

NOTICE TECHNIQUE

La PCR appliquée en génétique Mendélienne



Réf. : K12PLA

Conception, réalisation, production :
École de l'ADN - 30015 Nîmes, www.ecole-adn.fr

Édition :
APBG - 69356 Lyon, www.apbg.org

Produit Français, fabriqué à Nîmes (Gard) conforme à la réglementation européenne.
Rédaction juillet. 2012, version 1208

1- PRESENTATION

1-1 OBJECTIF

Le monde végétal peut développer des moyens d'adaptation ou des mécanismes de défense, notamment contre les multiples agressions du milieu environnant. Cela concerne aussi bien le système aérien des plantes (feuilles et tiges), que le système souterrain (racine). Ces adaptations peuvent être mises en évidence par des méthodes d'exploration génétique telles que la Réaction de Polymérisation en Chaîne ou PCR.

Les applications de la PCR sont multiples. Cette technique peut s'appliquer tant dans le cadre de l'identification d'une variété, que dans le contrôle de la pureté variétale ou la protection d'une variété.

La Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) fait partie des stratégies d'explorations génétiques les plus employées en biologie moléculaire. Cette méthode permet d'amplifier spécifiquement une région de l'ADN double brin de quelques centaines à plusieurs milliers de paires de bases. Ceci grâce à l'activité spécifiques d'enzymes extrêmophiles comme la Taq polymérase par exemple.

Voir le cours sur le PCR téléchargeable sur notre site L'ecole/Documents en ligne.

La PCR permet, entre autre, de révéler des marqueurs génétiques. Ce sont de courtes séquences d'ADN qui diffèrent selon les individus, les espèces, les genres, ou encore par la présence d'une séquence présentant un avantage sélectif.

Ce kit, dans sa conception, propose des fragments ADN amplifiés à partir de deux plants de vignes. L'un correspondant à une variété hybride résistante à la maladie, ayant intégré de façon stable, le gène de résistance, et le second correspondant à la variété receveuse de bonne valeur agronomique, mais sensible à la maladie.

Ces deux ADN amplifiés sont prêts à être déposés sur gel pour être comparés entre eux.

1-2 Méthodologie

Il s'agit de travaux pratiques comportant une phase expérimentale menée directement par l'élève avec des exigences de rigueur, d'habileté et de respect des principes d'hygiène et de sécurité.

Une telle phase pratique se replace dans l'ensemble d'un raisonnement scientifique expérimental.

1-3 Place dans les programmes

Cette méthodologie, associée à la technique de PCR, correspond très bien à l'optique du programme et des objectifs de spécialité SVT, de terminale S ainsi que les filières STL et BTS bioanalyse et contrôle.

Problématique:

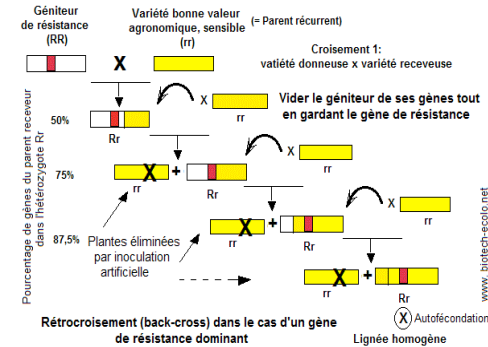
Recherche d'une voie d'amélioration de la résistance à l'oïdium chez la vigne (*Vitis Vinifera*) par croisement successif de ses hybrides F1 avec la variété receveuse sensible. (Programme de recherche)

L'oïdium est l'un des deux principaux parasites de la vigne. L'oïdium de la vigne (*Uncinula necator*) est visible à l'œil nu sous forme d'un feutrage blanc-grisâtre pulvérulent, il couvre l'intégralité des feuilles, des jeunes pousses et des grappes. Ce champignon ne peut être cultivé sur milieu artificiel.

Sa croissance est favorisée par des températures entre 25 et 28 °C, en absence d'eau après éclatement des bourgeons. Le traitement peut associer une préparation à base de cuivre, à une utilisation de plantes (en macération ou décoction) d'Ortie ou de Prêle des Champs. Le coût engendré par les traitements phytosanitaires restant élevé, il est souhaitable de s'orienter vers l'étude de nouveaux types de protection de la vigne.

