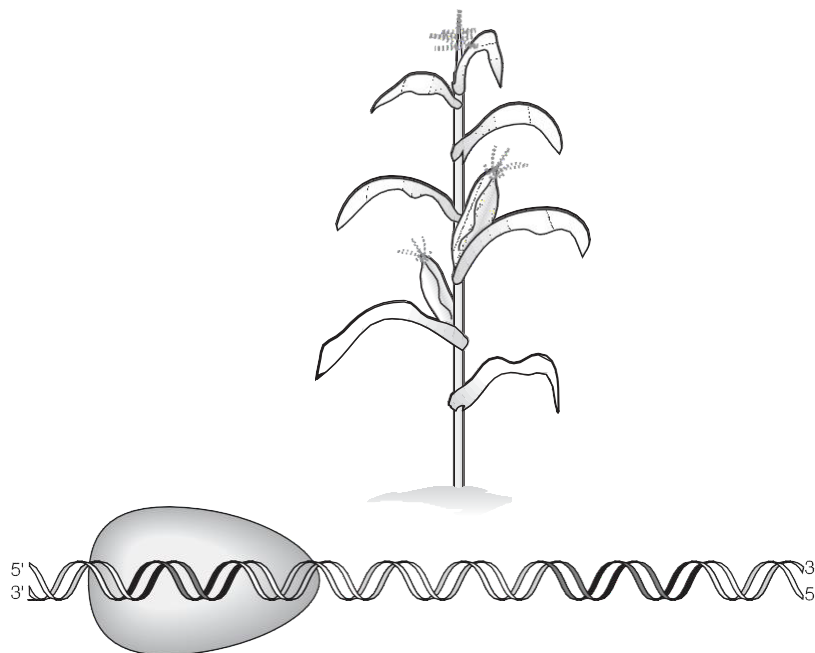




Biotechnology Explorer^{MC}

Kit GMO Investigator^{MC}

N° cat. 166-2500EDU

explorer.bio-rad.com

Remarque : Le kit contient des réactifs sensibles à la température. Ouvrir immédiatement à l'arrivée et conserver les composants à -20°C ou à 4°C comme indiqué.

La reproduction de toute partie de ce document est autorisée uniquement pour un usage en classe.

Veuillez visiter explorer.bio-rad.com pour accéder à notre sélection de traductions linguistiques des kits du programme Biotechnology Explorer.



À l'attention de l'instructeur¹

Vos aliments préférés sont-ils génétiquement modifiés ?

Actuellement aux États-Unis, les aliments génétiquement modifiés (GM) ne sont pas automatiquement étiquetés comme tels et les aliments contenant moins de 5 % de produits génétiquement modifiés peuvent être étiquetés « sans OGM ». En Europe et en Asie, les aliments génétiquement modifiés doivent être étiquetés s'ils contiennent plus de 1 % d'OGM.

L'objectif de ce kit est de permettre aux étudiants de tester leurs produits alimentaires préférés achetés en magasin (par exemple les croustilles de maïs et les hamburgers végétariens) afin de détecter la présence d'organismes génétiquement modifiés (OGM). De plus, les étudiants se livrent à une expérience de recherche scientifique au cours de laquelle ils recueillent des aliments à l'épicerie, extraient l'ADN des aliments, amplifient l'ADN à l'aide de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et utilisent l'électrophorèse sur gel pour identifier la présence ou l'absence des séquences OGM amplifiées.

Dans cette activité, les étudiants utilisent des techniques de biologie moléculaire de pointe pour tester des produits alimentaires familiers. Ce kit est particulièrement adapté aux étudiants qui ont des connaissances de base en biologie moléculaire et une expérience préalable dans certaines des techniques utilisées. L'exercice couvre une grande variété de sujets, notamment : le génie génétique et la transformation ; la transcription et la traduction de l'ADN ; la régulation des gènes ; la réplication de l'ADN et la PCR ; le développement et la physiologie des plantes ; les sciences agricoles et environnementales.

Stratégie d'enseignement : Investigation guidée et basée sur l'enquête

Le kit GMO Investigator permet une approche guidée de cet exercice. Les étudiants réalisent des procédures scientifiques sophistiquées qui comportent plusieurs niveaux de contrôle. Cela leur permet d'évaluer la validité de leurs résultats. Ainsi, non seulement la présence ou l'absence de séquences d'OGM dans leur aliment testé est déterminée, mais ils posent et répondent également aux questions suivantes : avons-nous réussi à extraire l'ADN, notre PCR a-t-elle fonctionné comme prévu et y a-t-il eu une contamination ?

Les cultures génétiquement modifiées sont-elles une bonne chose ?

De nombreuses personnes s'opposent à l'utilisation de culture de plantes qui sont génétiquement modifiées. Ils font valoir qu'il existe un potentiel de créer, par la pollinisation croisée, de super mauvaises herbes avec des cultures résistantes aux herbicides ou de super insectes résistants aux toxines des cultures résistantes aux herbicides. Nombreux sont ceux qui s'inquiètent des réactions allergiques potentielles aux nouvelles protéines ou de la résistance aux antibiotiques résultants des marqueurs sélectifs utilisés pour développer les cultures ou d'autres effets imprévus sur la santé publique. Les partisans des aliments génétiquement modifiés affirment que ces cultures sont en fait meilleures pour l'environnement. Moins de produits chimiques toxiques sont rejetés dans l'environnement et donc moins de produits chimiques toxiques peuvent nuire à l'environnement et à la santé humaine. De plus, ces cultures

¹ Dans ce document, le genre masculin est utilisé comme générique, dans le seul but de ne pas alourdir le texte.

peuvent préserver les terres arables en réduisant le stress subi et améliorer la valeur nutritionnelle des aliments dans les pays en développement et permettre la culture de plantes sur des terres auparavant non cultivables. Nous incluons un débat formel à l'annexe D pour faciliter la discussion de ces questions.

Ce manuel peut être téléchargé à partir de l'Internet. Visitez-nous sur le Web à explorer.bio-rad.com ou appelez-nous aux États-Unis au 1-800-4BIORAD (1-800-424-6723). Nous nous efforçons d'améliorer en permanence nos programmes et nos produits et nous sommes heureux de recevoir vos témoignages, vos idées et vos suggestions.

Biotechnology Explorer
Team Bio-Rad Life Science Group
6000 James Watson Drive
Hercules, California
USA 94547
Biotechnology_Explorer@Bio-Rad.com

Créer un contexte. Consolider l'apprentissage. Rester à jour.

Les nouvelles découvertes scientifiques et technologies créent davantage de contenu à enseigner, mais pas plus de temps.

Les kits Biotechnology Explorer vous aident à enseigner plus efficacement en intégrant plusieurs matières principales dans un seul laboratoire, relier les concepts aux techniques et les mettre en contexte avec des situations réelles.

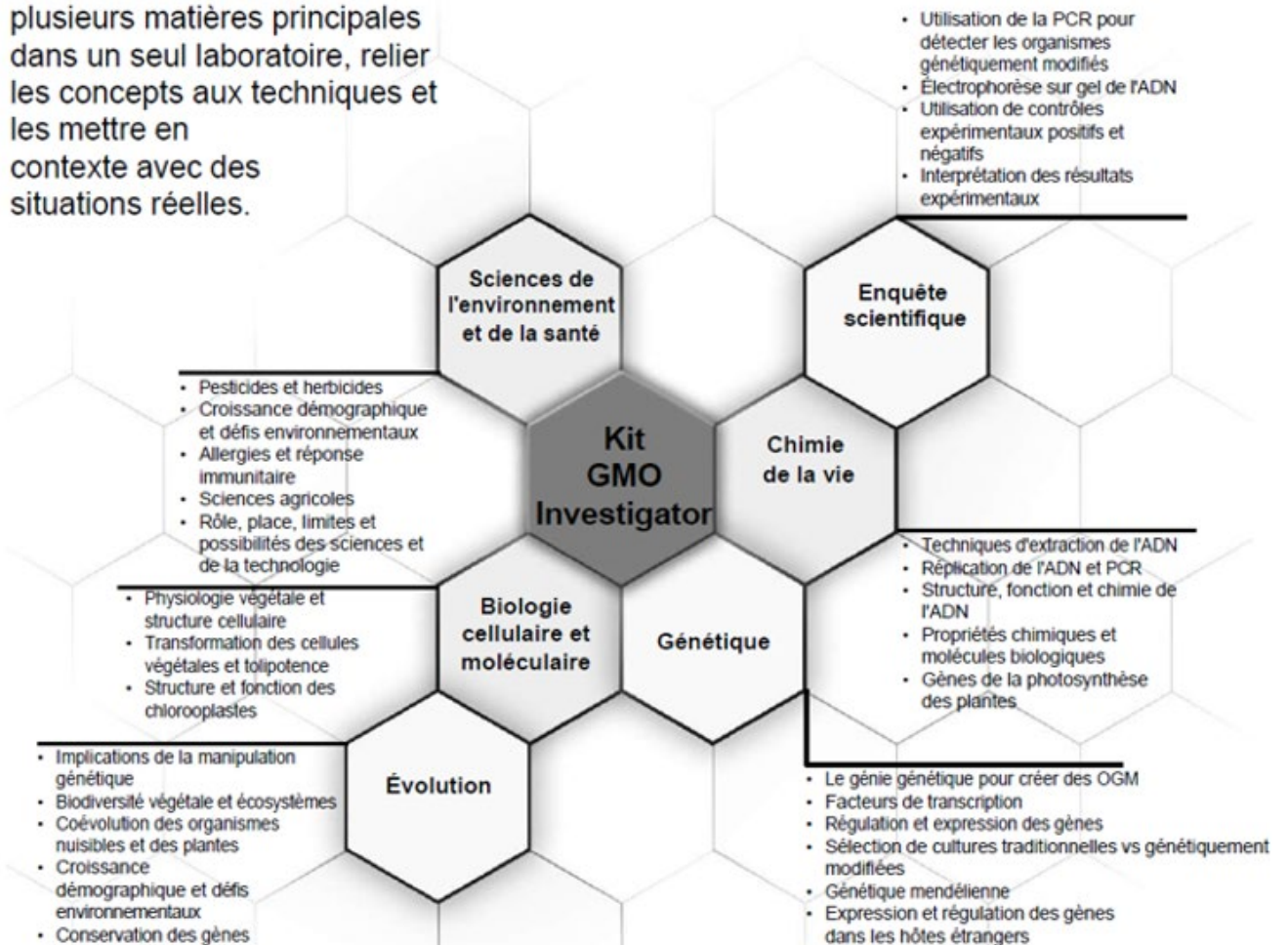


Table des matières

Résumé du kit	1
Liste d'inventaire du kit	3
Programme d'études Fit	6
Contexte pour les enseignants	8
Préparation de l'instructeur	15
Leçon 1 : Extraction d'ADN à partir d'échantillons d'aliments	17
Leçon 2 : Préparer les réactions PCR	18
Leçon 3 : Électrophorèse des produits PCR	20
Leçon 4 : Séchage des gels et analyse des résultats	28
Résultats typiques d'une salle de classe	30
Conseils et questions fréquemment posées	32
Guide rapide	38
Manuel de l'étudiant	42
Contexte fondamental	42
Leçon 1 : Extraction de l'ADN à partir d'échantillons alimentaires	45
Leçon 2 : Préparer les réactions PCR	50
Leçon 3 : Électrophorèse des produits PCR	57
Leçon 4 : Séchage des gels et analyse des résultats	63
Annexe A : Introduction à la PCR	67
Annexe B : Amplification par PCR et technique stérile	72
Annexe C : Glossaire des termes	73
Annexe D : Activité de débat post-laboratoire	75
Annexe E : Instructions de programmation pour le thermocycleur T100 ou MyCycler	78
Annexe F : Guide de réponse pour les enseignants	81
Annexe G : Assemblage du module d'électrophorèse Mini-PROTEAN® Tetra Cell	86
Annexe H : Sites Web et références recommandés sur les OGM	88
Annexe I : Réaliser des gels d'ADN à l'agarose en moins de 20 minutes	89

Résumé du kit

Le but de ce kit est de tester les produits alimentaires d'épicerie (par exemple, les croustilles de maïs, les saucisses végétariennes) afin de détecter la présence d'organismes génétiquement modifiés (OGM). Ce kit contient suffisamment de matériel pour extraire et amplifier l'ADN de 16 échantillons et nécessite un minimum de 4 périodes de laboratoire :

- Leçon 1 : Extraction d'ADN à partir d'échantillons alimentaires
- Leçon 2 : Préparer les réactions PCR
- Leçon 3 : Électrophorèse des produits PCR
- Leçon 4 : Séchage des gels et analyse des résultats

Les réactifs pour l'électrophorèse sur gel sont disponibles sous forme de modules séparés ; vous pouvez choisir d'effectuer une électrophorèse sur gel d'agarose ou une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).

Le kit GMO Investigator utilise la PCR pour tester la présence de deux différents types de séquences associées aux OGM : le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S) et le terminateur du gène de la nopaline synthase (NOS) d'*Agrobacterium tumefaciens*. L'une de ces séquences ou les deux sont présentes dans la plupart des cultures génétiquement modifiées dont la distribution est autorisée en Amérique du Nord, en Asie et en Europe. Le kit GMO Investigator permet une approche d'enquêtes guidées à cet exercice en fournissant plusieurs niveaux de contrôles pour évaluer la validité des résultats obtenus. Il imite le processus de recherche en utilisant plusieurs procédures pour répondre à des questions ouvertes. L'intégrité de l'ADN végétal extrait des aliments est testée à l'aide de la PCR pour identifier une troisième séquence d'ADN, le gène du chloroplaste du photosystème II, qui est commun à la plupart des plantes. L'intégrité de la réaction en chaîne par polymérase est testée en amplifiant les séquences du promoteur 35S et du gène du photosystème II directement à partir de la matrice d'ADN fournie dans le kit. La contamination potentielle des échantillons testés est identifiée en extrayant l'ADN d'un aliment témoin certifié Bio-Rad non-OGM fourni dans le kit et en effectuant une PCR pour tester la présence de séquences OGM.

Électrophorèse en 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 PCR généré à partir du gène du photosystème II est de 455 pb. La résolution de bandes de ces tailles nécessite un gel d'agarose à 3 % ou un gel de polyacrylamide à 10 %. Les deux techniques de gel donnent d'excellents résultats. Votre choix de technique de gel dépendra de l'équipement dont vous disposez et des techniques que vous souhaitez enseigner à vos étudiants. Les gels de polyacrylamide sont beaucoup plus fragiles que les gels d'agarose à 3 % et peuvent donc ne convenir qu'aux étudiants plus expérimentés. Cependant, les gels de polyacrylamide révèlent des bandes à un degré plus élevé, ce qui peut permettre de séparer les bandes d'ADN de taille similaire générées par un aliment testé qui contient à la fois le promoteur CaMV 35S et le

terminateur NOS, comme la papaye génétiquement modifiée. Reportez-vous à la page 4 pour connaître les accessoires dont vous aurez besoin selon que vous choisissiez l'électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide.

Instructions de stockage

Placez le sac de réactifs à -20 °C et la matrice InstaGene à 4 °C dans un délai d'une semaine après leur arrivée. Les autres réactifs peuvent être conservés à température ambiante.

Liste d'inventaire du kit

Cette section énumère les composants fournis dans le kit GMO Investigator. Elle énumère également les accessoires nécessaires. Chaque kit contient suffisamment de matériel pour 32 étudiants répartis sur 8 postes de travail, à raison de 4 étudiants par poste. Dès l'arrivée de votre kit, ouvrez-le et cochez le contenu de la liste pour vous familiariser avec le kit. **Placez immédiatement le sac contenant le Master Mix et les amorces au congélateur (-20 °C), et le flacon d'InstaGene au réfrigérateur (4 °C).** Le nombre de boîtes de gel et de pipettes dont vous aurez besoin dépend du nombre d'étudiants qui travailleront à chaque poste.

Composantes du kit	Nombre/Kit	(✓)
Aliment témoin certifié non-OGM Bio-Rad	1 paquet	☐
ADN de contrôle positif pour les OGM, 0,5 ml	1 tube	☐
Master Mix, 1,2 ml	1 tube	☐
Amorces OGM (rouge), 15 µl	1 tube	☐
Amorces PSII de plantes (vert), 15 µl	1 tube	☐
Règle de poids moléculaire PCR, 200 µl	1 tube	☐
Colorant de chargement Orange G, 1 ml	1 tube	☐
Matrice InstaGene ^{MC} , 20 ml	1 bouteille	☐
Pipettes de transfert en plastique jetables (PTPJ)	2 paquets	☐
Tubes à capuchon, 1,5 ml	2 paquets	☐
Tubes à bouchon à vis, 1,5 ml	1 paquet	☐
Tubes PCR, 0,2 ml	1 paquet	☐
Adaptateurs de tubes PCR sans bouchon, 1,5 ml	1 paquet	☐
Manuel	1	☐
Accessoires requis	Nombre/Kit	(✓)
Micropipettes à volume ajustable 2-20 µl (N° cat. 166-0506EDU) ou pipettes à volume fixe de 10 µl et de 20 µl (N° cat. 166-0512EDU et 166-0513EDU)	8	☐
Micropipette à volume ajustable 20-200 µl (N° cat. 166-0506EDU)	1	☐
Micropipette à volume ajustable 200-10 000 µl (N° cat. 166-0508EDU)	1	☐
Embouts de pipettes 2-20 µl, avec barrière aérosol (N° cat. 211-2006EDU)	8 portoirs	☐
Embouts de pipettes 20-200 µl, avec barrière aérosol (N° cat. 211-2016EDU)	1 portoir	☐
Embouts de pipettes 200-1000 µl, avec barrière aérosol (N° cat. 211-2021EDU)	1 portoir	☐
Mortier et pilon	8	☐
Stylos marqueurs	8	☐

Accessoires requis	Nombre/Kit	(✓)
Nourriture à tester provenant du supermarché	1-8	☐
Eau distillée	3,5 L	☐
Bain d'eau (N° cat. 166-0504EDU) ou bain sec (N° cat.. 166-0562EDU)	1	☐
Microcentrifugeuse (N° cat. 166-0602EDU) ou mini centrifugeuse (N° cat.. 166-0603EDU)	1-4	☐
Balance avec une plage de 0,5 à 2 g et papier ou petites coupelles pour pesée	1	☐
Thermocycleur (T100 ^{MC} N° cat. 186-1096EDU)	1	☐
Bloc d'alimentation (PowerPac ^{MC} Basic N° cat. 164-5050EDU)	2-4	☐

Si vous utilisez l'électrophorèse sur gel d'agarose :

Accessoires requis	Nombre/Kit	(✓)
Chambres d'électrophorèse horizontales avec plateaux de coulée de gel et peignes (N° cat. 166-4000EDU)	4-8	☐
Petit format de réactifs d'électrophorèse d'ADN Fast Blast ^{MC} (N° cat. 166-0450EDU) contenant 25 g d'agarose, 100 ml de TAE 50x, 100 ml de colorant d'ADN Fast Blast.	1	☐

Si vous utilisez l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide :

Accessoires requis	Nombre/Kit	(✓)
Chambres d'électrophorèse verticales Mini-PROTEAN® Tetra Cell (N° cat. 165-8005EDU)	4	☐
Gels préfabriqués Mini-PROTEAN 10 % TBE, format de 2, (N° cat. 456-5033EDU)*	8	☐
Tampons Tris-borate-EDTA 10x (10x TBE) (N° cat. 161- 0733EDU)	1L	☐
Colorant ADN Fast Blast (N° cat. 166-0420EDU)	100 ml	☐
Embouts Prot/Elec ^{MC} (N° cat. 166-9917EDU)	8 portoirs	☐

*Note : les gels de polyacrylamide ont une durée de conservation de 3 mois. Ne commandez donc les gels que lorsque le laboratoire sera mis au programme.

Accessoires optionnel	Nombre/Kit	(✓)
Système de séchage GelAir™ (N° cat. 165-1771EDU)	1	☐
Cellophane (si vous n'utilisez pas le système de séchage GelAir) (N° cat. 165- 1779EDU)	1	☐
Plate-forme à bascule (N° cat. 166-0709EDU)	1	☐
Vortexer (N° cat. 166-0610EDU)	1	☐
Feuilles d'acétate pour le traçage des gels	8	☐
Portoirs pour tubes flottants (N° cat. 166-0479EDU)	8 portoirs	☐
Portoirs pour microcentrifugeuse (N° cat. 166-0481EDU)	8 portoirs	☐
Portoirs pour tube de PCR (N° cat. TRC-0501EDU)	8 portoirs	☐

Recharges disponibles séparément

166-2501EDU	Kit GMO Investigator: recharge de réactifs, comprend des amorces OGM, des amorces PSII, ADN de contrôle positif, une règle de poids moléculaire PCR, colorant de charge Orange G, Master Mix 2x contenant dNTP, tampon, polymérase ADN
166-5009EDU	Master Mix pour PCR, 2x
732-6030EDU	Matrice InstaGene ^{MC} , 20 ml
166-0455EDU	Paquets de réactifs d'électrophorèse d'ADN Fast Blast moyen, permettant de réaliser 270 gels d'agarose à 1 % ou 90 gels d'agarose à 3 % de 7 x 10 cm ; comprend 125 g de poudre d'agarose, 100 ml de colorant d'ADN 500x Fast Blast, 1 L de tampon d'électrophorèse TAE 50x
166-0460EDU	Grand format de réactifs pour l'électrophorèse d'ADN Fast Blast, permet de réaliser 1080 gels d'agarose à 1 % ou 360 gels d'agarose à 3 % de 7 x 10 cm ; comprend 500 g de poudre d'agarose, 2x 100 ml de colorant d'ADN Fast Blast 500x, 5 L de tampon d'électrophorèse TAE 50x.
166-0473EDU	Tubes de microcentrifugation 1,5 ml colorés, 6 couleurs, 600
224-0110EDU	Tubes coniques, 1,5 ml, avec bouchons à vis O-ring installés, stériles, 500
TWI-0201EDU	Tubes de 0,2 ml avec bouchons bombés, neutres, 1000

Programme d'études Fit

En 1996, l'Académie nationale des sciences des États-Unis et ses groupes de travail, en collaboration avec le Conseil national de la recherche, ont publié les normes nationales d'enseignement des sciences. Ces normes préconisent de s'éloigner de l'enseignement traditionnel des sciences, qui consiste à mémoriser des faits et des informations scientifiques, à couvrir de nombreux domaines et à conclure les enquêtes par le résultat d'une expérience. Au lieu de cela, les enseignants sont encouragés à faire participer les étudiants à des enquêtes sur de longues périodes, à apprendre des thématiques dans le contexte de l'enquête et à appliquer les résultats des expériences aux arguments et explications scientifiques. Le kit GMO Investigator de Biotechnology Explorer suit cette approche. Elle propose une enquête guidée au cours de laquelle les étudiants recueillent des aliments courants, extraient l'ADN de l'échantillon, amplifient les séquences génétiques à l'aide de la PCR et utilisent l'électrophorèse sur gel pour identifier la présence ou l'absence des séquences marqueurs amplifiées. Les étudiants sont encouragés à analyser leurs résultats dans le contexte de contrôles expérimentaux afin d'évaluer 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.

Enquête scientifique

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

La chimie de la vie

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

Hérédité et biologie moléculaire

- Transformation génétique pour créer des OGM
- Contrôle de l'expression des gènes
- Techniques de profilage de l'ADN
- Sélection des cultures : traditionnelle ou génétiquement modifiée
- Expression et régulation des gènes dans des hôtes étrangers

Structure et fonction des organismes

- Transformation et régénération des plantes
- Structure cellulaire

Biologie évolutive

- Implications de la manipulation génétique
- Implications de l'altération de la biodiversité végétale et des écosystèmes
- Course évolutive entre les bioagresseurs les plantes

Sciences de l'environnement et de la santé

- Pesticides et herbicides
- Croissance démographique, qualité de l'environnement et défis mondiaux
- Rôle, place, limites et possibilités de la science et de la technologie

Plus précisément, aux États-Unis, le kit couvre les normes de contenu suivantes :

Normes

Conformité à la norme

Normes du contenu A

Les étudiants développeront leurs capacités à faire une enquête scientifique

Les étudiants réaliseront une expérience en utilisant procédures sophistiquées et contrôles multiples

Les étudiants développeront leur compréhension d'une enquête scientifique

Les étudiants appliqueront les résultats de cette expérience aux arguments scientifiques

Normes du contenu B

Les étudiants développeront leur compréhension de la cellule

Les étudiants comprendront les effets de la structure cellulaire sur l'extraction de l'ADN et comprendront pourquoi leur compréhension de la réplication cellulaire est nécessaire pour comprendre la PCR

Les étudiants développeront leur compréhension de la base moléculaire de l'hérédité

Les étudiants comprendront comment l'ingénierie génétique améliore les méthodes traditionnelles de la sélection des plantes afin de générer des traits nouveaux dans les cultures de plantes

Les étudiants développeront leur compréhension de l'évolution biologique

Les étudiants réfléchiront sur comment le fait de changer le génome d'un organisme peut affecter son habilité à survivre dans différents environnements

Les étudiants développeront leur compréhension de l'interdépendance des organismes

Les étudiants réfléchiront comment le fait de changer les cultures GM interagiront avec d'autres plantes et insectes de l'environnement

Normes du contenu F

Les étudiants développeront leur compréhension de la croissance des populations/de la qualité environnementale/des défis nationaux et mondiaux

Les étudiants apprendront comment la technologie alimentaire GM est proposée comme solution aux problèmes de la croissance des populations et des dommages environnementaux

Contexte pour les enseignants

Depuis la diffusion de la première culture génétiquement modifiée (GM) aux États-Unis en 1996, les scientifiques ont débattu de l'utilisation de ces cultures en raison des risques pour la santé et l'environnement. Les aliments génétiquement modifiés sont des aliments qui contiennent des composants de cultures génétiquement modifiées - des plantes qui ont été génétiquement modifiées par l'insertion de matériel génétique étranger. Ce matériel génétique étranger peut provenir non seulement d'une autre plante, mais aussi d'une espèce d'un autre règne (animal, fongique ou bactérien, par exemple). Le matériel génétique étranger est généralement un gène codant une protéine qui confère à la plante un avantage sur les plantes cultivées similaires. Parmi les exemples de caractères conférés, citons la résistance aux parasites, la tolérance aux herbicides, le retardement du mûrissement des fruits, l'amélioration du rendement des fruits, l'augmentation de la teneur en nutriments, etc.

Comment modifie-t-on génétiquement une culture ?

La première étape du processus de modification génétique consiste à identifier une protéine susceptible d'améliorer une culture. Une catégorie populaire de cultures GM utilise un gène de la bactérie du sol *Bacillus thuringiensis* (Bt) inséré dans leurs génomes. Les cultures Bt produisent une protéine appelée delta-endotoxine qui est mortelle pour la pyrale du maïs européenne, un parasite commun des plantes de maïs. Les agriculteurs qui plantent des cultures Bt n'ont pas à utiliser de pesticides, car les plantes produisent la protéine toxique à l'intérieur de leurs cellules. La toxine Bt a été identifiée pour la première fois dans des fermes à soie comme une toxine qui tue les vers à soie (qui appartiennent au même genre que la pyrale du maïs européenne).

