

## A RÉCEPTION DU COLIS :

- ☑ **Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- ☑ **Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :

**Ouvrir le carton, ⚠ Placer les éléments suivants au congélateur à - 20°C ⚠**

### **Sachet AX :**

- 200 µl de MIX PCR (tube à bouchon bleu) comprenant :  
La Taq polymérase  
dNTP  
Tampon PCR avec Mg2 +  
Colorant de charge sur gel
- 20 µl d'amorces 5' : A (tube à bouchon orange)
- 20 µl d'amorces 3' : B (tube à bouchon marron)
- 2 x 400 µl de Tampon d'extraction de l'ADN (tube à bouchon incolore)
- 2 x 15 µl de protéinase K (tube à bouchon blanc)
- 50 µl de marqueur de poids moléculaire taille 100 pb avec bleu de charge (tube à bouchon rouge)
- 20 µl d'enzyme de restriction (tube à bouchon vert)
- 45 µl de tampon R 10X (tube à bouchon violet)

**Centrifugez les tubes avant utilisation.**

Les éléments suivants se stockent à température ambiante :

- 100 microtubes à PCR

**Les réactifs doivent être utilisés dans les 2 mois suivant leur réception.**

Tous les composants de ce kit sont sans danger. Les règles de manipulations en laboratoire s'appliquent toutefois (le port de gants, lunettes et blouse est conseillé). Tous les résidus peuvent être jetés à l'évier.

**FICHIERS DISPONIBLES SUR <https://www.sordalab.com/>**

- Cytochrome oxydase I.edi (Geniegen 2)
- Protéinase K.pdb / Protéinase K + lactoferrine.pdb / Protéinase K + mercure (Libmol)
- Taq polymerase.pdb (Libmol)
- Cytochrome c oxydase bovine.pdb (Libmol)

## MATÉRIEL ET CONSOMMABLES NECESSAIRES

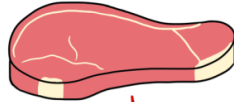
- Échantillons de bœuf, agneau, merguez (ou autre préparation culinaire contenant du bœuf et/ou de l'agneau)
- Agarose
- Tampon TBE 1X
- Agent révélateur de l'ADN : **GELGREEN (2µl pour 25 ml de gel) : conseillé pour ce kit**
- Thermocycleur MINIPCR ou autre marque
- Cuve à électrophorèse d'ADN, idéalement BLUEGEL ou autre cuve avec transilluminateur pour une visualisation en temps réel de la migration
- Micropipettes : 2-20 µL

- Techniques utilisées : extraction de l'ADN, PCR, digestion par enzyme de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation de l'ADN.
- Temps requis : deux séances de 1h (+ 1h10 pour la PCR)

Les différentes étapes de la manipulation

Séance 1

Bœuf  
(*Bos taurus*)



Merguez  
(Merguez sp)



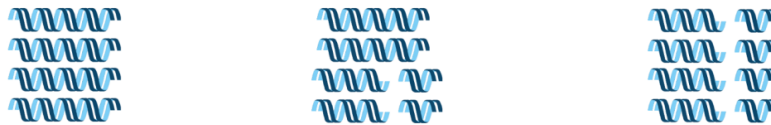
Mouton  
(*Ovis aries*)



Extraction de l'ADN

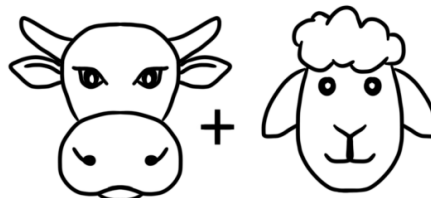
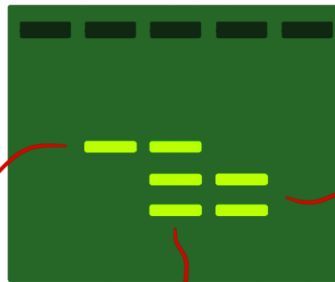
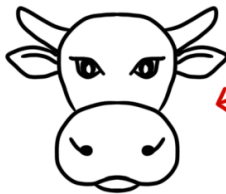


PCR



Digestion enzymatique

Séance 2



Électrophorèse sur gel d'agarose

## OBJECTIFS COGNITIFS

Les merguez sont de délicieuses petites saucisses épicées composées de bœuf et/ou de mouton (ou d'agneau). Présentes dès le moyen-âge dans la cuisine berbéro-musulmane, les merguez ont traversé les âges pour devenir les saucisses préférées des français (ex-aequo avec les chipolatas). Il s'en écoule pas moins de 120 000 tonnes par an !

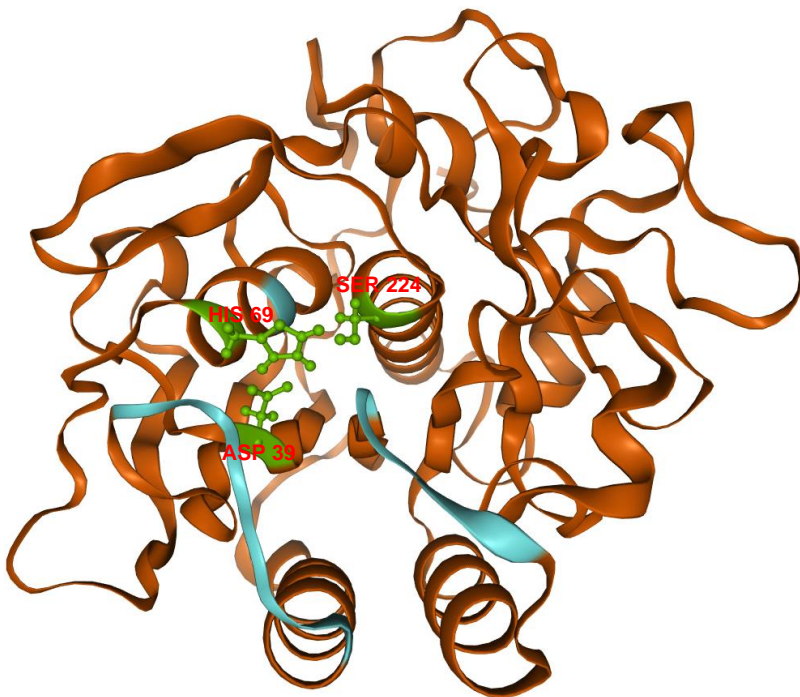
Certains fabricants peu scrupuleux ne respectent pas le cahier des charges de la merguez, et la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) a constaté en 2017 que pratiquement une merguez sur deux n'était pas conforme.

Aussi, un Label Rouge « Merguez véritable » a vu le jour en 2018. Pour pouvoir prétendre à cette certification, les merguez doivent être composées de viande de bœuf Label Rouge et par une proportion importante (entre 20 et 30 %) de viande ovine. De plus, leur coloration doit être uniquement due à l'utilisation d'épices comme le paprika, le curcuma et le piment. L'utilisation d'additifs est interdite. Le boyau employé pour la mise en forme est naturel et non coloré.

Soucieux de votre alimentation, vous souhaitez déterminer si la composition des viandes des (succulentes) merguez de la cantine respecte le cahier des charges du Label Rouge « Merguez véritable ». Pour ce faire, vous allez appliquer différentes techniques de biologie moléculaire :

### 1- Extraction de l'ADN :

Vous allez extraire l'ADN contenu dans un échantillon de merguez. Pour ce faire, vous utiliserez un tampon de lyse contenant une enzyme, la protéinase K. Couramment utilisée en biologie moléculaire, cette endopeptidase a été découverte en 1974 dans des extraits du champignon ascomycète *Parengyodontium album*. Sa capacité à digérer la kératine lui a valu son nom de « protéinase K ».



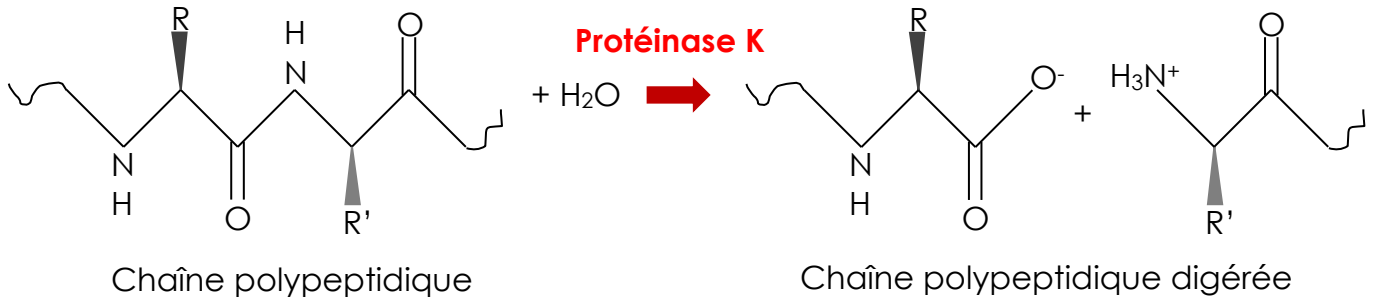
Le site actif de la protéinase K est une triade catalytique composée de 3 acides aminés (acide aspartique 39, histidine 69, serine 224).

Les sites de reconnaissance du substrat sont deux parties de la chaîne polypeptidique, 99-104 et 132-136. Il est également composé d'une cystéine 73 libre située à proximité de l'histidine 69

**Fig. 1 : Structure d'une protéinase K de *Parengyodontium album***

(En vert : acides aminés du site actif, en bleu : sites de reconnaissance du substrat)

Pendant une courte étape d'incubation (2 min à 37°C), cette enzyme va dégrader les tissus en digérant les protéines de la matrice extracellulaire et inactiver les nucléases qui pourraient dégrader l'ADN lors de l'extraction.



