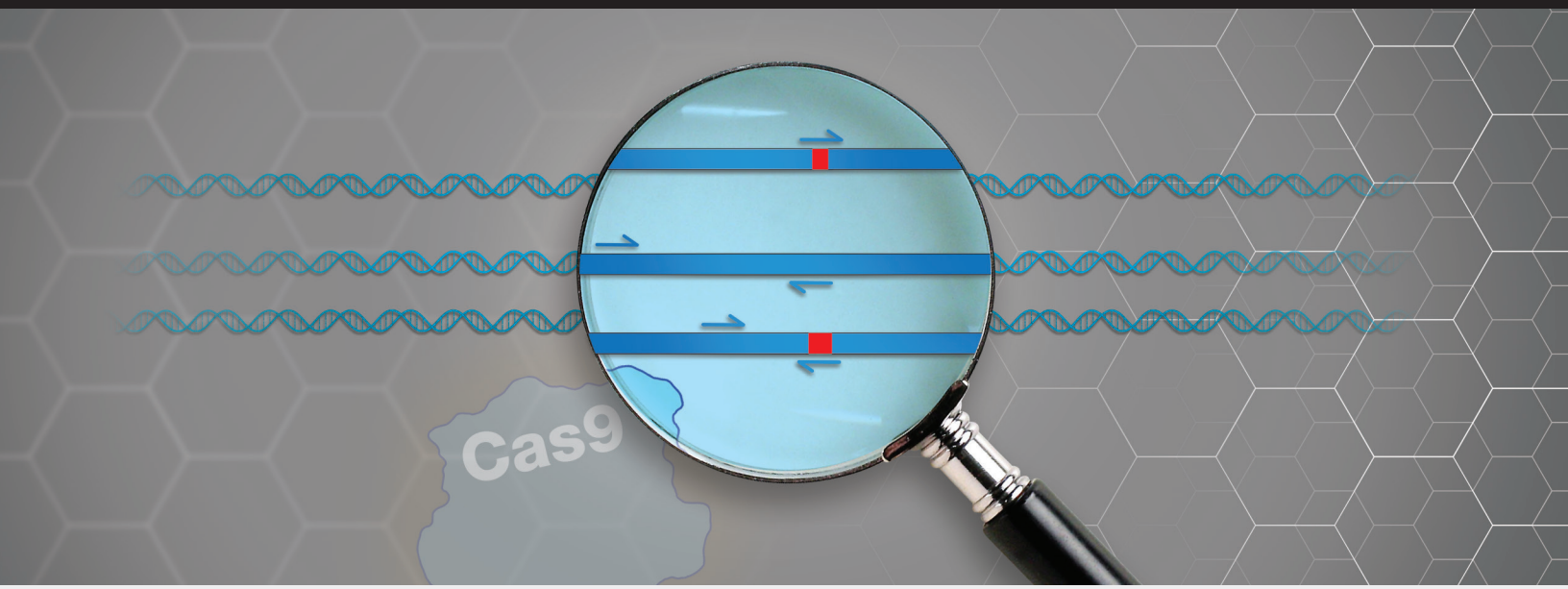
BIO-RAD Explorer



Out of the Blue Genotyping Extension

N° de référence 12012607EDU

Guide de l'enseignant

Remarque : La reproduction de toute partie du présent document est autorisée exclusivement à des fins non commerciales d'enseignement. L'usage commercial du contenu protégé par le droit d'auteur, incluant l'utilisation dans des matériaux éducatifs pour laquelle un paiement est reçu, nécessite l'autorisation expresse de la part de Bio-Rad™ Laboratories, Inc. Contactez-nous à l'adresse **explorer@bio-rad.com** pour de plus amples informations.

Ce produit n'est pas destiné à l'auto-médication.

Pour l'assistance technique, contactez votre service Bio-Rad local ou le **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723) option 2 pour les États-Unis.

BIO-RAD

Cher enseignant

Lors de leurs travaux pour percer peu à peu les mystères du mécanisme « CRISPR » nouvellement découvert, les chercheurs ont compris récemment que nos connaissances en matière d'immunité des bactéries étaient loin d'être complètes. La mise en lumière d'une réponse immunitaire adaptative chez les bactéries donne à la communauté scientifique encore un autre exemple de la puissance du processus de recherche scientifique. Des chercheurs issus de nombreux laboratoires du monde entier ont méticuleusement conçus des expériences, remis en cause les données de leurs confrères et émis des revendications étayées par de multiples sources de preuves. Au bout du compte, le travail fourni pour comprendre ce minuscule pan de biologie a conduit à une percée dans la recherche en sciences de la vie et dans le diagnostic qui aura des conséquences sur nos vies pour les décennies à venir.

Dans cette activité d'extension, les étudiants utiliseront l'amplification en chaîne par polymérase (communément appelée la PCR) pour rassembler des preuves au niveau moléculaire de l'édition du génome bactérien par CRISPR, en complément des résultats obtenus précédemment dans le cadre des activités de la trousse Out of the Blue CRISPR Kit. L'extension n'est pas seulement une étape clé du processus de recherche réel, mais offre aussi aux étudiants l'opportunité de s'exercer à la pratique scientifique, à savoir rassembler et utiliser des preuves issues de différentes sources. À l'instar des chercheurs qui dévoilent davantage de la complexité du mécanisme CRISPR avec chaque nouvelle expérience, vos étudiants participeront à l'avancée en cours de la découverte scientifique.

Les activités comprises dans cette trousse ont été développées en partenariat avec Sherry Annee, ancienne présidente de la National Association of Biology Teachers et professeure en biotechnologie à la Brebeuf Preparatory Academy à Indianapolis, dans l'Indiana, et Thomas Tubon Jr., professeur et directeur du programme Stem Cell Program de l'université Madison Area Technical College de Madison, dans le Wisconsin.

Votre retour d'information constitue une aide précieuse dans nos efforts permanents pour améliorer notre programme et nos produits. N'hésitez pas à nous faire parvenir vos anecdotes, commentaires et suggestions.