La deuxième étape consiste à isoler (cloner) le gène codant la protéine. Le gène entier doit d'abord être localisé dans le génome d'un organisme, puis il doit être copié afin de pouvoir être isolé ou cloné hors de l'organisme. Bien que la région codante d'un gène puisse n'avoir que quelques centaines ou milliers de paires de bases, le gène lui-même peut avoir des dizaines de milliers de paires de bases, en raison de ses introns (séquences non codantes). Le clonage d'un gène entier peut être très laborieux et prendre de nombreuses années.

Les gènes contiennent des signaux qui régulent leur expression dans les cellules de leur hôte, mais ces signaux ne sont souvent pas compris par les cellules d'un autre organisme. La troisième étape consiste donc à modifier le gène pour que les cellules de la plante cultivée le lisent correctement et fabriquent la protéine recherchée. Pour ce faire, on simplifie le gène en supprimant les introns inutiles et en ajoutant ou en modifiant les séquences qui permettront au gène d'être exprimé dans les cellules de la plante cultivée, notamment un promoteur et un terminateur (voir figure 1). Le promoteur sert de site d'accueil pour l'ARN polymérase et de signal pour savoir où elle doit commencer à transcrire un gène. Le terminateur est le signal d'arrêt de la transcription. Les promoteurs et terminateurs natifs des gènes non modifiés interagissent avec d'autres composants de la cellule hôte pour activer ou désactiver les gènes en fonction du type de cellule et de la situation, mais les scientifiques peuvent concevoir les constructions pour les OGM de sorte que le gène étranger soit continuellement transcrit et que la protéine étrangère soit produite dans toute la plante. Le promoteur le plus couramment utilisé dans les cultures GM est le promoteur 35S du

virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S). Ce promoteur est choisi parce qu'il est déjà conçu par la nature pour activer la transcription dans tous les types de cellules végétales. Le terminateur le plus couramment utilisé dans les cultures GM est le terminateur de la nopaline synthase (NOS) d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le GMO Investigator permet d'identifier ces deux modifications génétiques dans les produits alimentaires vendus en épicerie. L'un de ces éléments génétiques, ou les deux sont présents dans environ 85 % de toutes les cultures génétiquement modifiées actuellement autorisées dans le monde.

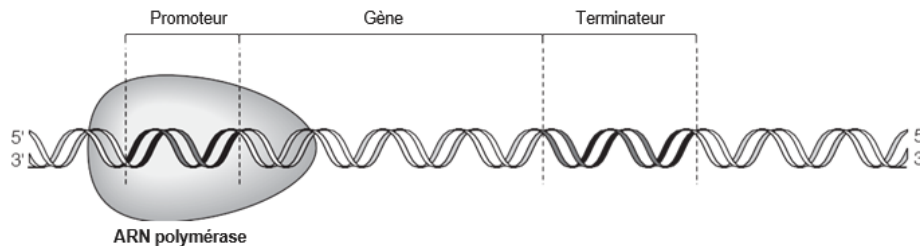


Fig. 1. Structure du gène

Une fois le gène modifié avec le promoteur et le terminateur appropriés, il doit être introduit dans la plante (voir figure 2). Le gène ne peut pas être inséré dans toutes les cellules d'une plante existante ; au lieu de cela, des cellules végétales individuelles sont transformées avec le gène modifié, puis de nouvelles plantes sont cultivées à partir de ces cellules individuelles. Les cellules sont d'abord prélevées sur la plante mère, puis cultivées sur un milieu spécial qui leur permet de former un amas de cellules indifférenciées, appelé callus. Le gène modifié est ensuite transféré dans les cellules du callus par diverses méthodes, chacune d'entre elles devant faire passer l'ADN à travers la paroi cellulaire, la membrane plasmique et les membranes nucléaires de la plante.

L'une des méthodes consiste à utiliser une version génétiquement modifiée de la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie provoque la maladie de la galle du collet en insérant une partie de son ADN dans le génome d'une 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 projette physiquement des particules d'or recouvertes 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 faciliter ce processus, des marqueurs de sélection sont insérés dans les cellules avec le gène modifié. Il peut s'agir de marqueurs de résistance aux antibiotiques ou de marqueurs visuels comme le gène de la protéine fluorescente verte. 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 appelée « événement ».

Le processus de transformation est très délicat, de sorte que les souches de cultures qui ont été optimisées pour la transformation sont rarement les mêmes que

celles qui sont utilisées dans les champs. La cinquième et dernière étape de la fabrication d'une culture génétiquement modifiée consiste à rétrocroiser la culture génétiquement modifiée qui est utilisée dans les champs de culture. Cela peut prendre des années, car seulement 50 % du génome de la culture à haut rendement est transféré à la culture génétiquement modifiée lors de chaque croisement.

Le processus de modification génétique est très inefficace, coûteux et long - il n'y a généralement qu'une poignée d'« événements » réussis pour chaque culture génétiquement modifiée, et il faut des millions de dollars et six à quinze ans pour amener chaque culture sur le marché.

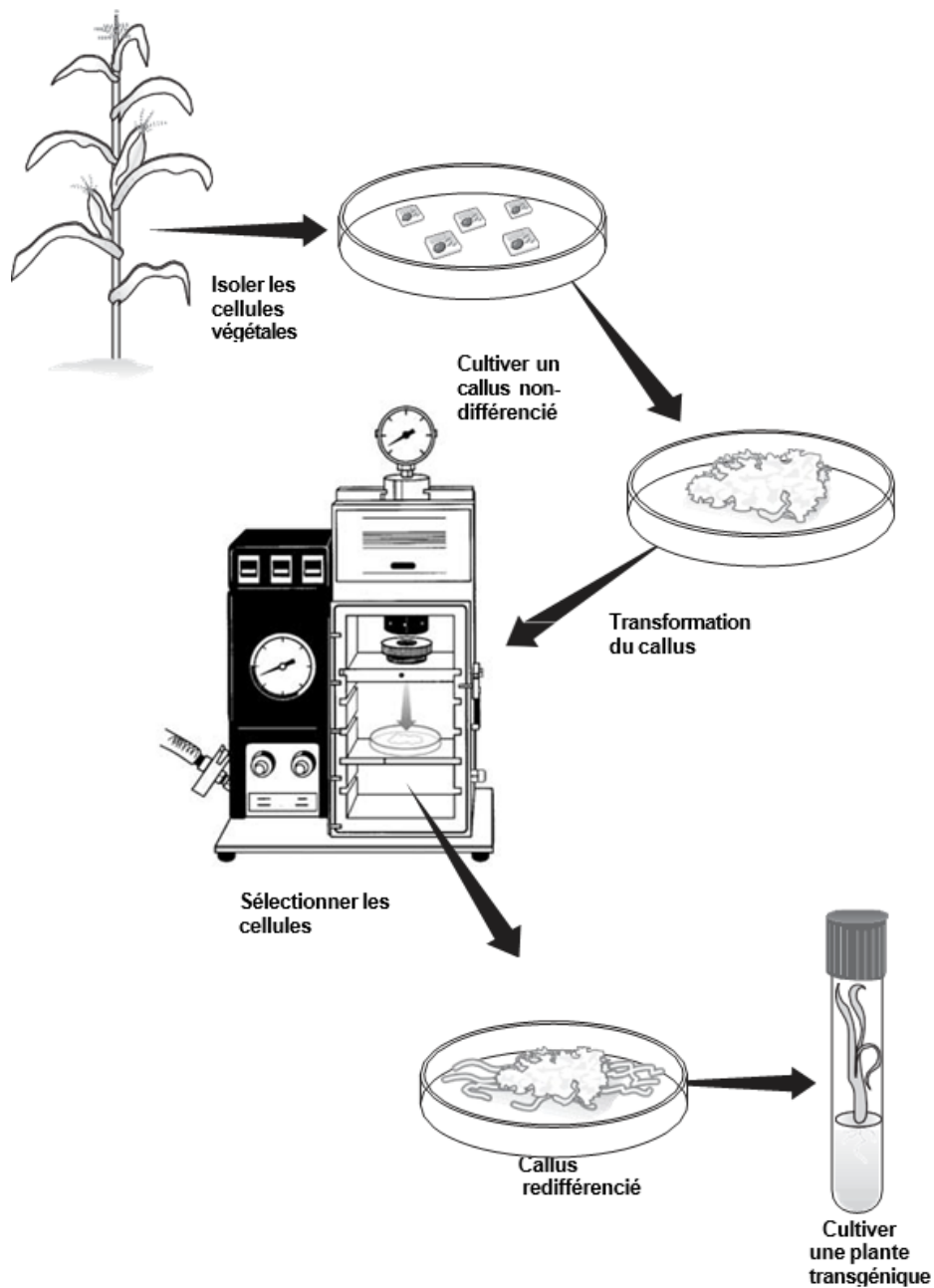


Fig. 2. Comment fabriquer une culture génétiquement modifiée.

Les cultures génétiquement modifiées sont-elles une bonne chose ?

De nombreuses personnes s'opposent à l'utilisation de cultures génétiquement modifiées. Ils font valoir qu'il y a un potentiel de pollinisation croisée d'espèces de mauvaises herbes naturelles avec des cultures résistantes aux herbicides pourrait donner naissance à de « super mauvaises herbes », ou que des « super microbes »

pourraient se développer et ne plus être sensibles aux toxines contenues dans les cultures résistantes aux micro agresseurs. Beaucoup s'inquiètent des réactions allergiques potentielles aux nouvelles protéines, de la résistance aux antibiotiques résultante des marqueurs de sélection utilisés pour développer les cultures, ou d'autres effets imprévus sur la santé publique. D'autres s'inquiètent du fait qu'il n'y a pas eu suffisamment de recherches pour comprendre pleinement les implications de la modification de la diversité végétale. Les personnes s'inquiètent également de l'absence d'exigences gouvernementales en matière d'étiquetage des aliments aux États-Unis.

Les partisans des aliments génétiquement modifiés affirment que ces cultures sont bénéfiques pour l'environnement, car elles réduisent l'utilisation d'herbicides et de pesticides, des produits chimiques potentiellement toxiques pour l'environnement et la santé humaine. Également, ces cultures peuvent préserver les terres arables en réduisant le stress subi par la terre, améliorer la valeur nutritionnelle des aliments dans les pays en développement et permettent de cultiver des plantes sur des terres auparavant non cultivables. Vous voudrez peut-être organiser un débat avec vos élèves pour répondre à ces arguments. Un débat formel est inclus dans l'annexe D.

Identifier les cultures GM

Comment tester les aliments et les cultures pour identifier ceux qui contiennent des génomes GM (voir figure 3) ? Deux méthodes sont actuellement utilisées. La première, l'essai d'immunoabsorption enzymatique (enzyme-linked immunosorbent assay ELISA) identifie les protéines. Il s'agit d'un test à base d'anticorps, qui identifie les protéines spécifiques produites par les plantes GM. Le test ELISA ne peut tester que les produits frais, en raison de la dégradation des protéines pendant la transformation des aliments. De plus, comme le test ELISA identifie les protéines produites par les cultures OGM, les tests doivent être individualisés en fonction du type de culture. Par exemple, un test ELISA Bt ne peut détecter que le maïs Bt, et non le maïs GM tolérant aux herbicides. Cependant, le test ELISA est peu coûteux et précis, et peut être réalisé sur le terrain avec peu d'expertise.

Le second test, qui utilise la réaction en chaîne par polymérase (PCR), identifie les séquences d'ADN qui ont été insérées dans la plante génétiquement modifiée. Contrairement aux protéines, l'ADN est une molécule relativement stable, de sorte que des fragments d'ADN peuvent être isolés d'aliments hautement transformés et sont suffisamment intacts pour être amplifiés par la PCR. Une version modifiée de la PCR, la PCR en temps réel, peut également quantifier le pourcentage de matériel GM dans l'échantillon alimentaire. Contrairement à un test ELISA qui est spécifique à une seule culture, un seul test PCR comme celui-ci peut détecter 85 % de toutes les cultures GM. En effet, les ingénieurs-généticiens n'utilisent qu'un petit nombre de séquences régulatrices (séquences promotrices et terminatrices) pour contrôler l'expression des gènes insérés, et ces séquences sont donc communes à la majorité des cultures 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) d'*Agrobacterium tumefaciens*, qui sont les séquences détectées par cette trousse. Une revue de la PCR est incluse dans l'annexe A.

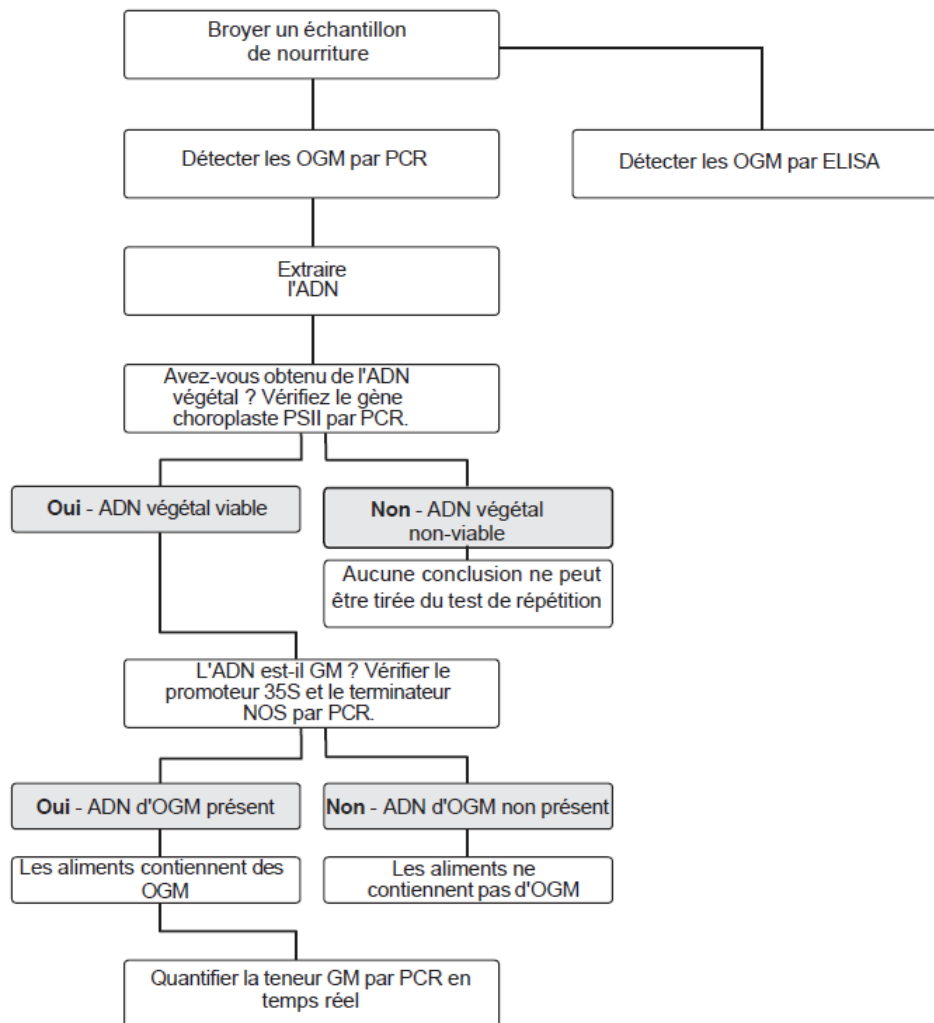


Fig.3. Comment détecter les OGM dans les aliments ?

Une expérience d'enquête guidée

Cette trousse est un laboratoire avancé en raison de l'utilisation de contrôles multiples. Vos étudiants doivent savoir que ce sont les types de contrôles qui sont utilisés par les scientifiques dans de vrais laboratoires et que si les erreurs identifiées par ces contrôles se produisent, les scientifiques répètent le test. Ces contrôles permettent aux étudiants de :

Vérifier que l'extraction d'ADN fut réussie

La trousse contient un jeu d'amorces (colorées en rouge) pour détecter les séquences spécifiques aux OGM, mais aussi un second jeu d'amorces (colorées en vert) qui identifie l'ADN végétal, qu'il soit dérivé d'OGM ou non. Le deuxième ensemble d'amorces vous permet de savoir si un résultat négatif pour les OGM est dû à l'absence de matériel OGM ou simplement à une extraction d'ADN infructueuse. Ces

amorces amplifient une région de 455 pb du gène chloroplastique du photosystème II (PSII) qui est commun à la plupart des plantes. Veuillez noter que l'ADN viable n'est pas toujours extrait de tous les aliments. Nous fournissons une liste à la page 33 des aliments recommandés qui donnent de l'ADN végétal viable. Le kit a été optimisé pour tester les aliments à base de maïs et de soja.

Éviter la contamination

Le kit contient un échantillon d'aliment non-OGM certifié par Bio-Rad qui doit être traité comme l'échantillon choisi pour l'aliment à tester. Cet échantillon permet d'éviter les résultats faussement positifs. Si cet échantillon donne un résultat positif aux OGM, cela indique une contamination de la réaction. Si l'aliment testé donne également un résultat positif aux OGM, vous ne pouvez pas vous fier à ce résultat. Veuillez noter que la contamination est un phénomène très courant dans la PCR en raison de sa très grande sensibilité, et des mesures de protection doivent être prises pour éviter toute contamination. Reportez-vous à l'annexe B pour obtenir une liste des précautions à prendre pour se protéger de la contamination.

S'assurer que la réaction PCR fonctionne comme prévu

Le kit contient également de l'ADN matrice qui code pour les séquences de la plante et de l'OGM. Et ceci sert de contrôle pour les faux négatifs. Si ces séquences de contrôle ne sont pas amplifiées, il y a un problème avec la réaction PCR et vous ne pouvez pas vous fier au résultat négatif pour les OGM de votre aliment testé. Cela vous donne également des bandes de référence pour celles produites par les échantillons testés.

Tester pour une large gamme d'aliments génétiquement modifiés

Cette trousse utilise la PCR « duplex », ce qui signifie que deux séquences cibles sont amplifiées simultanément. Les deux paires d'amorces de la réaction 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 afin de pouvoir détecter un plus grand nombre d'aliments génétiquement modifiés, car certains aliments ne contiennent que le promoteur CaMV 35S, d'autres que le terminateur NOS, et certains les deux. En utilisant ces deux séquences, environ 85 % de tous les aliments GM actuellement offerts sont détectables avec ce kit, alors que les amorces CaMV 35S seules ne peuvent détecter qu'environ 70 % des aliments GM.

Il n'est pas nécessaire que vos étudiants comprennent la PCR avec réaction double en chaîne de la polymérase pour une compréhension complète des principes de ce laboratoire, et dans le manuel de l'étudiant, le texte fait référence à l'amplification des « séquences OGM », sans explication détaillée de ces différentes séquences. Cependant, si un aliment contient à la fois les séquences CaMV 35S et NOS, comme une papaye GM, une bande double peut apparaître dans la voie OGM, où les produits PCR de 203 et 225 pb ont été générés. Cela sera particulièrement visible sur un gel de polyacrylamide.

Préparation de l'instructeur

Cette section décrit la préparation qui doit être effectuée par l'instructeur avant chaque période de laboratoire. Si des périodes en bloc sont utilisées, préparez les leçons 1-2 et les leçons 3-4 en même temps. Une estimation du temps de préparation est incluse.

Chronologie

L'ensemble de l'enquête nécessite un minimum de quatre périodes de laboratoire de 50 minutes ou deux cours en bloc de 90 minutes. Sachez qu'une période supplémentaire de 4 heures de cycle de réaction est nécessaire en dehors des heures de cours. Nous recommandons également 2 à 3 jours de révision du contexte et de conférences pour préparer vos élèves à l'exercice.

Avant le laboratoire

- Lire le manuel (2 h)
- Acheter des échantillons de nourriture à l'épicerie (si nécessaire)
- Faire l'inventaire des accessoires nécessaires (1 h)
- Effectuer la préparation préalable de l'instructeur (30 min à 3 h par laboratoire)
- Installer les postes de travail des élèves (30 min à 1 h par laboratoire).

Leçons de 50 minutes

- Leçon 1 : Extraire l'ADN (50 min)
- Leçon 2 : Préparer les réactions PCR (50 min)
- Réaliser les réactions PCR (4 heures), généralement pendant la nuit.
- Leçon 3 : Faire l'électrophorèse de l'ADN et la coloration des gels (50 min)
- Leçon 4 : Analyser des résultats (50 min)

Leçons en bloc de 90 minutes

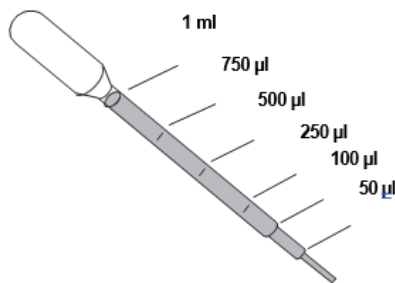
- Leçons 1 - 2 : Extraire l'ADN et préparer les réactions PCR (90 min)
- Réaliser les réactions PCR (4 heures)
- Leçons 3 - 4 : Faire l'électrophorèse de l'ADN, la coloration des gels, l'analyse des résultats (90 min)

Questions de sécurité

Il est interdit de manger, boire, fumer et appliquer des produits cosmétiques dans la zone de travail. Le port de lunettes et de gants de protection est fortement recommandé. Les étudiants doivent se laver les mains avec du savon avant et après cet exercice. Si une solution entre en contact avec les yeux d'un élève, rincez à l'eau pendant 15 minutes. Bien que le colorant d'ADN Fast Blast ne soit pas toxique, il est recommandé de porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation du colorant afin de ne pas se tacher les mains. Il est recommandé de porter des blouses de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour éviter de tacher les vêtements.

Mesures du volume

La préparation avancée de l'instructeur nécessite une pipette à volume réglable de 2 à 20 μl , de 20 à 200 μl et de 100 à 1000 μl , ainsi que des embouts à barrière anti-aérosols (les embouts à barrière anti-aérosols sont nécessaires pour éviter la contamination des réactifs et de vos pipettes). Des pipettes de transfert en plastique jetables graduées et stériles (PTPJ) sont fournies et peuvent être utilisées pour des volumes de 50, 100, 250, 500, 750 et 1 000 μl . L'illustration montre les marques sur la PTPJ correspondant aux volumes à mesurer. Les volumes supérieurs à 1 ml nécessiteront plusieurs ajouts. Pour chaque étape de la préparation en laboratoire, utiliser un nouveau PTPJ ou un nouvel embout de pipette.



Mortiers et pilons

Pour ce laboratoire, les aliments doivent être broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Veuillez vous assurer que ceux-ci ont été soigneusement lavés afin d'éliminer tout produit chimique résiduel qui pourrait interférer avec les réactions PCR. De plus, rincez les mortiers et les pilons avec de l'eau de Javel à 10 %, qui détruit tout ADN résiduel, puis rincez-les à l'eau pour éliminer l'eau de Javel. Le protocole de l'étudiant prévoit que les étudiants préparent un échantillon d'aliment non-OGM, puis lavent le mortier et le pilon avec du détergent et enfin préparent leur échantillon d'aliment test. Comme l'aliment non-OGM est préparé en premier, il ne devrait pas y avoir de risque de contamination de l'aliment test. Il vous appartient de décider si vos étudiants utilisent de l'eau de Javel entre les échantillons. Cependant, les mortiers et les pilons doivent être rincés avec de l'eau de Javel à 10 % entre les différentes classes.

Leçon 1 : Extraction d'ADN à partir d'échantillons d'aliments

Le point crucial de ce laboratoire est la qualité et la quantité d'ADN extraits de vos aliments. Le tableau de la page 33 indique la fiabilité de différents aliments en ce qui concerne l'extraction de l'ADN et les résultats de la PCR ; les aliments les moins fiables peuvent produire des bandes plus faibles. Si vous souhaitez que vos élèves trouvent des aliments contenant des OGM, vous pouvez éviter les produits à base de blé et de riz, les fruits et les légumes frais qui sont presque certainement négatifs aux OGM et choisir des produits à base de papaye, de soja et de maïs.

Matériel nécessaire à la préparation avancée	Quantité
Tubes à bouchon à vis	16
Béchers ou gobelets pour l'eau distillée	8
Matrice InstaGene ^{MC}	1 bouteille
Pipettes de transfert en plastique jetables (PTPJ)	8-16
Bain-marie réglé à 95 – 100 °C	1

Procédure (durée estimée : 35 min)

1. Ajouter 500 µl de matrice InstaGene dans chacun des 16 tubes à bouchon à vis à l'aide d'une pipette de transfert ou d'une micropipette à volume réglable de 200 à 1000 µl.

Note : la matrice InstaGene doit être constamment mélangée pour répartir uniformément les billes microscopiques. Ceci est facilement réalisé en pipettant de haut en bas avec la pipette entre chaque aliquote.

2. Mettre au moins 25 ml d'eau distillée dans les béchers ou les gobelets propres et les étiqueter « Eau DI ».
3. Régler le bain-marie à 95-100 °C au moins 30 minutes avant le laboratoire.
4. (Facultatif) Préparer l'aliment témoin sans-OGM certifié Bio-Rad. Pour gagner du temps, vous pouvez préparer l'aliment témoin sans-OGM : si vous le faites, nous vous recommandons de préparer l'échantillon jusqu'à l'étape de centrifugation (voir le protocole étudiant).
5. Installer les postes de travail des étudiants.
6. Installer le poste de travail commun.

Poste de travail pour les étudiants

Matériel	Quantité
Tube à bouchon vissé avec 500 µl de matrice InstaGene	2
Bécher d'eau distillée	1
Pipettes de transfert	2
Mortier et pilon	1
Aliments testés*	1-8
Stylo de marquage	1

*Consulter le tableau de la page 33 pour des suggestions d'aliment à utiliser.

Poste de travail commun

Matériel	Quantité
Bain-marie réglé à 95-100 °C	1
Microcentrifugeuse	1
ou mini-centrifugeuses	3-4
Balance et coupelles de pesée	1

Leçon 2 : Préparer les réactions PCR

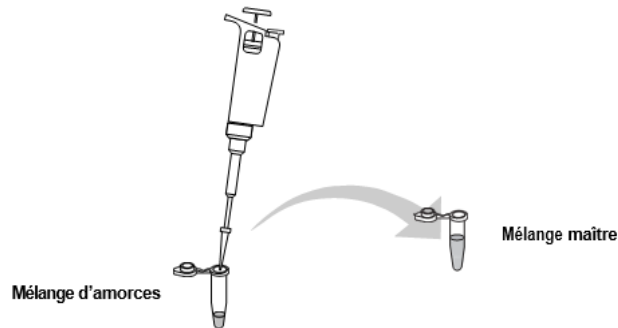
Matériel nécessaire à la préparation avancée	Quantité
Tubes à bouchon à vis	26
Tubes PCR	48
Adaptateurs pour tubes PCR	48
Master Mix	1 flacon
Amorces OGM (rouge)	1 flacon
Amorces PSII végétales (vertes)	1 flacon
Matrice d'ADN positif aux OGM	1 flacon
Échantillons des étudiants du laboratoire précédent	16 tubes
Micropipettes à volume ajustable de 2 à 20 µl ou micropipettes à volume fixe de 20 µl	8
Embouts de pipette 2 à 20 µl, barrière anti-aérosol	8 portoirs
Béchers avec glace ou bains de glace	8
Porte-microtubes en mousse	8
Stylos de marquage	8

Procédure (durée estimée : 45 min)

Note : Ajouter les amorces au Master Mix et mélanger seulement 30 minutes avant le début de la leçon et conserver le Master Mix préparé sur de la glace.