**Fig. 2 : Mode d'action de la protéinase K**

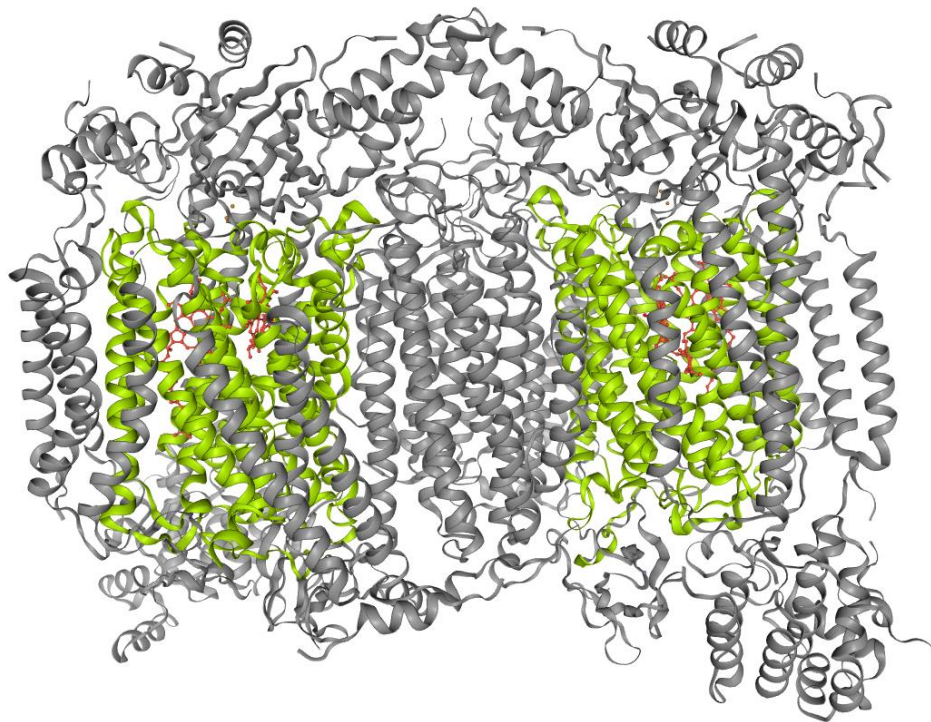
L'échantillon sera ensuite chauffé à 95°C pendant 1 min afin de lyser les membranes cellulaires (plasmiques, nucléaires, mitochondriales...). L'ADN sera ainsi libéré dans le tampon d'extraction.

Pour obtenir des témoins, vous extrayez de la même manière l'ADN d'échantillons de viandes de bœuf (*bos taurus*) et de mouton (*Ovis aries*).

## 2- Amplification d'une partie du gène mitochondrial COI par PCR :

Pour déterminer les viandes utilisées dans vos merguez, vous ne pourrez pas utiliser l'ADN extrait tel quel. Il vous faudra amplifier une séquence particulière permettant de discriminer la viande de bœuf de la viande de mouton.

Vous allez amplifier par PCR une partie du gène mitochondrial COI codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase, une protéine intervenant dans la chaîne respiratoire des mitochondries.



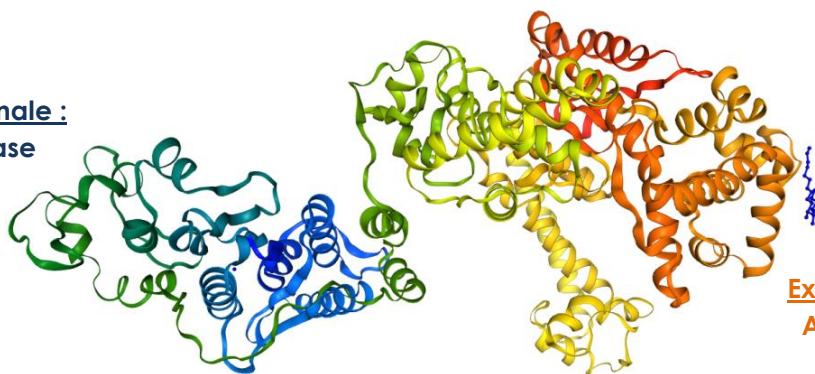
**Fig. 3 : Structure de la cytochrome c oxydase bovine**  
(la sous-unité 1 est colorée en vert)

La PCR : Réaction de polymérase en chaîne

La PCR (réaction en chaîne par polymérase) est une technique d'amplification génique mise au point par Kary Mullis en 1986. A partir d'une faible quantité de matériel génétique, la PCR permet de dupliquer une séquence d'ADN cible (amplicon) un grand nombre de fois. Depuis sa découverte, elle connaît de nombreuses évolutions et ses nombreuses applications la rendent incontournable en biologie moléculaire.

<b><u>Le milieu réactionnel</u></b>	
<b>Echantillon d'ADN</b>	L'échantillon d'ADN peut être issu de n'importe quelle source. Il peut être extrait d'un organisme suivant différents procédés et être utilisé pour réaliser la PCR. Dans le cas d'une Direct PCR quelques cellules (fragment de tissu, poils, cellules buccales...) peuvent être directement intégrées dans le mélange réactionnel. L'échantillon d'ADN sert de matrice pour l'amplification.
<b>ADN polymérase</b>	Les ADN polymérases sont des acteurs essentiels dans la réplication de l'ADN cible. La Taq polymérase est sans doute l'enzyme la plus connue utilisée pour la PCR. L'ADN polymérase Taq a une thermostabilité relativement élevée, avec une demi-vie d'environ 40 min à 95° C. Elle incorpore des nucléotides à une vitesse d'environ 60 bases par seconde à 70° C et peut amplifier des longueurs d'environ 5 kb. De nos jours, de nouvelles générations d'ADN polymérases ont été conçues pour améliorer considérablement les performances de la PCR.
<b>Amorces (Primers)</b>	Les amorces sont utilisées pour déterminer la séquence à amplifier. Les amorces de PCR sont des oligonucléotides d'ADN synthétiques d'environ 15 à 30 bases. Les amorces de PCR sont conçues pour se lier (via la complémentarité de séquence) aux séquences qui flanquent la région d'intérêt dans l'ADN matrice. Pendant la PCR, l'ADN polymérase synthétise le nouveau brin d'ADN à partir de leurs extrémités 3'.
<b>Desoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs)</b>	Les dNTP sont constitués de quatre nucléotides de base (dATP, dCTP, dGTP et dTTP). Ce sont les éléments constitutifs des nouveaux brins d'ADN. Ces quatre nucléotides sont généralement ajoutés à la réaction de PCR en quantités équimolaires pour une incorporation optimale des bases.
<b>L'ion magnésium (Mg<sup>2+</sup>)</b>	L'ion Mg <sup>2+</sup> fonctionne comme un cofacteur de l'activité des ADN polymérases en permettant l'incorporation des dNTPs pendant la polymérisation. Il facilite l'hybridation des amorces et des matrices d'ADN en stabilisant les charges négatives au niveau des groupements phosphates. Les ions Mg <sup>2+</sup> se lient au site actif de l'enzyme et catalysent la formation de liaisons phosphodiester entre le 3'-OH d'un dNTP et le groupement phosphate d'un autre dNTP.
<b>Tampon</b>	La PCR est réalisée dans un tampon qui fournit un environnement chimique approprié pour l'activité de l'ADN polymérase. Le pH du tampon est généralement compris entre 8,0 et 9,5 et est souvent stabilisé par du Tris-HCl.

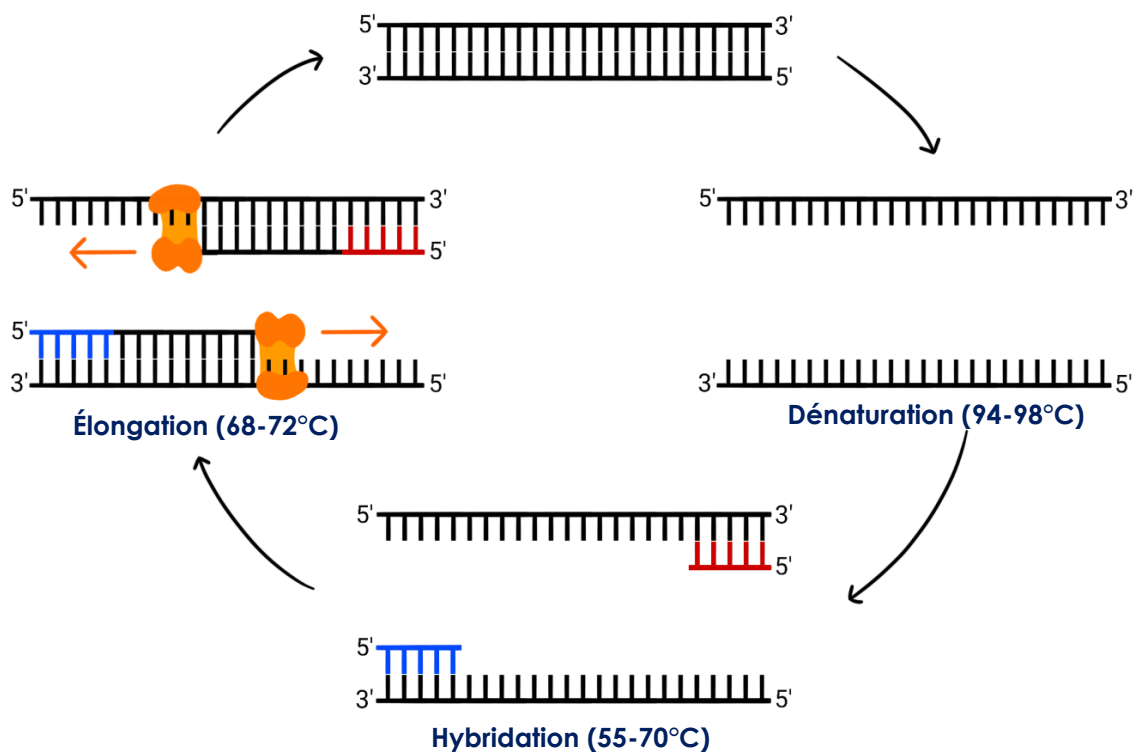
**Extrémité N-terminale :**  
Activité nucléase



