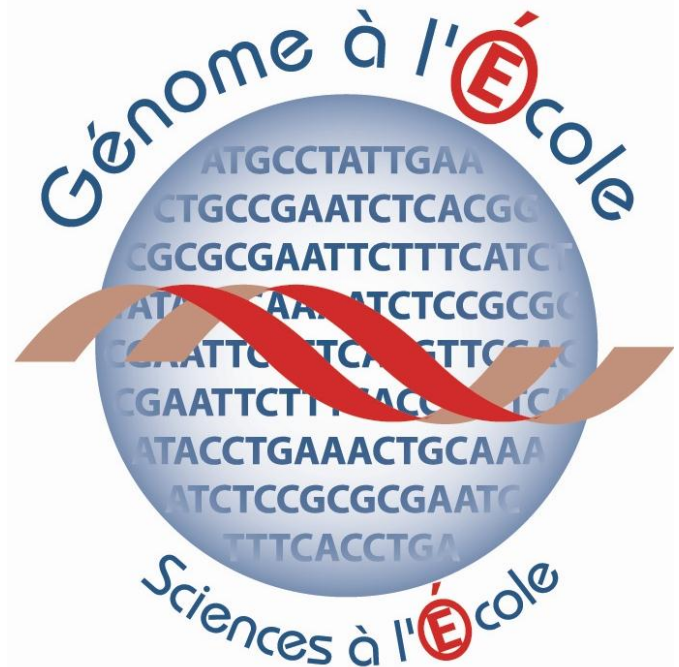




Notre logo mascotte!

Travaux réalisés pendant l'année scolaire 2011/2012
Dans le cadre du projet « *populus nigra* » génome à l'école .

Objectif : Analyse du polymorphisme nucléotidique de gènes d'intérêt chez le peuplier noir après séquençage de produits PCR (Polymerase Chain Reaction)



Programme génome à l'école (projet national impliquant 17 lycées)

- Phase 1 :** Récolte des échantillons et création de l'échantillothèque
- Phase 2 :** Extractions d'ADN et gestion de l'échantillothèque
- Phase 3 :** PCR sur les ADN extraits
- Phase 4 :** Contrôle des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose
- Phase 5 :** Expédition des produits de PCR pour le séquençage
- Phase 6 :** Gestion et exploitation des données de séquence

<i>Classes concernées:</i>	<i>Activités</i>	<i>Créneaux</i>
<i>Seconde K</i>	<i>Phase 2 Extraction et purification Phase 4 Electrophorèse</i>	<i>lors de séances Sciences et Laboratoire</i>
<i>Seconde E</i>	<i>Phase 2 Extraction et purification</i>	<i>Séance de TP</i>
<i>Première S1</i>	<i>Phase 2 Extraction et purification Phase 4 Electrophorèse</i>	<i>lors des plages de cours et d'AP (pour les élèves de l'atelier)</i>
<i>Terminale S option spécialité SVT</i>	<i>Phase 3 Amplification PCR</i>	<i>TP Enjeux actuels des biotechnologies</i>

- *Un travail en amont de recherches et d'élaboration du site a été réalisé par 18 élèves de l'atelier Génome, en 1S1 et 1S3*
- *La phase 1 de récolte n'a pas pu se faire sur des échantillons locaux mais grâce à des boutures envoyées par l'INRA et le Forest Research.*
- *De nombreuses PCR ont été réalisées hors temps scolaire par des élèves de l'atelier de 1S, en particulier Claire Bouvelle, mais aussi Anaïs Deloffre et Lucie Dutailly.*