1. Décongeler la matrice d'ADN positif pour les OGM et faire tourner/pulser les tubes dans une centrifugeuse pour faire descendre tout le contenu au fond. Ajouter 50 μ l de matrice d'ADN positive aux OGM dans 8 tubes à bouchon à vis étiquetés OGM (+). Ceci peut être préparé et stocké à -20 °C pendant 1 à 2 mois si nécessaire.
2. **Effectuer cette étape 30 minutes à 1 heure avant le laboratoire.** Décongeler le Master Mix et les amorces et faire tourner/pulser tubes dans une centrifugeuse pour faire descendre tout le contenu au fond. **Garder les tubes sur la glace.**
3. Étiqueter les tubes à bouchon à vis :
 - a. Étiqueter 9 tubes à bouchon à vis « MMV » (Master Mix végétal)
 - b. Étiqueter 9 tubes à bouchon à vis « OMM » (OGM et Master Mix)
4. Ajouter 550 μ l de Master Mix dans un tube MMV et un tube OMM.

Avant de distribuer les amorces aux étapes 5 et 6, faites tourner avec impulsions les tubes d'amorces à nouveau, si nécessaire, afin de vous assurer que le contenu n'est pas coincé dans le couvercle du tube.
5. Ajouter 11 μ l d'amorces vertes au master mix dans le tube MMV, et mélanger.
Conserver sur la glace.



6. Ajouter 11 μ l d'amorces rouges au Master Mix dans le tube OMM, et mélanger.
Conserver sur la glace.
7. Ajoutez 65 μ l du Master Mix végétal avec les amorces nouvellement ajoutées dans chacun des 8 tubes restants étiquetés MMV.
8. Ajoutez 65 μ l du Master Mix OGM avec les amorces nouvellement ajoutées dans chacun des 8 tubes restants étiquetés OMM.
9. Mettez un tube MMV, un tube OMM et un tube OGM (+) dans un bain de glace pour chaque poste de travail.
10. Installez les postes de travail des étudiants.

Postes de travail des étudiants

Matériel	Quantité
Bain de glace contenant les échantillons d'ADN et les tubes OMM, MMV et OGM (+)	1
Tubes PCR	6
Adaptateurs PCR	6
Porte-microtubes en mousse	1
Stylo de marquage	1
Micropipette à volume réglable de 2 à 20 µl ou micropipette à volume fixe de 20 µl	1
Embouts de pipette 2-20 µl, barrière anti-aérosols	1 portoir

11. Programmez le thermocycleur (voir l'annexe E pour des instructions détaillées).

Étape	Fonction	Température demandée	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	Dénaturation	94 °C	2 min	1
Amplification PCR	Dénaturation	94°C	1 min	40
	Renaturation	59 °C	1 min	
	Élongation	72 °C	2 min	
Extension finale	Élongation	72 °C	10 min	1
*Maintenance	Mise en attente	4 °C	Indéfinie	1

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

Leçon 3 : Électrophorèse des produits 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 PCR généré à partir du gène du photosystème II est de 455 pb. La résolution des bandes de cette taille nécessite un gel d'agarose à 3 % ou un gel de polyacrylamide à 10 %. Les deux techniques de gel donnent d'excellents résultats. Votre choix de technique de gel dépendra de l'équipement dont vous disposez et des techniques que vous souhaitez enseigner à vos étudiants. Les gels de polyacrylamide sont beaucoup plus fragiles que les gels d'agarose à 3 % et peuvent donc ne convenir qu'aux étudiants plus expérimentés. Cependant, les gels de polyacrylamide déchiffrent les bandes à un degré plus élevé, ce qui peut permettre de séparer les bandes d'ADN de taille similaire générées par un aliment testé qui contient à la fois le promoteur CaMV 35S et le terminateur NOS, comme la papaye génétiquement modifiée. Après des instructions

communes aux deux techniques, des instructions distinctes sont fournies ci-dessous pour chaque méthode.

Matériel nécessaire	Quantité
Colorant de chargement Orange G	1 flacon
Règle de poids moléculaire PCR	1 flacon
Microtubes à couvercle rabattable	16 tubes
Micropipettes à volume réglable 20–200 µl	1
Micropipettes à volume réglable 2-20 µl ou micropipettes à volume fixe 20 µl	8
Embouts de pipette 20-200 µl, barrière anti-aérosols ou régulière	1 portoir
Embouts de pipette 2-20 µl, barrière anti-aérosol	8 portoirs
Bloc d'alimentation	2 - 4
Colorant ADN Fast Blast	1 bouteille
Flacon ou bouteille de 500 ml pour stocker la coloration Fast Blast diluée	1
Eau distillée	3,5 L
Plateaux de coloration du gel	1 - 8
Matériel et équipement d'électrophorèse	Voir ci-dessous

Procédure (durée estimée : 1-3 h)

1. Décongeler le colorant de chargement Orange G et la règle de poids moléculaire PCR, et faire tourner avec impulsion les tubes dans une centrifugeuse pour faire redescendre tout le contenu au fond.
2. Ajouter 40 µl de colorant de chargement Orange G à la fiole de la règle de poids moléculaire PCR. Bien mélanger et faire tourner par impulsions.
3. Étiqueter les microtubes à essai à couvercle rabattable :
 - a. Étiqueter 8 tubes « CO »
 - b. Étiqueter 8 tubes « RPM »
4. Ajouter 70 µl de colorant de chargement Orange G dans chacun des 8 tubes marqués « CO ». Ceci peut être préparé et conservé à 4 °C pendant 1 à 2 mois.
5. Ajouter 25 µl de la règle de poids moléculaire PCR dans chacun des 8 tubes marqués « RPM ». Ceci peut être préparé et conservé à 4 °C pendant 1 à 2 mois.
6. Préparer les gels, le tampon de migration et l'appareil d'électrophorèse. Consulter les instructions ci-dessous pour les gels d'agarose ou les gels de polyacrylamide.
7. Préparer la coloration de l'ADN Fast Blast. Consulter les instructions ci-dessous pour la technique de coloration choisie.

8. Installer les postes de travail des étudiants.

Poste de travail pour les étudiants

Matériel	Quantité
Gel (voir ci-dessous)	1
Échantillons du laboratoire précédent	6
Tampon de migration (voir ci-dessous)	300 - 350 ml
Colorant de chargement orange	1 flacon
Règle de poids moléculaire PCR	1 flacon
Pipette à volume réglable 2-20 µl ou micropipette à volume fixe 20 µl	1
Embouts de pipette 1-20 µl, barrière anti-aérosols	1 portoir
Chambre d'électrophorèse sur gel (peut être partagée par 2 postes de travail)	1
Bloc d'alimentation (peut être partagée par plusieurs postes de travail)	1
Colorant d'ADN Fast Blast (au poste de travail commun)	1
Plateau de coloration du gel	1

Électrophorèse sur gel d'agarose

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

Ces procédures peuvent être effectuées 1 à 2 jours à l'avance par l'enseignant ou réalisées en classe individuellement par chacune des équipes. Note : Des gels d'agarose à 3 % prémoulés (N° cat. 161-3017 EDU) sont disponibles chez Bio-Rad.

Matériel (nécessaire en plus de ceux indiqués pour la leçon 3)	Quantité
Agarose	10,5 g
TAE 50x	60 ml
Cylindres gradués, 3 L et 500 ml	2
Plaque chauffante à micro-ondes ou magnétique et barre d'agitation	1
Bouteille ou flacon Erlenmeyer, 1 L	1
Flacon, 50 ml (facultatif)	1
Bain-marie à 60 °C (facultatif)	1
Plateaux de coulée en gel	4 - 8
Peignes en gel	1
Ruban adhésif de laboratoire (facultatif)	1 rouleau
Chambres d'électrophorèse horizontale	4 - 8

1. Préparer le tampon d'électrophorèse. Le tampon d'électrophorèse est fourni sous

forme de concentré 50x. Le tampon TAE 1x est nécessaire pour fabriquer le gel d'agarose et est également nécessaire pour chaque chambre d'électrophorèse. Trois litres de tampon TAE 1x seront suffisants pour faire fonctionner 8 chambres d'électrophorèse et verser 8 gels d'agarose. Pour préparer 3 litres de TAE 1x à partir de concentré de TAE 50x, ajoutez 60 ml du concentré 50x à 2,94 litres d'eau distillée.

2. Préparer la solution d'agarose. La concentration de gel recommandée pour cette application est de 3 % d'agarose. Cette concentration d'agarose offre une excellente résolution et minimise le temps de passage nécessaire à la séparation électrophorétique des fragments PCR. Pour obtenir une solution à 3 %, ajoutez 3 g de poudre d'agarose pour 100 ml de tampon d'électrophorèse TAE 1x dans un récipient approprié, résistant à la chaleur et suffisamment grand pour supporter une ébullition vigoureuse (par exemple, un flacon Erlenmeyer de 1000 ml, une bouteille Wheaton, etc.) Pour 8 gels, vous aurez besoin d'environ 350 ml d'agarose fondue (10,5 g d'agarose plus 350 ml de tampon TAE 1x). L'agarose doit être préparé avec du tampon d'électrophorèse et non de l'eau. Tournaillez pour mettre en suspension la poudre d'agarose dans le tampon. Si vous utilisez un Erlenmeyer, renversez un Erlenmeyer de 50 ml dans l'extrémité ouverte de l'Erlenmeyer de 1000 ml contenant l'agarose. Le petit flacon agit comme une chambre de reflux, permettant l'ébullition sans grande perte de volume du tampon par évaporation. L'agarose peut être fondu pour la coulée du gel sur une plaque chauffante magnétique ou dans un four à micro-ondes. Attention : Utilisez des gants de protection, des mitaines de four, des lunettes de protection et des blouses de laboratoire appropriés lors de la préparation et de la coulée des gels d'agarose. Le contact avec l'agarose fondue bouillant ou avec les récipients contenant l'agarose chaud peut provoquer de graves brûlures.

Méthode de la plaque chauffante magnétique. Ajouter un agitateur au flacon contenant l'agarose et le tampon. Chauffer le mélange jusqu'à ébullition tout en remuant sur une plaque chauffante magnétique. Les bulles ou la mousse doivent se briser avant de monter jusqu'au col du flacon. Faites bouillir la solution jusqu'à ce que toutes les petites particules transparentes d'agarose soient dissoutes. Avec le petit flacon toujours en place, mettre de côté l'agarose pour qu'il refroidisse à 60 °C avant de verser les gels (un bain-marie réglé à 60 °C est utile pour cette étape).

Méthode du four à micro-ondes. Placer le flacon ou la bouteille contenant la solution d'agarose dans le four à micro-ondes. Desserrer le bouchon du flacon s'il est présent. Utiliser un réglage moyen et programmer à 3 minutes. Arrêter le four à micro-ondes toutes les 30 secondes et faites tourner le flacon pour redistribuer l'agarose non dissout. Cette technique est le moyen le plus efficace de dissoudre l'agarose. Alternier l'ébullition et le tourbillonnement de la solution jusqu'à ce que toutes les petites particules d'agarose transparentes soient dissoutes. Avec le petit flacon ou le bouchon de bouteille toujours en place, mettre de côté pour refroidir à 60 °C avant de verser la solution (un bain-marie réglé à 60 °C est utile pour cette étape).

Coulée des gels d'agarose

Avec le système Mini-Sub^{MC} Cell GT de Bio-Rad, les gels peuvent être coulés directement dans la boîte de gel en utilisant les portes de coulée du plateau de gel. Si les portes de coulée ne sont pas disponibles, utilisez la méthode du ruban adhésif pour couler les gels, tel que décrit ci-dessous. D'autres méthodes sont détaillées dans le manuel d'instructions du système Sub-Cell^{MC} GT de Bio-Rad. 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 peut être chargé avec les échantillons de deux équipes d'étudiants. Ces gels plus longs ne tiennent pas dans les portes de coulée et doivent être fabriqués par la méthode du ruban adhésif.

1. Sceller solidement les extrémités du plateau de gel avec des bandes de ruban adhésif standard de laboratoire. Appuyer fermement le ruban adhésif sur les bords du plateau de gel pour former un joint étanche et poser le plateau de gel à plat.
2. Préparer une solution d'agarose de la concentration et de la quantité souhaitées dans un tampon d'électrophorèse TAE 1x.
3. Refroidir l'agarose au moins à 60 °C avant de le verser (un bain-marie est utile pour cette étape).
4. Pendant que l'agarose refroidit, placer le peigne dans les fentes appropriées du plateau de gel. Les peignes à gel doivent être placés à environ 2 cm de l'extrémité du plateau de coulée du gel.
5. Verser 30-50 ml d'agarose fondu dans le plateau jusqu'à une profondeur d'environ 0,5 cm.
6. Laisser le gel se solidifier à température ambiante pendant 10 à 20 minutes — il sera translucide lorsqu'il sera prêt à être utilisé.
7. Retirer délicatement le peigne du gel solidifié. Retirer le ruban adhésif des bords du plateau de gel. Les gels d'agarose peuvent être conservés enveloppés dans du film plastique, des sacs en plastique scellés ou immergés dans du tampon TAE 1x pendant 2 semaines à 4 °C.

Chargement et exécution des gels d'agarose

1. Placer le gel dans le plateau à gel sur une chambre d'électrophorèse d'ADN nivelée de sorte que les puits d'échantillons se trouvent à l'extrémité cathodique (noire) de la base. Les échantillons d'ADN migreront vers l'extrémité anodique (rouge) de la base pendant l'électrophorèse.
2. Remplir la chambre d'électrophorèse avec du tampon de migration TAE 1x jusqu'à environ 2 mm au-dessus de la surface du gel.
3. Charger les gels comme indiqué dans le manuel de l'étudiant.
4. Soumettre les gels à 100 V pendant 30 minutes. Une plus grande résolution peut être obtenue en utilisant un temps d'exécution plus long (par exemple, 45 min), mais si des gels doubles sont utilisés, ne soumettre les gels qu'à 100 V pendant seulement 30 min, car l'ADN du gel supérieur peut passer dans le gel inférieur. Ne laissez pas le colorant orange migrer hors du gel.
5. Colorer les gels avec la coloration Fast Blast DNA — voir ci-dessous.

Préparation pour la coloration des gels d'agarose

La coloration Fast Blast DNA est fournie sous forme de concentré 500x qui doit être diluée avant utilisation. La coloration peut être utilisée comme une coloration rapide lorsqu'elle est diluée à 100x pour permettre la visualisation de l'ADN en 15-20 minutes, ou peut être utilisée comme une coloration de nuit lorsqu'elle est diluée à 1x. La coloration d'ADN Fast Blast est une solution alternative pratique, sûre et non toxique au bromure d'éthidium pour la détection de l'ADN. Fast Blast contient un composé cationique qui appartient à la famille des colorants avec thiazine. Les molécules de colorant chargées positivement sont attirées et se lient aux groupes phosphates chargés négativement de l'ADN. La formule exclusive du colorant colore l'ADN en bleu foncé dans les gels d'agarose et fournit des résultats clairs et cohérents. Des instructions détaillées sur l'utilisation de la coloration Fast Blast sont incluses dans le manuel de l'étudiant.

AVERTISSEMENT

Bien que la coloration d'ADN Fast Blast soit non toxique et non cancérigène, il convient de porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation de la coloration ou des gels colorés pour éviter que les mains ne deviennent bleues. Il faut porter des blouses de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour éviter de tacher les vêtements. Jetez les solutions de coloration conformément aux protocoles en vigueur dans votre établissement. Utilisez une solution d'eau de Javel à 10 % ou une solution d'alcool à 70 % pour éliminer le Fast Blast de la plupart des surfaces. Vérifiez que ces solutions n'endommagent pas les surfaces avant de les utiliser.

Préparation du protocole de coloration pendant la nuit (recommandé)

Pour préparer la coloration 1x (pour la coloration de nuit), diluez 1 ml de Fast Blast 500x avec 499 ml d'eau distillée ou désionisée dans un flacon ou une bouteille de taille appropriée, et mélangez. Couvrez le flacon et conservez-le à température ambiante jusqu'au moment de l'utiliser.

Préparation du protocole de coloration rapide

Pour préparer la coloration 100x (pour une coloration rapide), diluez 100 ml de Fast Blast 500x avec 400 ml d'eau distillée ou désionisée dans un flacon ou une bouteille de taille appropriée et mélangez. Couvrez le flacon et conservez-le à température ambiante jusqu'au moment de l'utiliser.

La décoloration nécessite l'utilisation d'au moins un récipient de grand volume, capable de contenir au moins 500 ml, à chaque poste de travail des étudiants. Le Fast Blast 100x peut être réutilisé au moins sept fois. Veuillez noter que, contrairement aux gels d'agarose à 1 %, les gels d'agarose à 3 % nécessitent une coloration de 5 minutes, avant d'être décolorés dans de l'eau chaude. En raison du pourcentage élevé d'agarose, les gels colorés par cette méthode rapide peuvent prendre plus de temps que les gels d'agarose à 1 % pour être décolorés à un niveau satisfaisant. Plusieurs lavages à l'eau **chaude** du robinet faciliteront la décoloration de ces gels.

Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Préparation des gels de polyacrylamide et du tampon de migration TBE

Matériel nécessaire en plus de celui indiqué pour la leçon 3	Quantité
--	----------

Gels préfabriqués Mini-PROTEAN ^{MC} 10 % TBE (No. cat. 456-5033)	8
10x TBE (No. cat. 161-0733 EDU)	300 ml
Cylindre gradué, 3 L	1
Chambre d'électrophorèse verticale Mini-PROTEAN ^{MC} Tetra Cell	4 - 8
Embouts Prot/Elec ^{MC}	8 portoirs
Couteau aiguisé ou rasoir	1

Gels de polyacrylamide Ready Gel 10 % TBE préfabriqués

Les gels de polyacrylamide doivent être conservés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur utilisation. Commandez les gels 2 à 3 semaines avant le laboratoire pour des résultats optimaux. **Ne les congelez pas.** Pour préparer les gels pour le laboratoire, ouvrez les paquets de gel au-dessus d'un évier ou d'un récipient, videz l'excès de tampon et jetez le papier filtre et l'emballage plastique. Retirez le peigne d'entre les plaques en le poussant doucement vers le haut du bout des doigts. Décollez la bande de plastique qui recouvre la base du gel, comme indiqué sur la cassette du gel. Assurez-vous que la section entière de la bande est retirée complètement, afin de permettre à toute la longueur du fond du gel d'être exposée au courant électrique. Pour de meilleurs résultats, utilisez une pipette de transfert et un tampon de migration TBE 1x pour rincer les débris des puits. **Note :** Les gels TBE Mini-PROTEAN utilisés pour l'électrophorèse de l'ADN dans ce laboratoire sont différents des gels contenant 15 % de SDS utilisés pour l'électrophorèse des protéines par SDS-PAGE et les deux types ne doivent pas être substitués l'un à l'autre.

Remarque : les instructeurs peuvent choisir d'assembler les boîtes de gel jusqu'à une heure avant le laboratoire.

Préparer les chambres d'électrophorèse Mini-PROTEAN Tetra Cell

1. **Colorant de migration TBE 1x.** Une cellule Mini-PROTEAN Tetra Cell avec deux gels nécessite 700 ml de tampon de migration TBE 1x. Une cellule Mini-PROTEAN Tetra Cell utilisant le module d'exécution compagnon pour exécuter quatre gels nécessite 1,1 L de tampon de migration TBE 1x. Pour obtenir 3 L de tampon de migration TBE 1x, mélangez 300 ml de TBE 10x avec 2 700 ml d'eau distillée. Conserver à température ambiante.

Note : vous pouvez préparer 1 à 2 litres de tampon TBE 1x supplémentaire au cas où vos boîtes de gel fuient après l'assemblage. Si vous avez une fuite, la chambre extérieure de la boîte de gel peut être remplie jusqu'au-dessus des petites plaques intérieures pour égaliser les niveaux de tampon dans les deux réservoirs. Cela nécessite environ 1 200 ml de tampon TBE x1 par boîte de gel et constitue une solution plus pratique que de réassembler l'appareil au milieu de la leçon.

2. Suivez l'annexe G pour des instructions détaillées sur l'assemblage de l'appareil.

Chargement et migration des gels de polyacrylamide

1. Si disponible, placer un guide de chargement d'échantillon sur le dessus de l'assemblage d'électrode. Le guide dirigera l'embout de la pipette vers la position correcte pour charger chaque échantillon dans un puits.
2. Utiliser les embouts Prot/Elec pour charger les échantillons dans les puits. Ces embouts très étroits peuvent s'insérer entre les deux plaques de gel et livrer les échantillons directement dans les puits. Si les embouts Prot/Elec ou des embouts similaires ne sont pas disponibles, tenir l'embout directement au-dessus du puit et entre les deux plaques de gel, et laisser l'échantillon tomber doucement dans le puits.
3. Après le chargement, soumettre les gels de polyacrylamide à 200 V pendant 30 minutes. Il est acceptable que le front du colorant orange migre vers l'extérieur, mais arrêter l'électrophorèse si le colorant rouge arrive à 2 cm du fond du gel.
4. Lorsque les gels sont complétés, couper l'alimentation électrique et débrancher les fils. Retirer le couvercle et soulever l'ensemble des électrodes et le cadre de serrage.
5. Vider le tampon de migration de l'ensemble d'électrodes. Ouvrir les pinces et retirer les cassettes de gel.
6. Pour éviter que le gel ne soit contaminé par le bout de vos doigts, porter des gants pour manipuler les gels à partir de ce point. Poser une cassette de gel à plat sur l'établi, la plaque courte vers le haut. Séparer délicatement les plaques de gel à l'aide de la clé d'ouverture de gel fournie avec les gels. Le gel adhère généralement à l'une des plaques. Transférer la plaque avec le gel qui y adhère sur un plateau contenant le colorant Fast Blast 1x (voir ci-dessous), en laissant le liquide détacher le gel de la plaque. Le gel peut également être soulevé directement (très doucement !) de la plaque et placé dans le colorant.

Préparation pour la coloration des gels d'acrylamide

La coloration d'ADN Fast Blast est fournie sous forme de concentré 500x qui doit être dilué à 1x avant son utilisation et colore l'ADN dans le polyacrylamide en 30 minutes environ. Il s'agit d'une alternative pratique, sûre et non toxique au bromure d'éthidium pour la détection de l'ADN. Le Fast Blast contient un composé cationique qui appartient à la famille des colorants avec thiazine. Les molécules de colorant chargées positivement sont attirées et se lient aux groupes phosphates chargés négativement de l'ADN. La formule exclusive du colorant colore l'ADN en bleu foncé dans les gels d'acrylamide et fournit des résultats clairs et cohérents. Des instructions détaillées sur l'utilisation de Fast Blast sont incluses dans le manuel de l'étudiant.

AVERTISSEMENT

Bien que la coloration d'ADN Fast Blast soit non toxique et non cancérigène, il convient de porter des gants en latex ou en vinyle pour manipuler la coloration ou les gels colorés afin d'éviter que les mains ne deviennent bleues. Il faut porter des blouses de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour éviter de tacher les vêtements. Jetez les solutions de coloration conformément aux protocoles en vigueur dans votre établissement. Utilisez une solution d'eau de Javel à 10 % ou une solution d'alcool à 70 % pour éliminer le Fast Blast de la plupart des surfaces. Vérifiez que ces solutions n'endommagent pas la surface avant de les utiliser.

Préparation du protocole de coloration

Pour préparer la coloration 1x, diluez 1 ml de Fast Blast 500x avec 499 ml d'eau distillée ou désionisée dans un flacon ou une bouteille de taille appropriée, et mélangez. Couvrez le flacon et conservez-le à température ambiante jusqu'au moment de l'utiliser.

Leçon 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 des cahiers de laboratoire ; voir ci-dessous et le manuel de l'étudiant pour les protocoles sur ces deux méthodes de séchage.

Pour documenter les gels humides, on peut les numériser, les photocopier (un support jaune assure un contraste optimal) ou les tracer sur un film acétate. Remarque : les gels d'agarose à 3 % n'adhèrent pas bien au film support de gel d'agarose.

Méthode de séchage GelAir^{MC} :

Matériel (nécessaire pour le séchage de 8 gels avec utilisation du système de séchage du gel [No. cat. 165— 1771EDU])	Quantité
Cellophane GelAir (No. cat. 165-1779 EDU)	4 feuilles
Table d'assemblage GelAir (No. cat. 165-1776 EDU)	1
Cadres de séchage GelAir (No. cat. 165-1775 EDU)	2
Pinces GelAir (No. cat. 165-1780 EDU)	16
Four de séchage GelAir (optionnel) (No. cat. 165-1777 EDU)	1
Eau distillée	500 ml

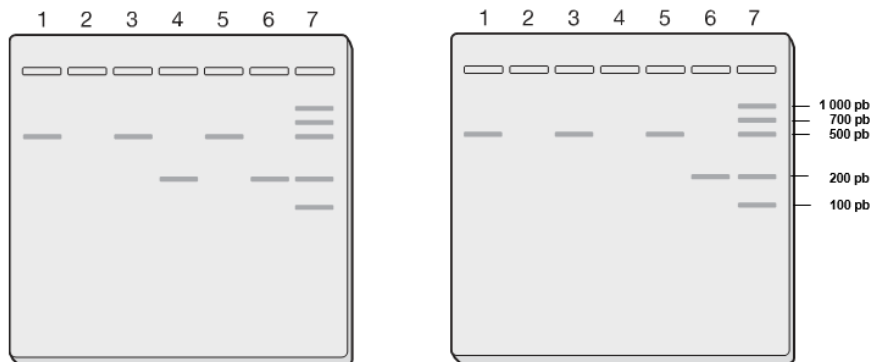
Vous pouvez également utiliser la méthode du sandwich en cellophane et du récipient en plastique :

Matériel (nécessaire pour le séchage de 8 gels à l'aide de récipients en plastique)	Quantité
Cellophane GelAir (No. Cat. 165-1779 EDU)	16 feuilles
Récipient en plastique	8
Élastique	16
Eau distillée	500 ml

Procédure

1. Préhumecter 2 feuilles de cellophane dans un récipient d'eau pendant 15 à 20 secondes.
2. Placer une feuille de cellophane sur un récipient en plastique. Tendre la feuille de cellophane de manière à former une surface plane sur le dessus du récipient et utiliser un élastique pour la maintenir en place.
3. Placer un gel sur la cellophane. L'inondation de la surface de la cellophane autour du gel avec de l'eau permettra d'éliminer les bulles.
4. Placer la deuxième feuille de cellophane mouillée sur le gel. En raison de leur épaisseur, vous ne pouvez pas éviter les bulles sur les bords des gels d'agarose, mais éviter les bulles entre la cellophane et la face du gel. Fixer la deuxième feuille de cellophane à la boîte avec un deuxième élastique.
5. Laisser le gel sécher pendant plusieurs jours dans un endroit bien ventilé.
6. Le contraste sur les gels d'agarose peut être amélioré en décollant la cellophane une fois que les gels d'agarose ont séché. Ceci n'est pas possible avec les gels de polyacrylamide.