Partagez les réussites de vos étudiants sur les réseaux sociaux avec le tag @bioradeducation.

L'Équipe Bio-Rad Explorer
Bio-Rad Laboratories
6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547
explorer@bio-rad.com

Sommaire

Avant de commencer
Conservation des trousses 1
Consignes de sécurité 1
Composants de la trousse 2
Informations relatives à la commande 3
Aperçu des activités de la trousse 4
Chronologie des activités 5
Adéquation du programme 6

Préparation réalisée par l'enseignant
Instructions de préparation 7
Informations préalables destinées à l'enseignant 9

Guide de l'enseignant
Extraction d'ADN de colonies bactériennes et PCR 10

Annexe : Protocole Fast Gel et instructions relatives à la préparation de l'électrophorèse 12

Ressources 16

Conservation des trousses

Sur réception de la trousse Out of the Blue Genotyping Extension :

1. Consigner l'emplacement de stockage et les numéros de lots figurant sur les étiquettes de produits.

2. Conserver le jeu de recharge de réactif **Out of the Blue Genotyping Extension Reagent Refill Pack** au congélateur (–20 °C).

3. Conserver la **matrice InstaGene** et le **colorant de charge UView 6x** (si acheté) à 4 °C.

4. Conserver la boîte de la trousse et les matériaux plastiques à température ambiante.

5. Visiter le site **bio-rad.com/outoftheblue** pour télécharger les guides de l'enseignant et de l'étudiant.

Le **support technique** est joignable à l'adresse support@bio-rad.com ou 1-800-4BIORAD, option 2.

Consignes de sécurité

Le port de lunettes de protection et de gants est vivement recommandé. Les étudiants doivent se laver les mains avec du savon avant et après cette expérience. Si quelque solution que ce soit touche les yeux des étudiants, rincez à l'eau pendant 15 minutes. Le port de blouses de laboratoire ou d'autres vêtements de protection est recommandé pour éviter de tacher les vêtements.

La gélose LB, que les étudiants manipuleront dans le cadre de l'activité d'extension du génotype, contient de la kanamycine et de la spectinomycine, des antibiotiques susceptibles de causer des réactions allergiques ou des irritations. Les personnes souffrant d'allergie à l'un de ces composants ou à des antibiotiques similaires doivent consulter leur médecin avant de manipuler les matériels et réactifs de cette trousse. En suivant les activités de laboratoire, placer toutes les boîtes de culture bactérienne et tous les matériels en contact avec les bactéries dans une solution d'eau de Javel de 10 % pendant au moins 20 minutes pour les décontaminer. Suivre les réglementations locales pour d'autres recommandations relatives à l'élimination.

La souche bactérienne *E. coli* HB101-pBRKan utilisée dans cette activité est non pathogène et a été génétiquement modifiée pour empêcher sa croissance en l'absence de milieu enrichi. Cependant, les pratiques d'usage en microbiologie doivent être mises en œuvre.

Faire preuve de prudence lors de la manipulation de gélose fondue chaude. Il est recommandé d'utiliser des gants hautement résistants ainsi que tout autre équipement de protection individuelle d'usage, y compris des lunettes et une blouse de laboratoire.

Composants de la trousse

Chaque trousse contient le matériel nécessaire pour 8 postes de travail étudiants.

Article	Quantité
InstaGene Matrix	20 ml
2x PCR Master Mix	1 200 µl
Out of the Blue Primer Mix, 50x	20 µl
Out of the Blue PCR Positive Control DNA	150 µl
PCR MW Ruler	200 µl
Orange G Loading Dye, 5x	1 ml
Tube conique de 1,5 ml, bouchon fileté à joint torique, stérile	50
Microtube avec bouchon, 1,5 ml	60
Tube PCR, 0,2 ml	100
Guide des réponses de l'enseignant	1
Small Fast Blast DNA Electrophoresis Pack	
Fast Blast DNA Stain, 500x	100 ml
Agarose de biologie moléculaire certifiée	25 g
Tampon d'électrophorèse TAE, 50x	100 ml
Small UView DNA Electrophoresis Pack	
UView 6x Loading Dye and Stain	1 ml
Agarose de biologie moléculaire certifiée	25 g
Tampon d'électrophorèse TAE, 50x	100 ml

Matériel requis (non compris dans cette trousse)	Quantité
Thermocycleur comportant au moins 56 puits	1
Micropipette et pointes à volume réglable de 100 – 1 000 µl	8
Micropipette et pointes à volume réglable de 20 – 200 µl	1
Micropipette et pointes à volume réglable de 2 – 20 µl	8
Chambre d'électrophorèse horizontale sur gel avec plateau et peigne de coulage	4 – 8
Alimentation électrique	1 – 8
Bain sec ou bain-marie avec ensemble de portoirs d'échantillons flottants à 56 °C	1 – 2
Bain sec ou bain-marie avec ensemble de portoirs d'échantillons flottants à 95 °C	1 – 2
Microcentrifugeuse, ≥2 000 x g	4 – 8
Transilluminateur UV (si colorant de charge UView 6x utilisé)	1
Plateau de coloration du gel (si le colorant Fast Blast DNA Stain est utilisé)	4 – 8
Portoirs d'échantillons	8
Micro-ondes	1
Eau distillée	750 ml
Éprouvettes graduées, 1 l, 200 ml et 50 ml, pour la préparation des tampons	1 pour chaque tampon
Bécher ou bidon plastique, >2,5 l, pour la préparation de tampons	1
Bécher, 500 ml, pour la préparation de colorant Fast Blast DNA Stain (s'il est utilisé)	1
Erlenmeyer, ≥500 ml, pour la préparation de l'agarose	1
Marqueur indélébile	8

Matériel recommandé (non compris dans cette trousse)	Quantité
Agitateur vortex	4 – 8
Adaptateur de tube PCR pour centrifugeuse	1 – 8
Portoir d'échantillons PCR	8

