

Kit pour électrophorèse d'ADN d'abeilles

Réf. ELECTABSG

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- ⚠ Stocker les articles du colis dans les bonnes conditions :
 - ⚠ Placer le sachet AR à **-20°C** ⚠
 - ⚠ Placer le reste à **température ambiante** ⚠

Attention : Ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit de 3 mois.

- Avant toute manipulation**, étudier les conseils de **sécurité**

COMPOSITION

- Un sachet AR contenant :
 - o Un tube de marqueur de poids moléculaire à bouchon rouge
 - o Un tube d'ADN de référence Q à bouchon marron
 - o Un tube d'ADN de référence PQ à bouchon noir
 - o 2 tubes d'ADN à identifier à bouchon rose (ADN1) et orange (ADN2)
- Un sachet d'agarose (4g)
- 1L de TBE 1X.

NB : Le TBE 1X (concentration utilisée par les élèves) ne présente aucune toxicité de part sa dilution. Le TBE étant plus adapté pour le fonctionnement de la cuve BLUEGEL, nous avons décidé de livrer ce kit avec ce tampon.

MATERIEL NECESSAIRE

- Micropipettes et cônes
- Ethanol absolu
- Eau distillée
- Cuve à électrophorèse BlueGel ou cuve standard avec générateur 70V et transilluminateur
- Alimentation pour cuve à électrophorèse
- Flacons d'un litre
- Gant anti-chaleur ou moufle de préhension
- Micro-onde ou bain-marie
- Gants type latex

OBJECTIFS COGNITIFS

Ce kit propose de réaliser une électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose afin de génotyper des espèces d'abeilles récoltées en France à partir de leur ADN mitochondrial ; amplifié sur une séquence spécifique par la technique la PCR.

Pourquoi génotyper les abeilles grâce à la technique de PCR ?

L'effondrement des colonies d'abeilles est un problème majeur qui touche tous les continents. Cet effondrement peut-être lié à plusieurs facteurs tels que l'utilisation massive des pesticides, les monocultures, le développement de parasites comme le varroa, les espèces invasives ...

Une pratique apicole peu évoquée est l'hybridation ; croisement entre plusieurs sous-espèces d'abeilles. L'hybridation pourrait aussi être un facteur de fragilisation des colonies car il introduit des espèces non endémiques qui vont entrer en compétition avec les espèces locales (endémiques) pour la conquête de l'espace. De plus, n'étant pas adaptées à leur nouvel écosystème, ni lui à elles, ces espèces exogènes perturbent cet écosystème et par conséquent les espèces locales qui y étaient adaptées.

Il s'agit donc pour les apiculteurs de déterminer le taux d'hybridation de leur(s) rucher(s) afin d'identifier l'ensemble des causes potentielles d'une décimation de colonies.



L'abeille est un hyménoptère, appartenant au genre *Apis*, qui comporte plusieurs espèces sociales.

L'*Apis mellifera* se rencontre en Europe, en Afrique, au Proche-Orient, et dans une partie de la Sibérie. Sa très grande extension géographique et les conditions climatiques différentes ont produit des lignées aux caractères morphologiques et comportementaux variés.

Il existe 4 lignées évolutives de l'espèce *Apis mellifera* sur leur aire de répartition naturelle :

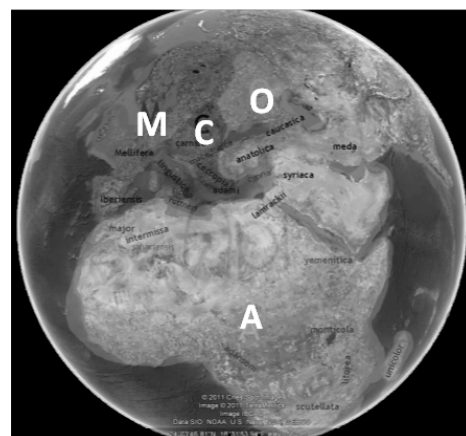
- la lignée M (ouest-méditerranéennes = abeille noire)
- la lignée A (africaines)
- la lignée C (nord-méditerranéennes)
- la lignée O (Turquie et Caucase)



Lorsque l'on s'intéresse aux aires de répartitions de ces 4 lignées, on s'aperçoit qu'elles sont vastes et peuvent notamment s'expliquer par la cartographie des périodes de glaciations. Par exemple, la divergence entre les lignées M et C-O s'explique par la présence d'une calotte glaciaire qui longeait leurs lignes de démarcations. Le réchauffement climatique et la fonte de ces calottes glaciaires a ensuite conduit au «métissage» des lignées (NB : toutes peuvent se reproduire entre elles).