Les chercheurs ont entrepris la sélection de variétés résistantes par l'introgession chez *Vitis vinifera*, d'un gène issu de l'espèce *Muscadinia rotundifolia*, nommé **Run1**. Ce dernier confère une résistance totale à l'oïdium. Il est sélectionné après plusieurs croisements successifs à partir d'un hybride F1 afin de limiter au maximum la proportion de gène non *Vitis vinifera* < 1% (tout en conservant le caractère de résistance).

Schéma opératoire :



Rappel sur les lois de Mendel :

PARENTS	R (résistant)	R (résistant)
r (sensible)	Rr	Rr
r (sensible)	Rr	Rr

Tableau de croisement :
Monohybridisme avec dominance (ici le gène de résistance est dominant)

PARENTS	R (résistant)	r (sensible)
r (sensible)	Rr	rr
r (sensible)	Rr	rr

Tableau de croisement :
Sélection de la variété vidée de ces gènes tout en fixant le gène de résistance

2 - PRESENTATION DU KIT

Ce kit présente des réactifs qui sont prêts à être déposés sur un gel d'agarose de 1 % à 1,2 % maximum. Les réactifs sont fournis de sorte à réaliser 20 dépôts de 20 µl pour chaque échantillon.

2-1 Constitution du kit:

- ADN de la plante sensible **450 µl d'ADN (r)**;
- ADN de la plante résistante **450 µl d'ADN (R)**;
- 1 tube marqueur de taille **50 µl** ;

2-2 Caractéristiques et conseils d'utilisation des réactifs

Tous les réactifs sont directement prêts à l'emploi. Les réactifs doivent être maintenus à 2 – 8°C.

Conservés à cette température ils ont une stabilité de 4 mois à 2 – 8 °C ou 48 heures s'ils sont maintenus à température ambiante.

- Il est recommandé de ne pas maintenir les réactifs de façon prolongée à température ambiante.
- Ne pas congeler.
- Dans tous les cas se référer aux spécifications de stockage mentionnées sur l'étiquette.

3- PROTOCOLE

3-1 Matériels complémentaires nécessaires au laboratoire (non fournis):

- Micro-pipettes ;
- Cuve à électrophorèse ;
- Appareil photo Polaroid® Gelcam pour biologie moléculaire (option);
- Portoirs pour tubes Eppendorfs® ;
- Marqueurs indélébiles ;
- Poubelle adaptées à la nature des déchets biologiques

3.2 Consommables

- Embouts pour micro-pipettes 200 µl ;
- tubes de type Eppendorfs® ;

3.3 Réactifs complémentaires nécessaires

Tous les réactifs nécessaires pour réaliser une électrophorèse en gel d'agarose, de 1 à 1,2%.

Voir Kit : Préparation d'un gel d'agarose réf. : DT-06

3.4 Opérations préalables aux travaux pratiques

Stérilisation du matériel et des réactifs :

Aucune stérilisation ni préparation de matériel spécifique.

Préparation des gels d'agarose:

Il est conseillé de préparer le gel d'agarose pour l'électrophorèse avant la séance de travaux pratiques. Se référer à votre procédure et protocole interne au laboratoire.

Préparation des solutions :

Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.

4- PREPARATION DE L'EXPERIMENTATION

4-1 Préparation préalable de la séance

Pour chaque poste, préparer des échantillons d'au moins 20 microlitres de chaque ADN.

- 20 µl d'ADN (r) - plante sensible ;
- 20 µl d'ADN (R) - plante résistante;

4-2 Déroulement de la séance (manipulation par les élèves)

Manipulation par les élèves

Les élèves déposent directement 20 µl de chaque ADN dans un puits de gel d'agarose traditionnel à 1 – 1,2 % d'agarose . Seulement 5 µl de marqueur de taille suffisent par gel dans un puits.

La révélation des fragments d'ADN se fait après une migration à 100 volts pendant 30 minutes ou 135 volts pendant 20 minutes.

Pour la coloration de l'ADN se référer à votre procédure et protocole interne au laboratoire.

Ces échantillons sont également adaptés pour le système qui utilise les « FlashGel® Cassettes » ; il suffit avec ce système de déposer seulement 5 microlitres de chaque échantillon.

Se référer à la notice technique du produit :
Réf. DT-FG2 ou DT-FG4.