Résultats typiques d'une salle de classe



Résultat pour les aliments positifs aux OGM

Résultat pour les aliments sans OGM

La présence ou l'absence d'une bande de 200 pb dans le couloir 5 indique si l'aliment testé contient ou non des OGM. Cependant, la validité de ce résultat dépend des résultats des autres réactions PCR. Les amorces végétales déterminent si l'ADN végétal a été extrait avec succès de l'échantillon. L'aliment témoin non-OGM est un indicateur des résultats faussement positifs, s'ils se produisent. Si le témoin alimentaire non-OGM est positif aux OGM (avec une bande dans le couloir 2), cela signifie que la PCR a été contaminée à un moment donné au cours du traitement. Si votre aliment testé est également positif aux OGM, vous ne pouvez pas vous fier à ce résultat. Le contrôle du modèle positif aux OGM est un indicateur de faux négatifs. Si le modèle de contrôle positif aux OGM ne s'amplifie pas, il y a un problème avec la réaction PCR et vous ne pouvez pas vous fier à un résultat négatif aux OGM de votre aliment testé. L'organigramme de la page suivante montre comment évaluer ces contrôles, étape par étape.

Échantillon PCR	Taille de la bande
Couloir 1 : Aliment non-OGM avec amorces végétales	455 pb
Couloir 2 : Aliments non-OGM avec amorces OGM	Aucune bande
Couloir 3 : Aliment testé avec amorces végétales	455 pb
Couloir 4 : Aliment testé avec des amorces OGM	200 pb ou aucune bande
Couloir 5 : Modèle OGM-positif avec amorces végétales	455 pb
Couloir 6 : Modèle OGM-positif avec amorces OGM	200 pb
Couloir 7 : Règle de poids moléculaire de la PCR	1000, 700, 500, 200, 100 pb

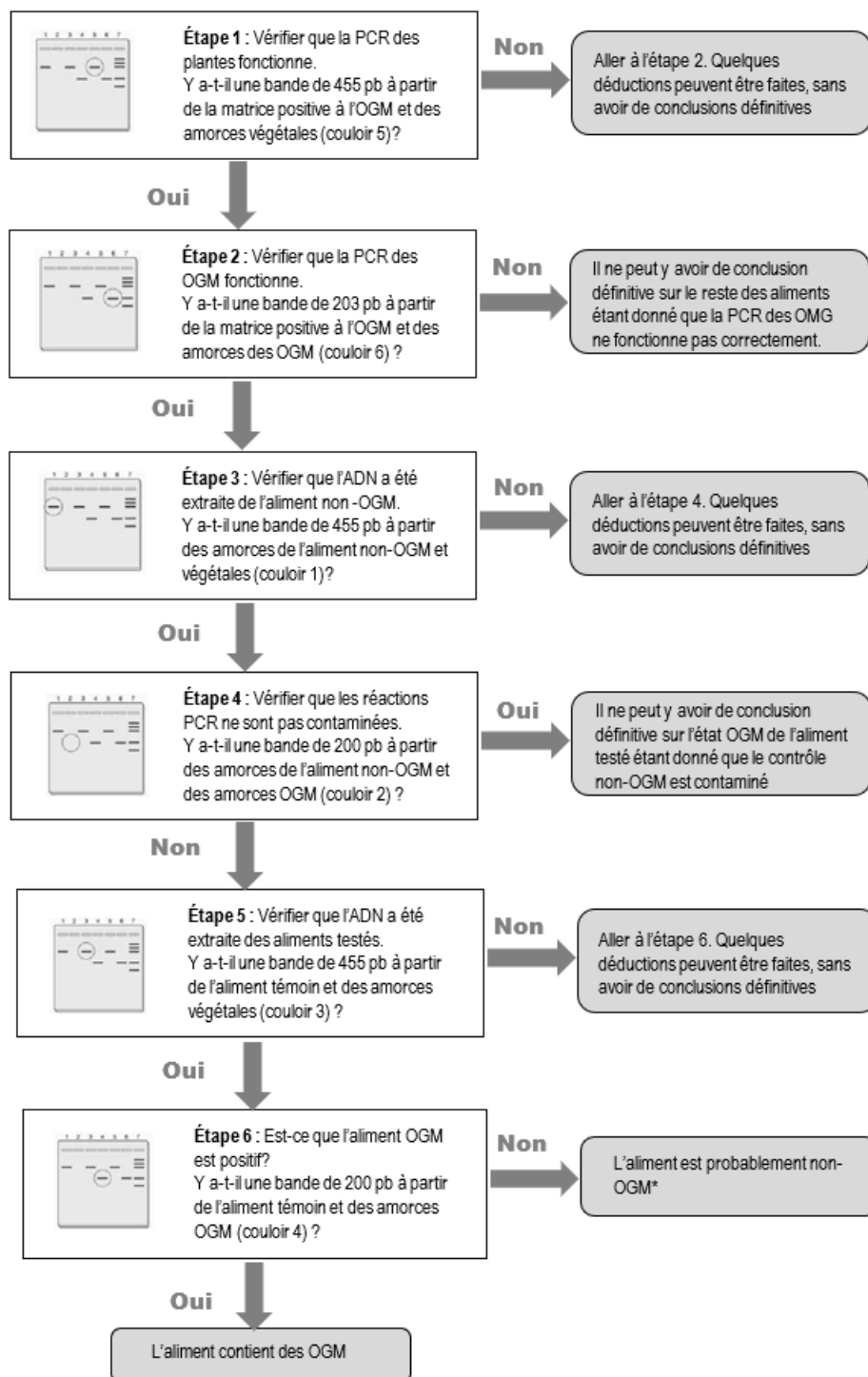


Fig. 4. Guide étape par étape de l'analyse des résultats.

* Remarque : ce kit détecte environ 85 % des aliments génétiquement modifiés. Vous ne pouvez donc pas conclure définitivement qu'un aliment est non-OGM.

Conseils et questions fréquemment posées

Leçon 1 : Extraction d'ADN à partir d'échantillons alimentaires

Aliment témoin certifié sans OGM par Bio-Rad :

- Moudre des grains entiers prend un certain temps, mais une mouture totale n'est pas nécessaire. Vous constaterez que l'eau aidera à ramollir les grains et à faciliter le broyage.
- Il est important de traiter d'abord l'échantillon certifié non-OGM de Bio-Rad, car la PCR est très sensible et tout ADN positif aux OGM peut contaminer votre équipement.
- Pour réduire le risque de contamination ou pour gagner du temps, vous pouvez préparer cet échantillon et demander à vos étudiants de préparer uniquement leurs échantillons de test.

Quels aliments dois-je choisir pour le laboratoire ?

Bien que chaque groupe puisse étudier la modification génétique d'un aliment différent, il est conseillé de demander à plusieurs équipes d'étudiants de tester chaque échantillon afin de valider les résultats des autres. La méthode d'extraction utilisée dans ce kit peut ne pas réussir à générer de l'ADN matrice à partir de tous les aliments. En outre, l'amplification diffère selon les aliments. Le tableau ci-dessous résume les aliments qui génèrent une matrice d'ADN pouvant être amplifiée avec des amorces végétales. **Note** : il ne s'agit pas d'une liste d'aliments contenant des modifications génétiques.

L'objectif de cette activité est de stimuler l'intérêt des étudiants pour le rôle que jouent les biotechnologies dans leur vie quotidienne. Bien que cette activité ne nécessite pas que l'aliment testé soit génétiquement modifié, voici quelques conseils pour vous aider à trouver des aliments génétiquement modifiés dans votre épicerie :

- Éviter d'utiliser du maïs ou du soja frais — aux États-Unis, il est rare de trouver du maïs ou du soja frais qui soit génétiquement modifié.
- Tester les aliments non biologiques — les aliments biologiques ne sont généralement pas génétiquement modifiés
- Utiliser des aliments transformés tels que les friandises de maïs soufflé au fromage, qui utilisent fréquemment du maïs génétiquement modifié.
- Tester les produits carnés bon marché, qui utilisent souvent le soja comme matière de remplissage et sont souvent de bons candidats pour les protéines de soja génétiquement modifiées.

Note : l'Europe et le Japon ont des réglementations beaucoup plus strictes que les États-Unis en matière d'OGM, il est très difficile de trouver des aliments génétiquement modifiés dans ces régions.

Tableau des aliments qui génèrent de manière fiable la matrice d'ADN pouvant être amplifié avec des amorces végétales.

Très fiable	Fiable	Moins fiable	Très difficile/pas du tout possible
Maïs frais	Saucisses végétales	Végé-burgers	Huile
Papaye fraîche	Croustilles de tortilla	Friandises au maïs frit	Vinaigrette
Mélanges pour pain/gâteau de maïs	Croustilles de tortilla aromatisées	Maïs soufflé	Céréales (ex. flocons de maïs)
Farine de soja	Friandises au maïs soufflé	Patates frites	Farine de blé
	Boulettes de viande ou burgers contenant de la protéine soja	Croustilles aux patates	
	Liquides/poudres contenant de la protéine soja		

Prévenir la contamination

Une partie de ce laboratoire consiste à rechercher un résultat négatif (c'est-à-dire que l'ADN extrait de votre aliment témoin non-OGM n'est pas amplifié avec des amorces OGM). Si cet échantillon est contaminé par de l'ADN positif aux OGM, produisant une bande sur le gel, les résultats de l'ensemble du laboratoire ne seront pas concluants, car tous les échantillons pourraient également avoir été contaminés et vous ne pouvez pas vous fier à un résultat positif aux OGM pour vos échantillons alimentaires. Il est donc impératif que vous et vos étudiants preniez les mesures nécessaires pour éviter toute contamination.

N'oubliez pas que l'ADN peut se répandre en aérosol, s'introduire dans les tubes de pipette et flotter dans l'air. Pour réduire le risque de contamination, il convient de garder les tubes bouchés, sauf en cas d'utilisation immédiate, d'utiliser des embouts de pipette anti-aérosols à toutes les étapes du laboratoire, d'essuyer les zones de travail et l'équipement et de rincer les barils de pipettes avec de l'eau de Javel à 10 % (pour détruire l'ADN). Des directives détaillées sont données à l'annexe B.

La matrice InstaGene^{MC} : Quelle fonction remplit-elle ?

La matrice InstaGene consiste en une suspension de billes microscopiques chargées négativement qui fixent les cations bivalents tels que le magnésium (Mg^{2+}). Il est important d'éliminer les cations bivalents des échantillons d'ADN extraits, car les cations aident les enzymes qui dégradent la matrice d'ADN. Lorsque les cellules provenant d'une joue sont lysées et bouillies en présence de la matrice InstaGene, les cations bivalents libérés par les cellules se lient aux billes, et la chaleur inactive les enzymes dégradant l'ADN. Les billes sont sédimentées par centrifugation et le surnageant, qui contient de l'ADN génomique propre et intact, peut être utilisé comme matrice dans les réactions PCR.

Les billes de la matrice InstaGene forment un précipité rapidement hors de la suspension. Il est donc extrêmement important de bien mélanger le flacon de matrice avant de pipetter des aliquotes pour chaque poste de travail des étudiants, afin que les aliquotes contiennent des quantités équivalentes de billes.

Si les échantillons d'ADN ne sont pas destinés à être amplifiés dans les 24 heures, ils peuvent être conservés au réfrigérateur dans la matrice InstaGene pendant une semaine maximum. Pour un stockage plus long, placez les échantillons au congélateur pour éviter la dégradation de l'ADN. Avant que les échantillons ne soient utilisés pour la PCR, les billes doivent être se sédimentent par centrifugation juste avant de préparer les réactions de PCR.

Leçon 2 : Préparer les réactions PCR

Contamination

Encore une fois, il faut rappeler aux étudiants de se prémunir contre la contamination, d'utiliser de nouveaux embouts qui filtrent les aérosols à chaque étape, et de garder les tubes bouchés sauf s'ils y ajoutent immédiatement un réactif.

Dois-je retirer la matrice InstaGene avant la PCR ?

Il est extrêmement important de sédimenter complètement les billes InstaGene avant de retirer toute partie du lysat pour la réaction PCR. Les billes lient et éliminent les cations bivalents tels que le Mg^{2+} , qui est essentiel à la fonction de la Taq polymérase. Ainsi, si des billes sont transportées dans la réaction PCR, la réaction peut être inhibée. La matrice InstaGene peut être efficacement granulée par centrifugation (6 000 x g pendant 5 minutes). Lors du transfert des échantillons d'ADN InstaGene, retirez soigneusement 20 µl du surnageant au-dessus des billes (qui contient l'ADN génomique).

Master Mix : Qu'est-ce que c'est ?

Le Master Mix contient un mélange de nucléotides, ou dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), un tampon et de l'ADN polymérase Taq. Le Master Mix complet est préparé en ajoutant les amorces au Master Mix juste avant la période de laboratoire. Lorsque 20 µl de matrice d'ADN sont ajoutés à 20 µl de Master Mix complet, tous les composants nécessaires à une réaction PCR de 40 µl sont présents.

Remarque : Une fois le Master Mix et les amorces mélangés, le mélange complet doit être conservé sur de la glace et utilisé dans les 30 minutes à 1 heure. Ces réactifs sont extrêmement sensibles.

Pourquoi les amorces sont-ils rouges et verts ?

Les mélanges d'amorces contiennent des colorants compatibles avec la PCR qui permettent aux étudiants de visualiser et de distinguer facilement les différents Master Mix. Les colorants migrent également dans le gel, ce qui permet une démonstration visuelle de l'électrophorèse.

PCR dans un thermocycleur

L'amplification par PCR a lieu dans un thermocycleur qui effectue des cycles de chauffage et de refroidissement en alternance. Ce laboratoire utilise un cycle en trois étapes : l'ADN subit une dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, une renaturation à 59 °C pendant 1 minute et une élongation à 72 °C pendant 2 minutes. Ce cycle est répété 40 fois au cours de l'amplification par PCR. Pendant la dénaturation, les deux brins de la matrice d'ADN sont séparés pour permettre l'accès aux amorces de la PCR. Au cours de l'étape de renaturation, les amorces de la PCR reconnaissent et se lient à la matrice d'ADN. Une fois que les amorces sont liées, l'ADN polymérase Taq

étend les amorces pour répliquer le segment d'ADN pendant l'étape d'extension. La réaction PCR prend environ 3,5 heures pour se terminer.

Les tubes PCR sont très petits et doivent être manipulés avec précaution. Il est important de boucher soigneusement et complètement les tubes avant de les placer dans le thermocycleur. Si les tubes ne sont pas complètement fermés, une évaporation importante peut avoir lieu, et l'amplification PCR sera inhibée. Les thermocycleurs Bio-Rad ont été conçus pour fonctionner sans huile. L'huile n'est pas nécessaire dans les puits du bloc thermique ou dans les tubes d'échantillon. Les puits d'échantillon sont formés pour fournir un contact uniforme avec la plupart des tubes PCR standard de 200 µl à paroi mince. **N'utilisez pas de microtubes à paroi mince de 500 µl avec ces thermocycleurs.** Le couvercle du bloc d'échantillons chauffé maintient une température plus élevée que le bloc d'échantillons à tout moment pendant un programme de thermocyclage. Cela empêche la vapeur d'eau de se condenser sous le bouchon du tube d'échantillon, réduisant ainsi l'évaporation de l'échantillon et éliminant la nécessité de recouvrir les tubes d'huile.

Quelle est la stabilité des réactions PCR nouvellement mises en place ?

Une incubation prolongée du Master Mix et de l'ADN génomique diminue l'efficacité de l'amplification. Ainsi, si vous souhaitez mettre deux classes attitrées à une machine PCR ou si vous avez plus de réactions PCR que vous n'avez de place dans votre thermocycleur, nous vous suggérons d'incuber les réactions sur la glace pendant une heure maximum avant le cyclage.

PCR manuelle

Il est possible d'effectuer une PCR manuelle sans thermocycleur automatisé, mais la PCR ne sera pas aussi efficace. Pour l'amplification PCR manuelle, les réactions doivent être effectuées dans des tubes à bouchon à vis et complétées par une goutte d'huile minérale pour éviter l'évaporation. Les tubes sont placés dans un bloc thermique ou un bain-marie réglé à 95 °C pendant 1 minute, puis transférés manuellement dans un bloc thermique ou un bain-marie réglé à 59 °C pendant 1 minute, et enfin transférés dans un bloc thermique ou un bain-marie réglé à 72 °C pendant 2 minutes. Quarante cycles de PCR manuelle devraient prendre environ 3 heures. C'est fastidieux, mais ça marche. Bonne chance !

Leçon 3 Électrophorèse des produits de la PCR

Électrophorèse en 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 PCR généré à partir du gène du photosystème II est de 455 pb. La résolution des bandes de cette taille nécessite un gel d'agarose à 3 % ou un gel de polyacrylamide à 10 %. Les deux techniques de gel donnent d'excellents résultats. Votre choix de technique de gel dépendra de l'équipement dont vous disposez et des techniques que vous souhaitez enseigner à vos étudiants. Les gels de polyacrylamide sont beaucoup plus fragiles que les gels d'agarose à 3 % et peuvent donc ne convenir qu'aux étudiants plus expérimentés. Cependant, les gels de polyacrylamide déchiffrent les bandes dans une plus grande mesure, ce qui peut permettre de séparer les bandes d'ADN de taille similaire générées par un aliment testé qui contient à la fois le promoteur CaMV 35S (203 pb) et le terminateur NOS (225 pb), comme la papaye génétiquement modifiée.

Reportez-vous à la page 4 pour connaître les accessoires dont vous aurez besoin selon que vous choisissiez l'électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide.

Colorant de chargement Orange G

Avant l'électrophorèse des échantillons amplifiés, les élèves doivent ajouter 10 µl de colorant de chargement Orange G 5x à chacun de leurs tubes PCR. Le colorant de chargement contient du glycérol, qui augmente la densité de l'échantillon et garantit qu'il s'enfonce dans le puit du gel d'agarose. En outre, le colorant de chargement contient un colorant appelé Orange G qui migre avec de l'ADN d'environ 50 pb dans un gel d'agarose à 3 % ou avec environ 20 pb dans un gel d'acrylamide à 10 %.

Migration des colorants

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

Gels de polyacrylamide — Le front du colorant orange peut migrer hors du gel de polyacrylamide. Le front rouge du colorant d'amorçage de l'OGM ne doit pas pouvoir migrer des gels de polyacrylamide.

En passant, les différents colorants utilisés pour colorer les amorces migrent à des vitesses différentes en raison des différences de charge, et ils fournissent une démonstration visible utile de l'électrophorèse.

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

Ce laboratoire a été optimisé pour être utilisé avec la coloration d'ADN Fast Blast, une coloration d'ADN non toxique et sûre. Le bromure d'éthidium (EtBr) est le colorant traditionnel utilisé pour visualiser l'ADN et est plus sensible que le Fast Blast. Il fonctionnera bien pour colorer les gels pour ce laboratoire. Cependant, l'EtBr est un mutagène connu et un agent cancérigène suspecté, et nécessite l'utilisation de lumière UV pour visualiser l'ADN. L'un des inconvénients de l'utilisation de l'EtBr est qu'en raison de sa plus grande sensibilité, les bandes d'amorces-dimères peuvent être plus visibles avec l'EtBr qu'avec le Fast Blast et peuvent perturber l'interprétation des résultats par des étudiants moins expérimentés. Si 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 des bandes amplifiées. Remarque : la coloration Fast Blast de l'ADN éteint la coloration EtBr, donc visualisez avec EtBr avant la coloration Fast Blast. Les gels de polyacrylamide doivent être colorés après l'électrophorèse. Colorer les gels dans 0,05 µg/ml d'EtBr et les décolorer dans l'eau au moins 2 fois pendant 20 minutes.

Leçon 4 : Analyse des résultats

Pourquoi les aliments étiquetés « sans OGM » ou « biologiques » sont-ils venus à être positifs aux OGM ?

Tout d'abord, vérifiez vos contrôles. Votre aliment témoin non-OGM est-il négatif pour les OGM ? Si la réponse est oui, il se peut que vous ayez encore une contamination dans ce seul échantillon, plutôt que dans toutes les réactions, et la meilleure façon de confirmer votre résultat est donc de répéter le test. Toutefois, il peut y avoir des OGM dans les aliments étiquetés « sans OGM ». Les pays ont des réglementations différentes en matière d'étiquetage des aliments. La plupart des pays autorisent l'étiquetage des aliments comme « non-OGM » (ou alternativement, non étiquetés comme « OGM ») lorsque le pourcentage de matériel dérivé d'OGM dans

l'aliment est inférieur au niveau légal (généralement 1-5 %). Le test PCR est suffisamment sensible pour détecter ces faibles niveaux. Des tests quantitatifs pour détecter le pourcentage d'OGM dans les aliments peuvent être réalisés par un laboratoire d'analyse des OGM en utilisant la PCR en temps réel.

Pourquoi mes contrôles non-OGM sont-ils positifs aux OGM ?

À un moment ou à un autre du processus, les échantillons ont été contaminés par de l'ADN positif d'OGM. Consultez l'annexe B pour connaître les moyens de se prémunir contre la contamination.

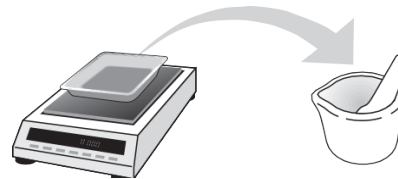
Pourquoi n'ai-je pas obtenu d'ADN végétal viable ?

Des erreurs peuvent avoir été commises lors de l'extraction de l'ADN, ce qui peut être vérifié en répétant le test. Cependant, certains aliments ne produisent pas d'ADN végétal amplifié par PCR. Ce kit a été optimisé pour tester les aliments à base de maïs, de soja et de papaye. Reportez-vous au tableau de la page 33 pour connaître les aliments fiables recommandés.

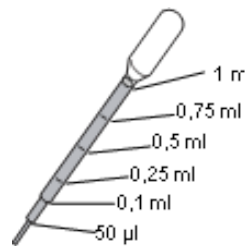
Guide rapide

Jour 1 : Extraction d'ADN à partir d'échantillons alimentaires

1. Trouver vos tubes à bouchons à vis et étiquetez un « non-OGM » et un « test »
2. Peser de 0,5 à 2 g d'aliments certifiés non — OGM et mettez-les dans le mortier



3. Ajouter 5 ml d'eau distillée pour chaque 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 autant de millilitres.

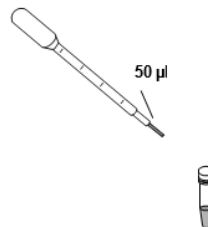


Masse de l'aliment = _____ g x 5 = _____ ml

4. Broyer avec le pilon pendant au moins 2 minutes pour former une bouillie.

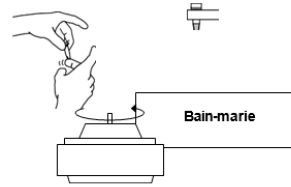


5. Ajouter encore 5 ml d'eau distillée pour chaque gramme d'aliment. Mélanger ou broyer encore avec le pilon jusqu'à ce que la bouillie soit suffisamment lisse pour être pipetée.



6. Pipetter 50 µl de bouillie sans le tube à bouchon à vis contenant 500 µl d'InstaGene étiqueté « non-OGM » en utilisant la marque de 50 µl sur une pipette graduée. Reboucher le tube.
7. Répéter les étapes 2 à 5 pour préparer l'échantillon alimentaire à tester.

8. Introduire à la pipette 50 μl de bouillie d'aliment test broyé dans le tube à bouchon à vis étiqueté « test ». Reboucher le tube.
9. Agiter ou donner des petits coups sur les tubes InstaGene de l'aliment non-OGM et de l'aliment testé et placer les tubes dans un bain -marie à 95 °C pendant 5 minutes.
10. Placer les tubes dans une centrifugeuse dans une conformation équilibrée et centrifuger pendant 5 min à la vitesse maximale.
11. Conserver les tubes au réfrigérateur jusqu'à la prochaine leçon.

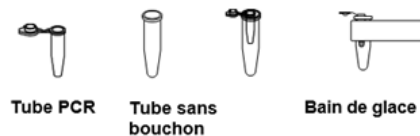


Jour 2 : Préparer les réactions PCR

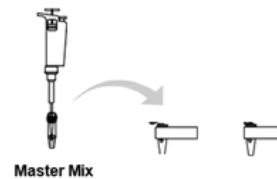
1. Numérototer les tubes PCR 1 à 6 et apposer vos initiales. Les numéros doivent correspondre au contenu des tubes suivants :

Tube numéro	Master Mix	ADN
1	20 μl MM plantes (vert)	20 μl d'ADN de l'aliment témoin non-OGM
2	20 μl MM OGM (rouge)	20 μl d'ADN de l'aliment témoin non-OGM
3	20 μl MM plantes (vert)	20 μl ADN de l'aliment testé
4	20 μl MM OGM (rouge)	20 μl ADN de l'aliment testé
5	20 μl Plantes MM (vert)	20 μl d'ADN de contrôle positif d'OGM
6	20 μl d'OGM MM (rouge)	20 μl d'ADN de contrôle positif d'OGM

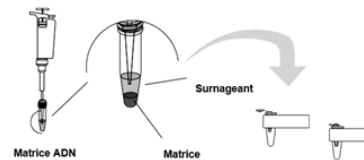
2. Placer chaque tube dans un adaptateur de microtube sans bouchon et placez-les dans le flotteur en mousse sur la glace.



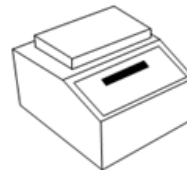
3. En se référant au tableau et en utilisant un nouvel embout pour chaque tube, ajouter 20 μ l du Master Mix indiqué à chaque tube de PCR, boucher les tubes



4. En se référant au tableau et en utilisant un nouvel embout pour chaque tube, ajouter 20 μ l de l'ADN indiqué dans chaque tube PCR, en veillant à éviter le culot InstaGene au fond des tubes. Mélanger en pipettant délicatement de haut en bas ; reboucher les tubes.