Aujourd'hui, le métissage est essentiellement dû à la pratique de plus en plus rependue de l'hybridation. Un des pionniers de l'hybridation contrôlée chez les abeilles était le frère Adam qui vivait en Angleterre dans l'abbaye de Buckfast. Il développa ce principe d'hybridation car il pensait pouvoir obtenir «l'abeille idéale».

A l'époque il s'agissait d'améliorer la race locale décimée par la maladie de l'île Wight (causée par *Acarapis woodi* une «mite trachéale»). De nos jours, les apiculteurs poursuivent ses méthodes afin de trouver une abeille excellente butineuse, propre, peu agressive et aussi peu essaimeuse (c'est-à-dire qui ne forme pas de ruche/colonie ailleurs qu'au lieu où elle a été implantée). La buckfast (connue dans le monde entier) est donc le résultat d'une hybridation considérée comme réussie par de nombreux professionnels ; croisement de plusieurs races résistantes importées de diverses régions du monde (saharienne, ligustica, mellifera). Ses qualités et ses performances continuent de s'améliorer grâce à une sélection continue (pour cumuler les qualités et écarter les défauts) car il est difficile de stabiliser les caractères de l'abeille sur plusieurs générations.



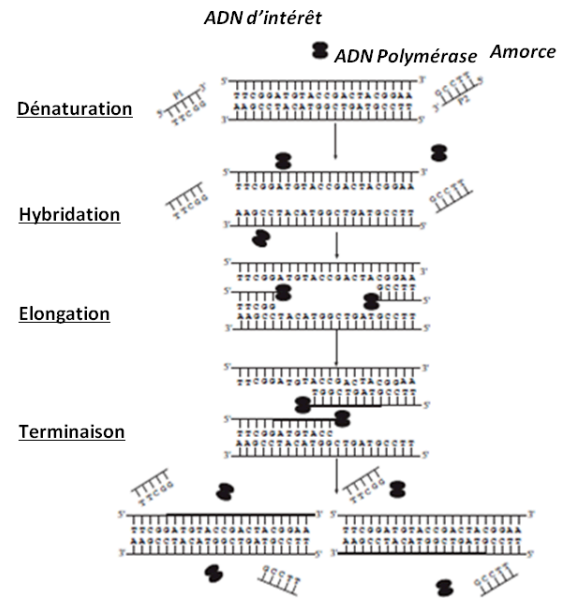
C'est pourquoi il est important de pouvoir identifier sur des caractères physiques et/ou génétiques l'état d'hybridation d'une colonie. La PCR est un des moyens rapides d'identifier un individu sur des caractéristiques génétiques.

Des élèves du Lycée Marie Laurencin à Mennecy ont réalisé, lors d'un TPE en 2013, une étude d'évaluation du taux d'hybridation de plusieurs ruchers, dont le leur, afin d'étayer l'argument actuellement controversé selon lequel l'hybridation pourrait aussi être un facteur de fragilisation des colonies d'abeilles. Nous les remercions pour leur contribution à l'élaboration de ce kit.

La réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain

La réaction en chaîne par polymérase est utilisée pour obtenir une quantité importante de copies d'un fragment d'ADN défini, à partir d'une quantité infime de celui-ci.

La réaction de PCR consiste en une réplication d'ADN in vitro. C'est possible grâce à l'ajout d'une enzyme de réplication ; l'ADN polymérase, des quatre desoxyribonucléotides triphosphates nécessaires à la synthèse de molécule d'ADN (adénine, cytosine, guanine, thymine), et d'amorces de réplication consistant en de courtes séquences d'ADN simple spécifiques de l'ADN d'intérêt. En effet, les amorces sont synthétisées artificiellement de façon à avoir une séquence strictement complémentaire aux extrémités de l'ADN d'intérêt. réaction de PCR, on ajout un couple d'amorces constitué d'une complémentaire à la région 3' de l'ADN d'intérêt et d'une complémentaire à sa région 5'. La séquence desoxyribonucléotidique du segment d'ADN d'intérêt doit donc



Le processus de PCR fonctionne selon quatre étapes :

Le mélange est d'abord chauffé à une température proche de 100°C afin de dénaturer les molécules d'ADN. En effet, les molécules d'ADN d'intérêt sont des doubles brins qui doivent être séparés préalablement à la réplication. De plus, la dénaturation assure aussi que l'ADN d'intérêt et les amorces soient dans une configuration linéaire pour faciliter l'étape d'hybridation qui suit.