Out of the Blue Genotyping Extension

Small Fast Blast DNA Electrophoresis Pack

Small UView DNA Electrophoresis Pack

Informations relatives à la commande

N° de référence	Description
Trousses et jeux de recharge	
12012607EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension**
12012708EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension Refill Pack**
17006070EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension plus Small Fast Blast Electrophoresis Pack**
17006284EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension plus Small UView Electrophoresis Pack**
12012608EDU	**Out of the Blue CRISPR Kit**
12012620EDU	**Out of the Blue CRISPR Kit Refill Pack**
17006081EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension Kits**
17006286EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits plus Small Fast Blast DNA Electrophoresis Pack**
17006285EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits plus Small UView DNA Electrophoresis Pack**
Consommables	
7326030EDU	**InstaGene Matrix**, 20 ml
1660450EDU	**Small Fast Blast Electrophoresis Reagent Pack**, comprend 25 g d'agarose en poudre, 100 ml de colorant 500x Fast Blast DNA Stain, 100 ml de tampon d'électrophorèse TAE 50x
1660462EDU	**Small UView Electrophoresis Reagent Pack**, comprend 25 g d'agarose en poudre, 1 ml de colorant de charge UView 6x Loading Dye and Stain, 100 ml de tampon d'électrophorèse TAE 50x
1613015EDU	**1% TAE Mini ReadyAgarose Precast Gel**, 7,1 x 10 cm, 8 puits
Équipement et matériel de laboratoire	
1660506EDU	**Professional Adjustable-Volume Micropipet**, 2 – 20 µl
1660507EDU	**Professional Adjustable-Volume Micropipet**, 20 – 200 µl
1660508EDU	**Professional Adjustable-Volume Micropipet**, 100 – 1 000 µl
1861096EDU	**T100 Thermal Cycler**
1664000EDU	**Mini-Sub™ Cell GT Cell**
1645050EDU	**PowerPac Basic Power Supply**
1660562EDU	**Digital Dry Bath**, 120 V
1660504EDU	**Temperature-Controlled Water Bath**, 120 V
12011919EDU	**Mini Centrifuge**, 100 – 240 V
1660531EDU	**UView Mini Transi lluminator**
1660610EDU	**BR-2000 Vortexer**, 120 V
1660477EDU	**Gel Staining Trays**, pack de 4
1660481EDU	**Green Racks**, lot de 5
TRC0501EDU	**96-Place PCR Tube Racks and Covers**, lot de 5, multicolores
2240110EDU	**1.5 ml Conical Tubes**, bouchons filetés à joint torique, stériles, 500
TWI0201EDU	**0.2 ml PCR Tubes with Domed Caps**, transparents, 1 000

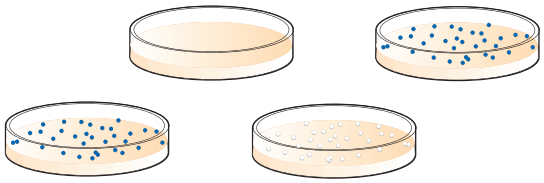
Visiter le site **explorer.bio-rad.com** pour obtenir une liste complète des équipements 220 – 240 V.

Aperçu des activités de la trousse

Partie 1

Explication des résultats obtenus lors de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR

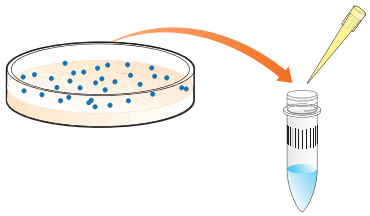
Les étudiants analysent les résultats de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène bactérien *lacZ* par CRISPR et fournissent deux explications sur les résultats. Ils réfléchissent ensuite aux informations supplémentaires susceptibles de les aider à exclure l'une des deux explications.



Partie 2

Extraction d'ADN de colonies bactériennes et PCR

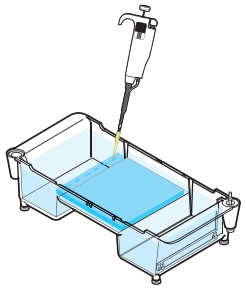
Les étudiants extraient de l'ADN génomique des colonies bactériennes et préparent des échantillons PCR multiplex pour amasser des preuves moléculaires permettant de vérifier si le gène *lacZ* a été modifié ou non dans les colonies bactériennes choisies.



Partie 3

Électrophorèse sur gel et visualisation

Les étudiants analysent leurs échantillons PCR au moyen d'une électrophorèse sur gel d'agarose et les observent au moyen d'une coloration rapide de l'ADN ou d'un colorant d'ADN fluorescent.



Partie 4

Analyse des données et argumentation

Les étudiants analysent les résultats de l'électrophorèse pour déterminer le génotype de la bactérie source et déduisent de leurs preuves des affirmations sur l'édition du génome.

Chronologie des activités

Démarrer l'activité complémentaire Out of the Blue Genotyping Extension dans les deux semaines après avoir terminé l'activité 2 Travaux en laboratoire d'édition du gène bactérien *lacZ* par CRISPR de la trousse Out of the Blue CRISPR Kit, mais avant de faire l'activité de synthèse. L'activité d'extension du génotype est prévue pour deux à trois cours de 90 minutes ou plus, comme indiqué dans le tableau 1. Une chronologie alternative pour des cours d'env. 50 minutes est présentée dans le tableau 2.

Tableau 1. Chronologie suggérée pour des cours de 90 minutes ou plus une à deux fois par semaine. L'horaire comprend les activités de la trousse CRISPR Kit et le cours complémentaire Genotyping Extension.

	Cours 1	Cours 2	Cours 3
Travail en classe	Commencer la partie 1. Explication des résultats de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR (exige les résultats des étudiants de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène bactérien *lacZ* par CRISPR) Commencer la partie 2. Extraction d'ADN de colonie bactérienne et PCR, Questions préalables aux travaux de laboratoire	Partie 2. Extraction d'ADN de colonies bactériennes et PCR (exige les boîtes de culture bactérienne des étudiants de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène bactérien *lacZ* par CRISPR) Commencer la partie 3. Électrophorèse sur gel et visualisation, Questions préalables aux travaux de laboratoire	Partie 3. Électrophorèse sur gel et visualisation Commencer la partie 4. Analyse des données et argumentation
Travail personnel	Terminer la partie 2. Questions préalables aux travaux de laboratoire	Finir la PCR et conserver les échantillons au réfrigérateur Suite de la partie 3. Questions préalables aux travaux de laboratoire	Récupérer les gels d'agarose colorés pendant la nuit pour analyse Terminer la partie 4.