**Extrémité C-terminale :**  
Activité polymérase

**Fig. 4 : Structure de la Taq polymérase de Thermus aquaticus**

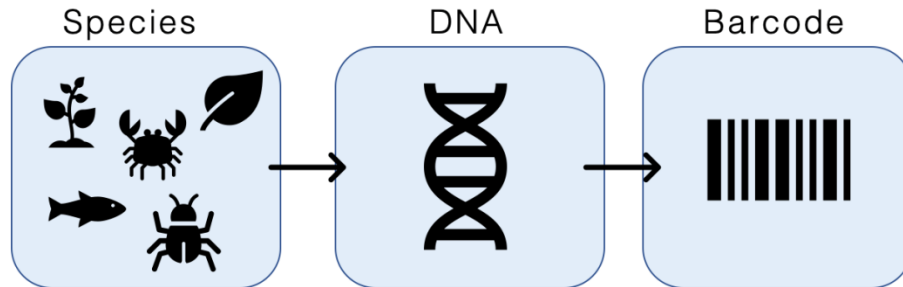
<b><u>Les étapes de la PCR</u></b>	
<b>Dénaturation initiale (94-98°C)</b>	L'étape de dénaturation initiale est réalisée au début de la PCR pour séparer l'ADN matrice double brin en monocaténaires afin que les amorces puissent se lier à la région cible et initier l'extension. La dénaturation complète de l'ADN d'entrée permet d'assurer une amplification efficace de la séquence cible pendant le premier cycle d'amplification. En outre, la température élevée à cette étape aide à inactiver les protéases ou nucléases thermolabiles qui peuvent être présentes dans l'échantillon, avec un impact minimal sur les ADN polymérases thermostables.
<b>Dénaturation (94-98°C)</b>	Après l'étape de dénaturation initiale, les cycles de PCR suivants commencent par une étape de dénaturation distincte. Le temps et la température doivent être optimisés en fonction de la nature de l'ADN matrice, de l'ADN polymérase et des composants du tampon.
<b>Hybridation (55-70°C)</b>	Dans cette étape, la température de réaction est abaissée pour permettre l'hybridation des amorces sur l'ADN cible.
<b>Élongation (68-72°C)</b>	Pour l'étape d'élongation, la température augmente pour atteindre la température optimale de l'ADN polymérase afin que son activité soit maximale. L'ADN polymérase incorpore des dNTPs pour polymériser le nouveau brin d'ADN complémentaire de la matrice à partir de l'extrémité 3'-OH des amorces.
<b>Nombre de cycles</b>	Les étapes de PCR de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sont répétées (ou «cyclées») plusieurs fois pour amplifier l'ADN cible. Le nombre de cycles est en général de 25 à 35, mais peut varier en fonction de la quantité d'ADN de départ et du rendement souhaité en produit de PCR.
<b>Élongation finale (68-72°C)</b>	La dernière étape d'extension suit l'achèvement du dernier cycle de PCR. Dans cette étape, le mélange PCR est incubé à la température d'élongation. La durée de cette étape finale dépend de la longueur et de la composition de l'amplicon et doit être optimisée pour assurer une polymérisation complète et un bon rendement de l'ADN cible.



**Fig. 5 : Illustration simplifiée des principales étapes de la PCR**

## Choix du gène COI : Merguez et barcoding moléculaire...

Le barcoding moléculaire est une technique permettant de caractériser une espèce à partir d'une courte séquence d'ADN commune à de nombreux organismes.



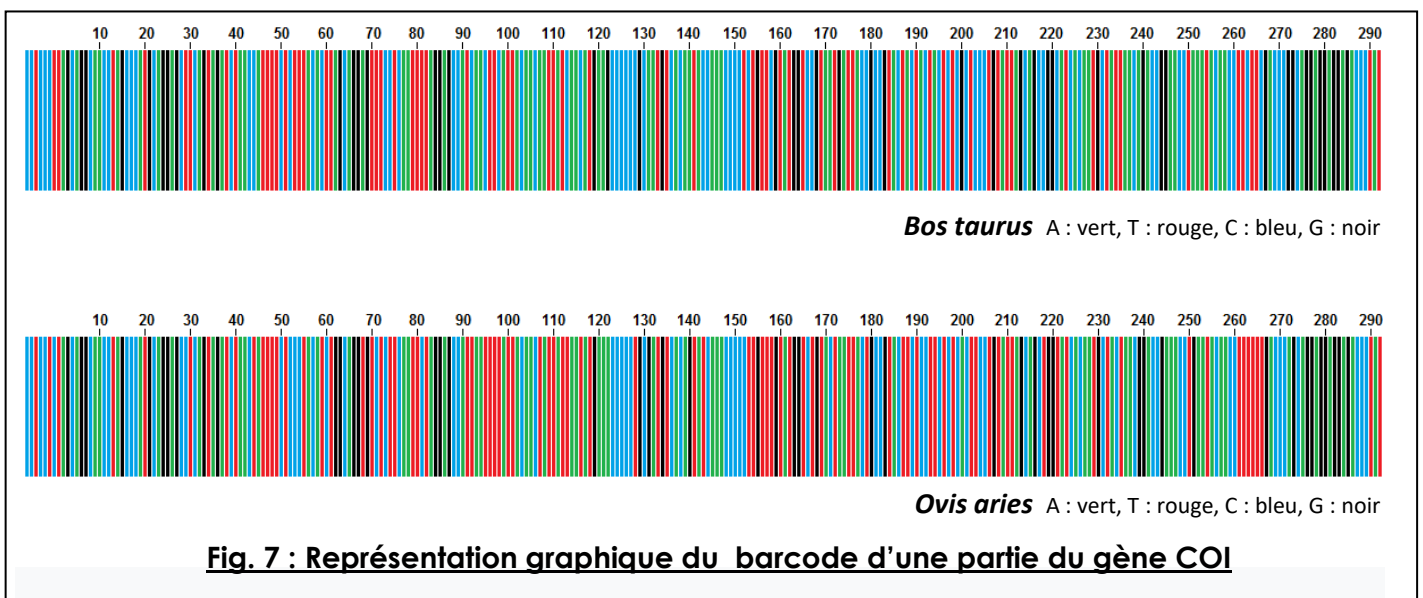
**Fig. 6 : Illustration de la technique du barcoding moléculaire**

(Par LarissaFruehe — Travail personnel, CC BY-SA 4.0,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=77645790>)

Chez les animaux, c'est le gène mitochondrial COI qui est utilisé. En effet, le gène COI a une faible variabilité entre les individus d'une même espèce et une forte variabilité entre les individus d'espèces différentes. De plus, les cellules contenant de nombreuses mitochondries, le gène COI est présent en de nombreux exemplaires, ce qui facilite son amplification et son séquençage.

Dans le cas d'une merguez, qui contient potentiellement les génomes de deux espèces différentes, nous pouvons parler de métabarcoding.

Les fragments d'ADN que vous allez amplifier sont composés de 292 pb. Après séquençage et traitement informatique, voici les barcodes que vous devriez obtenir :



**Fig. 7 : Représentation graphique du barcode d'une partie du gène COI**

Avec cette représentation, le terme de « barcoding moléculaire » prend tout son sens ! De la même manière qu'un code-barres UPC (code universel des produits) peut différencier une boîte d'œuf d'une pizza surgelée lorsqu'ils sont numérisés à l'épicerie, les séquences d'ADN peuvent être utilisées pour identifier différentes espèces.

**Malheureusement, vous ne disposez pas (encore !) de séquenceurs d'ADN. Aussi vous allez devoir utiliser d'autres biais pour discriminer la viande de bœuf de la viande de mouton.**

### 3- Digestion des produits de PCR par une enzyme de restriction :

Ne possédant pas de séquenceur d'ADN, vous allez utiliser une enzyme de restriction pour distinguer la viande de bœuf de la viande de mouton.

Une enzyme de restriction est une protéine capable de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence nucléotidique définie appelée site de restriction. Vous utiliserez les propriétés de l'enzyme de restriction AseI pour distinguer les parties du gène COI du bœuf et du mouton.

L'enzyme AseI reconnaît la séquence **5' ATTAAT 3'**. Parmi les fragments d'ADN que vous allez amplifier, cette séquence nucléotidique n'est présente que chez le mouton.

<b>Bos taurus 486/489</b>	5' --- CCATCAAC TT --- 3'	La séquence n'est pas reconnue par AseI, il n'y a pas coupure
<b>Bos taurus 507/510</b>	5' --- TTATCAAC AT --- 3'	

<b>Ovis aries 486/489</b>	5' --- CCATTAAT TT --- 3'	La séquence est reconnue par AseI, il y a coupure
<b>Ovis aries 507/510</b>	5' --- TTATTAAT AT --- 3'	

**Fig. 8 : Action de l'enzyme de restriction AseI**

Après digestion enzymatique, dans le cas d'une « merguez véritable », nous devrions donc obtenir des fragments d'ADN de 292 pb (*Bos taurus*) ainsi que des fragments de 91 pb, 21 pb et 180 pb (*Ovis aries*).



#### 4- Migration des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose :

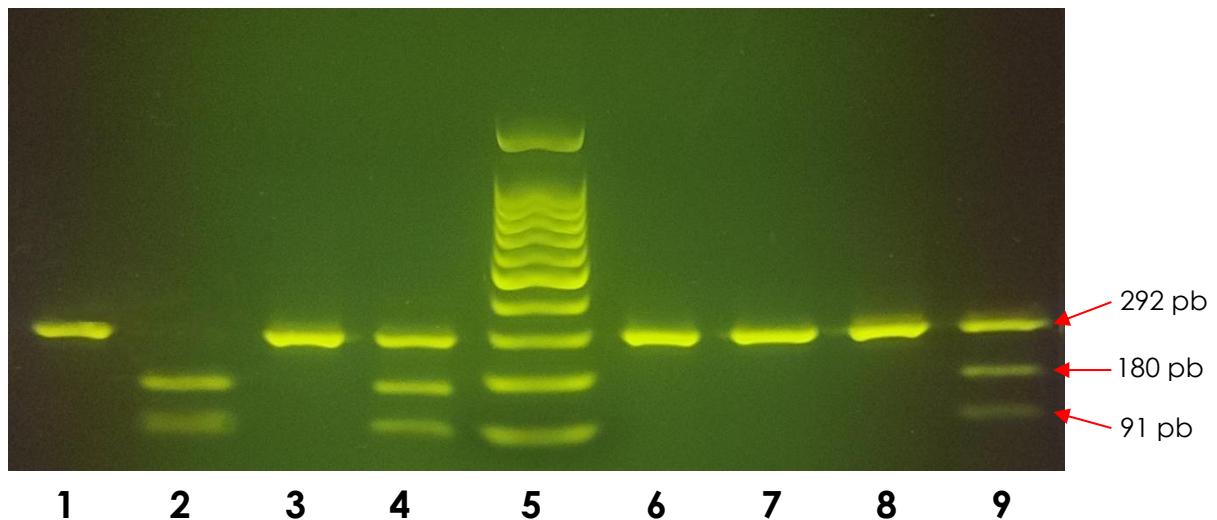
Pour pouvoir visualiser les fragments d'ADN obtenus après digestion enzymatique, vous allez réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose.