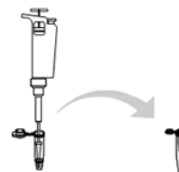


5. Lorsque demandé, placer les tubes de PCR dans le thermocycleur

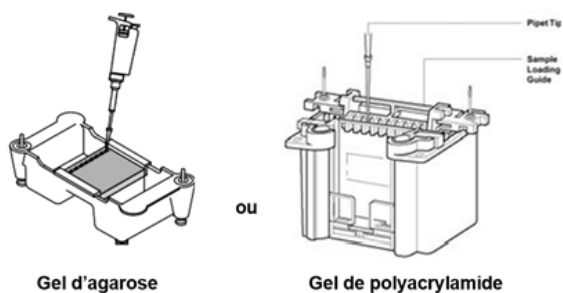


Jour 3 : Électrophorèse des produits PCR

1. Installer votre appareil d'électrophorèse pour gel selon les instructions
2. Retirer le tube PCR du thermocycleur et placez-le dans l'adaptateur à microtube sans bouchon. Faire tourner avec pulsation le tube pour environ 3 secondes.
3. Utilisant à chaque fois un nouvel embout, ajouter 10 μ l de colorant de chargement Orange G (CO) dans chaque échantillon et bien mélanger

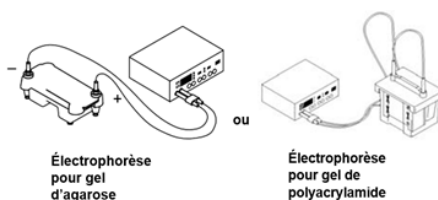


4. Charger 20 μ l de la règle de poids moléculaire et 20 μ l de chaque échantillon au gel dans l'ordre indiqué ci-dessous :



Ligne	Échantillon	Volume de chargement
1	Échantillon 1 : Aliment témoin non-OGM avec amorces de plantes	20 μ l
2	Échantillon 2 : Aliment témoin non-OGM avec amorces OGM	20 μ l
3	Échantillon 3 : Aliment testé avec amorces de plantes	20 μ l
4	Échantillon 4 : Aliment testé avec amorces OGM	20 μ l
5	Échantillon 5 : ADN positif à OGM avec amorces de plantes	20 μ l
6	Échantillon 6 : ADN positif à OGM avec amorces OGM	20 μ l

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



6. Colorer dans le colorant Fast Blast. Référez aux instructions spécifiques selon le type de gel utilisé.



Manuel de l'étudiant

Contexte fondamental

Avec l'explosion de la population mondiale et la disparition des terres cultivables, les spécialistes de l'agriculture s'inquiètent de la capacité du monde à produire suffisamment de nourriture pour alimenter la population croissante. Les écologistes s'inquiètent de la surutilisation des pesticides et des herbicides et des effets à long terme de ces produits chimiques sur l'environnement et la santé humaine. Pourrait-il y avoir une solution à ces deux problèmes ? L'industrie de la biotechnologie le pense. Ses partisans pensent que les organismes génétiquement modifiés (OGM), en particulier les cultures de plantes génétiquement modifiées (GM), peuvent résoudre ces deux problèmes. Cette solution proposée a toutefois rencontré une forte opposition dans le monde entier. Qualifiés de « frankenfoods » par les opposants et soumis à des restrictions dans la plupart des pays européens, les OGM sont largement produits et vendus aux États-Unis. Actuellement, aux États-Unis, les aliments qui contiennent des OGM n'ont pas à être étiquetés comme tels.

La manipulation génétique des plantes cultivées n'est pas nouvelle. Les agriculteurs modifient génétiquement les cultures depuis des siècles et la sélection des cultures pour encourager des caractéristiques spécifiques, telles qu'un rendement élevé, constitue encore aujourd'hui une part importante de l'agriculture. Cependant, il est désormais possible d'introduire directement dans les plantes cultivées des gènes permettant d'obtenir certaines caractéristiques. Ces gènes n'ont pas à provenir nécessairement de la même espèce — en fait, ils peuvent ne pas nécessairement provenir de plantes du tout. Une catégorie populaire de cultures GM a un gène de la bactérie du sol *Bacillus thuringiensis* (Bt) inséré dans leurs génomes. Les cultures Bt produisent une protéine appelée delta — endotoxine qui est mortelle pour la pyrale du maïs européenne, un parasite commun des plants de maïs. Les agriculteurs qui plantent des cultures Bt n'ont pas besoin d'appliquer de pesticides, car les plantes produisent la protéine toxique à l'intérieur de leurs cellules. Lorsque la pyrale du maïs se nourrit de la plante génétiquement modifiée, elle meurt. Parmi les autres OGM, on trouve ceux qui sont résistants aux herbicides avec une maturation retardée des fruits, qui sont résistants aux champignons ou à la sécheresse, qui ont un rendement accru ou qui portent des fruits améliorés.

De nombreuses personnes s'opposent à l'utilisation de plantes cultivées génétiquement modifiées. Ils font valoir que la pollinisation croisée avec des cultures résistantes aux herbicides risque de créer de super mauvaises herbes ou que des super microbes qui évoluent en étant plus résistants aux toxines de ces cultures résistantes aux bioagresseurs. Nombreux sont ceux qui s'inquiètent des réactions allergiques potentielles aux nouvelles protéines ou de la résistance aux antibiotiques résultante des marqueurs sélectifs utilisés pour développer les cultures ou d'autres effets imprévus sur la santé publique. Les partisans des aliments génétiquement modifiés affirment que ces cultures sont en fait meilleures pour l'environnement. Moins de produits chimiques toxiques sont déployés dans l'environnement et donc moins de produits chimiques toxiques peuvent nuire à l'environnement et à la santé humaine. En outre, ces cultures peuvent préserver les terres arables en réduisant le stress subi, améliorer la valeur nutritionnelle des aliments dans les pays en développement et permettre la culture de plantes sur des terres auparavant non cultivables.

Quelle que soit la position que l'on adopte dans le débat sur les OGM, il serait bénéfique de pouvoir tester les aliments que l'on trouve dans les épiceries pour détecter la présence de produits dérivés d'OGM. Cela peut se faire de plusieurs manières. L'une d'entre elles consiste à utiliser un test à base d'anticorps tel que le test immuno-enzymatique (ELISA), qui peut détecter les protéines produites spécifiquement par les cultures génétiquement modifiées. Cependant, le test ELISA n'est pas utile pour tester les aliments qui ont été fortement transformés, car les protéines ont très probablement été détruites et différents aliments génétiquement modifiés produisent différentes protéines. Une autre méthode consiste à utiliser la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour rechercher une séquence d'ADN commune aux aliments génétiquement modifiés. L'ADN est plus résistant que les protéines à la transformation et peut être extrait d'aliments même hautement transformés. Ce sont ces séquences d'ADN provenant d'OGM que nous allons rechercher dans ce laboratoire.

Dans la première leçon, vous extrairez l'ADN génomique d'échantillons alimentaires, dans le deuxième laboratoire, vous effectuerez des réactions PCR pour amplifier les séquences d'OGM et de plantes naturelles à partir de l'ADN, et dans le troisième laboratoire, vous soumettrez à l'électrophorèse les échantillons amplifiés pour visualiser l'ADN.

Voyons si votre aliment préféré contient des OGM !

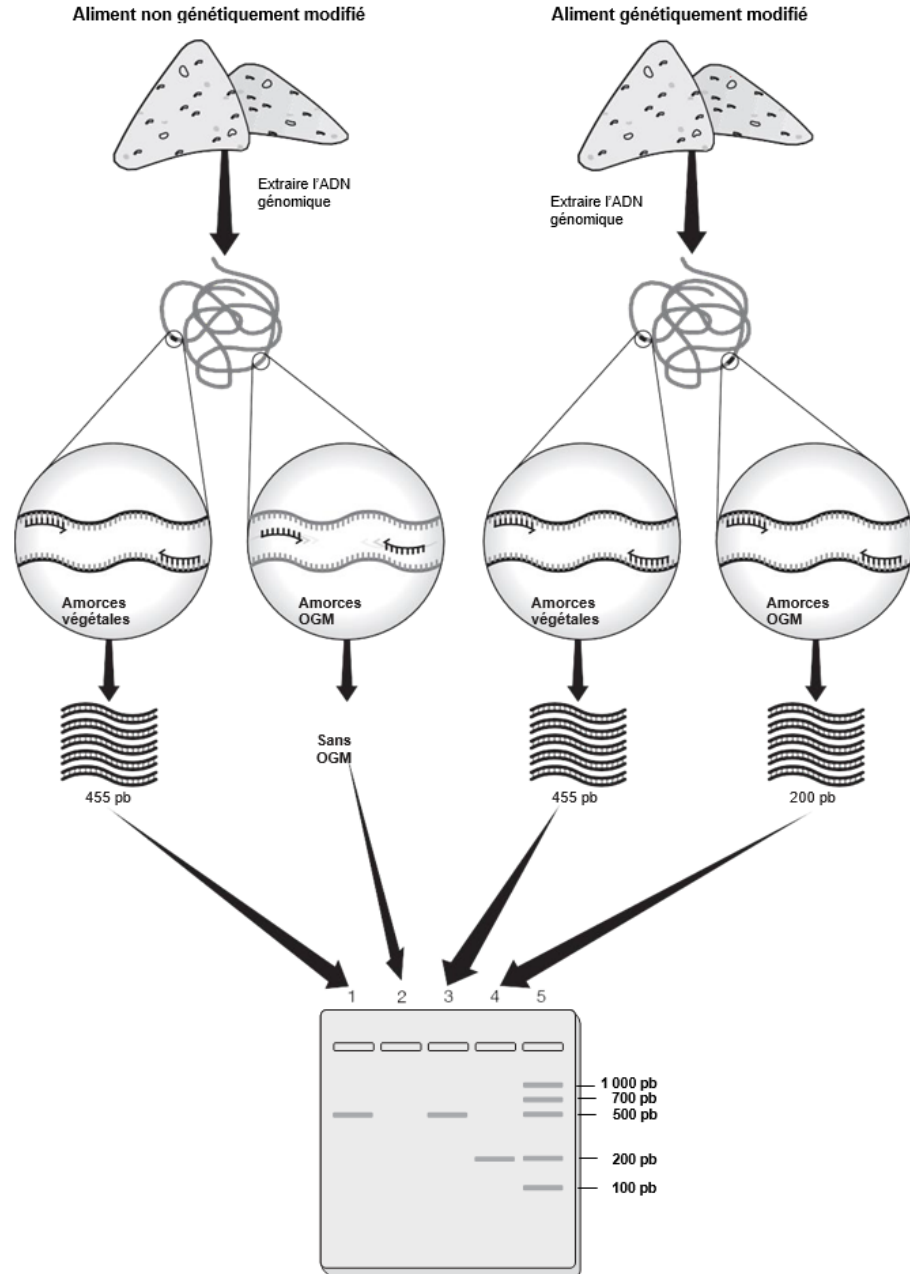


Fig. 5. Détection d'aliments génétiquement modifiés par PCR. L'ADN génomique est extrait des aliments testés (leçon 1), puis deux réactions PCR sont réalisées sur chaque échantillon de l'ADN génomique provenant d'un aliment testé (leçon 2). L'une des réactions PCR utilise des amorces spécifiques à un gène végétal commun (amorces végétales) pour vérifier que de l'ADN viable a été extrait avec succès de l'aliment. Que l'aliment soit génétiquement modifié ou non, cette réaction PCR devrait toujours amplifier l'ADN (voir les voies 1 et 3 du gel ci-dessus). L'autre réaction PCR utilise des amorces spécifiques aux séquences couramment trouvées dans les cultures GM (amorces OGM). Cette réaction PCR n'amplifiera l'ADN que si l'aliment testé est génétiquement modifié (voir le couloir 4). Si l'aliment testé n'est pas génétiquement modifié, les amorces OGM ne seront complémentaires d'aucune séquence de l'ADN génomique de l'aliment testé et ne s'apparieront pas et aucun ADN ne sera amplifié (voir le couloir 2). Pour savoir si l'ADN a été amplifié ou non, les produits de la PCR sont soumis à une électrophorèse sur un gel et colorés pour visualiser l'ADN sous forme de bandes (leçon 3). Une règle de poids moléculaire (voie 5) est soumise à une électrophorèse avec les échantillons afin de déterminer la taille des bandes d'ADN.

Leçon 1 : Extraction de l'ADN à partir d'échantillons alimentaires

Dans cette leçon, vous allez extraire l'ADN d'un aliment témoin non-OGM et d'un aliment de supermarché que vous allez tester afin de détecter la présence d'OGM. Les aliments les plus couramment modifiés sont à base de maïs et de soja. L'aliment testé peut donc être du maïs ou du soja frais, ou un aliment préparé ou transformé tel que de la semoule de maïs, des bâtonnets au fromage, des saucisses végétales, etc. Vous traiterez d'abord le contrôle sans OGM.

Vous allez d'abord peser votre échantillon alimentaire, puis le broyer avec de l'eau pour obtenir une bouillie. Vous ajouterez ensuite une petite quantité de cette bouillie à un tube à bouchon à vis contenant la matrice InstaGene et le ferez bouillir pendant 5 minutes.

Le contenu cellulaire que vous libérez de l'échantillon broyé contient des enzymes (ADNases) qui peuvent dégrader l'ADN que vous tentez d'extraire. La matrice InstaGene est composée de billes microscopiques chargées négativement qui « chélatent » ou retiennent les ions métalliques de la solution. Elle chélate les ions métalliques tels que le Mg^{2+} , qui est nécessaire comme cofacteur dans les réactions enzymatiques. Lorsque l'ADN est libéré de votre échantillon en présence de la matrice InstaGene, les billes chargées capturent le Mg^{2+} et le rendent indisponible pour les enzymes qui dégraderaient l'ADN que vous essayez d'extraire. Cela vous permet d'extraire l'ADN sans le dégrader. L'ébullition des échantillons détruit ces enzymes.

Après avoir centrifugé les échantillons pour sédimenter la matrice InstaGene et les débris, le surnageant contient de l'ADN extrait intact. Cet ADN extrait sera utilisé dans le laboratoire suivant comme votre ADN cible.

Leçon 1 : Extraction de l'ADN à partir d'échantillons alimentaires

Questions thématiques

1. Comment tester un aliment pour savoir s'il contient du matériel dérivé d'un organisme génétiquement modifié (OGM) ?

2. Dans quelles organelles se situe l'ADN des plantes ?

3. De nombreux aliments contenant des cultures génétiquement modifiées sont hautement transformés. Pouvez-vous suggérer comment l'ADN de plantes entières peut différer de celui extrait d'aliments transformés, par exemple des croustilles de maïs, de la semoule de maïs, etc.

4. Quelles sont les molécules présentes dans la cellule qui pourraient interférer avec l'extraction de l'ADN ?

5. Pourquoi effectuer également des analyses sur des aliments dont on sait qu'ils ne contiennent pas d'OGM ?

6. Pourquoi l'aliment témoin non-OGM a-t-il été préparé avant votre échantillon alimentaire testé ?

Protocole de l'élève – Leçon 1

Le matériel et fourniture nécessaires au poste de travail avant de commencer cet exercice sont énumérés ci-dessous.

Poste de travail des étudiants

Matériel	Quantité
Tube à bouchon vissé avec 500 µl de matrice InstaGene	2
Bécher d'eau distillée	1
Échantillons alimentaires	1 ou 2
Pipettes de transfert en plastique jetables (PTPJ)	2
Micropipette de 2-20 µl (si vous préparez un aliment témoin non-OGM)	1
Embouts de pipette 2-20 µl, barrière anti-aérosols	1 portoir
Mortier et pilon	1
Stylo de marquage	1

Poste de travail commun

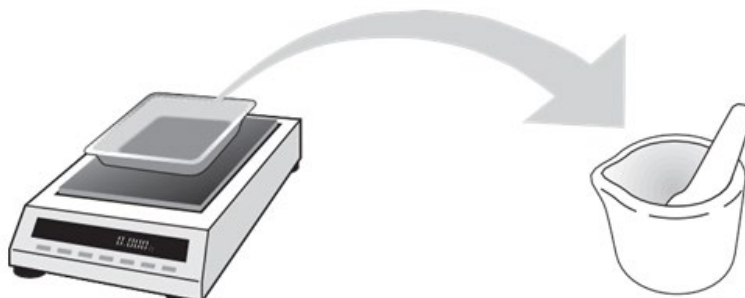
Matériel	Quantité
Bain-marie réglé de 95 à 100 °C	1
Microcentrifugeuse ou mini-centrifugeuse	3-4
Balance et coupelle de pesée	1

Protocole

Note : TOUJOURS traiter le témoin non-OGM avant l'échantillon d'essai afin de réduire le risque de contamination.

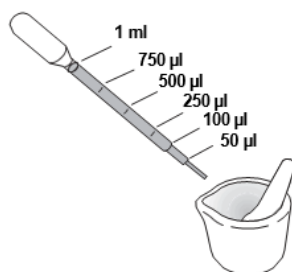
1. **Broyer des aliments témoins non-OGM** (votre instructeur peut effectuer cette étape pour vous)
2. Trouver vos tubes à bouchon à vis contenant 500 µl de matrice InstaGene et en étiqueter un « non-OGM » et un autre « test ».

3. Peser 0,5 à 2 g de l'aliment témoin certifié non-OGM et le placer dans le mortier.

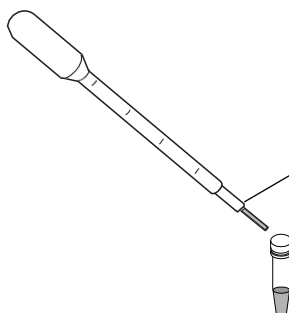


4. À l'aide de la pipette de transfert, ajouter 5 ml d'eau distillée pour chaque gramme d'aliment en utilisant les graduations de la pipette de transfert. Pour calculer le volume d'eau dont vous avez besoin, multiplier la masse en grammes de l'aliment pesé par 5 et ajouter ce nombre en millimètres.

Masse de l'aliment = _____ g x 5 = _____ ml



5. Broyer avec le pilon pendant au moins 2 minutes jusqu'à ce qu'une bouillie soit formée.
6. Ajouter encore 5 ml d'eau distillée pour chaque gramme d'aliment. Mélanger ou broyer encore avec le pilon jusqu'à ce que la bouillie soit suffisamment lisse pour être pipetée.
7. Ajouter **50 µl** de bouillie au tube à bouchon à vis contenant 500 µl de matrice InstaGene étiquetée « non-OGM » à l'aide d'une pipette de transfert



8. Reboucher le tube et bien agiter



9. Laver le mortier avec un détergent et le sécher.

Broyer les aliments testés

1. **Peser 0,5 à 2 g de l'aliment à tester et le placer dans le mortier.**
2. À l'aide de la pipette de transfert, ajouter 5 ml d'eau distillée pour chaque gramme d'aliment en utilisant les graduations de la pipette de transfert. Pour calculer le volume d'eau dont vous avez besoin, multiplier la masse en grammes de l'aliment pesé par 5 et ajouter ce nombre en millimètres.
Masse de l'aliment = _____ g x 5 = _____ ml
3. Broyer avec le pilon pendant au moins 2 min jusqu'à ce qu'une bouillie soit formée.
4. Ajouter encore 5 ml d'eau distillée pour chaque gramme d'aliment et mélanger ou broyer encore avec le pilon jusqu'à ce que la bouillie soit suffisamment lisse pour être pipetée.
5. Ajouter **50 µl** de bouillie dans le tube à bouchon à vis étiqueté « test » en utilisant la marque de 50 µl sur une pipette de transfert.
6. Reboucher le tube et bien agiter.

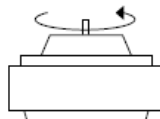
Traiter les échantillons afin d'en extraire l'ADN

1. Placer les tubes de l'aliment témoin non-OMG et de l'échantillon d'aliment testé dans un bain-marie à 95 °C pendant 5 minutes.



Bain-marie

2. Placer les tubes dans une centrifugeuse avec une configuration balancée et tourner pour 5 minutes à vitesse maximum.



3. Conserver les tubes au réfrigérateur jusqu'à la prochaine leçon.

Leçon 2 : Préparer les réactions PCR

Dans le dernier laboratoire, vous avez extrait l'ADN d'un échantillon d'aliment certifié non-OGM et d'un échantillon d'aliment à tester que vous analysez afin de détecter la présence de séquences d'ADN provenant d'OGM. Dans ce laboratoire, vous allez préparer ces deux échantillons et un témoin positif (matrice d'ADN positif aux OGM) pour la réaction en chaîne par polymérase (PCR).

La PCR est la réplication de l'ADN dans un tube à essai. La PCR vous permet d'amplifier des sections spécifiques d'ADN et de faire des millions de copies de la séquence ciblée. Votre expérience consiste à déterminer si l'ADN que vous avez extrait des aliments dans la leçon 1 contient ou non les séquences cibles d'intérêt que l'on trouve typiquement dans les aliments génétiquement modifiés (GM).

Révision de la PCR

La PCR est un outil si puissant en raison de sa simplicité et de sa spécificité. Tout ce qu'elle requiert est des quantités infimes de la matrice d'ADN que l'on désire amplifier, d'un ADN polymérase, de deux amorces d'ADN, de quatre sous unités de paires de bases d'ADN (désoxyribonucléotides triphosphates d'adénine, de guanine, de thymine et de cytosine) et de tampons.

Parce que la PCR identifie une séquence spécifique d'ADN et fabrique des millions de copies (ou amplifie) de cette séquence, elle est l'un des outils les plus utiles de la biologie moléculaire. Les scientifiques utilisent la PCR pour obtenir de grandes quantités d'une séquence spécifique d'ADN qui sont nécessaires pour des techniques telles que le clonage de gènes, où de l'ADN est physiquement déplacé d'un génome à un autre. Vous utilisez la propriété de la PCR qui permet l'identification d'une séquence spécifique, à savoir la capacité de la PCR à rechercher une séquence unique de quelques centaines de paires de bases dans un contexte de milliards de paires de bases. Par exemple, le génome du maïs compte 2,5 milliards de paires de bases d'ADN. Cette séquence est ensuite amplifiée de manière jusqu'à ce qu'il y ait des millions de copies de celle-ci, et de sorte qu'elle se distingue des quelques copies de l'ADN matrice d'origine.

La PCR localise des séquences d'ADN spécifiques à l'aide d'amorces complémentaires à la matrice d'ADN. Les amorces sont de courts brins d'ADN (généralement entre 6 et 30 paires de bases) appelés oligonucléotides. Deux amorces sont nécessaires pour amplifier une séquence d'ADN, une amorce directe et une amorce inverse. Les deux amorces sont conçues et synthétisées en laboratoire avec une séquence spécifique de nucléotides de sorte qu'elles puissent s'hybrider (se lier) aux extrémités opposées de la séquence d'ADN cible sur les brins complémentaires de la matrice d'ADN cible. La séquence d'ADN cible est copiée par l'ADN polymérase qui lit le brin complémentaire de l'ADN matrice et ajoute des nucléotides aux extrémités 3' des amorces (voir figure 6). Les amorces donnent la spécificité à la PCR, mais elles sont également nécessaires, car l'ADN polymérase ne peut ajouter des nucléotides qu'à de l'ADN à double brin.

Au cours de la PCR, la matrice d'ADN à double brin est séparée en la chauffant, puis chaque amorce se lie (s'hybrider) à sa séquence complémentaire sur chacun des brins d'ADN séparés, et l'ADN polymérase allonge chaque amorce en ajoutant des nucléotides pour fabriquer un nouvel ADN à double brin (voir figure 6).

L'ADN polymérase utilisée dans la PCR doit être une enzyme thermostable, car la réaction PCR est chauffée à 94 °C, ce qui détruirait l'activité biologique de la plupart des enzymes. L'ADN polymérase thermostable la plus couramment utilisée est l'ADN polymérase Taq. Elle a été isolée d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, qui vit dans les cheminées de vapeur à haute température, comme celles du parc national de Yellowstone.

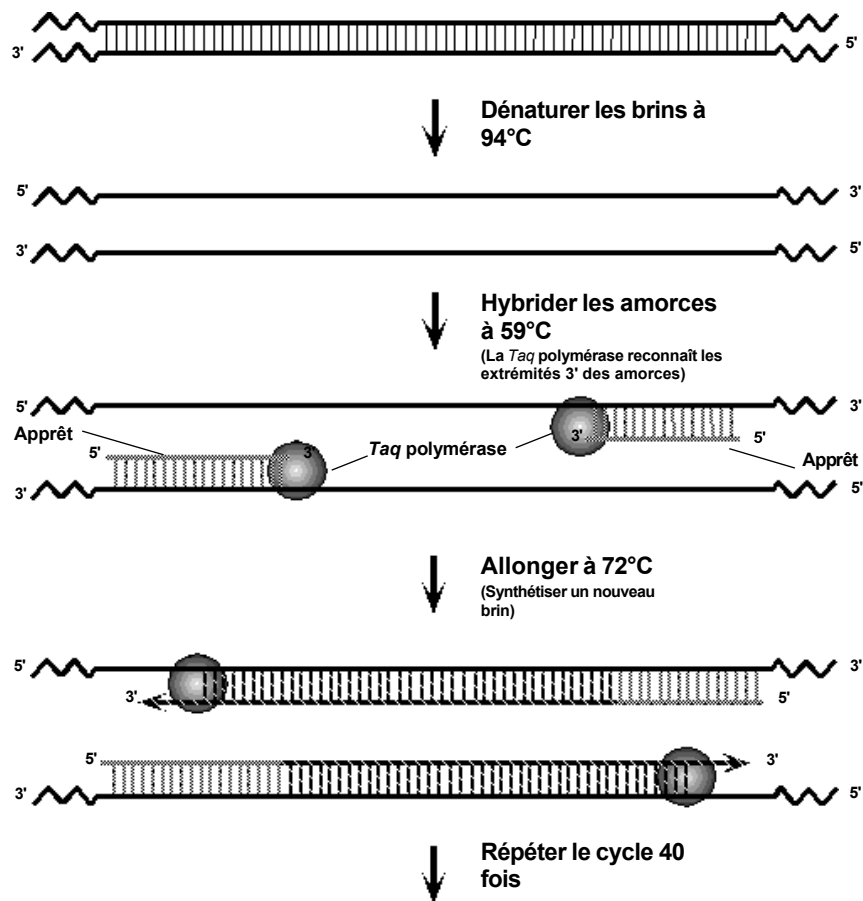


Fig. 6. Un cycle complet de PCR.

PCR étape par étape

La PCR comporte trois étapes : une étape de dénaturation, une étape d'hybridation et une étape d'élongation. Pendant l'étape de dénaturation, la matrice d'ADN est chauffée à 94 °C pour séparer (ou dénaturer) la molécule d'ADN double brin en deux brins simples. L'ADN est ensuite refroidi à 59 °C pour permettre aux amorces de localiser et de s'hybrider (s'apparier) à l'ADN. Comme les amorces sont beaucoup plus courtes que la matrice d'ADN, elles s'hybrident, à cette température, beaucoup plus rapidement que les longs brins de la matrice d'ADN. L'étape finale consiste à

augmenter la température de la réaction PCR à 72 °C, qui est la température optimale pour le fonctionnement de l'ADN polymérase. Au cours de cette étape, l'ADN polymérase ajoute des nucléotides (A, T, G ou C) un par un à l'extrémité 3' de l'amorce pour créer une copie complémentaire de la matrice d'ADN originale. Ces trois étapes forment un cycle de PCR. Une amplification PCR complète subit plusieurs cycles de PCR, dans ce cas-ci 40 cycles.

La totalité de la réaction à 40 cycles est effectuée dans un tube à essai placé dans un thermocycleur ou une machine PCR. Cet équipement contient un bloc d'aluminium qui peut être rapidement chauffé et refroidi. Le chauffage et le refroidissement rapides de ce bloc thermique sont connus sous le nom de cyclage thermique.

Deux nouveaux brins de matrice sont créés à partir de la matrice à double brin originale pendant chaque cycle complet de la PCR. Cela entraîne une croissance exponentielle du nombre de molécules d'ADN cible, c'est-à-dire que le nombre de molécules d'ADN cible double à chaque cycle ; c'est pourquoi on parle de réaction en chaîne. Par conséquent, après 40 cycles, il y aura 2^{40} , soit plus de 1 100 000 000 000 fois plus de copies qu'au début. Une fois que les séquences d'ADN cibles d'intérêt ont été suffisamment amplifiées, elles peuvent être visualisées par l'électrophorèse sur gel. Cela permet aux chercheurs de déterminer la présence ou l'absence des produits PCR d'intérêt.