Tableau 2. Chronologie alternative pour des cours d'env. 50 minutes.

	Cours 1	Cours 2	Cours 3	Cours 4	Cours 5
Travail en classe	Commencer la partie 1. Explication des résultats de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR (exige les résultats des étudiants de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène bactérien *lacZ* par CRISPR)	Commencer la partie 2. Extraction d'ADN de colonies bactériennes et PCR (exige les boîtes de culture bactérienne des étudiants de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène bactérien *lacZ* par CRISPR) Arrêter une fois que les étudiants ont extrait l'ADN	Terminer la partie 2. PCR	Partie 3. Électrophorèse sur gel et visualisation	Récupérer les gels d'agarose colorés pendant la nuit pour analyse Partie 4. Analyse des données et argumentation
Travail personnel	(Option) Terminer la partie 1. Partie 2. Extraction d'ADN de colonie bactérienne et PCR Questions préalables aux travaux de laboratoire		Réaliser la PCR et conserver les échantillons au réfrigérateur Commencer la partie 3. Électrophorèse sur gel et visualisation, Questions préalables aux travaux de laboratoire	(Option) Commencer la partie 4. Analyse des données et argumentation	Terminer la partie 4.

Adéquation du programme

Connaissances et compétences préalables requises

- Structure et fonction de base de l'ADN, incluant les règles d'appariement des bases nucléiques
- Fonction de base de la protéine Cas9 et de l'ARN guide simple brin (ARNsg) dans une coupure d'ADN cible
- Fonction de base et processus de réparation d'ADN par recombinaison homologue, incluant le rôle de la matrice d'ADN donneur
- Théorie fondamentale (ADN > ARN > Protéine > Caractère)
- Expression du gène *lacZ* et méthode de détection *de la* β-galactosidase avec le criblage bleu/blanc
- Étapes clés et objectif de l'amplification en chaîne par polymérise (PCR)
- Utilisation d'une micropipette
- Réalisation d'une électrophorèse sur gel d'agarose et interprétation des résultats

Concepts, thèmes et compétences

- **Génétique** — Les étudiants détermineront si les bactéries sont de type naturel ou à gène *lacZ* modifié en utilisant l'amplification par PCR. Les résultats du génotypage fourniront des preuves permettant aux étudiants de confirmer si l'édition du gène par CRISPR a eu lieu sur certains échantillons bactériens

- **Génie génétique** — Les étudiants transformeront les bactéries et réaliseront une édition du génome par CRISPR, qui sont deux techniques clés du génie génétique. La manipulation ou la modification de génomes par l'ingénierie en vue d'obtenir un phénotype particulier est l'objectif sous-jacent du génie génétique

- **PCR multiplex** — Les étudiants utiliseront des paires d'amorces multiples sur un seul et même échantillon PCR; cette technique est un moyen pratique pour détecter des cibles d'ADN multiple en une fois

- **Théorie fondamentale** — Les étudiants entraveront la fonction du gène *lacZ* qui code l'enzyme β-galactosidase (β-gal), lequel hydrolyse le lactose, le sucre présent dans le lait. Les étudiants éditeront le gène *lacZ* et observeront un changement visible sur le phénotype

- **Argumentation scientifique** — Les étudiants élaboreront des arguments sur l'édition des gènes incluant des affirmations étayées par les preuves qu'ils auront amassées dans les activités des trousses Out of the Blue CRISPR Kit et Genotyping Extension

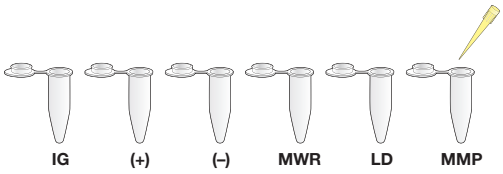
Instructions de préparation

Préparation et distribution des solutions

Préparer les réactifs, à l'exception du mélange de base PCR et des amorces, jusqu'à quatre semaines avant l'activité et les conserver à 4 °C au réfrigérateur. Le mélange de base PCR additionné des amorces *ne doit pas être préparé plus de 30 minutes avant la préparation des échantillons PCR par les étudiants.*

1. Préparer et distribuer les solutions dans des tubes étiquetés comme stipulé dans le tableau ci-dessous.

   Pour éviter toute contamination croisée, étiqueter les tubes et distribuer une solution à la fois. S'assurer qu'une nouvelle pointe de pipette soit utilisée pour chaque solution.



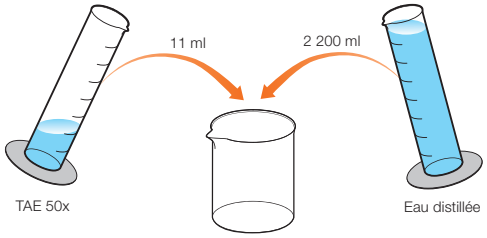
Type de tube et quantité pour 8 postes de travail de laboratoire	Étiquette de tube	Contenus de tube et instructions de préparation
Pour l'activité d'extraction d'ADN et la PCR		
8 microtubes avec bouchons, 1,5 ml	**IG**	1,3 ml de matrice InstaGene **Préparation :** Avant de distribuer la résine, la remettre en suspension en la secouant, en l'agitant à la main ou sur un plateau d'agitation à l'aide d'un agitateur magnétique inclus dans le flacon.
8 microtubes avec bouchons, 1,5 ml	**+**	15 µl d'ADN de contrôle positif pour PCR Out of the Blue
8 microtubes avec bouchons, 1,5 ml	**–**	15 µl d'eau distillée
8 microtubes avec bouchons, 1,5 ml	**MMP**	80 µl de solution de mélange de base et d'amorces **Préparation :** Juste avant l'activité PCR, ajouter 735 µl de mélange de base PCR 2x et 15 µl de mélange d'amorce Out of the Blue pour un microtube de 1,5 ml séparé, aspirer avec la pipette et relâcher pour mélanger le tout puis distribuer la solution obtenue.
Pour l'activité d'électrophorèse		
8 microtubes avec bouchons, 1,5 ml	**LD**	40 µl de colorant de charge
8 microtubes avec bouchons, 1,5 ml	**MWR**	15 µl d'étalon de masse moléculaire avec du colorant de charge **Préparation :** Avant de distribuer la solution, ajouter 50 µl de colorant de charge directement dans le tube d'étalon de masse moléculaire PCR et aspirer avec la pipette, puis relâcher pour mélanger le tout.