La vitesse de migration des fragments d'ADN dans le gel sera fonction de leur taille : plus les fragments seront petits et plus leur vitesse de migration sera élevée.

Remarque : les fragments d'ADN de 21 pb seront trop petits pour être observables.

#### Exemple de résultats attendus :

Les échantillons ont été déposés deux à deux : sans et avec digestion enzymatique.



1	Mouton sans digestion enzymatique
2	Mouton avec digestion enzymatique
3	Merguez A sans digestion enzymatique
4	Merguez A avec digestion enzymatique
5	Marqueur de taille
6	Bœuf sans digestion enzymatique
7	Bœuf avec digestion enzymatique
8	Merguez B sans digestion enzymatique
9	Merguez B avec digestion enzymatique

Dans cet exemple, les deux merguez étudiées contiennent bien de la viande de bœuf et de la viande de mouton.

Remarque : Certaines fois, la bande à 91 pb apparaît « doublée ». En effet l'enzyme de restriction *Asel* va effectuer une première coupure aléatoirement au niveau du nucléotide 485 ou du nucléotide 506. Si la première coupure a lieu au niveau du nucléotide 506, elle produit un fragment de 112 pb et un fragment de 180 pb. L'enzyme *Asel* aura alors du mal à se fixer sur le fragment de 112 pb et il ne sera pas digéré par la suite. Ainsi, la vitesse de migration des fragments de 91 et 112 pb étant très proche, nous aurons bien 2 bandes pratiquement accolées.

## PRÉPARATION DE LA SALLE

### 1- Séance 1 : Extraction /Amplification

Ce kit est conçu pour réaliser 18 tests. Cependant, si vous disposez d'un thermocycleur à 16 puits, vous pouvez réaliser 16 tests, de manière à avoir un peu de réactifs de secours en cas de mauvaise manipulation.

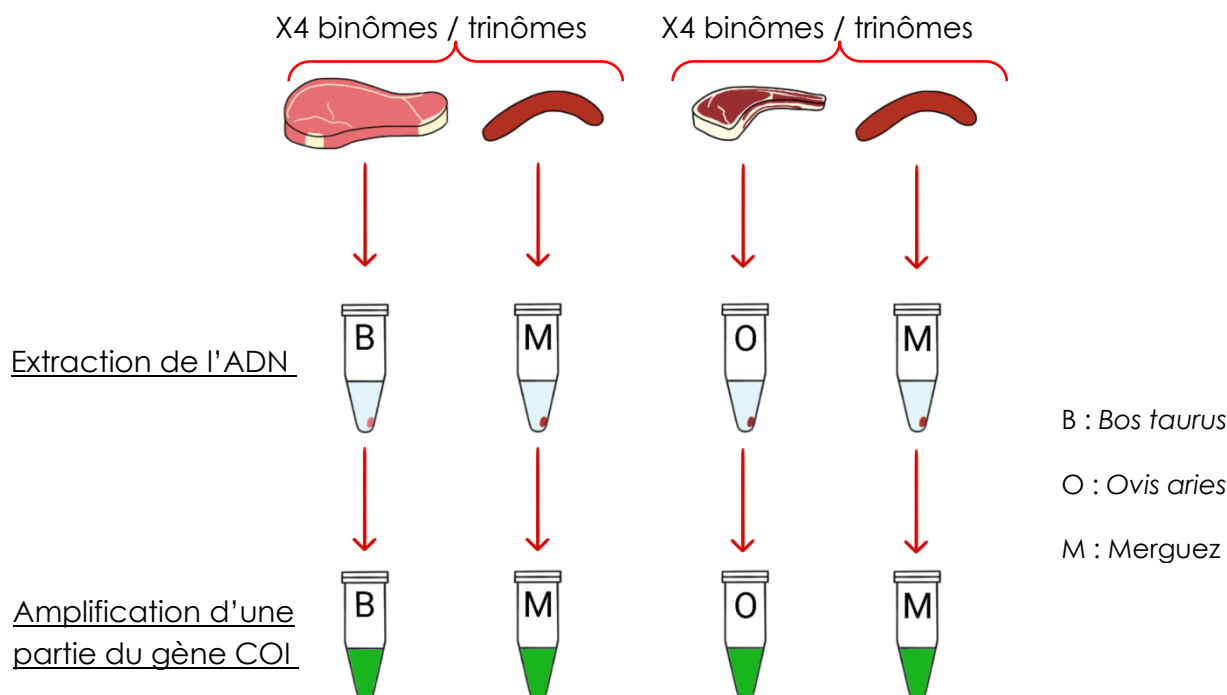
Chaque binôme /trinôme réalisera l'extraction et l'amplification d'un échantillon témoin (bœuf ou mouton) et d'un échantillon de merguez.

#### Matériel commun

Thermocycleur  
Centrifugeuse pour microtubes  
Vortex (optionnel)

#### Matériel par binôme / trinôme

1 portoir pour tubes PCR 0,2 ml  
1 portoir pour microtubes 1,5 ml  
2 tubes PCR contenant 40 µl de tampon de lyse  
2 tubes PCR vides  
2 microtubes 1,5 ml notés A contenant 11 µl d'amorce  
2 microtubes 1,5 ml notés M contenant 11 µl de Mix pour PCR  
1 micropipette 2-20 µl  
1 rack de pointes de micropipettes 20 µl  
1 marqueur indélébile à pointe fine  
1 mortier + pilon  
2 scalpels ou 2 lames de rasoir  
2 cure-dents ou deux aiguilles montées  
1 échantillon de 1 cm<sup>3</sup> de bœuf ou de mouton / agneau dans du papier aluminium  
1 échantillon de 1 cm de merguez dans du papier aluminium  
1 poubelle



A la fin de cette étape, nous obtenons **8 produits de PCR pour la merguez, 4 produits de PCR pour le bœuf et 4 produits de PCR pour le mouton**. Ces tubes peuvent être stockés au congélateur.

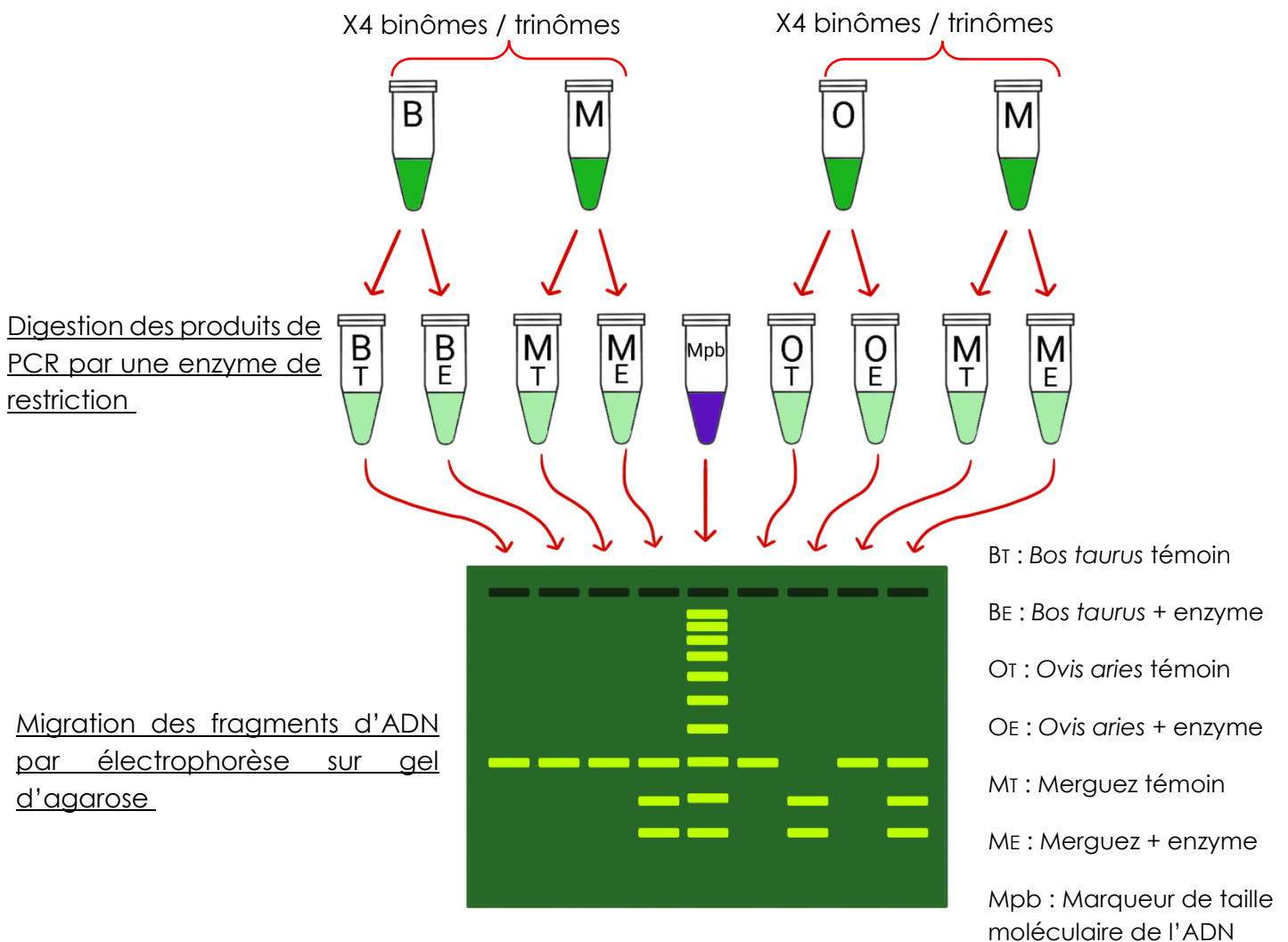
## 2- Séance 2 : Digestion / Migration

### Matériel commun

Thermocycleur ou bain-marie  
Centrifugeuse pour microtubes  
4 cuves à électrophorèse  
4 lampes à dissection