Activité n°1

Extraction et purification de l'ADN de *Populus nigra*

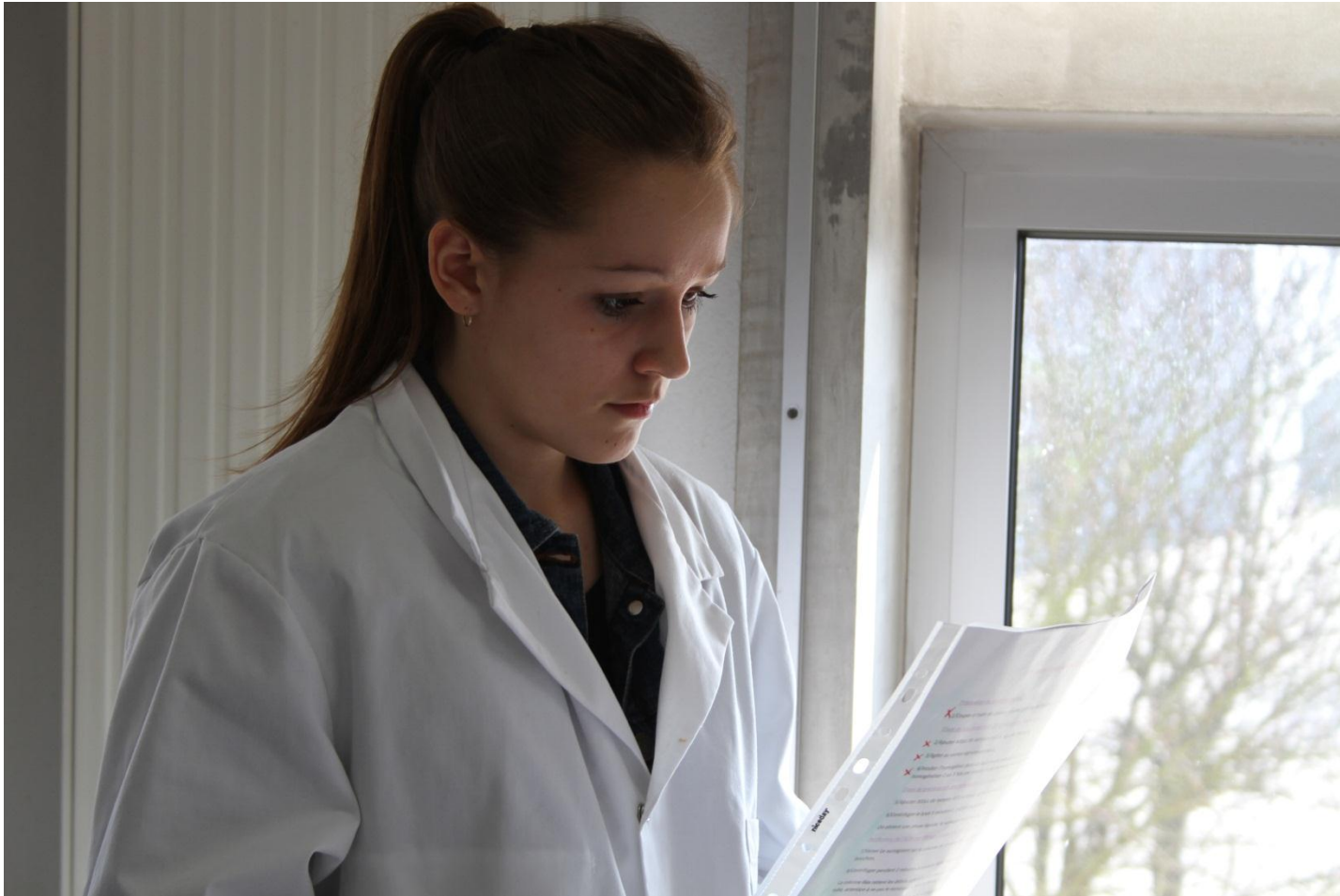
Compte rendu rédigé par : Guillaume Wain , Julie Boulet, Ophélie Devrainne, Thomas Duconseille de seconde K
Photos prises par Mme PIQUOT lors du TP dirigé par Mme DECAU avec les élèves de première S1 ,

L'extraction que nous avons effectuée a nécessité 2 heures de travail en 22 étapes .

Cette extraction a été réalisée à partir de feuilles du peuplier noir (*Populus nigra*).

Nous avons purifié plusieurs fois l'ADN et après ces différentes étapes nous avons obtenu le liquide contenant l'ADN .

Mise en application du protocole
d'extraction....



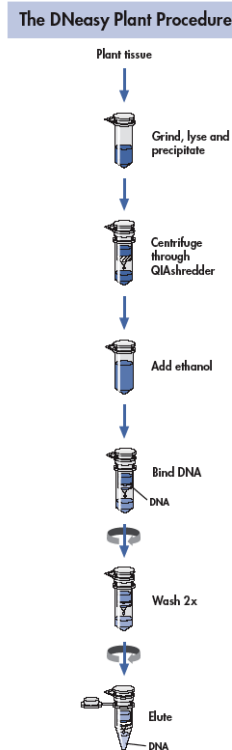
DNeasy® Plant Mini kit de Qiagen

Réf. : Mode opératoire normalisé : MON-GE Populus1
Objet : Extraction d'ADN à partir de cellules végétales

Préparation :

Peser entre 50 et 100 mg de matière végétale (une balance à 0,2 g peut suffire) dans un tube de 1,5 ml, ce qui représente environ 1/4 du tube en matière végétale. Ne pas dépasser 130 mg, car sinon la solution contiendra trop de composés pouvant interférer. On peut découper la feuille aux ciseaux / cutter mais il faudra alors, après chaque feuille, nettoyer très soigneusement la lame à l'alcool.