Votre tâche pour cette leçon

Pour cette expérience, vous allez mettre en place deux réactions PCR pour chaque échantillon d'ADN, ce qui fait 6 réactions PCR au total. Une réaction PCR, utilisant le Master Mix végétal (MMV), sert de contrôle pour déterminer si vous avez réussi ou non à extraire l'ADN végétal de votre aliment test. Pour ce faire, on identifie une séquence d'ADN commune à toutes les plantes en utilisant des amorces (colorées en vert dans le kit) qui amplifient spécifiquement une section d'un gène du chloroplaste utilisé dans la réaction lumineuse (photosystème II). Pourquoi cela est-il nécessaire ? Que se passe-t-il si vous n'amplifiez pas l'ADN en utilisant les amorces OGM ? Pouvez-vous conclure que votre aliment testé n'est pas génétiquement modifié ou est-ce simplement parce que votre extraction d'ADN n'a pas réussi ? Si vous amplifiez l'ADN en utilisant les amorces végétales, vous pouvez conclure que vous avez réussi à amplifier l'ADN. Par conséquent, que vous amplifiez ou non l'ADN avec vos amorces OGM, vous aurez davantage confiance dans la validité de votre résultat.

La deuxième réaction PCR que vous effectuerez déterminera si votre échantillon d'ADN contient ou non des séquences d'ADN GM. Pour ce faire, vous identifiez les séquences d'ADN qui sont communes à la plupart (environ 85 %) de toutes les plantes GM en utilisant des amorces spécifiques à ces séquences. Ces amorces sont colorées en rouge et se trouvent dans le Master Mix OGM (MMO).

Pourquoi faut-il mettre en place une réaction PCR avec de l'ADN provenant d'aliments certifiés non-OGM ? Que se passe-t-il si de l'ADN positif aux OGM s'est introduit dans l'InstaGene ou le Master Mix à partir d'un embout de pipette sale ou d'une classe précédente ? Cet ADN pourrait être amplifié dans la réaction PCR de votre aliment testé et vous donner un faux résultat. En disposant d'un témoin non-OGM connu, dont vous savez qu'il ne devrait pas amplifier les séquences cibles OGM, vous pouvez savoir si vos réactions PCR ont été contaminées par de l'ADN OGM-positif.

Leçon 2

Questions thématiques

1. Quels sont les produits chimiques et les molécules nécessaires à la PCR, et quelle est la fonction de chaque composant ?
2. Examinez la séquence promoteur de 150 bases ci-dessous.

5'TAGAAAAGGA AGGTGGCTCC TACAAATGC C ATCATT GCGA AAAGGAAAG

GTATCATT C AAGATGCCTC TGCCGACAGT GGTC CCAAAG ATGGACCCC C

ACCCACGAGG AGC ATCGTGG AAAAAGAAGA CGTTCCAACC ACGTCT CAA3'

Inscrivez la séquence du brin complémentaire et marquez les extrémités 3' et 5' du brin complémentaire.

3. Sachant que les ADN polymérases ne peuvent ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité 3' de l'ADN, concevez une amorce directe et une amorce inverse, chacune de 10 bases de long, pour amplifier une séquence cible de l'ADN d'au moins 100 pb de long. Écrivez la séquence des amorces ci-dessous, en indiquant leurs extrémités 3' et 5'. Indiquez également sur la séquence ci-dessus à quel brin elles sont complémentaires (s'hybrident avec).

Séquence d'amorces directe :

Séquence d'amorces inverse :

4. Pourquoi effectuez-vous deux réactions PCR sur chaque échantillon d'ADN ?

5. Quel est l'objectif de l'ADN témoin positif pour les OGM ?

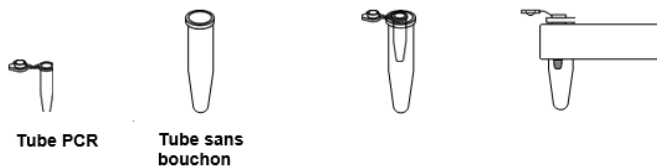
Protocole de l'élève - Leçon 2 Préparer les réactions de PCR

Matériel	Quantité
Bain de glace contenant 3 tubes	1
Master Mix OGM (rouge) (sur glace)	1
Master Mix végétal (vert) (sur glace)	1
ADN témoin positif pour OGM (sur glace)	1
ADN alimentaire à tester (du laboratoire précédent)	1
ADN témoin pour aliments non-OGM (du laboratoire précédent)	1
Tubes PCR	6
Adaptateurs PCR	6
Porte-microtube en mousse	1
Stylo de marquage	1
Micropipette à volume réglable de 2 à 20 µl ou micropipette à volume fixe de 20 µl	1
Embouts de pipette 2-20 µl, barrière anti-aérosols	1 portoir

Postes de travail des étudiants

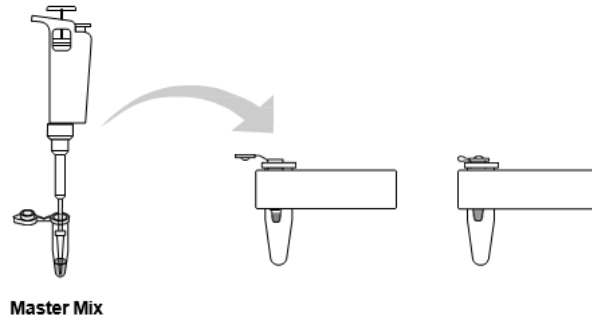
1. Numéroté six tubes PCR de 1 à 6 et les étiqueter avec vos initiales. Les numéros correspondent au contenu des tubes suivants :

Numéro du tube	ADN	Master Mix
1	20 µl d'ADN du témoin alimentaire non-OGM	20 µl de Master Mix végétal (vert)
2	20 µl d'ADN du témoin alimentaire non-OGM	20 µl de Master Mix OGM (rouge)
3	20 µl ADN de l'aliment testé	20 µl de Master Mix végétal (vert)
4	20 µl ADN de l'aliment testé	20 µl de Master Mix OGM (rouge)
5	20 µl d'ADN du témoin positif OGM	20 µl de Master Mix végétal (vert)
6	20 µl d'ADN du témoin positif OGM	20 µl de Master Mix OGM (rouge)

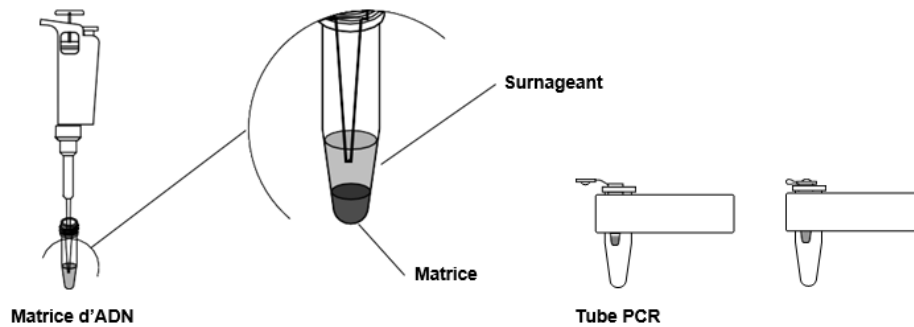


2. Garder les tubes sur la glace pour les étapes restantes.
3. En utilisant une nouvelle pointe à chaque fois, ajouter 20 µl du Master Mix indiqué dans chaque tube. Par exemple, ajouter 20 µl du Master Mix végétal (vert) (MMV) aux tubes 1, 3 et 5. Ensuite, ajouter 20 µl de Master Mix OGM rouge (MMO) aux

tubes 2, 4, 6. Bouchonner chaque tube.



4. En utilisant une nouvelle pointe de pipette pour chaque tube, ajouter 20 μ l d'ADN dans chaque tube comme indiqué dans le tableau ci-dessus. S'assurer de ne pas transférer de billes InstaGene dans votre réaction PCR. Si les billes sont désorganisées centrifuger à nouveau vos échantillons d'ADN pour les résédimenter. Ajoutez 20 μ l d'ADN du témoin alimentaire non-OGM au tube 1 et pipetter de haut en bas pour mélanger. Jeter l'embout. Utiliser une nouvelle pointe pour ajouter 20 μ l d'ADN du témoin alimentaire non-OGM au tube 2 et mélanger. Jeter l'embout. De la même façon, ajouter 20 μ l d'ADN de l'aliment à tester dans les tubes 3 et 4, et ajouter 20 μ l d'ADN du témoin positif OGM dans les tubes 5 et 6, en changeant de pointe pour chaque tube. Reboucher les tubes.



5. Lorsque demandé, placer les tubes PCR dans le thermocycleur.

Leçon 3 : Électrophorèse des produits PCR

Vous avez terminé votre amplification PCR. Cependant, vous ne pouvez pas, à ce stade, déterminer si vous avez ou non des produits PCR. Pour ce faire, vous devez visualiser vos produits. Pour ce faire, vous utiliserez l'électrophorèse sur gel.

Les bandes de votre produit PCR sont très petites par rapport à celles des autres expériences sur l'ADN que vous avez pu réaliser. Par exemple, les fragments produits par une digestion *Hind*III de l'ADN lambda sont de 23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027 et 500 paires de bases (pb). La taille des bandes de produit dans ce laboratoire est de 455 pb pour les amorces végétales et de 200 pb pour les amorces d'OGM donc un gel à 1 % ne permettrait pas de séparer ces bandes. Au lieu de cela, une matrice de gel plus serrée est nécessaire afin d'entraver le mouvement de ces bandes pour qu'elles soient plus séparées sur le gel et qu'elles puissent être vues. Par conséquent, si vous utilisez l'électrophorèse à l'agarose, vous utiliserez un gel d'agarose à 3 %. Votre professeur peut également choisir d'utiliser un gel de polyacrylamide, qui a des pores plus petits, pour séparer vos produits. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est utilisée pour séparer les petites molécules en vue de leur visualisation.

Quel que soit le type de gel, vous chargerez une règle de poids moléculaire (standard d'ADN) afin d'avoir une référence pour déterminer la taille des bandes de votre produit. Le gel sera ensuite coloré avec la coloration Fast Blast afin de rendre les bandes visibles.

Leçon 3

Questions thématiques

1. Pourquoi avez-vous vérifié vos produits PCR par électrophorèse ?
2. Expliquez pourquoi les fragments d'ADN se séparent en fonction de leur taille dans un gel d'électrophorèse.
3. Pourquoi avez-vous besoin d'une règle de poids moléculaire à côté de vos échantillons ?
4. Quels résultats attendez-vous dans chaque couloir ? Remplissez le tableau ci-dessous.

Couloir	Échantillon	Résultat attendu (Bande) (oui, non, je ne sais pas) ?
1	Échantillon 1 : Aliment témoin non-OGM avec des amorces végétales	
2	Échantillon 2 : Aliment témoin non-OGM avec des amorces OGM	
3	Échantillon 3 : Aliment testé avec des amorces végétales	
4	Échantillon 4 : Aliment testé avec des amorces OGM	
5	Échantillon 5 : ADN témoin positif OGM avec amorces végétales	
6	Échantillon 6 : ADN témoin positif OGM avec amorces OGM	

Leçon 3

Poste de travail des étudiants

Matériel	Quantité
Gel (agarose 3 % ou polyacrylamide 10 %)	1
Échantillons de la période de laboratoire précédente	6
Tampon de migration (1x TAE pour les gels d'agarose ou 1x TBE pour les gels de polyacrylamide)	300 - 350 ml
Colorant de chargement Orange G	1 flacon
Règle de poids moléculaire pour PCR	1 flacon
Pipette à volume réglable 2-20 µl ou micropipette à volume fixe 20 µl	1
Embouts de pipette 1-20 µl, barrière anti-aérosols	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
Coloration de l'ADN Fast Blast, 1x ou 100x selon le protocole (à une station de travail commune)	1
Plateau de coloration du gel	1

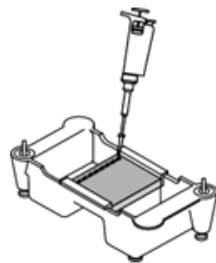
Protocole

1. Installer votre appareil d'électrophorèse sur gel comme demandé

Les détails sur la mise en place de l'équipement d'électrophorèse se trouvent dans le guide de l'instructeur

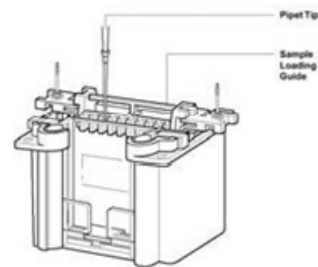
2. En utilisant une nouvelle pointe à chaque fois, ajouter 10 µl de colorant de chargement Orange G à chaque échantillon et bien mélanger.
3. Charger 20 µl de règle de poids moléculaire pour PCR et 20 µl de chaque échantillon sur votre gel dans l'ordre indiqué ci-dessous.

Couloir	Échantillon	Volume de charge
1	Échantillon 1 : Aliment témoin non-OGM avec des amorces végétales	20 µl
2	Échantillon 2 : Aliment témoin non-OGM avec des amorces OGM	20 µl
3	Échantillon 3 : Aliment testé avec des amorces végétales	20 µl
4	Échantillon 4 : Aliment testé avec des amorces OGM	20 µl
5	Échantillon 5 : ADN témoin positif OGM avec amorces végétales	20 µl
6	Échantillon 6 : ADN témoin positif OGM avec amorces OGM	20 µl
7	Règle de poids moléculaire pour PCR	20 µl
8	Laisser vide	



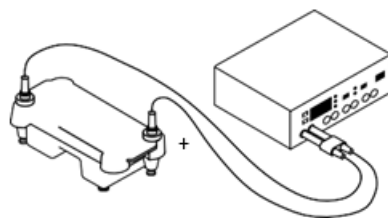
Gel d'agarose

ou



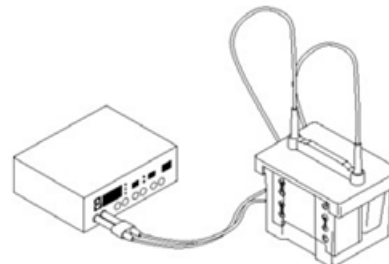
Gel de polyacrylamide

4. La durée de fonctionnement et la tension dépendent du type de gel utilisé.
 - Charger un gel d'agarose à 100 V pendant 30 minutes. Ne pas laisser le front du colorant orange migrer hors du gel d'agarose.
 - Charger un gel de polyacrylamide à 200 V pendant 30 minutes et ne pas laisser le colorant rouge de l'amorce OGM s'écouler du gel.



Électrophorèse sur gel d'agarose

ou

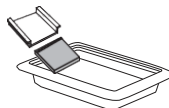


Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

5. Colorer le gel avec le colorant Fas Blast DNA. Reportez-vous aux instructions spécifiques ci-dessous pour votre type de gel.

Coloration des gels d'agarose

1. Lorsque l'électrophorèse est terminée, éteindre l'appareil et retirer le couvercle de la boîte à gel.
2. Retirer délicatement le plateau de gel et le gel de la boîte de gel. Attention, le gel est très glissant. Glisser le gel hors du plateau de gel avec le pouce et faire glisser avec précaution dans votre plateau de coloration en plastique.

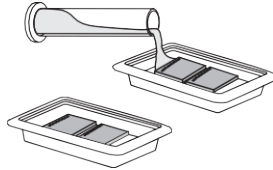


3. Il existe deux protocoles pour la coloration de votre gel. L'instructeur indiquera celui qui doit être utilisé.

Protocole 1 : Coloration pendant la nuit

- a. Plonger le gel dans le Fast Blast 1x.

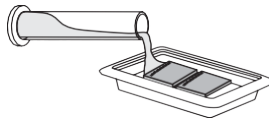
- b. Laisser les gels se colorer pendant la nuit, en les secouant légèrement pour obtenir les meilleurs résultats. Aucune décoloration n'est nécessaire.



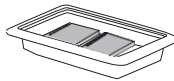
Protocol 2 : Coloration rapide (nécessite 20 minutes)

Cette méthode permet de voir les bandes rapidement (dans les 15 minutes), mais peut nécessiter une décoloration importante pour obtenir une intensité optimale des bandes par rapport au fond. Remarque : il est important d'utiliser de l'eau **chaude** pour les étapes de décoloration de ce protocole.

- a. Immerger le gel dans le Fast Blast 100x.



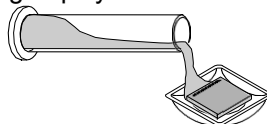
- b. Colorer le gel pendant 5 minutes en l'agitant doucement. Conserver le colorant utilisé pour une utilisation ultérieure.
- c. Transférer les gels dans un grand récipient de lavage et les rincer à l'eau **chaude** (40-55 °C) du robinet pendant environ 10 secondes.



- d. Pour de meilleurs résultats, décolorer en lavant trois fois dans de l'eau **chaude** du robinet pendant 5 minutes à chaque fois et en agitant légèrement. Les bandes devraient être visibles après 10 minutes si vous regardez le gel avec la lumière venant du bas du plateau de coloration. Si nécessaire, continuer la décoloration dans l'eau **chaude** jusqu'à ce que le contraste souhaité soit obtenu.

Coloration des gels en polyacrylamide

1. Lorsque les gels sont finis, couper l'alimentation électrique et débrancher les fils. Retirer le couvercle et soulever l'ensemble des électrodes et le cadre de serrage.
2. Vider le tampon de migration de l'ensemble d'électrodes. Ouvrir les portillons et retirez les cassettes de gel.
3. Pour éviter que le gel ne soit contaminé par le bout de vos doigts, porter des gants pour manipuler les gels à partir de ce point. Poser une cassette de gel à plat sur l'établi, la plaque courte vers le haut. Couper le ruban adhésif le long des côtés de la cassette de gel. Séparer délicatement les plaques de gel à l'aide d'une spatule ou du bout des doigts. Le gel va généralement adhérer à l'une des plaques. Transférer la plaque avec le gel qui y adhère sur un plateau contenant un colorant



Fast Blast 1x (voir ci-dessous), permettant au liquide de détacher le gel de la plaque. Le gel peut également être soulevé directement (et doucement !) de la plaque et placé dans le colorant.

4. Des bandes commenceront à apparaître après 10 minutes et la coloration sera complète en 1 heure. Cependant, les gels peuvent être laissés dans la coloration toute la nuit. Aucune décoloration n'est nécessaire.

Leçon 4 : Séchage des gels et analyse des résultats

Pour conserver une trace permanente de l'expérience, les gels peuvent être séchés entre des feuilles de cellophane et incorporés dans des cahiers de laboratoire. Pour documenter les gels humides, ces derniers peuvent être scannés, photocopiés (un support jaune offre un contraste optimal) ou tracés sur un film acétate. Votre professeur vous indiquera la méthode à utiliser.

Méthode de séchage GelAir^{MC}

Matériel (requis pour sécher 8 gels avec le système Gel Drying)	Quantité
Cellophane GelAir	4 feuilles
Table d'assemblage GelAir	1
Cadre de séchage GelAir	2
Pinces GelAir	16
Four de séchage GelAir (en option)	1
Eau distillée	500 ml

Procédure

1. Préhumecter 2 feuilles de cellophane dans un récipient d'eau pendant 15 à 20 secondes.
2. Placer un cadre de séchage en plastique sur la table d'assemblage GelAir. Centrer une feuille de cellophane sur la table de montage.
3. Poser délicatement un gel sur la cellophane, en le positionnant de manière à pouvoir accueillir d'autres gels (jusqu'à six au total). S'il y a des bulles entre le gel et la cellophane, les pousser doucement avec un doigt ganté. Notez que les gels de polyacrylamide doivent être débarrassés de l'arête située au bas du gel en les coupant (et non en les tranchant) à l'aide d'une carte en plastique, par exemple une carte d'identité.
4. Inonder les gels d'eau et poser la deuxième feuille de cellophane par-dessus. Si des gels de polyacrylamide sont séchés, essayer de ne pas emprisonner de bulles dans le sandwich, car les bulles provoqueront des fissures dans le gel pendant le séchage. S'il y a des bulles, les pousser doucement avec un doigt ganté. En raison de leur épaisseur, les bulles ne peuvent pas être évitées sur les bords des gels d'agarose, mais éviter les bulles entre la cellophane et la face du gel.
5. Placer le cadre métallique carré sur le sandwich de cellophane. Fixer les huit pincés sur le cadre, deux de chaque côté. Si l'étuve de séchage GelAir n'est pas utilisée, placer les cadres dans un endroit bien ventilé pendant 12 à 36 heures. Avec utilisation de l'étuve de séchage GelAir, placer jusqu'à quatre cadres de séchage dans l'étuve, mettre le chauffage en marche et régler le cadran sur 3 heures. Le séchoir s'éteint automatiquement.
6. Lorsque les gels sont complètement secs, ils seront plats. Enlever les pincés et sortir le sandwich gel/cellophane du cadre. Couper l'excédent de cellophane autour des gels séchés avec des ciseaux.

Méthode du sandwich en cellophane et du récipient en plastique

Matériel (nécessaire pour sécher 8 gels en utilisant des contenants en plastique)

	Quantité
Cellophane GelAir	16 feuilles
Contenant en plastique	8
Rubans élastiques	16
Eau distillée	500 ml

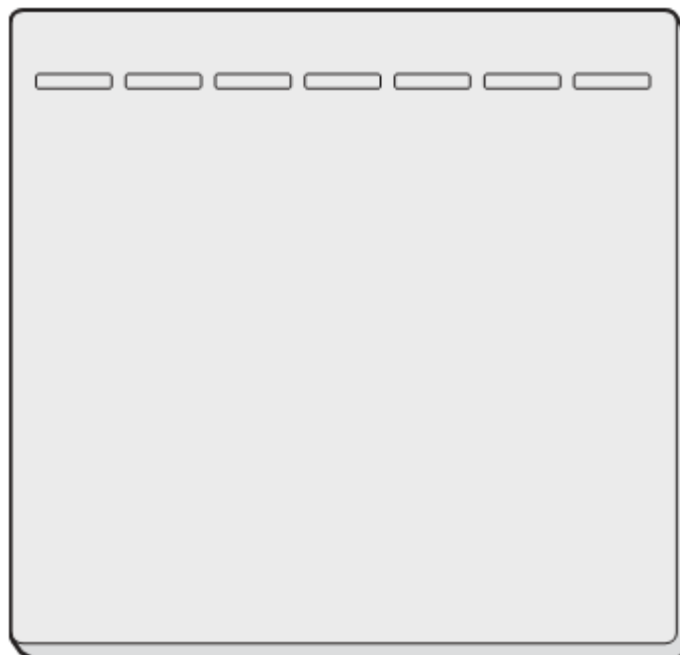
Procédure

1. Préhumecter 2 feuilles de cellophane dans un récipient d'eau pendant 15 à 20 secondes.
2. Placer une feuille de cellophane sur un récipient en plastique. Tendre la feuille de cellophane de sorte qu'elle forme une surface plane sur le dessus du récipient et utiliser un élastique pour la maintenir en place.
3. Placer un gel sur la cellophane. L'inondation de la surface de la cellophane autour du gel avec de l'eau permettra d'éliminer les bulles.
4. Placer la deuxième feuille de cellophane mouillée sur le gel. En raison de leur épaisseur, les bulles ne sont pas évitables sur les bords des gels d'agarose, mais éviter les bulles entre la cellophane et la face du gel. Fixer la deuxième feuille de cellophane à la boîte avec un deuxième élastique.
5. Laisser le gel sécher pendant plusieurs jours dans un endroit bien ventilé.

Analyse des résultats

Couloir	Échantillon	Bandes visibles ?	Grandeur des bandes (bp)
1	Échantillon 1 : Aliment témoin non-OGM avec des amorces végétales		
2	Échantillon 2 : Aliment témoin non-OGM avec des amorces OGM		
3	Échantillon 3 : Aliment testé avec des amorces végétales		
4	Échantillon 4 : A ; Aliment testé avec des amorces OGM		
5	Échantillon 5 : ADN témoin positif OGM avec amorces végétales		
6	Échantillon 6 : ADN témoin positif OGM avec amorces OGM		
7	Règle de poids moléculaire pour PCR		

1 2 3 4 5 6 7



Leçon 4

Question 4

1. Quel était votre aliment testé ?

2. Votre aliment testé a-t-il généré une bande de 200 pb avec l'amorce OGM (couloir 4) ?

3. Qu'est-ce que cela vous dit sur le statut OGM de vos aliments ?

4. De quelles autres informations avez-vous besoin pour confirmer le statut OGM de votre échantillon ?

5. Comment les résultats de vos cinq autres réactions PCR contribuent-ils à confirmer ou à infirmer votre résultat pour votre aliment testé ?

6. Comment les résultats de vos cinq autres réactions PCR contribuent-ils à confirmer ou à infirmer votre résultat pour votre aliment testé ?

Annexe A : Introduction à la PCR

En 1983, Kary Mullis, de Cetus Corporation, a mis au point la technique de biologie moléculaire qui a depuis révolutionné la recherche génétique et lui a valu le prix Nobel en 1993. Cette technique, appelée **réaction en chaîne par polymérase (PCR)**, a transformé la biologie moléculaire en un outil de recherche multidisciplinaire. De nombreuses techniques de biologie moléculaire utilisées avant la PCR étaient laborieuses, prenaient du temps et nécessitaient un haut niveau d'expertise technique. En outre, le fait de ne travailler qu'avec des traces d'ADN rendait difficile l'intégration de la biologie moléculaire dans les schémas de recherche des chercheurs d'autres domaines biologiques (pathologie, botanique, zoologie, pharmacie, etc.).

La PCR a eu un impact sur quatre grands domaines de la biotechnologie : la cartographie génétique, le clonage, le séquençage de l'ADN et la détection des gènes. La PCR est aujourd'hui utilisée comme outil de diagnostic médical pour détecter des mutations spécifiques susceptibles de provoquer des maladies génétiques, dans les enquêtes criminelles et les tribunaux pour identifier les suspects au niveau moléculaire, et dans le séquençage du génome humain. Avant la PCR, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire à des fins thérapeutiques, médico-légales, pharmaceutiques ou de diagnostic médical n'était ni pratique ni rentable. Le développement de la technologie PCR a fait passer ces aspects de la biologie moléculaire d'une science difficile à l'un des outils les plus accessibles et les plus utilisés dans la recherche génétique et médicale.

PCR et biotechnologie - De quoi s'agit-il et pourquoi a-t-elle révolutionné toute une communauté de chercheurs ?

La PCR produit des quantités exponentielles d'un morceau spécifique d'ADN à partir de quantités infimes de matériel de départ (matrice). La matrice peut prendre toute forme d'un ADN double brin, comme l'ADN génomique. Un chercheur peut prélever des traces d'ADN dans une goutte de sang, un follicule pileux ou une croustille de maïs et utiliser la PCR pour générer des millions de copies d'un fragment d'ADN souhaité. En théorie, il suffit d'une seule molécule de la matrice d'ADN double brin pour générer des millions de copies. Avant le développement de la technique PCR, il aurait été impossible de réaliser des études médico-légales ou génétiques avec un échantillon minuscule ne contenant que quelques molécules de la source d'ADN. La capacité d'amplifier une séquence précise d'ADN en une quantité suffisante pour qu'un chercheur puisse l'analyser et la manipuler est le véritable pouvoir de la PCR.