### Matériel par binôme / trinôme

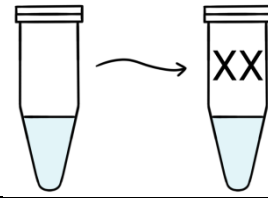
1 portoir pour tubes PCR 0,2 ml  
1 portoir pour microtubes 1,5 ml  
2 tubes PCR contenant les produits de PCR de la séance  
4 tubes PCR vides  
2 tubes 1,5 ml notés T contenant 11 µl de tampon sans enzyme de restriction  
2 tubes 1,5 ml notés E contenant 11 µl de tampon avec enzyme de restriction  
1 micropipette 2-20 µl  
1 rack de pointes de micropipettes 20 µl  
1 marqueur indélébile à pointe fine  
1 poubelle



**Avec 16 tests, il est donc possible de réaliser 4 gels d'électrophorèse à 9 puits.**

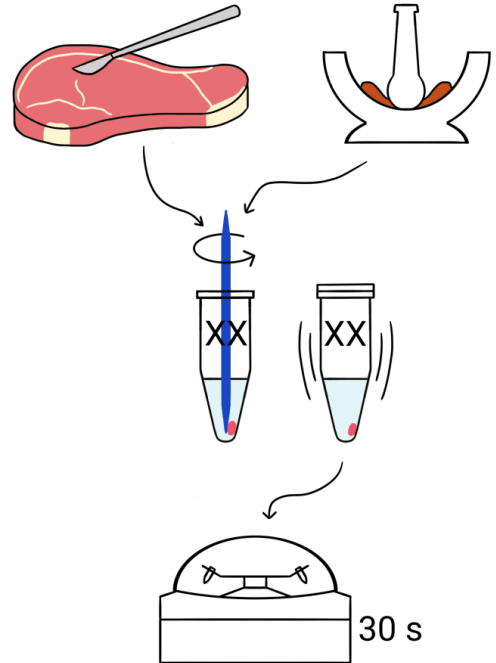
**EXTRACTION DE L'ADN**

Notez vos initiales ainsi sur le côté d'un microtube PCR contenant 40 µl de tampon d'extraction de l'ADN.



Prélevez un échantillon de viande de **1 à 2 mm<sup>3</sup>** :

- Pour les témoins (agneau et bœuf), grattez un peu de muscle avec une lame de rasoir ou un scalpel et insérez un échantillon dans le microtube contenant le tampon d'extraction de l'ADN à l'aide d'un cure-dents.
- Pour la merguez, broyez un morceau de 3 cm au mortier pour homogénéiser les tissus et insérez un échantillon dans le microtube contenant le tampon d'extraction de l'ADN à l'aide d'un cure-dents.



Fermez le microtube et tapotez le fond ou utiliser un vortex pour homogénéiser le tampon.

Placez les microtubes dans la centrifugeuse (étape commune).

*! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !*

Centrifugez les tubes pendant **30 s**.

*! Vérifiez que les échantillons de viande sont bien dans le tampon d'extraction de l'ADN !*

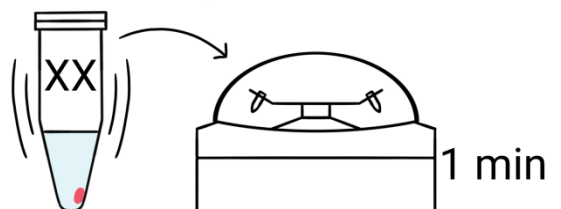
Incubez le microtube pendant **2 min à 37°C puis 1 min à 95°C**.

Vous pouvez effectuer cette étape au bain-marie ou bien directement dans le thermocycleur MiniPCR :

- 1- Cliquez sur « + »
- 2- Choisissez « Flex »
- 3- Entrez un nom pour le protocole ; par exemple « Extraction de l'ADN »
- 4- Cliquez sur « Ajouter une étape »
- 5- Choisissez « Incubation »
- 6- Définissez les paramètres d'incubation : **37°C / 2 min**
- 7- Cliquez sur « Ajouter une étape »
- 8- Choisissez « Incubation »
- 9- Définissez les paramètres d'incubation : **95°C / 1 min**
- 10- Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole ou cliquez sur "Démarrer" pour lancer l'incubation.

Une fois l'incubation terminée, retirez le microtube et laissez-le refroidir sur un portoir à température ambiante (étape commune).

Tapotez le fond du microtube ou utilisez un vortex pour remettre le contenu du microtube en suspension puis centrifugez les microtubes pendant **1 min**.



*! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !*

## PCR ( Polymerase Chain Reaction ) : Amplification de l'ADN

Notez vos initiales sur le côté d'un microtube PCR propre.

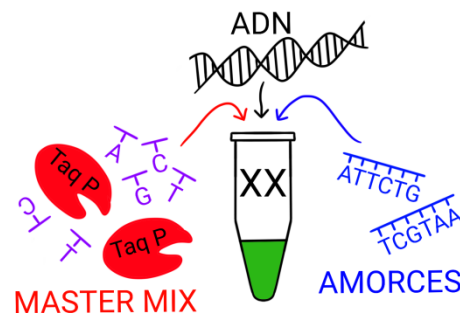
Ajoutez les réactifs suivants :

**Mix (M) 10 µl**  
**Amorces (A) 10 µl**  
 Echantillon d'ADN 2 µl

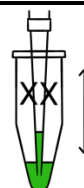
**Prélevez l'ADN en surface du tampon d'extraction.**

*! Si une couche lipidique est présente en surface, ne la transférez surtout pas dans le microtube PCR !*

*! Si un précipité s'est formé dans le tube d'extraction, ne le transférez surtout pas dans le microtube PCR !*

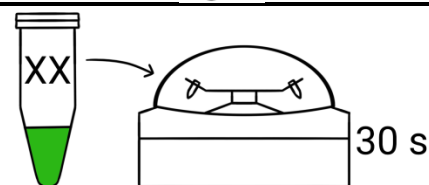


Aspirez et refoulez plusieurs fois avec la micropipette pour bien mélanger les réactifs de PCR (ou utilisez un vortex).



Bouchez soigneusement le microtube et centrifugez-le pendant **30 s** (étape commune).

*! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !*



Placez le tube dans le thermocycleur et fermez soigneusement le couvercle (étape commune).

Programmez le thermocycleur (étape commune) :

CYCLE	T (°C)	t (s)
Dénaturation initiale	94°C	120 s
Dénaturation	94°C	15 s
Hybridation	60°C	15 s
Elongation	68°C	20 s
Elongation finale	68°C	120 s
<b>Nombre de cycles</b>	<b>35</b>	

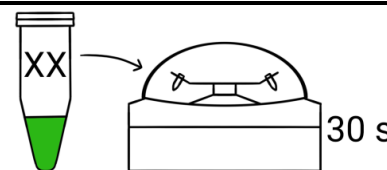
Si vous possédez un thermocycleur MiniPCR :

- Cliquez sur « + ».
- Choisissez « PCR ».
- Entrez un nom pour le protocole, par exemple « Merguez ».
- Entrez les paramètres du protocole PCR.
- Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole.
- Cliquez sur "Démarrer" pour lancer la PCR.

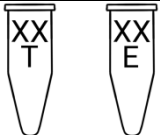

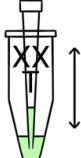

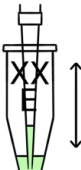
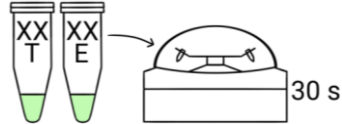
Une fois la PCR terminée, ouvrez le couvercle et retirez les microtubes.

Centrifugez les tubes pendant **30 s**.

*! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !*



**Vous pouvez mettre les tubes au congélateur à ce stade, pour terminer à la séance suivante.**

DIGESTION ENZYMATIQUE	
<p>Notez vos initiales suivies de « E » (Enzyme) sur le côté d'un microtube PCR propre et « T » (Témoin) sur le côté d'un deuxième microtube PCR.</p>	
Préparation du produit de PCR témoin	
<p>Prélevez 5 µL de produit de PCR (contenant l'ADN amplifié) et déposez-les au fond du microtube PCR.</p>	
<p>Ajoutez 10 µL de solution tampon directement dans le produit de PCR du microtube noté « T ». Aspirez et refoulez délicatement une dizaine de fois avec la micropipette pour bien mélanger la solution tampon avec l'ADN.</p>	
Préparation du produit de PCR digéré par l'enzyme de restriction	
<p>Prélevez 5 µL de produit de PCR (contenant l'ADN amplifié) et déposez-les au fond du microtube PCR.</p>	
<p>Ajoutez 10 µL de solution tampon contenant l'enzyme de restriction directement dans le produit de PCR du microtube noté « E ». Aspirez et refoulez délicatement une dizaine de fois avec la micropipette pour bien mélanger les enzymes de restriction avec l'ADN.</p>	
Centrifugation	
<p>Bouchez soigneusement les microtubes et centrifugez-le pendant 30 s (étape commune). <i>! Veillez à bien équilibrer la centrifugeuse (microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !</i></p>	
Incubation	
<p>Incubez le microtube pendant <b>15 min à 37°C</b></p>	
<p>Si vous possédez un thermocycleur MiniPCR :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cliquez sur le '+'</li> <li>- Choisissez « Incubation »</li> <li>- Entrez un nom pour le protocole ; par exemple « Digestion enzymatique »</li> <li>- Entrez les paramètres d'incubation :</li> </ul>	
<b>Température</b>	<b>37°C</b>
<b>Temps</b>	<b>15 min</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole.</li> <li>- Cliquez sur "Démarrer" pour lancer l'incubation.</li> </ul>	
<p>Une fois que la digestion est terminée, retirez les microtubes du thermocycleur ou du bain-marie.</p>	