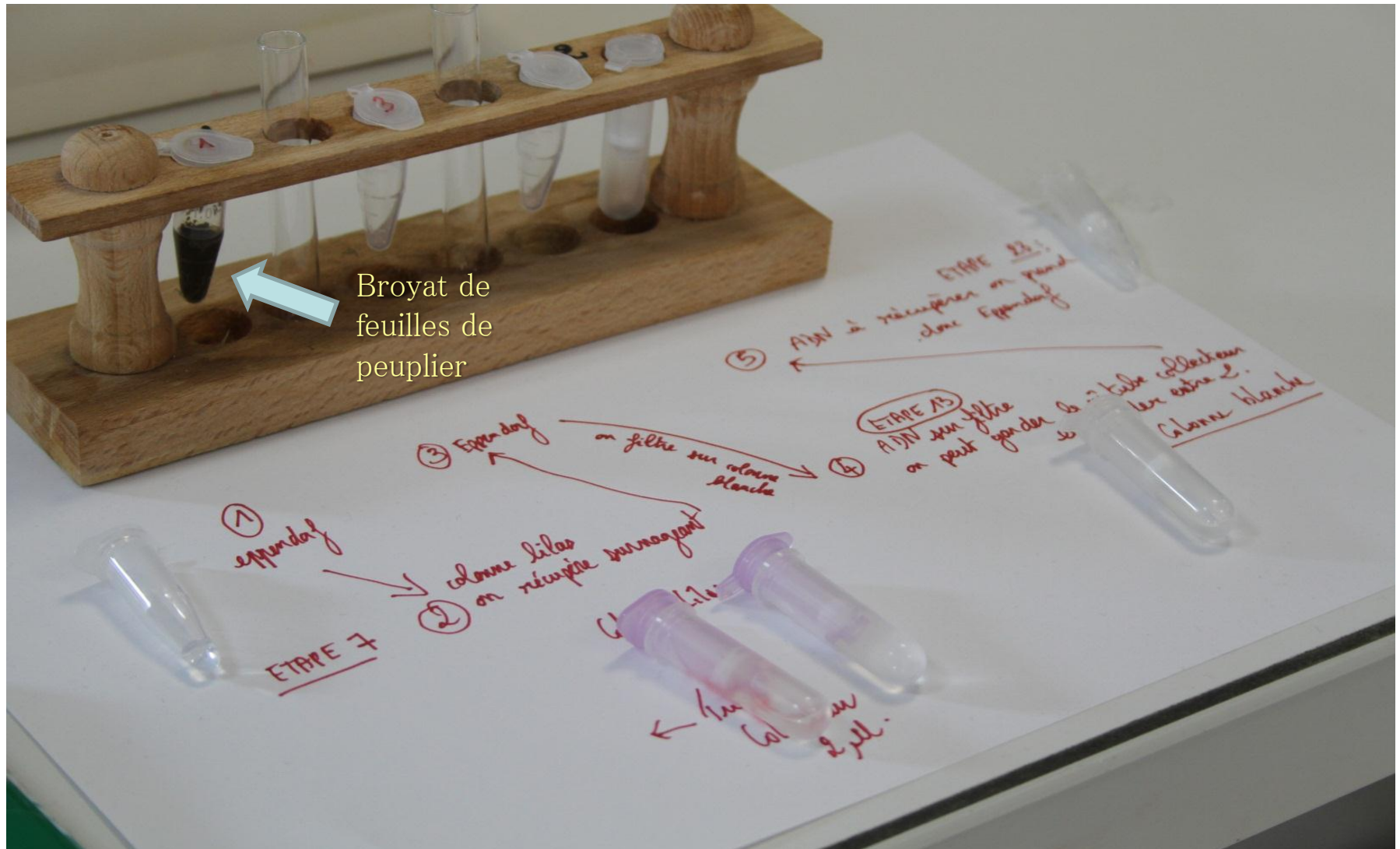
	DNeasy® Plant Mini Kit	
Catalog no.	69104	69106
Number of preps	50	250
DNeasy Spin Columns (colorless)	50	250
QIAshredder™ Mini Spin Columns (lilac)	50	250
QIAshredder Maxi Spin Columns (lilac)	-	-
Collection Tubes (2 ml)	50	250
Collection Tubes (50 ml)	-	-
Buffer AP1	40 ml	200 ml
Buffer AP2	18 ml	90 ml
Buffer AP3/E (concentrate)*†	30 ml	125 ml
Buffer AW (concentrate)†	17 ml	81 ml
Buffer AE	2 x 12 ml	2 x 60 ml
RNase A (100 mg/ml)	220 µl	5 x 220 µl
Handbook	1	1