Le mélange est ensuite refroidi vers une température de 45 à 60°C selon les couples d'amorces pour permettre leur appariement avec l'ADN d'intérêt ; c'est l'hybridation.

L'ADN polymérase va alors ajouter les desoxyribonucléotides à l'extrémité 3' de chaque amorce en utilisant le brin d'ADN d'intérêt comme matrice de réplication ; c'est l'élongation. Cette étape s'effectue à 72°C ; la température optimum de fonctionnement de l'enzyme de réplication ADN polymérase. De cette manière, un nouveau brin complémentaire est formé et on obtient ainsi deux molécules d'ADN double brin identique à l'ADN d'intérêt.

Le cycle formé par ces 3 premières étapes est répété entre 30 et 50 fois. A chaque cycle, le nombre de molécule d'ADN est doublé.

La dernière étape consiste en la terminaison des molécules d'ADN nouvellement synthétisées. Cette étape s'effectue aussi à 72°C et assure que les molécules d'ADN nouvellement synthétisées soient entières et correspondent strictement à la molécule d'ADN d'intérêt.

MANIPULATION

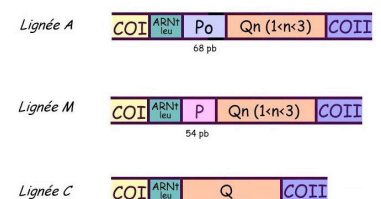
Les échantillons d'ADN fournis correspondent à :

- 2 échantillons de référence obtenus lors d'une vraie expérience de PCR réalisées à partir d'ADN mitochondrial d'abeilles Méditerranéennes et Africaines.
- 2 échantillons obtenus lors d'une vraie expérience de PCR réalisées à partir d'ADN mitochondrial d'abeilles récoltées en France, et à identifier par comparaison aux échantillons de référence.

L'ADN mitochondrial de l'abeille est caractérisé par des régions intergéniques dont la longueur varie d'une race à une autre. Dans ces régions, il existe des sous-unités P (54 pb) et des sous-unités Q (192-196 pb). Ces sous-unités peuvent se combiner selon différentes séquences de répétitions : P, PQ, PQQ ...

- o Les sous unités P suivies d'un ou plusieurs Q correspondent à lignée M
- o Les sous unités Po suivies d'un ou plusieurs Q correspondent à la lignée A
- o La présence d'un unique Q correspond à la lignée C.

Les échantillons d'ADN fournis ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spéciales ciblant les régions P et Q.



Informations pour organiser au mieux le TP :

Type de cuve	Nb de gels	Nb de puits	Q à déposer / puits (µl)	% agarose des gels
BlueGel	4	9*	15	2 %
		13*	8	
Standard	4	6	20	0,8 %
		8	15	

*Possibilité de faire 2 lignes de dépôts, soit 18 ou 26 puits par gel.

PREPARATION

Préparation pour 4 gels d'agarose : concentration en fonction de la cuve (voir tableau p.2)

(Opération réalisable à l'avance : gel pouvant être conservé quelques semaines à + 4°C dans un flacon bouché)

• Gels à 2 % :

- Transvaser le contenu du sachet noté agarose contenant 4 g d'agarose dans un flacon de 500 mL passant au micro-ondes
- Ajouter 220 mL de tampon TBE 1X.
- "NB" : la quantité de tampon utilisée tient compte de l'évaporation due au passage au micro-onde.

• Gels à 0,8 % (pour la préparation de 4 gels) :

- Peser 1.6 g provenant du sachet noté agarose contenant 4 g d'agarose.
- Les transvaser dans un flacon de 500 mL passant au micro-onde
- Ajouter 220 mL de tampon TBE1x.
- "NB" : la quantité de tampon utilisée tient compte de l'évaporation due au passage au micro-onde.

- Placer le flacon au micro-onde puissance 1000w pendant 1 à 2 minutes
- Utiliser des gants anti-chaueur ou des maniques de préhension pour saisir et manipuler le flacon chaud
- Surveiller toutes les 30 s l'état de la préparation jusqu'à ce qu'elle soit transparente et sans grumeaux
- "NB" : A défaut de micro-ondes, vous pouvez utiliser un bain-marie et surveillant régulièrement le mélange. Mais la fonte est beaucoup plus lente.
- Faire refroidir le mélange fondu jusqu'à une température d'environ 55°C

ATTENTION : la réussite du TP réside à 50% dans la qualité du gel

Vous pouvez couler les gels tout de suite ou bien conserver le flacon de gel bouché à + 4°C pendant 4 semaines maximum.