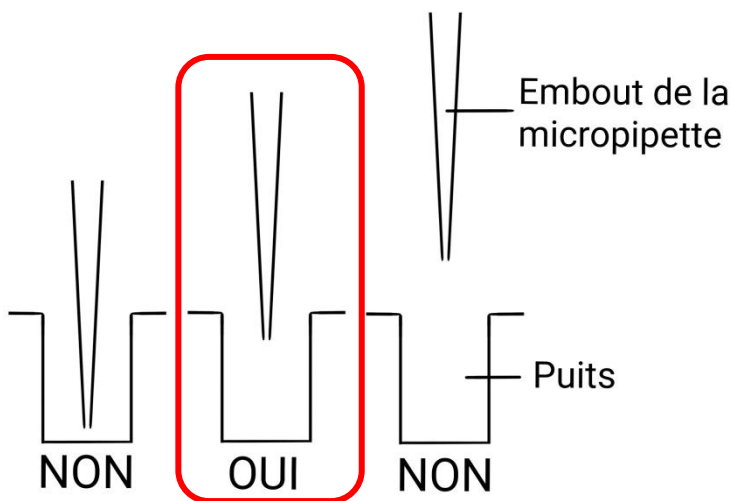
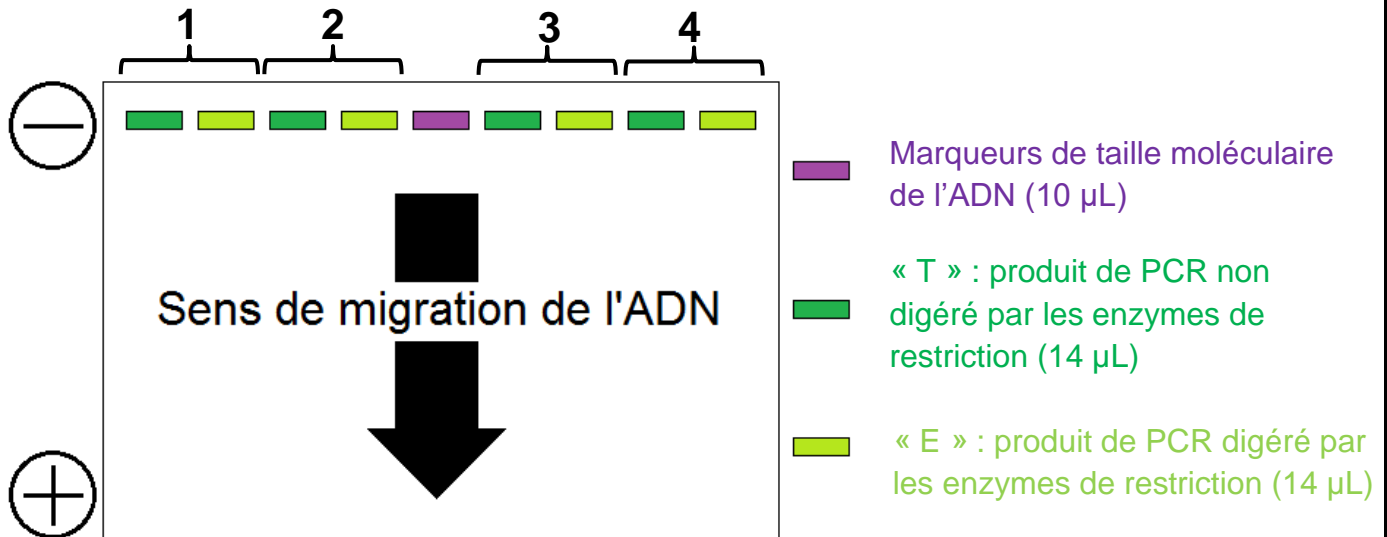
## ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

La cuve à électrophorèse contient un gel d'agarose à 9 puits immergé dans 25 ml de tampon TBE. Chaque gel est prévu pour analyser le génotype de 4 individus.

Pour chaque analyse, vous disposez d'un microtube PCR témoin « T » (produit de PCR non digéré par les enzymes de restriction) et d'un microtube PCR noté « E » (produit de PCR digéré par les enzymes de restriction).

Pour connaître la taille des fragments d'ADN, vous disposez également d'un microtube contenant des marqueurs de taille moléculaire de l'ADN (mélange de différents fragments d'ADN de taille connue).

Déposer les échantillons d'ADN dans les puits du gel d'agarose comme indiqué ci-dessous :



Le dépôt des échantillons se fait à la micropipette. La manière d'effectuer ces dépôts conditionne la réussite de la manipulation !

Si on effectue le dépôt au fond du puits, il y a un risque de débordement ou pire de percer le fond du puits !

Si on effectue le dépôt trop au-dessus du puits, le dépôt se fera hors du puits !

Placez le couvercle sur la cuve d'électrophorèse.



Mettez en marche la cuve d'électrophorèse.

Mette le cache sur la cuve et contrôler régulièrement l'avancée de l'électrophorèse.

Une fois l'électrophorèse terminée, prenez une photo du gel.

Eteignez et débranchez la cuve.

## FICHE LABORATOIRE

EXTRACTION DE L'ADN
Préparation de la solution de lyse
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pipetez et répartissez 800 µl de tampon de lyse (2x 400 µl) dans deux microtubes Eppendorf.</li> <li>- Ajoutez 12 µl de Protéinase K dans chaque microtube.</li> <li>- Mélanger en aspirant et refoulant à la micropipette ou brièvement avec un vortex.</li> <li>- Centrifuger 15 s.</li> <li>- Aliquotez la solution de lyse : pipetez 40 µl de solution de lyse dans 18 microtubes PCR.</li> </ul>

PCR
Préparation du Mix d'amorces
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pipetez 184 µl d'eau distillée (dH<sub>2</sub>O) dans un microtube Eppendorf.</li> <li>- Ajoutez 8 µl du tube d'amorces A à 10 µM et les ajouter dans le microtube Eppendorf.</li> <li>- Ajoutez 8 µl du tube d'amorces B à 10 µM et les ajouter dans le microtube Eppendorf.</li> <li>- Mélanger en aspirant et refoulant à la micropipette ou brièvement avec un vortex.</li> <li>- Centrifuger 15 s.</li> <li>- Aliquotez ce Mix d'amorces : pipetez 11 µl de Mix d'amorces dans 18 microtubes Eppendorf.</li> </ul>
Préparation du Mix PCR
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aliquotez le Mix PCR : pipetez 11 µl de Mix PCR dans 18 microtubes Eppendorf.</li> </ul>

DIGESTION ENZYMATIQUE
Préparation de la solution tampon « témoin »
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pipetez 180 µl d'eau distillée (dH<sub>2</sub>O) dans un microtube Eppendorf.</li> <li>- Ajoutez 20 µl de tampon R 10x.</li> <li>- Mélanger délicatement en aspirant et refoulant à la micropipette de manière à bien homogénéiser la solution.</li> <li>- Aliquotez la solution tampon « témoin » : pipetez 11 µl de solution tampon dans 18 microtubes Eppendorf notés T.</li> </ul>
Préparation de la solution tampon contenant l'enzyme AseI
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pipetez 160 µl d'eau distillée (dH<sub>2</sub>O) dans un microtube Eppendorf.</li> <li>- Ajoutez 20 µl de tampon R 10x.</li> <li>- Ajoutez l'intégralité du tube contenant l'enzyme de restriction AseI (20 µl).</li> <li>- Mélanger délicatement en aspirant et refoulant à la micropipette de manière à bien homogénéiser la solution.</li> <li>- Aliquotez la solution tampon contenant l'enzyme AseI : pipetez 11 µl de solution tampon contenant l'enzyme AseI dans 18 microtubes Eppendorf notés E.</li> </ul>

ÉLECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE
<p>Préparez les gels d'agarose à 2% additionnés de Gelgreen (2 µl pour 25 ml) avec du tampon TBE 1X</p> <p>Exemple pour 100 ml de gel d'agarose à 2% :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mélangez 2 g d'agarose avec 110 ml de tampon TBE 1X et portez à ébullition au micro-ondes jusqu'à complète dissolution de l'agarose.</li> <li>- Ajoutez 8 µl de Gelgreen et mélangez.</li> <li>- Laissez refroidir la solution d'agarose pendant 2 min.</li> <li>- Coulez les gels en suivant la notice de vos cuves à électrophorèse. Si vous utilisez une cuve Bluegel, coulez des gels de 20 ml.</li> <li>- Placez les gels dans les cuves à électrophorèse.</li> <li>- Immergez les gels d'agarose avec le tampon TBE 1X en suivant la notice de vos cuves à électrophorèse. Si vous utilisez une cuve Bluegel, mettez 25 ml de tampon TBE 1X</li> </ul>



## CONSEILS ET ASTUCES

### EXTRACTION DE L'ADN

Cette étape est déterminante !

- Le tampon d'extraction peut être aliquoté la veille du TP et conservé au réfrigérateur avant utilisation.
- Attention aux contaminations : le matériel doit être utilisé pour un seul et même échantillon. La PCR est une technique très sensible, même une faible quantité d'ADN peut contaminer un échantillon (possibilité de « faux positifs »).
- Assurez-vous bien que les échantillons de viande sont bien immergés dans le tampon d'extraction avant l'incubation.
- Ne mettez pas plus de 1 à 2 mm<sup>3</sup> d'échantillon de viande dans le tube d'extraction. Une trop grande quantité peut inhiber l'extraction de l'ADN.
- Utilisez préférentiellement un thermocycleur pour effectuer l'incubation. Si, malgré tout, vous décidez d'utiliser un bain-marie, utilisez un microtube à vis pour éviter d'éventuelles projections et soyez précis sur les températures d'incubation.
- La centrifugation finale est importante, elle permet de séparer l'ADN extrait des débris cellulaires qui pourraient inhiber la réaction de PCR.