Dans tous les cas d'utilisation de gels d'agaroses spécifiques se reporter aux spécificités d'utilisations décrites par le fabricant.

4-3 Résultats attendus

Pour l'intérêt pédagogique de cet atelier, le résultat proposé est celui d'une PCR multiplexe réalisée de façon réglementaire pour la détection et l'amplification de deux gènes dans la même réaction de PCR.

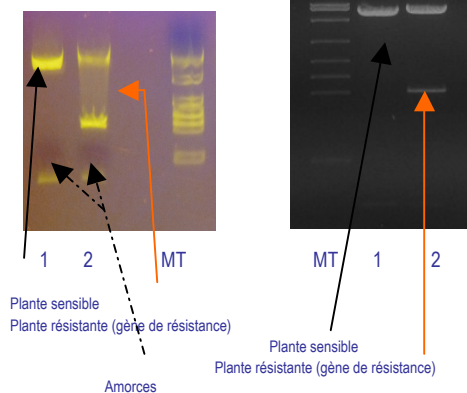
1 gene polymorphe de vigne VMC 5g7 : 900 pb
1 gene Run 1 (résistance à l'oidium) : 400 pb

Le détail du protocole PCR pour cette experimentation est disponible sur notre site ([L'école/Documents en ligne](#)).

Résultats de l'électrophorèse des produits d'amplification PCR

Photo sur cassette Flashgel

Photo sur gel coloré au BET



MT : marqueur de taille

Piste 1: plante sensible (r) bande à 900 pb
Piste 2: plante résistante (R) bandes à 400 pb + bande à 900 pb

Interprétation des résultats :

Problématique : il s'agit d'identifier la plante qui présente le gène de résistance et donc porteuse de l'amplicon (produit PCR) de 400 pb.

Que conclure :

Dans les deux cas les produits d'amplification PCR correspondent à de la vigne, car on observe le fragment VMC 5g7 de 900pb spécifique de *Vitis vinifera*.

On observe sur la piste 2, le marqueur génétique correspondant à la présence du gène de résistance chez la variété sélectionnée. Ce qui permet de confirmer la transmission du caractère génétique Run 1 et sa fixation lors des croisements successifs.

Les données permettent de conclure en l'acquisition du gène chez la plante 2, traduit par la présence d'un fragment d'amplification d'ADN de 400 pb chez cette plante. Cette bande n'est pas visible chez la plante sensible à la maladie (r) piste 1.

5- CONSIGNES DE SECURITE

Les réactifs qui constituent ce kit pédagogique ne présentent aucun caractère dangereux, toxique ou pathogène.
La fiche de sécurité MSDS est disponible, sur simple demande auprès de l'École de l'ADN.

Au début de chaque formation, il est néanmoins important de sensibiliser les élèves aux risques encourus lors des manipulations :

- se référer aux mesures de sécurité d'utilisation des appareils électriques et matériels ;
- utiliser les précautions d'usage pour toutes manipulations de produits dangereux ou toxiques ;

En cas d'ingestion informez le médecin responsable ou contactez le centre antipoison le plus proche.

Précautions spécifiques :

Le port de gants et de la blouse est conseillé.
Mesures d'hygiène : se laver les mains avant et après l'expérimentation.

Dans le cadre d'une révélation des fragments d'ADN au BET, il est important de veiller à respecter rigoureusement ces recommandations :

Interdire formellement aux élèves de manipuler le gel d'agarose chargé en BET, (manipulation effectuée par le professeur préalablement formé) ;
Porter des lunettes de protection en utilisant la table UV ;
Pour l'élimination du BET chaque établissement doit se référer à sa procédure interne de « traitement des déchets ».

La fiche de consigne de sécurité MSDS est disponible en ligne sur le site www.ecole-adn.fr/MSDS

Contact commande

APBG - B.P. 8337
69356 Lyon cedex 08

tel 04 78 74 47 22
fax 04 78 01 22 14

apbg@wanadoo.fr

www.apbg.org

Informations Renseignements

Ecole de l'ADN
19, Grand Rue
BP 81295
F-30015 Nîmes Cedex 1

Tel/fax : +33 (0) 466 67 82 29

E-mail : info@ecole-adn.fr

www.ecole-adn.fr

**DNATOOLS est une marque
déposée par l'école de l'ADN**

Action parrainée par
Thermo Scientific Molecular Biology