NB : Coulez les gels jusqu'à mi-hauteur des peignes

Préparation des échantillons contenus dans le sachet AR :

Les tubes sont prêts à l'emploi.

- Centrifuger rapidement les tubes afin de faire retomber tout le liquide dans le fond du tube. Si vous ne possédez pas de centrifugeuse, secouer **d'un seul mouvement sec**, de haut en bas, les tubes un à un.

MANIPULATION avec la cuve BlueGel

Mise en œuvre de l'électrophorèse :

- Placer le support de gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Un détrompeur sur le support du gel vous empêche de mal positionner le gel.
- Verser 25 ml de tampon TBE 1X dans la cuve jusqu'à recouvrir le gel et remplir les puits (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- Pulvériser du spray anti-condensation sur la partie intérieure du couvercle (orange) puis l'essuyer avec un tissu non pelucheux.

Dépôt et migration des ADN :

- Déposer l'ADN (la quantité dépend du peigne utilisé, voir p. 4) à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. Faire doucement et éviter les bulles (attention à bien noter l'ordre des dépôts).
- Déposer chaque ADN à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. Faire doucement et éviter les bulles (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- Fermer la cuve à électrophorèse et brancher l'alimentation.
- Mettre en marche l'alimentation en appuyant sur le bouton marche. **Le voyant lumineux doit s'allumer.** Si ce n'est pas le cas, vérifiez que l'appareil est branché au secteur (230V) et que le couvercle est bien fermé.

Dès le début de la migration vous pouvez allumer le transilluminateur et suivre votre migration en temps réel. Pour augmenter le contraste, dépliez et placez la chambre noire sur la cuve en prenant bien garde à ne pas soulever le couvercle orange.

En effet, le soulèvement du couvercle éteint immédiatement la cuve par mesure de sécurité. Il faut donc surveiller que la lumière d'indication de fonctionnement est bien allumée après avoir touché à la cuve. Un arrêt de la cuve pendant trop longtemps fait 'disparaître' l'ADN qui va se diffuser partout.

MANIPULATION avec une cuve standard

Mise en œuvre de l'électrophorèse :

- Vérifier que la cuve n'est pas sous tension avant de manipuler
- Si les gels ne sont pas déjà dans les cuves, retirer délicatement le peigne des gels : tirer bien dans l'axe pour que les puits calibrés soient bien formés.
- Les puits sont visibles dans le gel.
- Placer le gel dans les cuves, bien immergé dans le tampon. Rajouter éventuellement du TBEx1.
- Vérifier que les puits du gel sont du côté de la cathode (pôle négatif de couleur noire). Retourner éventuellement le gel.

Dépôt et migration des ADN :

- Déposer l'ADN (la quantité dépend du peigne utilisé, voir p. 4) à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. Faire doucement et éviter les bulles (attention à bien noter l'ordre des dépôts).
- Brancher les générateurs
- Appliquer une tension de 70 à 120 V selon si on veut obtenir une migration précise (70 V) ou rapide et bien moins précise (120V)
- Placer et allumer le transilluminateur sous la cuve

👁️ **ATTENTION** 👁️: lancer la migration juste après les dépôts : ne pas attendre que les dépôts diffusent dans les gels.

