

+

TP 1

Recherche de l'ADN de *Tuber melanosporum* dans les mycorhizes

Application du Tp de biologie moléculaire de BTSA 1 pour les trufficulteurs de la Drôme des collines.



Une mycorhize est le résultat de l'association symbiotique, appelée mycorrhization, entre des champignons et les racines des plantes

TP1 BIOMOL : DÉTECTION *TUBER MELANOSPORUM*

Les objectifs du TP :

- Mettre en œuvre une technique de biologie moléculaire dans un objectif analytique :
- Décrire, expliquer et mettre en œuvre une technique de biologie moléculaire : La PCR, la séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose
- Utiliser des appareillages tels que thermocycler, matériels d'électrophorèse, table UV, Scanner de gel...
- Exploiter et interpréter les résultats de manière critique

Remarque : travail préalable sur les amorces

2 paires d'amorces (« primers ») seront employées :

Spécificité	nom	nbr de bases	séquences	Produit amplifié
<i>T melanosporum</i>	ITSM	22 bases	5'-TGGCCATGTGTCAGATTTAGTA-3'	440pb
	ITS4LNG	22 bases	5'-TGATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'	
<i>T brumale</i>	ITSB	23 bases	5'-CAATGTCAGAGCCAATCTAATGC-3'	700pb
	ITS4LNG	22 bases	5'-TGATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'	

PROTOCOLE : Organisation travail par binôme

Chaque binôme doit réaliser l'extraction d'ADN à partir de truffes (échantillon TA et TM)

Echantillon TA Spore de truffes *Tuber melanosporum*
 TM mycorhize d'un plant

On pourrait envisager de faire 5 analyses :

Noms et origines	Nature de l'échantillon
TA	Echantillon + de Truffes
TM 1	Mycorhize de ...
TM 2	Mycorhize de ...
TM 3	Mycorhize de ...
TM 4	Echantillon négatif : Eau stérile

Expliquer le choix des analyses

1/ Extraction

Il peut être envisagé de faire une seule extraction par échantillon.
(Voir avec l'enseignant pour des explications et l'utilisation des produits)

Il est souhaitable de travailler sous PSM avec des gants :

Pour chaque échantillon :

A l'aide d'une pipette pasteur, prélever un échantillon dans 100µl de **Solution d'Extraction**.

(Toujours bien vérifier le volume restant pour les autres groupes)

Bien écraser dans les tubes pour faire sortir les cellules et l'ADN.

Placer les tubes au bain-marie à 95 °C pendant 10 minutes.

Vortexer brièvement

Ajouter 100µl de **Dilution Solution**.

Vortexer

2/ Préparation des MIX.

II.1 Choix des échantillons

Le milieu réactionnel final pour la PCR sera de 16 µl (mix) et 4 µl de l'ADN .
(Voir l'enseignant si problème)

II.2 Préparation des mix

Ci-joint le tableau de préparation des mix.

Dans l'idée, on prépare un grand volume de mix sans ADN pour éviter des erreurs.
Puis au final il faut préparer plusieurs petits tubes pour la PCR.

Réactifs KIT	[solution mère]	V sol mère en µL pour 1 mix 1 puit du gel	[finale]	V final	Exemple V sol pour 10 mix
1/ Eau sterile		3.6			36
2/ Amorce ITSM	10µmole.L ⁻¹	0.8	0,4µmole.L ⁻¹	20	8
3/ Amorce ITSB	10µmole.L ⁻¹	0.8	0,4µmole.L ⁻¹	20	8
4/ Amorce ITS4LNG	10µmole.L ⁻¹	0.8	0,4µmole.L ⁻¹	20	8
5/ Ajouter l'ADN étudié dans les tubes. Penser à faire un tube négatif		4			?
6/ RED extract N Amp PCR readymix 2X		10			?
	Vol mix en µL	20			200

Remarque ; la red extract doit être mis en dernier, car il est très actif et agit rapidement

3/ Mise en route du thermocycler et programmation

Vérifier la programmation de l'appareil pour le programme tuber 1

STEP 1	95°C – 3 min, 1 cycle
STEP 1 - Séparation	94 °C – 30 secondes
STEP 2 - Hybridation	63 °C – 30 secondes
STEP 3 - Elongation	72 °C – 45 secondes
Nbr de cycles	23
STEP 1	72 °c – 7 minutes
Nbr de cycles	1
END	

4/ Préparation du gel d'électrophorèse

4.1 Rappel sur le principe de fonctionnement avec le choix du gel !

Concentration en agarose (%)	Domaines de séparation efficace de molécules d'ADN bicaténares linéaires (taille en kb)
0.3	5 – 40
0.4	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.9	0.5 – 7
1.2	0.4 – 4
1.5	0.2 – 3
2	0.1 – 2

4.2 Préparation du gel

- Préparer une solution d'agarose à 1,5 % TBE 1X
(Volume en fonction des cuves : 40mL pour les minicuves)
- Fusion au micro-onde de l'agarose 3min (position moyen+).
Homogénéiser toutes les 30 s.