Préparation des gels d'agarose, du tampon TAE et du colorant
*(protocole Fast Gel uniquement)**

2. Préparer huit gels d'agarose à 1 % pour 8 puits chacun. Il est primordial d'utiliser du TAE 1x (pas du TAE 0.25x) pour préparer ces gels. Se reporter à l'annexe pour les instructions relatives au coulage du gel.

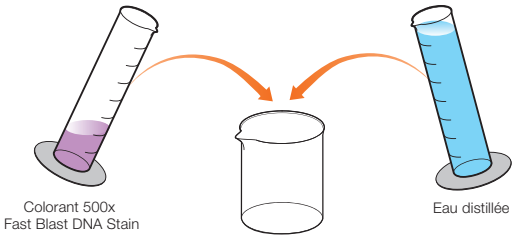
3. Préparer 2,2 l de tampon d'électrophorèse de TAE 0.25x en ajoutant 11 ml de TAE 50x à 2 200 ml d'eau distillée à utiliser avec le protocole Fast DNA Gel.*

   Remarque : Le volume exact d'eau distillée doit être 2 189 ml, mais la différence ne doit pas affecter les résultats.



4. Si du colorant est utilisé, préparer le colorant 100x Fast Blast DNA Stain pour colorer les gels d'agarose. Se reporter à l'annexe pour les instructions.

   Remarque : Le colorant Fast Blast DNA Stain n'est pas nécessaire si le colorant de charge UView 6x est utilisé pour la visualisation.



* Cette activité est conçue pour mettre en œuvre le protocole Fast Gel de Bio-Rad en utilisant du tampon de migration TAE 0.25x et des tensions supérieures. Se reporter à l'annexe pour plus d'information et d'autres options d'électrophorèse avec les instructions de préparation.

Informations préalables destinées à l'enseignant

Méthodes multiples de détection de l'édition du génome

En suivant un protocole d'édition du génome, il est primordial de ne pas seulement vérifier qu'une édition a eu lieu au bon endroit, mais également qu'elle correspond à l'objectif visé. Un exemple de conséquence possible d'une vérification incomplète d'édition du génome est fourni dans la section des ressources (voir Regalado 2019). Les chercheurs disposent de tout un arsenal de techniques différentes pour déterminer le génotype d'un organisme qu'ils ont étudié ou vérifier l'édition d'un gène. Le choix de la technique dépend du nombre de gènes, des types de différences alléliques étudiés, ainsi que du coût et du temps des analyses. Certaines variations alléliques peuvent, par exemple, entraîner des changements dans les schémas des fragments de restriction (polymorphismes dans la taille des fragments de restriction, RFLP), alors que d'autres peuvent uniquement être détectées par le séquençage. Dans le cas de l'édition du gène *lacZ* (insertion) de la trousse d'activité 2 Travaux en laboratoire d'édition du gène *lacZ* de la trousse Out of the Blue CRISPR Kit, la modification peut être détectée par PCR, une étape commune dans le processus de travail de biologique moléculaire. En plus de fournir aux étudiants une vraie expérience en matière de recherche, rassembler ce type de preuves moléculaires souligne un principe fondamental de la pratique scientifique : la collecte et l'utilisation de preuves provenant de sources diverses pour étayer une affirmation et exclure d'autres explications. Reportez-vous aux ressources pour connaître les articles et outils concernés.

PCR multiplex

La PCR multiplex correspond à l'amplification simultanée de plusieurs amplicons dans un unique puits de réaction en utilisant une paire d'amorces unique pour chacun. Au lieu d'effectuer plusieurs réactions isolément, toutes les réactions peuvent être réalisées sur un seul échantillon. Après une extraction rapide d'ADN de chaque colonie, les étudiants utiliseront une PCR multiplex pour détecter la présence / l'absence d'insertion modifiée par CRISPR : une paire d'amorces générera un amplicon d'une taille d'env. 1 100 bp en présence du gène *lacZ* à l'état naturel, alors qu'une autre paire d'amorces générera un amplicon d'une taille d'env. 650 bp en présence du gène *lacZ* modifié (voir le guide de l'étudiant pour plus d'informations sur la cible des amorces). Dans de nombreuses expériences de PCR multiplex, les séquences cibles d'ADN ne se chevauchent pas. Dans cette activité cependant, les amorces sont intentionnellement conçues pour se chevaucher sur le site de l'édition de manière à ce que soit la paire d'amorces « éditée », soit la paire d'amorces « non éditée » génère un amplicon permettant de déterminer le génotype. Une troisième paire d'amorces génère un amplicon d'une taille d'env. 350 bp à titre de contrôle interne uniquement si l'ADN chromosomique a été extrait et amplifié avec succès.

Bien que la PCR multiplex offre des avantages et puisse aider à préserver l'utilisation des échantillons, la réalisation d'une expérience PCR multiplex nécessite une méthode savamment réfléchie de manière à ce que toutes les cibles puissent être amplifiées avec les mêmes paramètres de cycle (sur un seul échantillon). Certains aspects sont à prendre en compte :

- **La taille des amplicons** — S'ils doivent être analysés par électrophorèses sur gel, les amplicons doivent avoir une taille différente pour que la séparation soit idéale, mais cette différence de taille ne pourra pas être trop importante puisque les amplicons de petite taille sont amplifiés de manière privilégiée
- **Les paires d'amorces** — Toutes les paires d'amorces doivent avoir une température de fusion similaire (pour fonctionner correctement avec les mêmes paramètres de cycle), elles ne doivent pas former des dimères les unes avec les autres et doivent être spécifiques à leurs cibles

Le travail supplémentaire effectué à ce stade permettra d'analyser plus d'une cible sur un même échantillon et offrira une plus grande précision dans l'analyse comparative et le dénombrement dans les domaines de la recherche, de la médecine légale et du diagnostic.