### PCR (Polymerase chain reaction) : Amplification de l'ADN

- Préparez le Mix d'amorces au dernier moment juste avant le TP.
- Le Mix PCR peut être aliquoté quelques jours avant le TP et remis au congélateur avant utilisation.
- Ne prélevez pas plus de 2 µl de suspension d'ADN. En règle générale, il faut s'assurer que l'utilisation de la micropipette est maîtrisée avant d'effectuer les différentes manipulations !
- Comme indiqué sur le protocole, pipetez l'ADN en surface du tampon d'extraction pour éviter d'incorporer des débris cellulaires dans le milieu réactionnel.
- Quel que soit le thermocycleur utilisé, respectez les températures et temps indiqués pour chaque étapes de la PCR. Ces valeurs sont optimales pour l'ADN polymérase et les amorces utilisées.

### DIGESTION ENZYMATIQUE

- La solution tampon témoin peut être préparée et aliquotée quelques jours avant le TP et remise au congélateur avant utilisation.
- Préparez la solution tampon contenant l'enzyme Asel juste avant le TP et conservez-la au frais jusqu'au dernier moment.
- Mélangez délicatement et consciencieusement l'enzyme avec le tampon. Pour ce faire, réglez une micropipette sur 20 µl et aspirez et refoulez plusieurs fois pour bien homogénéiser la solution.
- N'utilisez pas de vortex.

### ÉLECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

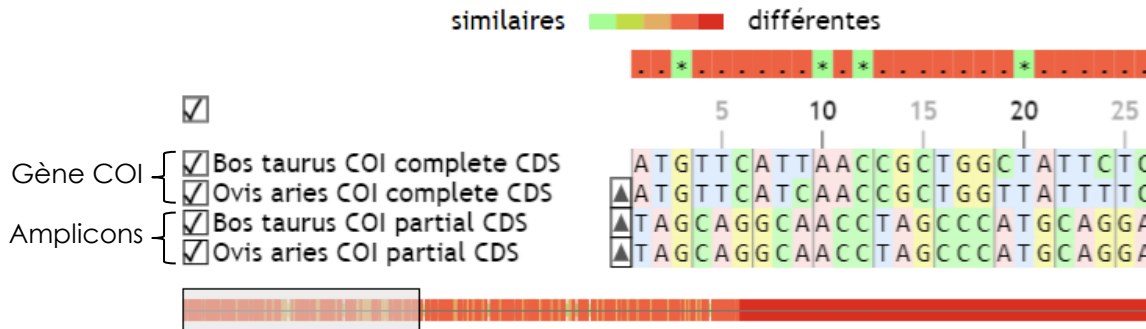
- Si vous utilisez une cuve Bluegel, Respectez scrupuleusement les volumes des gels (20 ml) et du tampon TBE 1X (25 ml). Assurez-vous que les puits du gel sont bien immergés.
- Lors du dépôt des produits de PCR dans les puits, il n'est pas nécessaire d'aller jusqu'à la deuxième butée de la micropipette pour éviter les bulles d'air.
- Utilisez une micropipette 2-20 µl, leurs embouts sont plus adaptés aux dépôts dans les puits.
- Le pourcentage d'agarose des gels est parfaitement adapté pour les cuves Bluegel. Suivant le matériel utilisé, la migration de l'ADN peut être plus longue. Pour une migration plus rapide, réalisez des gels d'agarose plus fins ou diminuez la quantité d'agarose (au minimum 1,5 %).

## Exploitation du fichier Cytochrome oxydase I.edi sur Genieen 2

<https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/genieen2/>

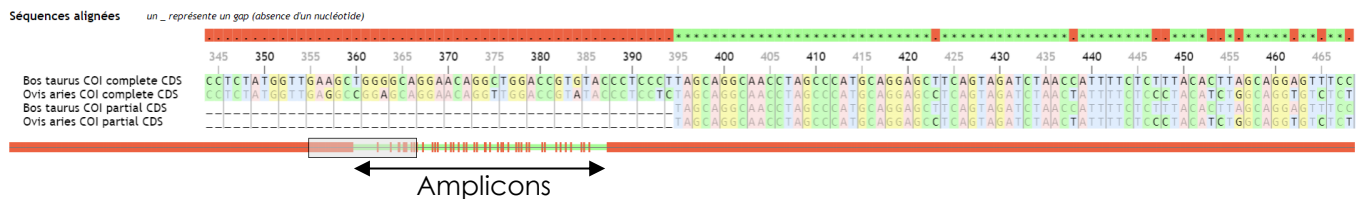
Le fichier Cytochrome oxydase I.edi contient 4 séquences : les deux premières séquences correspondent à l'intégralité du gène COI du bœuf et du mouton, les deux dernières correspondent aux amplicons issus de la PCR.

### Séquences chargées



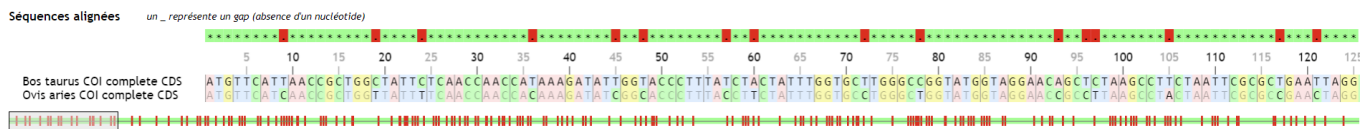
### 1 - Position des amplicons dans le gène COI

Aligner les 4 séquences permet de déterminer la position des amplicons dans le gène COI :



### 2 - Redondance du code génétique

Pour mettre en évidence la redondance du code génétique, vous pouvez aligner les deux premières séquences (gènes complets) et afficher le tableau de comparaison :



#### Tableau de comparaison

en %  identités  noms complets

Matrice d'identité :  
(pourcentage d'identités)

	(1)	(2)
Bos taurus COI complete CDS (1)	100	87,38
Ovis aries COI complete CDS (2)	87,38	100

Il y a 87,38 % d'identités (12,62 % de différences) entre les séquences des gènes COI du bœuf et du mouton.

Il faut ensuite traduire les séquences nucléotidiques. Vous pouvez ainsi aligner les séquences peptidiques et afficher le tableau de comparaison :

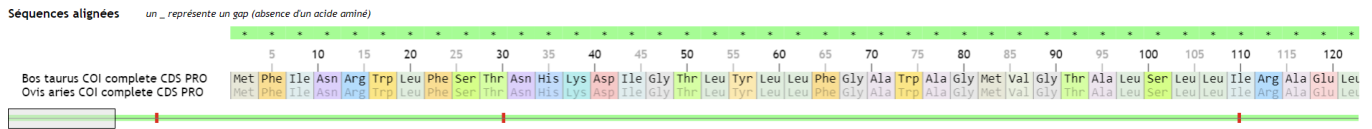


Tableau de comparaison

en %  identités  noms complets

Matrice d'identité :  
(pourcentage d'identités)

	(1)	(2)
<i>Bos taurus</i> COI complete CDS PRO (1)	100	99,42
<i>Ovis aries</i> COI complete CDS PRO (2)	99,42	100

Il y a 99,42 % d'identités (0,58 % de différences) entre les séquences peptidiques. Bien qu'il y ait 12,62 % de différences entre les séquences nucléotidiques, les sous-unités I de la cytochrome c oxydase du bœuf et du mouton ne diffèrent que de 3 acides aminés.

Ceci est possible grâce à la redondance du code génétique.

### 3 - Détermination de la taille des fragments de restriction

Pour déterminer la taille des fragments de restriction après digestion enzymatique des amplicons par l'enzyme AseI, il faut utiliser la fonction « Enzymes de restriction » de Geniegeen 2 et sélectionner AseI dans la banque d'enzyme.



Des sites de restriction ne sont présents que chez l'agneau. Après digestion enzymatique par AseI, nous devrions obtenir pour l'agneau 3 fragments de restrictions de 91 pb, 21 pb et 180 pb.

## Exploitation des fichiers Protéinase K.pdb, Protéinase K + lactoferrine.pdb et Protéinase K + mercure sur Libmol

<https://libmol.org/>

Le fichier Protéinase K.pdb est modèle moléculaire de la protéinase K de *Paronyodontium album* (avec les atomes d'hydrogène affichés).

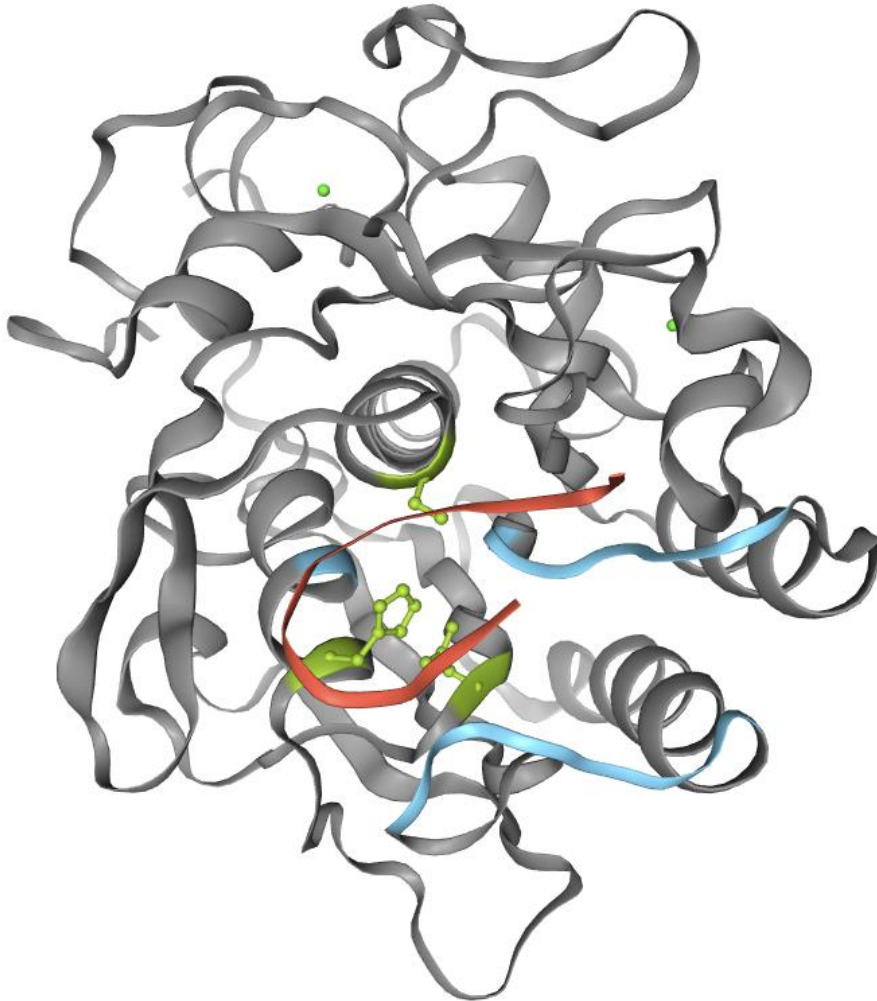
Le fichier Protéinase K+ lactoferrine.pdb est modèle moléculaire de la protéinase K avec un fragment de lactoferrine (protéine = substrat) au niveau du site actif.