Prendre des gants pour se protéger de la chaleur

- Transférer l'agarose liquide dans un tube « type Falcon »

4.3 Ajout du gel red et fabrication du gel

Sous une hotte de chimie. (Voir l'enseignant pour la sécurité des produits).

Prendre des gants, prendre la pipette pour le gel red...

- Incorporer dans ce tube le gel red à raison de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ final dans le tube falcon.
(Soit 4 μl d'une solution mère à 10 mg.mL^{-1} pour 40 ml de gel)
- Préparer le moule .../... sous la hotte de chimie
- Couler le gel dans le moule. Jeter le tube dans la poubelle « mutagène BET »
Insérer le peigne. Attendre la solidification (20 minutes environ) et enlever le peigne.

➤ **ATTENTION : Le gel red se liant à l'ADN est donc hautement mutagène et donc cancérigène, par contact seulement : il est donc absolument INTERDIT de manipuler sans gants au nitrile (gants bleus)**

4.4 Mise en place du gel dans la cuve d'électrophorèse.

- Déposer le gel et son support dans la cuve.
- Ajouter le **tampon de migration TBE 1X** jusqu'à recouvrir le gel

5/ Dépôts des produits PCR et marqueur de taille

Pour chaque échantillon :

Déposer des gouttes de 2 µl de bleu de charge sur un carré de parafilm. et mélanger avec 10 µl d'amplifiât PCR. Déposer uniquement 10 µL par puit...

Pour le marqueur de taille « Ladder 100pb»: (5 µl de Marqueur)

Déposer 10 µl de chaque mélange dans les puits

Connaître les rôles :

Un marqueur de poids moléculaire est une solution de molécules d'ADN ou de protéines servant à déterminer le poids moléculaire de fragments d'ADN ou de protéine. Ils sont couramment utilisés dans les différents types d'électrophorèse (en gel d'agarose, gels SDS-PAGE...).

Le tampons de charge pour gel d'ADN doivent être mélangés avec des échantillons contenant de l'ADN pour faciliter le chargement des échantillons dans les puits pour électrophorèse horizontale et verticale sur agarose et polyacrylamide. Les tampons de charge 10X se composent de 0,21% de bleu de bromophénol, 0,21% de xylène cyanol FF, 0,2M EDTA, pH 8,0, et 50% de glycérol dans de l'eau de qualité biologique moléculaire. Les tampons de charge 6X se composent de 0,03% de bleu de bromophénol, 0,03% de xylène cyanol FF, 60 mM EDTA, pH 7,6, et 60% de glycérol dans de l'eau de qualité biologique moléculaire.

6/ Migration et lecture

Lancer la migration en veillant au sens de migration :

Du négatif au positif : Pourquoi
Migration 120 V – 30 min

Lecture du gel :

Prendre des gants pour transporter le gel avec son support.
Placer le gel sur la table UV en UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

Récupérer les résultats :

Scanner le gel avec l'appareil doc print .Transférer l'image sur PC

ATTENTION : les UV peuvent causer de très graves brûlures aux yeux-. Ils sont par contre très peu pénétrants et sont arrêtés par le plexiglas, Il est donc OBLIGATOIRE de fermer la plaque de protection de la table à UV et d'utiliser des gants pour manipuler les gels

Feuille calcul mix Tuber

réactifs	[solution mère]	V sol mère en μL pour 1 mix	[finale]	V final	V sol pour 20 mix par binome
Tampon Taq	10 x	5	1x	50	100
MgCl ₂	50 mmole.L ⁻¹	4	4 mmole.L ⁻¹	50	80
dNTP mix des 4 dNTP	10 mmole.L ⁻¹	1	200 $\mu\text{mole.L}^{-1}$ = 0,2 mmol.L ⁻¹	50	20
Amorce ITSM	10 $\mu\text{mole.L}^{-1}$	2	0,4 $\mu\text{mole.L}^{-1}$	50	40
Amorce ITSB	10 $\mu\text{mole.L}^{-1}$	2	0,4 $\mu\text{mole.L}^{-1}$	50	40
Amorce ITS4LNG	10 $\mu\text{mole.L}^{-1}$	2	0,4 $\mu\text{mole.L}^{-1}$	50	40
Taq polymérase*	5 U μL^{-1}	0,5	2,5 U par tube	50	10
Eau stérile	-	31,5	qsp V _f = 48 μL	50	630
	Vol mix en μL				

FICHE N° 1' Feuille calcul mix KIT

Réactifs KIT	[solution mère]	V sol mère en μL pour 1 mix	[finale]	V final	V sol pour 10 mix
Eau sterile		3,6			36
RED extract N Amp PCR readymix 2X		10		20	100
Amorce ITSM	$10\mu\text{mole.L}^{-1}$	0,8	$0,4\mu\text{mole.L}^{-1}$	20	8
Amorce ITSB	$10\mu\text{mole.L}^{-1}$	0,8	$0,4\mu\text{mole.L}^{-1}$	20	8
Amorce ITS4LNG	$10\mu\text{mole.L}^{-1}$	0,8	$0,4\mu\text{mole.L}^{-1}$	20	8
Extrait ADN		4			
	Vol mix en μL	20			