Extraction d'ADN de colonies bactériennes et PCR

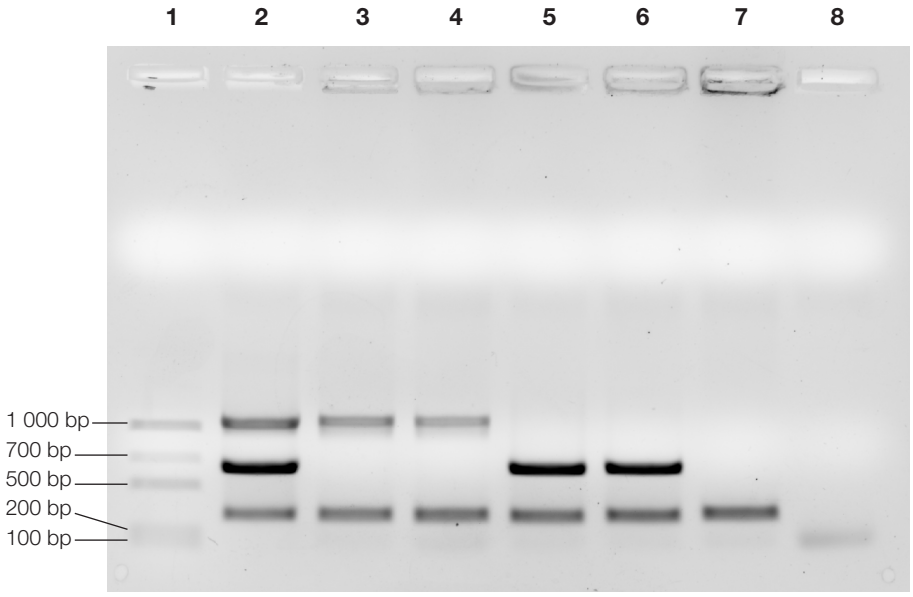
Objectif : Les étudiants amassent des preuves d'ADN et les combinent avec leurs preuves précédentes pour étayer leurs affirmations relatives à l'édition du gène par CRISPR.

	Astuces et remarques pour l'enseignement
Partie 1. Explications des résultats de l'activité Travaux en laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR	• Il existe une multitude d'explications des résultats de l'activité de laboratoire de transformation bactérienne réalisée précédemment. Une couleur de colonie peut par exemple être influencée par l'introduction d'une protéine de liaison à l'ADN, des interactions protéine-protéine qui réduisent l'activité de la β-galactosidase voire par un effet d'annulation entre les éléments qui ont été introduits dans la bactérie. De nombreuses autres explications sont fortement improbables compte tenu des connaissances dont nous disposons de la biologie des cellules bactériennes. Mais elles peuvent aussi être écartées par des preuves supplémentaires. • Demander aux étudiants de réfléchir et de partager des exemples de preuves issues des expériences qui écarteraient une des deux autres explications est un moyen pour les étudiants de s'exercer à déterminer comment les preuves peuvent servir à soutenir une affirmation. • Option : Si les étudiants ont besoin de plus d'aide, leur fournir une autre explication à utiliser pour répondre aux questions. Par exemple : Le complexe Cas9-ARNsg réprime l'expression de gènes importants, incluant le gène *lacZ,* ce qui entraîne la mort cellulaire; le mécanisme de réparation par recombinaison homologue (HDR) utilisant l'ADN modèle de donneur interfère avec la fonction du complexe Cas9/ARNsg. • Option : Demander aux étudiants de concevoir une expérience qui leur fournirait les informations nécessaires pour exclure une de leurs explications.
Partie 2. Extraction d'ADN de colonies bactériennes et PCR	• Le protocole d'extraction d'ADN inclut les étapes de chauffage et de centrifugation nécessaires. Pour réaliser ces étapes en moins de 50 minutes, vous pourriez avoir besoin de plusieurs bains secs/bains-marie et centrifugeuses. Assurez-vous de prévoir le temps nécessaire pour traiter tous les échantillons des étudiants. • Si certains groupes d'étudiants identifient une colonie bactérienne sur la boîte B, nous recommandons de remplacer l'échantillon D3 par la colonie provenant de la boîte B. La croissance bactérienne sur la boîte B est inattendue et constitue l'occasion de conduire de vraies recherches dans votre salle de classe. • Vos étudiants peuvent prévoir la génération d'un amplicon d'env. 1 750 bp produit par les amorces inverses de type naturel et modifiés précédemment. C'est une réelle possibilité. L'élongation de l'amplicon de 1 750 bp prend plus de temps, mais est éliminée par le programme PCR tel qu'il est conçu. • Le surnageant de la matrice InstaGene représente techniquement un meilleur contrôle négatif que l'eau. Toutefois, la décantation du surnageant rend le reste de la matrice InstaGene inutilisable. L'eau sert donc de contrôle négatif pour éviter le gaspillage. • Le modèle d'ADN de contrôle positif inclut les trois cibles PCR et la réaction produira des amplicons d'env. 1 100, d'env. 650 et d'env. 350 bp. • Possibilité d'évaluation didactique : Revoyez les prévisions PCR des étudiants pour vérifier ce qu'ils ont compris. Faites attention aux incompréhensions selon lesquelles les paires d'amorces sont ajoutées aux échantillons séparément ou que les amplicons de 1 100 et de 650 bp sont tous deux produits dans un seul échantillon. Il se peut que les deux amplicons soient produits à partir d'une colonie dotée d'une population mixte, mais si une colonie se développe à partir d'une unique cellule transformée comme l'activité le prévoit, alors un seul amplicon devrait être observé.
Partie 3. Électrophorèse sur gel et visualisation	• L'activité de laboratoire d'électrophorèse sur gel d'agarose est conçue pour tirer partie du protocole Fast Gel de 10 minutes de Bio-Rad. Une alimentation électrique capable de fournir 300 V, telle que l'alimentation électrique basique PowerPac Basic Power Supply de Bio-Rad, est nécessaire pour ce protocole. Reportez-vous à l'annexe pour de plus amples informations.