1. Ajouter 400 μ l de tampon AP1 et 4 μ l de RNase A (solution stock à 100 mg/ml) pour un maximum de 100 mg de produit sec ou 20 mg de produit lyophilisé.
Agiter au vortex vigoureusement.
Attention à ne pas mélanger le tampon AP1 et la RNase avant utilisation.
2. Incuber l'homogénat pendant 10 minutes à 65°C. Pendant l'incubation, homogénéiser 2 ou 3 fois par simple renversement, non par vortex. Cette étape lyse les cellules. L'ADN génomique est fragile, il faut donc éviter le vortex à ce stade.
3. Ajouter 300 μ l de tampon AP2 au lysat, agiter et incuber pendant 5 minutes sur glace. Cette étape précipite les détergents, protéines et polysaccharides.
Centrifuger le lysat 5 minutes à 20 000 g (environ 13 000 tours/min, dépend du rayon du rotor).
4. Déposer la fraction surnageante sur la colonne QIAshredder Mini Spin (couleur lilas), emboîtée sur un tube de 2ml, et centrifuger pendant 2 minutes à 20 000 g (environ 13 000 tours/min). Cette colonne fractionne et retient les précipités et débris cellulaires ; cependant, une petite fraction n'est pas retenue et apparaît sous forme de micro-culot au fond du tube : veillez à ne pas resuspendre ce culot dans l'étape 5.
5. Transférer le filtrat de l'étape 4 dans un nouveau tube, sans perturber le micro-culot de débris cellulaires. En général, on récupère environ 450 μ l de solution, évaluer tout de même le volume pour l'étape suivante.
à \geq 8000 rpm). Éliminer la solution filtrée, conserver le tube collecteur.

6. Vérifier que l'éthanol a bien été ajouté au tampon AP3/E.
Ajouter 1,5 volume du tampon AP3/E au lysat et mixer immédiatement par pipetage. Exemple : pour 450 μ l de lysat, ajouter 675 μ l de tampon AP3/E. Après ajout de ce tampon, l'éthanol provoque un léger précipité qui n'affecte pas la procédure DNeasy.
7. Ajouter 650 μ l de la solution de l'étape 6 sur la mini colonne DNeasy emboîtée sur un tube de 2 ml. Centrifuger 1 minute à ≥ 6000 g (correspond
8. Renouveler l'étape 7 avec le reste de l'éluat. Eliminer le tube collecteur avec la solution filtrée.
9. Vérifier que l'éthanol a été ajouté dans le tampon AW.
Placer la colonne DNeasy Mini Spin sur un nouveau tube collecteur, ajouter 500 μ l de tampon AW et centrifuger 1 min à ≥ 6000 g (≥ 8000 rpm). Éliminer le filtrat et réutiliser la colonne à l'étape 10.
10. Ajouter 500 μ l de tampon AW sur la colonne DNeasy Mini Spin et centrifuger 2 minutes à 20 000 g (14 000 rpm) pour sécher la membrane de filtration. Cette étape est importante car l'éthanol résiduel peut interférer avec les étapes suivantes. Eliminer le filtrat sans toucher la membrane.
11. Transférer la colonne sur DNeasy Mini Spin sur un nouveau tube de 1,5 ml et ajouter 50 μ l de solution tampon AE directement sur la membrane, incubé 5 minutes à température ambiante (15-25°C) et centrifuger 1 minute à ≥ 6000 g (≥ 8000 rpm) pour éluer.
12. Répéter l'étape 11 dans le même tube pour assurer une extraction totale.

Le matériel nécessaire :



Le vortex pour homogénéiser