Le fichier Protéinase K+ mercure.pdb est modèle moléculaire de la protéinase K avec deux atomes de mercure au niveau du site actif.

### 1- Mise en évidence du site actif et du site de reconnaissance du substrat de la protéinase K

Pour rappel, le site actif de la protéinase K est une triade catalytique composée de 3 acides aminés (acide aspartique **39**, histidine **69**, serine **224**).

Les sites de reconnaissance du substrat sont deux parties de la chaîne polypeptidique, **99-104** et **132-136**. Il est également composé d'une cystéine **73** libre située à proximité de l'histidine **69**



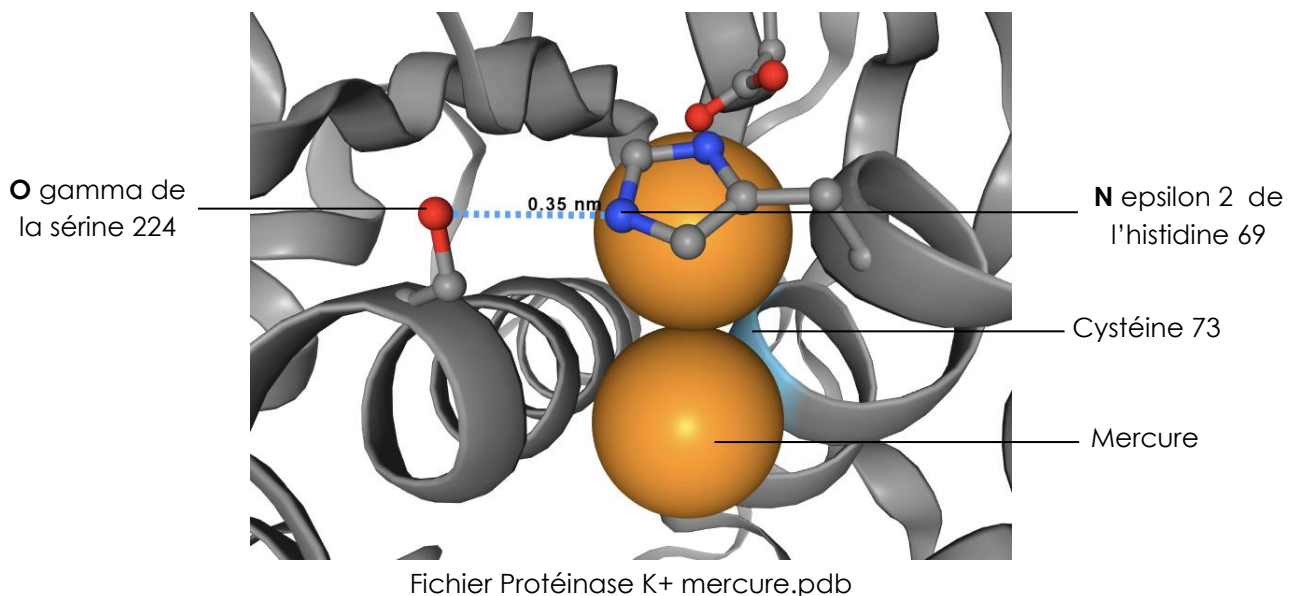
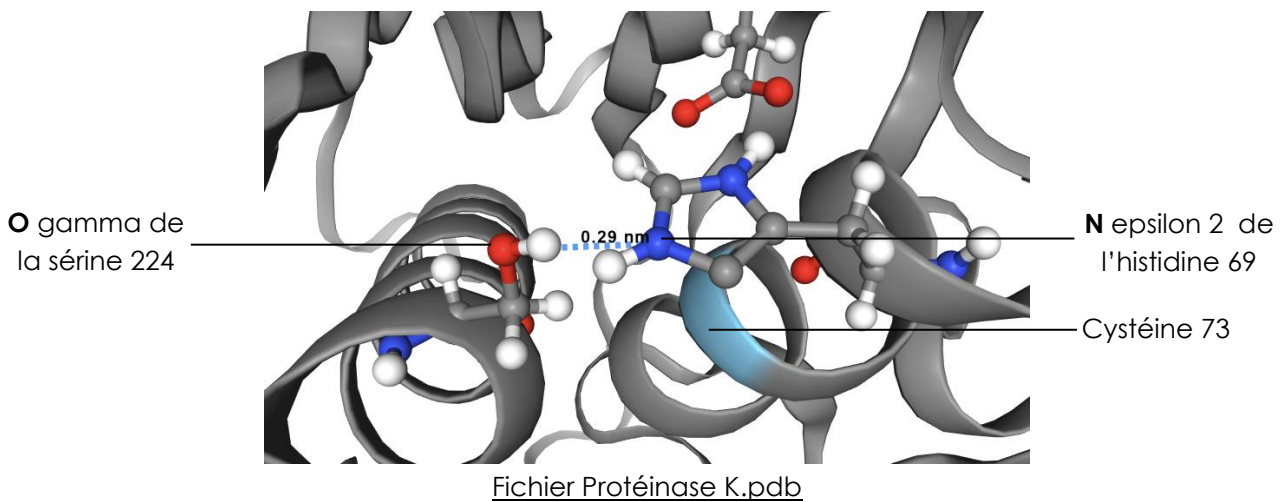
Fichier Protéinase K+ lactoferrine.pdb

Dans cette représentation, le site actif est coloré en vert, le site de connaissance du substrat est coloré en bleu et le substrat est coloré en rouge.

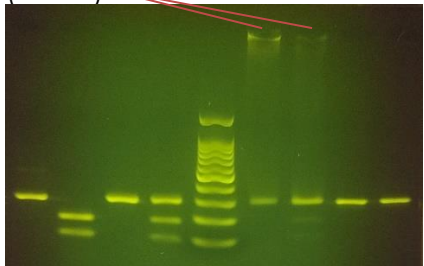
## 2- Inactivation de la protéinase K par le mercure

Lorsque la protéinase K est incubée avec du chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) en excès, celui-ci va venir se fixer de façon covalente à la cystéine 73 à proximité d'un résidu du site actif, l'histidine 69. La liaison du mercure fausse la stéréochimie des résidus voisins dont ceux appartenant à la triade catalytique. En conséquence, la distance entre l'O gamma de la sérine 224 et le N epsilon 2 de l'histidine 69 passe de 0,29 nm à 0,35 nm (l'O gamma de la sérine 224 est déplacé de 0,06 nm), ce qui provoque l'inactivation de la protéinase K (Mercury induced modifications in the stereochemistry of the active site through Cys-73 in a serine protease--crystal structure of the complex of a partially modified proteinase K with mercury at 1.8 Å resolution, Gourinath, S., Degenhardt, M., Eschenburg, S., Moore, K., Delucas, L.J., Betzel, C.H., Singh, T.P. (2001) Indian J Biochem Biophys 38: 298-302).

Ce changement de distance peut être mesuré avec Libmol :



**DÉPANNAGE**

Observation	Cause possible	Action recommandée
Pas ou peu de produit de PCR	Erreur de pipetage	Bien former à l'usage des micropipettes
	Problème de calibration des micropipettes	Vérifier le calibrage des micropipettes
	Paramétrage des cycles de PCR incorrects.	Assurez-vous d'utiliser les paramètres de cycles de PCR recommandés dans le protocole.
Digestion enzymatique absent ou incomplète	Mauvais stockage de l'enzyme	Conservez l'enzyme au congélateur dès réception
	Temps d'incubation trop court	Augmentez le temps d'incubation (20 min)
Présence de traînées dans le gel (smear) 	Pipetage de débris cellulaires divers	Pipetez l'ADN en surface du tampon d'extraction.

Remarque : Une autre manière de distinguer la viande de bœuf de celle du mouton serait de procéder à une PCR multiplex en mettant dans le milieu réactionnel de la PCR un couple d'amorce propre au bœuf et un couple d'amorce propre au mouton (en choisissant bien évidemment d'amplifier deux séquences d'ADN de tailles différentes). Cette méthode a l'avantage de pouvoir détecter aussi d'autres types de viandes (porc, cheval...) en fonction des couples d'amorces choisis.

## FICHE SÉCURITÉ (guide non exhaustif)

- Ne pas inhaler ni ingérer les produits contenus dans ce kit. Eviter les projections dans les yeux. En cas de projection dans les yeux, rincer à grande eau.  
Cependant, aucun des produits contenus dans ce kit ne requièrent de précaution particulière.
- Le gel d'agarose chaud peut provoquer des brûlures. Manipuler avec des gants anti-chaleur.  
**En cas de brûlures, passer la zone atteinte sous l'eau froide pendant 15 minutes.**
- Nous vous conseillons de manipuler les colorants avec des gants.

## FICHE CONSERVATION

**Les échantillons d'ADN sont stockés à -20°C pendant 2 mois.**

*Attention :* ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit pendant 2 mois.

## FICHE TRI ET RÉCUPÉRATION

Les ADN, et le TBE peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau. Les tubes de plastique, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon). L'agarose peut être jeté à la poubelle.