Extraction d'ADN de colonies bactériennes et PCR (suite)

	Astuces et remarques pour l'enseignement
Partie 4. Analyse des données et argumentation	

- Exemple de gel d'étudiant :



Allée	Échantillon	État du gène *lacZ*
1	Étalon de masse moléculaire	N/A
2	ADN de contrôle positif (+)	N/A
3	Échantillon PCR (S)	Type naturel
4	Échantillon PCR (C)	Type naturel
5	Échantillon PCR (D1)	Modifié
6	Échantillon PCR (D2)	Modifié
7	Échantillon PCR (B/D3)	???
8	ADN de contrôle négatif (–)	N/A

- La bande 7 représente un résultat rare observé lorsque les bactéries réparent la coupure double brin causée par la protéine Cas9 sans utiliser la matrice d'ADN donneur et qui peut être observé dans les colonies de la boîte B ou D. Bien que le gène *lacZ* soit modifié dans ces cas, la séquence de liaison de la paire d'amorces *lacZ* modifiée, introduite par l'ADN modèle de donneur, est absente. L'origine exacte de ces phénomènes rares est incertaine. Pour la plupart des étudiants, la bande 7 sera similaire aux bandes 5 et 6.
- Assurez-vous que les étudiants incluent les preuves de la PCR multiplex et des expériences de transformation bactérienne lors de la formulation de leurs affirmations.
- Possibilité d'évaluation : Montrer aux étudiants l'image du gel produit et leur demander de proposer des explications quant au résultat obtenu dans la bande 7 ET d'autres expériences susceptibles d'aider à en déterminer la cause. Le séquençage pourrait par exemple fournir des informations détaillées sur l'état du gène *lacZ.*

Annexe

Protocole Fast Gel et instructions pour la préparation de l'électrophorèse

Reportez-vous aux ressources pour visionner des vidéos pratiques sur le coulage, le chargement et l'analyse des gels d'agarose.

Protocole Fast Gel

Il existe plusieurs manières d'accélérer la visualisation des bandes d'ADN sur un gel d'agarose en modifiant les conditions et en utilisant des réactifs alternatifs. Les options ainsi que les matériels nécessaires et les protocoles sont présentés ci-dessous.

1. Couler les gels d'agarose 1 % avec tampon TAE 1x.
2. Préparer le tampon d'électrophorèse TAE 0.25x.
3. Charger les échantillons, préparer le gel dans les conditions figurant dans le tableau 1 et observer l'ADN en utilisant une des options de coloration ci-dessous.

Tableau 1. Options d'électrophorèse.

Tampon d'électrophorèse et tension	Durée de l'électrophorèse
TAE 0.25x à 300 V*	10 min
TAE 0.25x à 200 V	20 min
TAE 1x à 100 V	30 min

* Nécessite une alimentation électrique permettant des tensions de 300 V, comme l'alimentation PowerPac Basic Power Supply (n° de référence 1645050EDU).

Colorant UView 6x Loading Dye and Stain : Préparer les échantillons d'ADN pour l'électrophorèse en utilisant le colorant de charge UView 6x. Après l'électrophorèse sur gel, observer immédiatement dans le noir à l'aide d'un transilluminateur UV ou d'une lampe UV portative.

Colorant Fast Blast DNA Stain : Préparer les échantillons d'ADN avant l'électrophorèse avec du colorant de charge 5x Orange G. Après l'électrophorèse, colorer l'ADN avec le colorant Fast Blast DNA Stain et observer le lendemain.

Préparation des gels d'agarose

Couler soit huit gels 7 x 7 cm avec un peigne à 8 puits pour huit postes de travail ou quatre gels 7 x 10 cm avec deux peignes à 8 puits chacun, à répartir entre deux postes de travail. Le tableau 2 fournit les mesures pour plusieurs options.

Tableau 2. Volumes et quantités de réactifs pour gels d'agarose.

Nombre de gels	1	4	8	16
Gel d'agarose TAE à 1 % (7 x 7 cm) — pour un poste de travail				
Eau purifiée, ml	39	156	312	624
TAE 50x, ml	0,8	3,2	6,4	12,8
Agarose, g	0,4	1,6	3,2	6,4
Volume total d'agarose fondue, ml	40	160	320	640
Gel d'agarose TAE à 1 % (7 x 10 cm) — pour un poste de travail				
Eau purifiée, ml	49	196	392	784
TAE 50x, ml	1,0	4,0	8,0	16,0
Agarose, g	0,5	2,0	4,0	8,0
Volume total d'agarose fondue, ml	50	200	400	800

Préparation de l'agarose fondue

1. Ajouter la quantité d'agarose en poudre et de liquide adaptée au récipient. Remplir le récipient à moins de 50 % du volume. Agiter pour mélanger.

   Remarque : Si un erlenmeyer est utilisé, placer un bécher de 25 ml à l'envers sur l'ouverture pour réduire l'évaporation. Avec une bouteille, retirer le bouchon pour que l'air et la vapeur puissent s'échapper.

2. Placer la solution d'agarose dans le micro-ondes. Faire chauffer pendant 3 minutes. Poursuivre par intervalles de 30 secondes jusqu'à ébullition et dissolution complète de l'agarose.

   Attention : Porter en tout temps des gants thermo-protecteurs, des lunettes et une blouse de laboratoire durant la préparation des gels d'agarose. L'agarose fondue chaude peut causer de graves brûlures.