L'amplification par PCR nécessite la présence d'au moins un brin de la matrice d'ADN. Dans ce kit, l'ADN végétal isolé à partir d'aliments d'épicerie fournit les brins de matrice. L'une des principales raisons pour lesquelles la PCR est un outil si puissant est sa simplicité et sa spécificité. Il suffit de disposer de tampons peu coûteux, de quatre sous-unités d'ADN (désoxynucléotides triphosphates d'adénine, de guanine, de thymine et de cytosine), d'un ADN polymérase, de deux amorces d'ADN et de quantités infimes de la séquence de la matrice que l'on souhaite amplifier. La spécificité vient de la capacité à cibler un segment spécifique d'ADN (ou de gène) parmi un génome complet grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques à la séquence.

La PCR fait appel à deux processus fondamentaux de la génétique moléculaire.

1. Hybridation des brins d'ADN complémentaires
2. Synthèse des brins d'ADN par l'ADN polymérase

Dans le cas de la PCR, l'hybridation des brins complémentaires a lieu lorsque deux amorces oligonucléotidiques différentes s'hybrident à chacune de leurs paires de bases complémentaires respectives sur la matrice. Les deux amorces sont conçues et synthétisées en laboratoire avec une séquence spécifique de nucléotides de manière à pouvoir s'hybrider aux extrémités opposées et sur les brins opposés de la portion d'ADN double brin (matrice) à amplifier.

Avant de pouvoir amplifier une région d'ADN, il faut identifier et déterminer la séquence d'une zone d'ADN en amont et en aval de la région d'intérêt. Ces zones sont ensuite utilisées pour déterminer les séquences des amorces oligonucléotidiques qui seront synthétisées et utilisées comme points de départ pour la réplication de l'ADN. Les amorces sont nécessaires, car les ADN polymérases ne peuvent ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité d'une chaîne préexistante. L'ADN polymérase utilisée dans la PCR doit être une polymérase thermostable, car la réaction en chaîne de la polymérase se déroule entre 59 °C et 94 °C. L'ADN polymérase thermostable (Taq) utilisée dans la PCR a été isolée à partir d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, qui vit dans les événements de vapeur à haute température comme ceux que l'on trouve dans le parc national de Yellowstone.

Deux nouveaux brins de matrice sont créés à partir de la matrice double brin d'origine pendant chaque cycle complet de la réaction de synthèse des brins. Cela entraîne une croissance exponentielle du nombre de molécules de matrice, c'est-à-dire que le nombre de brins d'ADN double à chaque cycle. Par conséquent, après 30 cycles, il y aura 2^{30} , ou plus de 109, fois plus de copies qu'au début. Une fois que l'ADN d'intérêt a été suffisamment amplifié, il peut être visualisé à l'aide d'une électrophorèse sur gel. Cela permet aux chercheurs de déterminer la présence ou l'absence des produits PCR souhaités.

PCR étape par étape

La PCR implique des séries répétitives de cycles, dont chacune consiste en une dénaturation de la matrice, une hybridation de l'amorce et une extension de l'amorce hybridée par l'ADN polymérase Taq. Avant de commencer l'amplification de l'ADN, l'ADN génomique est préparé à partir d'échantillons - dans ce laboratoire, à partir d'aliments d'origine végétale.

Après la préparation des échantillons, l'ADN matrice, les amorces oligonucléotidiques, l'ADN polymérase thermostable (Taq), les quatre désoxynucléotides (A, T, G, C) et le tampon de réaction sont mélangés dans un seul microtube à essai. Le tube est placé dans le thermocycleur MyCyclerMC. Ces thermocycleurs contiennent un bloc d'aluminium qui contient les échantillons et peut être rapidement chauffé et refroidi sur de grandes différences de température. Le chauffage et le refroidissement rapides de ce bloc thermique sont appelés **cycle de température** ou **cyclage thermique**.

La première étape de la procédure de cycle de température de la PCR consiste à chauffer l'échantillon à 94 °C. À cette température élevée, les brins de la matrice se séparent (dénaturation). C'est ce qu'on appelle l'**étape de dénaturation**.

Le thermocycleur refroidit ensuite rapidement à 59 °C pour permettre aux amorces de s'hybrider aux brins séparés de la matrice. C'est ce qu'on appelle l'**étape d'hybridation**. Les deux brins de matrice d'origine peuvent s'hybrider à nouveau l'un à l'autre, ou entrer en compétition avec les amorces pour les sites de liaison complémentaires des amorces. Cependant, les amorces sont ajoutées en excès de telle sorte que les amorces concurrencent effectivement les brins d'ADN originaux pour les sites de liaison complémentaires des amorces.

Enfin, le thermocycleur chauffe l'échantillon à 72 °C pour que l'ADN polymérase Taq étende les amorces et fasse des copies complètes de chaque brin d'ADN. C'est ce qu'on appelle l'**étape d'extension**. La Taq polymérase fonctionne le plus efficacement à cette température. Deux nouvelles copies de chaque brin complémentaire sont créées. Il y a maintenant deux ensembles d'ADN double brin (ADNdb). Ces deux ensembles d'ADNdb peuvent maintenant être utilisés pour un autre cycle et la synthèse subséquente de brins.

À ce stade, un cycle complet de température (cycle thermique) a été réalisé.

Cycle de température = étape de dénaturation + étape d'hybridation + étape d'extension

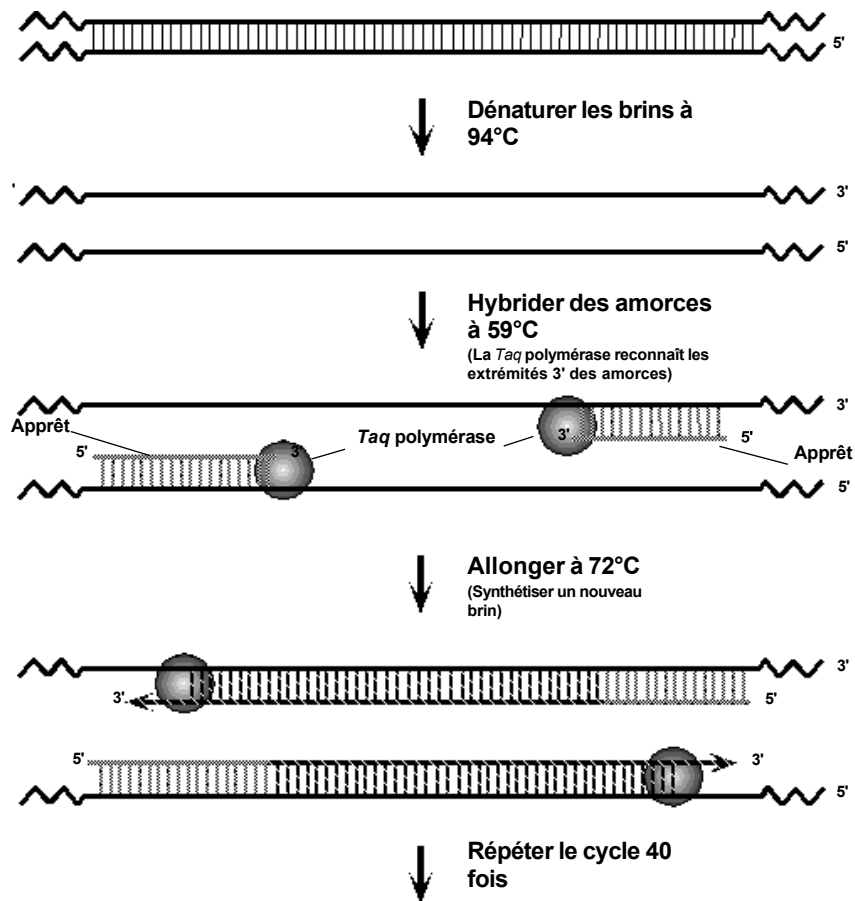


Fig. A1 Un cycle complet de PCR

Habituellement, le cycle thermique se poursuit pendant environ 40 cycles. Après chaque cycle thermique, le nombre de brins de matrice double, ce qui entraîne une augmentation exponentielle du nombre de brins d'ADN matrice. Après 40 cycles, il y aura $1,1 \times 10^{12}$ copies supplémentaires du nombre initial de molécules d'ADN matrice.

La PCR génère un ADN d'une longueur et d'une séquence précises. Lors du premier cycle, les deux amorces s'hybrident à la matrice d'ADN génomique d'origine à des extrémités opposées et sur des brins opposés. Après le premier cycle thermique complet, deux nouveaux brins sont générés, plus courts que les brins de la matrice originale, mais toujours plus longs que la longueur de l'ADN que le chercheur veut amplifier. Ce n'est qu'au troisième cycle thermique que des fragments de la longueur exacte sont générés.

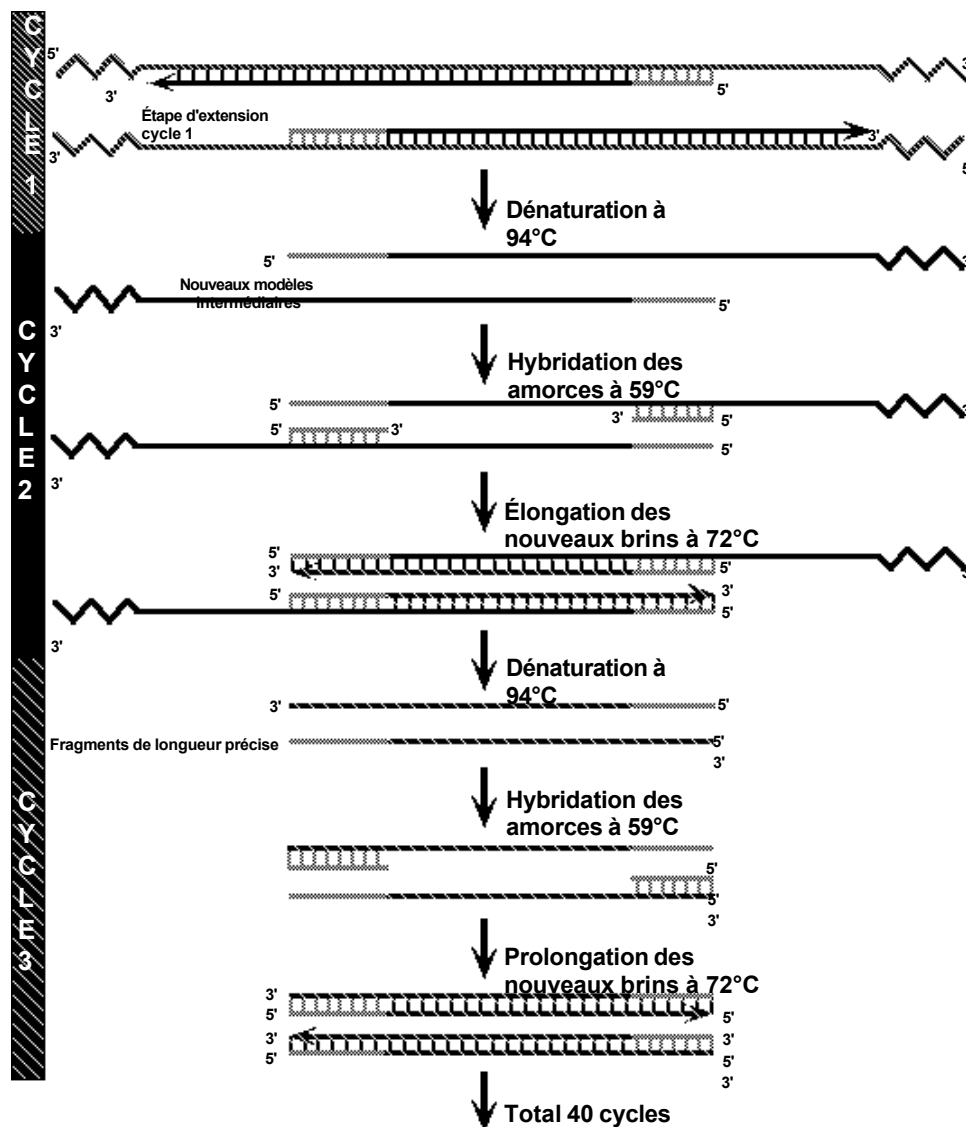


Fig. A2. Génération de fragments de longueur précise.

Ce sont les brins de matrice de la longueur précise qui sont amplifiés de manière exponentielle (X^n , où X = le nombre de brins de matrice originaux et n = le nombre de cycles). Il y a toujours un ensemble de molécules d'ADN de la longue matrice originale qui ne sont jamais entièrement dupliquées. Après chaque cycle thermique, deux brins de longueur intermédiaire sont produits, mais comme ils ne peuvent être générés qu'à partir des brins de la matrice originale, les brins intermédiaires ne sont pas amplifiés de manière exponentielle. Ce sont les brins de longueur précise générés à partir des brins intermédiaires qui sont amplifiés exponentiellement à chaque cycle. Par conséquent, si 20 cycles thermiques sont effectués à partir d'une molécule d'ADN double brin, il y aura 1 ensemble de brins d'ADN matrice génomique d'origine, 20 ensembles de brins de matrice intermédiaires et 1 048 576 ensembles de brins de matrice de longueur précise. Après 40 cycles, il y aurait 1 ensemble de brins d'ADN matrice génomique d'origine, 40 ensembles de brins matriciels intermédiaires et $1,1 \times 10^{12}$ ensembles de brins de matrice de longueur précise.

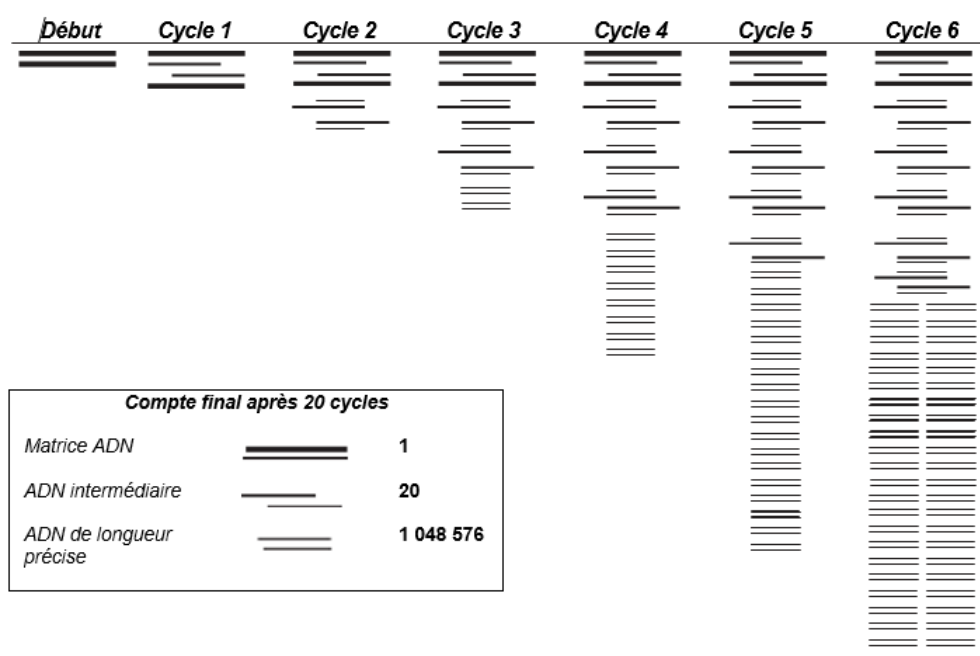


Fig. A3. Schéma de l'amplification par PCR des fragments d'ADN.

Annexe B : Amplification par PCR et technique stérile

La PCR est une technique ultra performante et sensible qui permet aux chercheurs de produire de grandes quantités d'ADN spécifique à partir de très petites quantités de matériel de départ. En raison de cette sensibilité, la contamination des réactions PCR par de l'ADN indésirable est toujours un problème possible. Il faut donc prendre le plus grand soin pour éviter la contamination croisée des échantillons. Les mesures à prendre pour éviter la contamination et l'échec des expériences sont les suivantes :

1. Embouts de pipettes de type filtre. L'extrémité des barils des micropipettes peut facilement être contaminée par des molécules d'ADN en aérosol. Les embouts de pipette qui contiennent un filtre à leur extrémité peuvent empêcher la contamination par aérosols des micropipettes. Les molécules d'ADN qui se trouvent dans la micropipette ne peuvent pas passer à travers le filtre et contaminer les réactions PCR. Les embouts de pipette Xcluda^{MC} à filtre anti-aérosols (N°. Cat. 211- 2006EDU et 211-2016EDU) sont des embouts de pipette idéaux à utiliser dans les réactions PCR.
2. Séparer en aliquotes les réactifs. Le partage des réactifs et les pipettages multiples dans le même tube de réactif peuvent facilement introduire des contaminants dans vos réactions PCR. Dans la mesure du possible, divisez les réactifs en petites aliquotes pour chaque équipe, ou si possible, pour chaque étudiant. Si une seule aliquote d'un réactif est contaminée, alors seul un nombre minimal de réactions PCR sera contaminé et échouera.
3. Changer les embouts de pipette. Utilisez toujours une nouvelle pointe de pipette lorsque vous entrez dans un tube de réactif pour la première fois. Si un embout est utilisé de manière répétée, les molécules d'ADN contaminantes à l'extérieur de l'embout seront transférées vers d'autres solutions, ce qui entraînera des réactions PCR contaminées. Si vous n'êtes pas sûr de la propreté de votre embout de pipette, jouez la carte de la sécurité et jetez l'embout pour en utiliser un nouveau. Le prix de quelques embouts supplémentaires est beaucoup moins élevé que le prix des réactions ratées.
4. Utiliser une bonne technique stérile. Lorsque vous ouvrez des tubes ou pipettez des réactifs, laissez les tubes ouverts le moins longtemps possible. Les tubes ouverts et exposés à l'air peuvent facilement être contaminés par des molécules d'ADN en aérosol. Entrez dans les tubes de réactifs de manière efficace, et fermez-les dès que vous avez fini de pipetter. Essayez également de ne pas prendre les tubes par le bord ou le bouchon, car vous pouvez facilement introduire des contaminants provenant du bout des doigts.
5. L'eau de Javel à une concentration de 10 % détruit l'ADN. Par conséquent, l'essuyage des surfaces et le rinçage des barils de pipettes en plastique, des mortiers et des pilons avec de l'eau de Javel à 10 % peuvent éliminer toute contamination de l'ADN sur les surfaces.

Annexe C : Glossaire des termes

ADN génomique - La somme totale de l'ADN qui se trouve dans une cellule.

ADN polymérase Taq - ADN polymérase thermostable qui a été isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* thermostable. Cette ADN polymérase est couramment utilisée dans les réactions PCR.

Aliquote - La division d'une quantité de matériel en partie plus petite et égale.

Amorce - Petite chaîne de nucléotides (généralement de 16 à 24 bases de long) qui fournit une extrémité libre à partir de laquelle l'ADN polymérase peut s'étendre. Les amorces pour la PCR sont conçues (synthétisées en laboratoire) pour être complémentaires de séquences spécifiques proches de la séquence d'ADN cible, de sorte qu'elles « s'ancrent » à la matrice et fournissent un point de départ à l'ADN polymérase pour copier la région d'intérêt.

Bromure d'éthidium - Un colorant fluorescent qui est utilisé pour détecter l'ADN. Il s'intercale entre les paires de bases de l'ADN et devient fluorescent lorsqu'il est exposé à la lumière ultraviolette.

Bt — *Bacillus thuringiensis* — Dans le contexte des cultures génétiquement modifiées, le terme Bt désigne une modification spécifique dans laquelle un gène d'un membre de la famille des protéines Cry de la bactérie du sol *Bacillus thuringiensis* est inséré dans la culture. Ce gène confère une résistance à la pyrale européenne du maïs.

Callus - Une masse indifférenciée de cellules végétales.

Chélateur - Lier les ions métalliques de la solution. Un exemple d'agent chélateur commun est l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique).

Cofacteur - Ion ou autre petite molécule dont une enzyme a besoin pour fonctionner correctement. Par exemple, l'ADN polymérase Taq a besoin de Mg^{2+} pour fonctionner correctement. Le Mg^{2+} est considéré comme un cofacteur.

Dénaturation - Le processus de désassemblage de deux brins d'ADN complémentaires. La dénaturation in vivo est accomplie par des enzymes ; dans la réaction PCR (in vitro), la dénaturation est accomplie par la chaleur.

DNAase - Enzyme qui dégrade l'ADN.

dNTP - Abréviation couramment utilisée pour désigner les quatre désoxynucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) utilisés dans la synthèse de l'ADN.

Élongation — Extension d'une amorce par l'ajout de dNTP (désoxynucléotides triphosphates). — dATP, dTTP, dCTP ou dGTP par une ADN polymérase. L'élongation suit la règle de l'appariement des bases et se fait dans le sens 5' vers 3'.

Exons - Régions codantes d'un ARN messager transcrit qui sont épissées ensemble et quittent le noyau pour être traduites en séquence protéique.

Génie génétique - Processus par lequel les scientifiques modifient le patrimoine génétique d'un organisme.

GM - Génétiquement modifié

Hybridation - Liaison de l'ADN simple brin à des séquences complémentaires. Les amorces oligonucléotidiques s'hybrident avec les brins d'ADN dénaturés (simple brin).

Intron - Région d'un ARN messager transcrit qui est épissée et n'est pas traduite en séquence protéique.

Lyse - Le processus de rupture d'une cellule pour libérer ses constituants. Dans ce laboratoire, les cellules végétales sont lysées afin de libérer l'ADN génomique pour les réactions PCR.

Matrice - L'ADN qui contient la séquence à copier (en une séquence complémentaire) dans une réaction de synthèse de l'ADN. L'ADN double brin sert de matrice pour la réplication de copies de lui-même, car la séquence de chaque brin sert de matrice pour la réplication de la séquence de l'autre brin. Un ADN simple brin, en revanche, ne peut servir de matrice que pour les copies de sa séquence complémentaire, et non pour les copies de lui-même.

Matrice InstaGene^{MC}- Billes microscopiques qui lient les cations bivalents dans une solution. La liaison des cations bivalents à ces billes empêche leur disponibilité pour les enzymes qui peuvent dégrader l'ADN.

Master Mix (mélange maître) - Solution de réactifs prémélangés conçue pour les réactions PCR, contenant tous les composants nécessaires (dNTP, amorce, tampon, sels, polymérase, Mg^{2+}) de la réaction, à l'exception de l'ADN matrice.

Nucléotide - Unité fondamentale de l'ADN ou de l'ARN. Constitué d'un sucre (désoxyribose ou ribose), d'un phosphate et d'une base azotée (adénine, cytosine, guanine, thymine ou uracile).

OGM - Organisme génétiquement modifié.

PCR - Réaction en chaîne par polymérase. Processus utilisé pour amplifier (synthétiser de grandes quantités à partir d'un petit échantillon de départ) l'ADN dans un tube à essai.

Rétrocroisement - Dans le contexte des cultures OGM, méthode par laquelle une culture génétiquement modifiée nouvellement créée est croisée à plusieurs reprises avec une culture commercialement viable afin de transférer la modification génétique en une production élevée ou commercialement viable.

Annexe D : Activité de débat post-laboratoire

De nombreuses personnes s'opposent à l'utilisation de plantes cultivées génétiquement modifiées. Ils font valoir que la pollinisation croisée avec des cultures résistantes aux herbicides risque de créer de super mauvaises herbes ou que de super insectes qui ne résistent plus aux toxines des cultures résistantes aux parasites vont se développer. Nombreux sont ceux qui s'inquiètent des réactions allergiques potentielles aux nouvelles protéines ou de la résistance aux antibiotiques résultants des marqueurs sélectifs utilisés pour développer les cultures ou d'autres effets imprévus sur la santé publique. Les partisans des aliments génétiquement modifiés affirment que ces cultures sont en fait meilleures pour l'environnement. Moins de produits chimiques toxiques sont rejetés dans l'environnement et donc moins de produits chimiques toxiques peuvent nuire à l'environnement et à la santé humaine. En outre, ces cultures peuvent préserver les terres arables, en réduisant les contraintes sur la terre, améliorer la valeur nutritionnelle des aliments dans les pays en développement et permettre des plantations sur des terres auparavant non cultivables. Nous incluons ici une activité de débat pour faciliter la discussion de ces questions.

Jour 1 - Préparer le terrain

Divisez la classe en deux groupes et désignez au hasard un groupe qui soutiendra le développement et l'utilisation des cultures génétiquement modifiées et l'autre qui s'opposera à l'utilisation et au développement de ces cultures. Expliquez le format du débat et demandez à chaque équipe de choisir un capitaine.

Jours 2 à 5 - Recherche par les étudiants

- Les étudiants effectuent des recherches sur le développement et l'utilisation des cultures génétiquement modifiées à l'aide de la fiche de données pour ou contre de la page suivante (facultatif - à donner en devoir).
- Les équipes compilent les recherches de tous les membres.
- Les équipes rédigent des déclarations d'ouverture de 4 minutes et désignent des porte-parole.

Jour 6 - Le débat

Format du débat

Déclaration d'ouverture : Les partisans de l'utilisation des OGM présentent une déclaration d'ouverture soulignant les avantages des cultures OGM (4 minutes).

Pause : Les opposants dressent une liste de questions qui, selon eux, montrent des failles dans l'argumentation des partisans (2 minutes).

Questions : Les opposants présentent des questions (2 minutes).

Déclaration d'ouverture : Les opposants à l'utilisation des OGM présentent une déclaration d'ouverture exposant les raisons pour lesquelles les cultures d'OGM ne devraient pas être autorisées (4 minutes).

Pause : Les partisans dressent une liste de questions qui, selon eux, montrent des failles dans l'argumentation de l'opposition (2 minutes).

Questions : Les partisans présentent des questions (2 minutes).

Réfutation : Les partisans présentent les réponses aux questions des opposants (2 minutes).

Réfutation : Les adversaires répondent aux questions des partisans (2 minutes).

Plaidoirie finale : point de vue de l'opposition (3 minutes).

Plaidoirie finale : point de vue de soutien (3 minutes).

Grille de notation

Déclarations d'ouverture

- 4 Éloquent, très bien organisé, recherché et présenté.
- 3 Bien organisé, recherché et présenté.
- 2 Quelque peu organisé, recherché et présenté.
- 1 Manque d'organisation, recherche partiellement correcte, pas bien présentée.

Questions

- 4 Les questions étaient réfléchies, soulevaient des préoccupations légitimes, étaient fondées sur la recherche et étaient bien présentées.
- 3 Les questions ont été quelque peu réfléchies, ont soulevé quelques préoccupations et ont été bien présentées.
- 2 Les questions n'étaient pas fondées sur la recherche, ne soulevaient pas de préoccupations légitimes ou n'étaient pas bien présentées.
- 1 Les questions n'avaient aucun rapport avec le sujet, ne soulevaient pas de préoccupations légitimes ou n'étaient pas bien présentées.