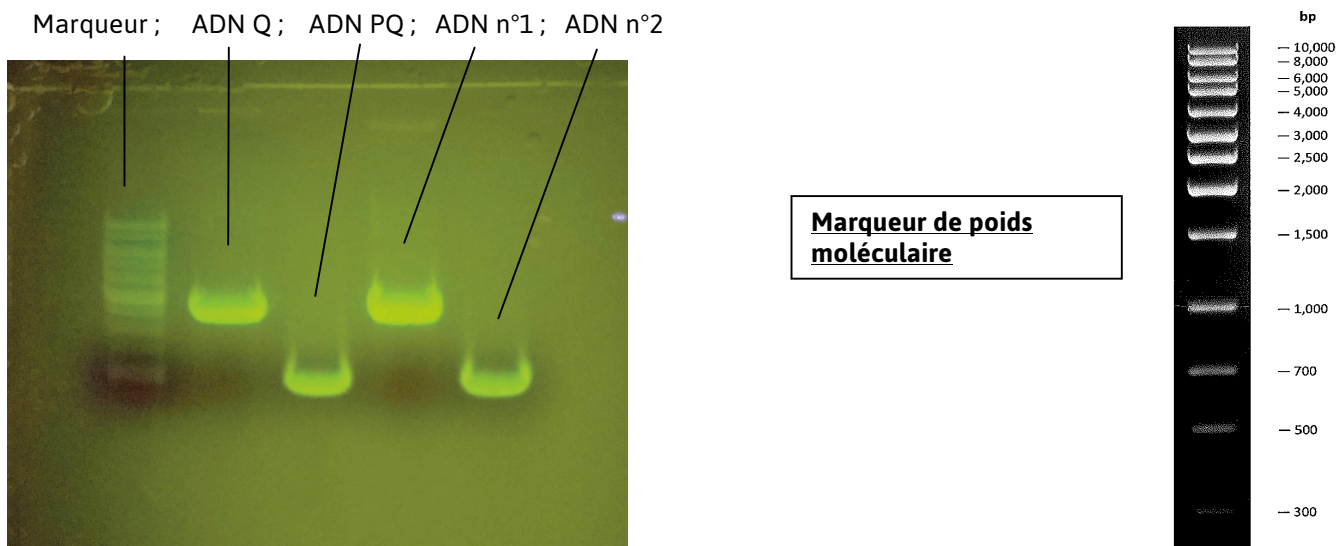
☐ **NB** ☐ : le temps de migration dépend de plusieurs paramètres : plus le gel est épais, plus le temps de migration est important et plus il y a de tampon de migration au dessus du gel, plus la durée de la migration augmente)

RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

La hauteur de migration des bandes d'ADN correspond à la taille des fragments d'ADN contenu dans chaque échantillon. Cette taille peut être quantifiée grâce à l'échelle de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue. En effet, un fragment d'une taille donnée migre toujours à la même vitesse et plus le fragment est court, plus il migre vite à travers les mailles du gel d'agarose.

Ainsi, les bandes hautes correspondent à des ADN de grande taille qui ont migrés lentement, telles que les séquences PQ. Les bandes plus basses correspondent à des ADN de plus petite taille qui ont migrés plus rapidement, telles que les séquences Q.

Voici un exemple de résultats obtenus avec ce kit :



Suite à la migration sur gel, on peut identifier les ADN comme suit :

- ADN n°1 : Q
- ADN n°2 : PQ

FICHE SECURITE (guide non exhaustif)

Ne pas ingérer. En cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer abondamment.

Les ADN, les enzymes, le tampon TBE, le SafeGreen et l'Azure A ne requièrent pas de précautions d'utilisation particulières. Nous vous recommandons tout de même de manipuler ces produits avec des gants pour éviter tout contact direct avec la peau.

La gélose chaude peut provoquer des brûlures. Manipuler avec des gants anti-chaleur. En cas de brûlures, passer sous l'eau froide immédiatement et contacter le service médical si nécessaire.

- 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.

Utilisation du SAFEGREEN

Le colorant Safe-Green™ est déjà ajouté à vos échantillons.

Après l'électrophorèse, voir les résultats avec une lumière bleue et un cache orange.

Extrait de la FDS (à retrouver sur notre site web : www.sordalab.com)

SECTION 2: Identification des dangers

2.1 Classification de la substance ou du mélange

Classification en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008

N'est pas une substance ni un mélange dangereux conformément au règlement (CE) No. 1272/2008.

2.2 Éléments d'étiquetage

Étiquetage en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008

Le produit ne nécessite pas d'étiquetage conformément aux directives de la CE et aux réglementations nationales du pays concerné.

2.3 Autres dangers

Une substance/préparation ne contient aucun ingrédient considéré comme persistant, bioaccumulable et toxique (PBT), ou très persistant et très bioaccumulable (vPvB) à des niveaux de 0,1% ou plus.

FICHE CONSERVATION

Attention: ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit pendant 3 mois.

Les échantillons d'ADN sont stockés à -20°C pendant 3 mois.

Le tampon TBE 1X se conserve pendant 3 à 6 mois à +4°C. Ce tampon est périmé lorsqu'un précipité blanc apparaît au fond du flacon.

L'agarose en poudre se conserve indéfiniment à température ambiante dans un endroit sec. L'agarose en gel se conserve environ un mois à +4°C dans un récipient hermétiquement fermé, type bouteille. Veillez à ajouter un peu d'eau par-dessus le gel de façon à ce qu'il reste toujours humide.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les ADN, le SafeGreen et le TBE peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau.

Les tubes de plastiques, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon). L'agarose peut être jeté à la poubelle. Retrouvez la vidéo du produit sur notre site web :

www.sordalab.com