3. Laisser l'agarose refroidir à environ 60 °C avant de verser le gel.

Coulage des gels d'agarose

Il existe plusieurs méthodes pour couler les gels d'agarose. Cette section présente la méthode avec ruban adhésif. Consultez le manuel d'instructions relatif à votre système d'électrophorèse horizontal pour découvrir d'autres méthodes.

1. Sceller fermement les extrémités d'une plaque de gel avec du ruban adhésif de laboratoire standard (pas du ruban adhésif ordinaire).

2. Placer le peigne dans une fente appropriée sur le plateau à gel. Si le gel est versé dans un double puits, placer un peigne à une extrémité du plateau et un autre au centre.

3. Une fois que l'agarose fondue a refroidi jusqu'à atteindre au moins 60 °C, en verser suffisamment pour couvrir les dents du peigne de gel ou une profondeur de 0,5 – 0,75 cm.

4. Laisser le gel se solidifier à température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

5. Retirer le(s) peigne(s) et le ruban adhésif avec précaution.

6. Conserver les gels dans un sachet plastique refermable jusqu'à 1 jour à température ambiante ou jusqu'à 1 semaine au réfrigérateur.

Préparation du tampon TAE

Le tampon TAE 1x est généralement utilisé pour le coulage du gel ainsi que pour la réalisation du tampon. La durée de l'électrophorèse peut être considérablement réduite en faisant passer les gels avec un tampon TAE 0.25x à 200 ou 300 V. Même avec ce protocole plus rapide, il est toujours recommandé de couler les gels avec un tampon TAE 1x. Reportez-vous au tableau 3.

1. Mélanger de l'eau distillée avec le volume de tampon TAE 50x indiqué dans le tableau 10 et bien agiter.

   Remarque : Si le tampon TAE 0.25x est utilisé de manière entre les classes, assurez-vous que le tampon est à température ambiante ou à une température inférieure avant de l'utiliser. Si le tampon est utilisé alors qu'il est chaud, il peut au cours d'une série à haute tension atteindre une température telle, que le gel d'agarose risque de fondre.

Tableau 3. Volumes et quantités de réactifs pour le tampon d'électrophorèse.

Nombre de gels	1	4	8	16
Tampon TAE à 0,25 %				
Eau purifiée, ml	274	1 094	2 189	4 378
TAE 50x, ml	1,4	5,6	11	22
Volume total de tampon TAE à 0,25 %, ml	275	1 100	2 200	4 400

Visualisation de l'ADN

Colorant UView 6x Loading Dye and Stain

Aucune préparation supplémentaire n'est requise lorsque le colorant Uview 6x Loading Dye and Stain est utilisé.

1. Remplacer le colorant Orange G Loading Dye par le colorant Uview 6x Loading Dye and Stain lors de la préparation des échantillons d'ADN.

2. Immédiatement après l'électrophorèse, placer les gels soigneusement sur un transilluminateur UV, abaisser l'écran UV et allumer la lumière UV pour la visualisation.

Colorant Fast Blast DNA Stain

1. Préparer le colorant 100x Fast Blast DNA Stain conformément aux volumes indiqués dans le tableau 4.

2. Ajouter env. 50 ml de colorant 100x par gel dans le plateau de coloration de gel et agiter doucement pendant 2 à 3 minutes.

3. Après 2 minutes, retirer le colorant et le conserver pour une utilisation ultérieure.* Une coloration plus longue augmenterait considérablement la coloration de fond.

4. Rincer le gel à l'eau courante pendant 30 secondes à 1 minute ou jusqu'à ce que toute la coloration de surface ait disparu. Couvrir entièrement le gel avec un grand volume d'eau et agiter doucement jusqu'au lendemain pour décolorer. L'ADN sera visible sous la forme de bandes bleu foncé sur fond bleu clair après quelques heures, avec un contraste augmentant progressivement durant la nuit.

   Remarque : L'utilisation du colorant 100x Fast Blast DNA Stain empêche les petits fragments d'ADN de se diffuser dans le gel durant la nuit. En raison de sa faible concentration, le colorant 1x Fast Blast DNA Stain n'empêchera pas la diffusion des fragments d'ADN. C'est pourquoi il ne doit pas être utilisé pour la coloration toute la nuit.

   * Le colorant 100x Fast Blast DNA Stain peut être réutilisé au moins six fois.

Tableau 4. Préparation du colorant 100x Fast Blast DNA Stain.

Nombre de gels 7 x 10 cm à colorer	1	4	8	16
Colorant 500x Fast Blast DNA Stain, ml	10	40	100	200
Eau distillée, ml	40	160	400	800
Volume total de colorant 100x Fast Blast DNA Stain, ml	50	200	500	1 000

Ressources

How to Load and Run Agarose Gel Electrophoresis: https://www.youtube.com/watch?v=uAttNVEEEwY. Accessed February 6, 2020.

How to Cast an Agarose Gel: https://www.youtube.com/watch?v=qbUMRDrNnu8. Accessed March 5, 2020.

Polymerase Chain Reaction interactive animation: https://www.bio-rad.com/webroot/web/movies/lse/global/english/what-is-polymerase-chain-reaction/tutorial.html. Accessed February 6, 2020.

Carroll D (2017). Genome editing: past, present, and future. Yale J Biol Med 90, 653–659.

Edwards MC and Gibbs RA (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. Genome Res 3, S65–S75.

Markoulatos P, et al. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. J Clin Lab Anal 16, 47–51.

Regalado A. (2019) Gene-edited cattle have a major screwup in their DNA. MIT Technology Review, https://www.technologyreview.com/s/614235/recombinetics-gene-edited-hornless-cattle-major-dna-screwup/. Accessed February 24, 2020.

Mentions légales

BIO-RAD et MINI-SUB sont des marques déposées de Bio-Rad Laboratories Inc. dans certaines juridictions.
Toutes les marques déposées mentionnées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.
© 2022 Bio-Rad Laboratories, Inc.
Ce produit n'est pas destiné à l'auto-médication.

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Website *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
Canada *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
France *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
Italy *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 2 3473 4460* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
Russian Federation *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
Switzerland *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

10000122387 Ver C FR *22-0527 0822 Sig 0122*