Réfutation

- 4 Les élèves ont utilisé la recherche pour réfuter directement les questions.
- 3 Les élèves ont utilisé la recherche pour réfuter partiellement les questions.
- 2 Les élèves ont mal utilisé les recherches pour tenter de réfuter les questions.
- 1 Les élèves n'ont pas réfuté les questions.

Déclarations de clôture

- 4 Le discours de clôture était éloquent, très bien organisé, présenté.
- 3 La déclaration finale est bien organisée, bien documentée et bien présentée.
- 2 La déclaration de clôture était quelque peu organisée, recherchée et présentée.
- 1 La déclaration finale, manque d'organisation, utilise une recherche partiellement correcte et n'est pas bien présentée.

Travail en équipe (selon les autres membres de l'équipe)

- 4 Participation complète et contribution à l'équipe.

- 3 Participation et contribution à l'équipe.
- 2 Participation partielle, quelque peu utile.
- 1 Peu de participation, peu d'aide.

Fiche technique pour ou contre

Dressez une liste des raisons pour lesquelles nous devrions utiliser les cultures génétiquement modifiées (incluez des références).

Dressez une liste des raisons pour lesquelles nous ne devrions pas utiliser les cultures génétiquement modifiées (incluez des références).

Si vous êtes pour, trouvez des recherches pour réfuter les arguments des adversaires. Si vous êtes contre, trouvez des recherches pour réfuter le pour. Incluez-les dans vos déclarations d'ouverture ou de clôture.

Annexe E : Instructions de programmation pour le thermocycleur T100 ou MyCycler

Des instructions abrégées pour la programmation de votre T100 ou MyCycler pour les cycles d'amplification et les températures appropriées utilisés dans ce laboratoire sont fournies ci-dessous. Reportez-vous au manuel d'instructions du T100 ou du MyCycler pour des instructions plus détaillées et le dépannage.

Thermocycleur T-100

Programmer le T100 (nécessaire uniquement la première fois que vous effectuez le laboratoire)

Allumer le T100 en basculant l'interrupteur d'alimentation à l'arrière de la machine

Sélectionner « New Protocol ».

Appuyer sur « 50 µl » en haut à droite de l'écran

Entrer 40

Appuyer sur « OK ».

Programmer la dénaturation initiale

Appuyer sur « 95 °C » dans la colonne 1

Entrer 94

Appuyer sur « OK »

Appuyer sur « 3:00 » dans la colonne 1

Entrer 200

Appuyer sur « OK »

Programmer les 40 cycles PCR

Appuyer sur « 95 °C » dans la colonne 2

Entrer 94

Appuyer sur « OK ».

Appuyer sur « 0:30 » dans la colonne 2

Entrer 100

Appuyer sur « OK »

Appuyer sur « 55 °C » dans la colonne 3

Entrer 59

Appuyer sur « OK ».

Appuyer sur « 0:30 » dans la colonne 3

Entrer 100

Appuyer sur « OK »

Appuyer sur « 1:00 » dans la colonne 4

Entrer 200

Appuyer sur « OK »

Appuyer sur « 34X » dans la colonne 5

Entrer 40

Appuyer sur « OK ».

Programmer l'élongation finale

Appuyer sur « 5:00 » dans la colonne 6

Entrer 1 000

Appuyer sur « OK »

Sauvegarder le protocole

Appuyer sur « Save » dans la barre de menu inférieure de l'écran
Entrer « OGM ».

Appuyer sur « Save ».

Appuyer sur « Home » dans la barre de menu inférieure de l'écran.

Gérer le programme OGM

Appuyer sur « Saved Protocols ».

Appuyer sur « Main » dans la colonne Folder

Appuyer sur « OGM » dans la colonne Files

Appuyer sur « Run » dans la barre de menu inférieure de l'écran

Appuyer sur « OK ».

Thermocycleur MyCycler

Programmer le MyCycler (nécessaire uniquement la première fois que vous effectuez le laboratoire)

Sélectionner « Standby » pour allumer la machine

Sélectionner « Create ».

Faites défiler jusqu'à « Standard-3 » et appuyer sur « Enter ».

Programmer la dénaturation initiale

Entrer 94.0

Appuyer sur la flèche vers le bas

Entrer 2.00

Appuyer sur la flèche vers le bas

Entrer 1.00

Appuyer sur la flèche droite

Programmer les 40 cycles de PCR

Entrer 94.0

Appuyer sur la flèche vers le bas

Entrer 1.00

Appuyer sur la flèche vers la droite

Appuyer sur la flèche vers le haut

Entrer 59.0

Appuyer sur la flèche vers le bas

Entrer 1.00

Appuyer sur la flèche vers la droite

Appuyer sur la flèche vers le haut

Entrer 72.0

Appuyer sur la flèche vers le bas

Entrer 2.00

Appuyer sur la flèche vers le bas

Entrer les cycles 40X

Appuyer sur la touche Enter

Programmer l'extension finale

Appuyer sur la flèche droite

Entrer 72.0

Appuyer sur la flèche vers le bas

Entrer 10.00

Appuyer sur la flèche vers le bas

Entrer le cycle 1X
Appuyer sur la flèche droite
Programmer le maintien du refroidissement final
Entrer le cycle 1X
Appuyer sur « Done ».

Sauvegarder le protocole

Appuyer sur « Save Protocol As »
Appuyer sur « Enter »
Appuyer sur « GMO » en utilisant le clavier alphanumérique
Appuyer sur « Enter »

Gérer le programme OGM

Sélectionner « Protocol Library »
Sélectionner « GMO »
Appuyer « Enter »
Appuyer « Enter » afin d'activer le protocole
Entrer « Mesure algorithmique »
Entrer un volume de 40 µl
Sélectionner « No Hot Start »
Sélectionner « Begin Run »
Le MyCycler devrait commencer à fonctionner

Annexe F : Guide de réponse pour les enseignants

Leçon 1 : Extraction d'ADN à partir d'échantillons d'aliments

1. Comment tester un aliment afin de savoir s'il contient du matériel dérivé d'un organisme génétiquement modifié (OGM) ?

Il existe deux méthodes pour tester les aliments contenant des OGM. Le test ELISA est utilisé pour voir si des protéines particulières sont présentes dans un échantillon. La PCR est utilisée pour amplifier des régions du génome des OGM.

2. Dans quels organelles se trouve l'ADN des plantes ?

L'ADN végétal ne se trouve pas seulement dans le noyau, mais aussi dans les mitochondries et les chloroplastes. Les plantes et les autres organismes autotrophes sont les seuls organismes à posséder des chloroplastes. L'ADN végétal est plus difficile à obtenir intact, car la paroi cellulaire doit être détruite.

3. De nombreux aliments contenant des cultures génétiquement modifiées sont hautement transformés. Pouvez-vous suggérer comment l'ADN de plantes entières peut différer de celui extrait d'aliments transformés, par exemple des croustilles de maïs, de la semoule de maïs, etc.

Les températures élevées ou la manipulation physique du tissu végétal pendant le traitement peuvent détruire ou fragmenter l'ADN.

4. Quelles sont les molécules présentes dans la cellule qui pourraient interférer avec l'extraction de l'ADN ?

Des enzymes, telles que les ADNases, peuvent dégrader l'ADN. Les ions métalliques agissent comme cofacteurs et coenzymes pour les enzymes qui dégradent l'ADN. Les parois cellulaires végétales étant en cellulose peuvent agir comme une barrière à l'extraction de l'ADN.

5. Pourquoi effectuer également des analyses sur des aliments dont on sait qu'ils sont contrôlés sans OGM ?

Pour s'assurer que les échantillons n'ont pas été contaminés. Il est également utilisé à titre de comparaison pour montrer à quoi devrait ressembler la configuration des bandes non-OGM.

6. Pourquoi l'aliment témoin sans OGM a-t-il été préparé avant votre échantillon d'aliment à tester ?

Lors du processus de broyage, les particules en suspension peuvent se déplacer dans l'air et contaminer les échantillons d'aliments non-OGM. De même, un mortier et un pilon qui ne sont pas correctement lavés peuvent transférer un échantillon minuscule. La PCR n'a besoin que d'UNE molécule d'ADN pour fabriquer un produit amplifié.

Leçon 2 : Préparer les réactions PCR

1. Quels sont les produits chimiques et les molécules nécessaires à la PCR, et quelle est la fonction de chaque composant ?

- *ADN polymérase Taq - une polymérase qui n'est pas sensible à la chaleur. Elle relie les désoxynucléotides triphosphates pour former un brin d'ADN complémentaire à la matrice.*
- *Les désoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - les unités de base qui sont connectées pour former le brin complémentaire.*
- *Amorces - courtes séquences d'ADN qui servent de point de départ à l'ADN nouvellement synthétisé.*
- *Tampons et cofacteurs nécessaires pour que la réaction se déroule à un taux optimal.*

2. Examinez la séquence de 150 bases ci-dessous.

5'TAGAAAAGGA AGGTGGCTCC TACAAATGC C ATCATT GCGA
TAAAGGAAAG
3'ATC TTTTCC T TCCACCGAGG AT GTTT ACGG ATCA AACGCT
ATTCCTTT C
Amorce directe 5' AGGAAGGTGG3'.

GCTATCATT C AAGATGCCTC TGCCGACAGT GGTC CCAAAG
ATGGACCCC C
CGATAGTAAGTT CTACGGAG ACGGCTGTCA CCAGGGTT TC TACC
TGGGGG

3' CTTCT GCAAG5' Amorce inverse
ACCCACGAGG AGC ATCGTGG AAAAAGAAGA CGTTCCAACC ACGTCT
TCAA3'
TGGGTGCTCC TCGTAGC ACC TTTT CTTC T GCAAGGTTGG
TGCAGAAGTT5'

Inscrivez la séquence du brin complémentaire et marquez les extrémités 3' et 5' du brin complémentaire (voir les séquences en italique).

3. En vous rappelant que les ADN polymérases ne peuvent ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité 3' de l'ADN, concevez une amorce directe et une amorce inverse, chacune de 10 bases de long, pour amplifier une séquence cible de l'ADN d'au moins 100 pb de long. Écrivez la séquence des amorces ci-dessous, en indiquant leurs extrémités 3' et 5'. Indiquez également sur la séquence ci-dessus à quel brin elles sont complémentaires (s'hybrideront).

Ces amorces peuvent être de n'importe quelle séquence tant que leur orientation et leur complémentarité correspondent à ces exemples en gras.

Amorce directe 5' AGGAAGGTGG3'
Amorce inverse 3' CTTCTGCAAG5'.

Si vous enseignez la conception d'amorce de manière plus approfondie, vous pouvez donner plus de critères pour leur conception d'amorce tels que le % de contenu GC et la formation de dimères d'amorce.

4. Pourquoi effectuez-vous deux réactions PCR sur chaque échantillon d'ADN ?

Une réaction est un contrôle pour montrer que nous avons extrait l'ADN végétal en utilisant des amorces à une séquence d'ADN végétal universelle. La deuxième réaction sert à identifier la séquence cible de l'OGM.

5. Quel est le but de l'ADN de contrôle positif de l'OGM ?

Nous voulons nous assurer que notre réaction PCR a fonctionné ; si le contrôle positif donne un résultat positif, mais que je n'obtiens pas de bande dans mon échantillon, le test est très probablement non-OGM. Si je n'obtiens pas la bande de 200 paires de bases dans le contrôle positif, je peux supposer que la réaction PCR n'a pas fonctionné.

Leçon 3 Électrophorèse des produits de la PCR

1. Pourquoi avez-vous vérifié vos produits PCR par électrophorèse ?

L'électrophorèse sur gel sépare les molécules d'ADN en fonction de leur charge et de leur taille. Après la séparation des bandes, le gel est coloré pour visualiser la configuration des bandes. Nous pouvons calculer la taille des molécules d'ADN, en paires de bases, dans chaque bande.

2. Expliquez pourquoi les fragments d'ADN se séparent en fonction de leur taille dans un gel d'électrophorèse.

L'ADN est chargé négativement, est repoussé par l'électrode négative (cathode) et attiré par l'électrode positive (anode) lorsqu'un courant électrique est appliqué à travers le gel. Il se sépare parce que les différentes longueurs d'ADN se déplacent à travers la matrice du gel à des vitesses différentes. Les fragments plus longs se déplacent plus lentement que les fragments plus courts.

3. Pourquoi avez-vous besoin d'une règle de masse moléculaire à côté de vos échantillons ?

Nous avons besoin d'une règle de masse moléculaire pour calculer la taille de chacune des bandes obtenues. Nous savons exactement combien de bandes se trouvent dans la règle et la taille de chacune de ces bandes. Nous pouvons représenter graphiquement la taille des bandes en fonction de leur distance de déplacement dans le gel pour créer une courbe standard. Nous pouvons ensuite mesurer la distance parcourue par les bandes de produit PCR dans le gel et utiliser la courbe standard obtenue pour calculer la taille des bandes de produit.

4. Quels résultats attendez-vous dans chaque couloir ? Remplissez le tableau ci-dessous..

Couloir	Échantillon	Bande visible attendue ?
1	Échantillon 1 : Aliment test non-OGM avec des amorces végétales	Oui
2	Échantillon 2 : Aliment test non-OGM avec des amorces OGM	Non
3	Échantillon 3 : Aliment test avec des amorces végétales	Oui
4	Échantillon 4 : Aliment test avec des amorces OGM	Je ne sais pas
5	Échantillon 5 : ADN test positif OGM avec des amorces végétales	Oui
6	Échantillon 6 : ADN test positif OGM avec des amorces OGM	Oui

Leçon 4 Séchage des gels et analyse des résultats

1. Quel était votre aliment d'essai ?

Réponse à déterminer par l'instructeur.

2. Votre aliment testé a-t-il généré une bande de 200 pb avec l'amorce OGM (couloir 4) ?

Oui ou non.

3. Qu'est-ce que cela vous dit sur le statut OGM de vos aliments ?

Une bande indique que l'aliment peut être OGM-positif, l'absence de bande indique que l'aliment peut être OGM-négatif.

4. De quelles autres informations avez-vous besoin pour confirmer le statut OGM de votre échantillon ?

S'il y avait une bande dans le couloir 4, nous devons déterminer qu'il n'y a pas eu de contamination des échantillons pour nous assurer que le résultat n'est pas un faux positif.

S'il n'y a pas de bande dans le couloir 4, nous devons confirmer que l'ADN a été extrait de l'échantillon et que la réaction PCR a fonctionné correctement pour nous assurer que le résultat n'est pas un faux négatif.

5. Comment les résultats de vos cinq autres réactions PCR contribuent-ils à confirmer ou à infirmer votre résultat pour votre aliment testé ?

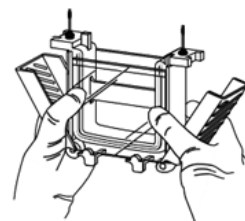
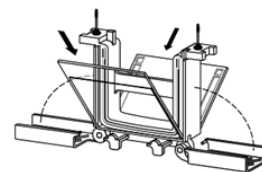
Reportez-vous à l'organigramme (figure 4 page 31)

6. Si vous deviez répéter la procédure, quelle pratique de laboratoire pourrait donner de meilleurs résultats ?

Acceptez toutes les réponses raisonnables.

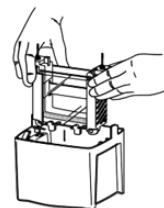
Annexe G : Assemblage du module d'électrophorèse Mini-PROTEAN® Tetra Cell

1. Installez la boîte de gel Mini-PROTEAN Tetra.
2. Préparez un gel TBE Mini-PROTEAN en décollant la bande de plastique du fond du gel.
3. Retirez le peigne du gel.
4. Placez la cassette de gel dans l'assemblage d'électrodes qui comporte les fiches banane, la plaque courte étant tournée vers l'intérieur. Placez une digue tampon ou une autre cassette de gel sur le côté opposé de l'assemblage d'électrodes, l'encoche du barrage tampon étant tournée vers l'intérieur.
5. Poussez les deux gels (ou le gel et la digue tampon) l'un vers l'autre, en veillant à ce qu'ils soient contre les joints verts intégrés au cadre de serrage ; assurez-vous que les plaques courtes se trouvent juste en dessous de l'encoche en haut du joint vert. Faites glisser les bras verts du cadre de serrage par-dessus les gels, en les verrouillant en place.
6. Abaissez l'ensemble d'électrodes avec les gels à l'intérieur dans le mini réservoir sur le côté du réservoir avec les languettes en plastique. Veillez à ce que la fiche banane rouge aille sur le côté du réservoir avec l'ovale rouge.



ATTENTION : Lors de l'exécution, avec 1 ou 2 gels seulement, NE PAS placer le Companion Running Module dans le réservoir. Cela entraînerait une production excessive de chaleur et empêcherait la séparation électrophorétique.

7. Remplir complètement la chambre intérieure avec le tampon d'électrophorèse TBE 1x, en s'assurant que le tampon couvre la plaque courte (environ 150 ml).
8. Remplir le mini réservoir avec environ 700 ml de TBE 1x tampon d'électrophorèse jusqu'à ce que le tampon atteigne la ligne des 2 gels sur le réservoir.
9. Si vous l'utilisez, placez le guide de chargement des échantillons sur le dessus de l'assemblage d'électrodes.



Assemblage de cellules Mini-PROTEAN Tetra

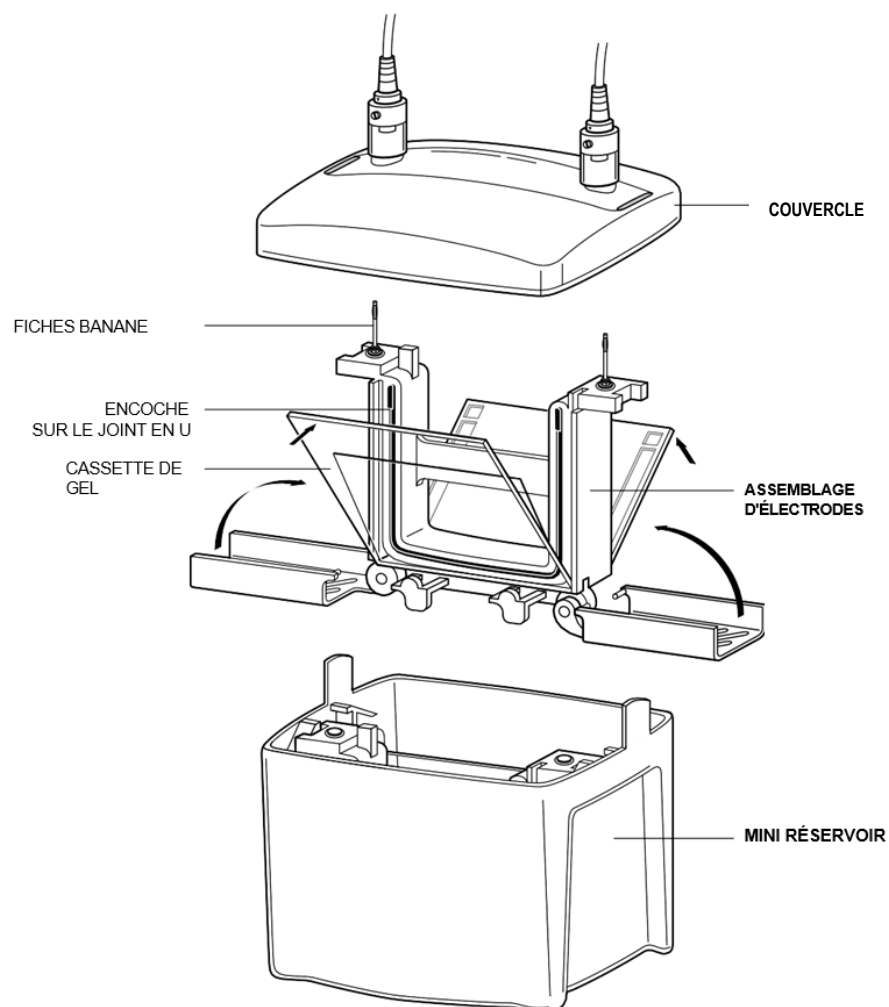


Fig. G1. Assemblage de la cellule Mini-PROTEAN Tetra

Annexe H : Sites Web et références recommandés sur les OGM

Cours en ligne de l'Université du Nebraska (<http://croptechnology.unl.edu/>).

Base de données du Center for Environmental Risk Assessment sur les cultures OGM, leur mode de fabrication et la date de leur approbation (<http://www.cera-gmc.org>).

Données du service de recherche économique du ministère américain de l'Agriculture sur la proportion des cultures OGM aux États-Unis (<http://www.ers.usda.gov/Data/biotechcrops/>).

Commission européenne, Centre commun de recherche, Review of GMO Detection and Quantification Techniques, 2002-07-23, Bonfini Laura, Heinze Petra, Kay Simon, Van den Eede Guy (<http://mbg.jrc.ec.europa.eu/home/documents/EUR20384Review.pdf>).

Site web pro-OGM avec des liens éducatifs (<http://www.monsanto.com>).

Site web anti-OGM (<http://www.greenpeace.org>).

Annexe I : Réaliser des gels d'ADN à l'agarose en moins de 20 minutes

L'équipe R&D BioEducation de Bio-Rad a développé une nouvelle formule de tampon d'électrophorèse. En utilisant une concentration réduite de tampon de migration (TAE 0,25x), et une tension plus élevée (200 V), tout gel d'agarose peut être exécuté 33 % plus rapidement. Les avantages de cette nouvelle formule sont les suivants :

- Excellente résolution du gel
- Temps d'exécution minimal
- Séparation rapide de l'ADN dans des gels de toute concentration de gel d'agarose (0,8-4,0 %)
- Compatibilité avec tous les kits du programme Explorer de Bio-Rad Biotechnology.

Le tampon TAE est fourni sous la forme d'un concentré 50x qui peut être mélangé avec de l'eau distillée pour obtenir les concentrations nécessaires à la fabrication de gels d'agarose et de tampons d'électrophorèse.

Utiliser TAE 1x pour faire des gels d'agarose :

350 ml de TAE 1x sont suffisants pour couler huit gels d'agarose de 7 x 10 cm. Pour préparer 350 ml de TAE 1x à partir d'un concentré de TAE 50x, ajouter 7 ml de concentré à 343 ml d'eau distillée. Les instructions détaillées pour la fabrication des gels d'agarose se trouvent dans les manuels d'instructions de chaque kit.

- Utiliser TAE 1x pour faire des gels d'agarose à 3 % pour le kit GMO Investigator^{MC}.
 - Avec le petit format d'électrophorèse d'ADN, dissolvez 10,5 g d'agarose dans 350 ml de tampon TAE 1x, faites bouillir, et versez 40 ml par gel pour réaliser 8 gels d'agarose à 3 %. Les gels peuvent être conservés immergés dans un tampon pendant plusieurs semaines à 4 °C.
 - Pour plus de commodité, des gels d'agarose préfabriqués à 3 % avec TAE 1x sont disponibles auprès de Bio-Rad (N° cat. 161-3017EDU).

Utilisez du TAE 0,25 x pour préparer le tampon de migration de l'électrophorèse:

Un volume de 2,5 L de tampon TAE 0,25x est nécessaire pour réaliser huit gels d'agarose de 7 x 10 cm. Pour préparer 2,5 L de TAE 0,25x à partir d'un concentré de TAE 50x, ajouter 12,5 ml de concentré à 2,49 L d'eau distillée. Pour préparer 2,5 L de TAE 0,25 x à partir d'une solution de TAE 1x, ajoutez 625 ml de TAE 1x à 1,875 ml d'eau distillée.

Remarque : n'utilisez pas de TAE 0,25 x pour réaliser des gels d'agarose ; cela peut entraîner une perte de résolution de l'ADN.

Pour exécuter les gels :

Placer le gel dans une chambre d'électrophorèse et le recouvrir de TAE 0,25x ; s'assurer que le gel est immergé. Charger les gels à 200 V pendant 20 minutes au maximum. Surveillez la progression du colorant de chargement du gel pour avoir une idée relative de la progression de l'électrophorèse.

Avis juridiques

Avis concernant les thermocycleurs et les systèmes en temps réel Bio-Rad :
L'achat de cet instrument confère à l'acheteur une immunité limitée et non transférable contre toute poursuite judiciaire pour ses propres activités de recherche et de développement internes et pour une utilisation dans des domaines d'application autres que le diagnostic in vitro humain, en vertu d'un ou plusieurs des brevets américains n° 5 656 493, 5 333 675, 5 475 610 (revendications 1, 44, 158, 160-163 et 167 uniquement) et 6 703 236 (revendications 1-7 uniquement), ou des revendications correspondantes dans leurs équivalents non américains, détenus par Applera Corporation. Aucun droit n'est transmis expressément, implicitement ou par estoppel en vertu de toute autre revendication de brevet, telle que les revendications relatives aux appareils, réactifs, kits ou méthodes telles que les méthodes de nucléase 5'. De plus amples informations sur l'achat de licences peuvent être obtenues en contactant le Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, É.-U.. Les thermocycleurs en temps réel de Bio-Rad sont des thermocycleurs en temps réel sous licence en vertu du brevet américain n° 6 814 934 B1 d'Applera pour une utilisation en recherche et pour tous autres domaines, à l'exception des domaines du diagnostic humain et du diagnostic vétérinaire. L'achat de l'ADN polymérase iTaq^{MC} comprend une immunité de poursuite au titre des brevets spécifiés dans la notice du produit pour utiliser uniquement la quantité achetée pour la recherche interne de l'acheteur. Aucun autre droit de brevet (tel que les droits de brevet du procédé 5' Nuclease) n'est transmis expressément, implicitement ou par estoppel. De plus amples informations sur l'achat de licences peuvent être obtenues en contactant le directeur des licences, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, É.-U.

Marques commerciales

Roundup Ready est une marque de commerce de Monsanto Company

© 2011 Bio-Rad Laboratories Inc



Bio-Rad
Laboratories, Inc.



Life
Science
Group

Site web www.bio-rad.com USA 800 424 6723 Australie 61 2 9914 2800 Autriche 01 877 89 01 Belgique 09 385 55 11 Brésil 55 31 3689 6600
Canada 905 364 3435 Chine 86 21 6169 8500 République tchèque 420 241 430 532 Danemark 44 52 10 00 Finlande 09 804 22 00
France 01 47 95 69 65 Allemagne 089 31 884 0 Grèce 30 210 777 4396 Hong Kong 852 2789 3300 Hongrie 36 1 459 6100 Inde 91 124 4029300
Israël 03 963 6050 Italie 39 02 216091 Japon 03 6361 7000 Corée 82 2 3473 4460 Malaisie 60 3 2117 5260 Mexique 52 555 488 7670
Pays-Bas 0318 540666 Nouvelle-Zélande 64 9 415 2280 Norvège 23 38 41 30 Pologne 48 22 331 99 99 Portugal 351 21 472 7700
Russie 7 495 721 14 04 Singapour 65 6415 3170 Afrique du Sud 27 861 246 723 Espagne 34 91 590 5200 Suède 08 555 12700
Suisse 061 717 95 55 Taiwan 886 2 2578 7189 Thaïlande 66 2 6518311 Royaume-Uni 020 8328 2000

Sig 0211

10002155 Rex C