



UTILISATION DU KIT

GMO Detective



Matériel	2
Matériel fourni :	2
Matériel non fourni dont vous aurez besoin :	2
But & Principe de l'expérience	3
Partir d'un questionnaire	3
Extraire l'ADN de nos échantillons	3
Tester la présence d'ADN d'OGM	4
Monter le détecteur de fluorescence	5
Interpréter les résultats	6
Protocole	7
Déploiement dans un cadre éducatif	9

Vous trouverez également dans nos fichiers annexes (en HD) :

- Le protocole
- Le guide d'utilisation d'une pipette
- Le guide de montage de détecteur de fluorescence
- La fiche d'aide à l'interprétation des résultats
- Le cadre théorique et l'explication avancée de cette expérience

Ces documents sont utiles pour un usage en classe (pour avoir 15 copies du protocole par exemple) ou pour comprendre les principes scientifiques sous jacent.

Matériel

Matériel fourni :

- 1 x 8 Tubes PCR contenant les réactifs “dry-freezed”
 - Tube 1 to 4 : Primers for Plant Gene + Enzyme + DNTPs
 - Tube 5 to 8 : Primers for GMO markers + Enzyme + DNTPs
- 1 x Tubes d'eau DNase
- 1 x Tubes contenant la solution tampon
- 2 x tubes Eppendorf 1,5mL vide
- 2 x pilons
- Le détecteur de fluorescence

Matériel non fourni dont vous aurez besoin :

- 1 x Bain marie réglé sur 63°C
- 1 x Micropipette 1-10 ou 2-20
- 8 x Cônes pour micropipette

Pour information les volumes à manipuler sont 2µL, 8µL, 60µL (1x60µL, 3x20µL ou 6x10µL). La micropipette peut être substituée par tout autres outils de mesure capable de travailler les même volume.

But & Principe de l'expérience

But de l'expérience : détecter la présence d'**ADN** de maïs ou de soja **OGM** dans de la nourriture.

Principe de l'expérience :

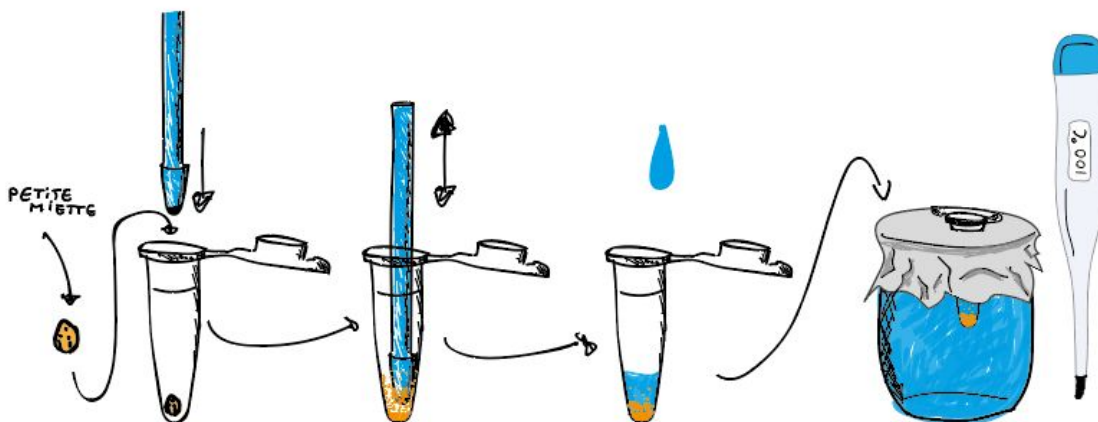
1) Partir d'un questionnement

Partir d'une question précise c'est prendre conscience de ce que l'on recherche vraiment. Ici la question est de savoir si un aliment contient en lui du maïs ou du soja transgénique.

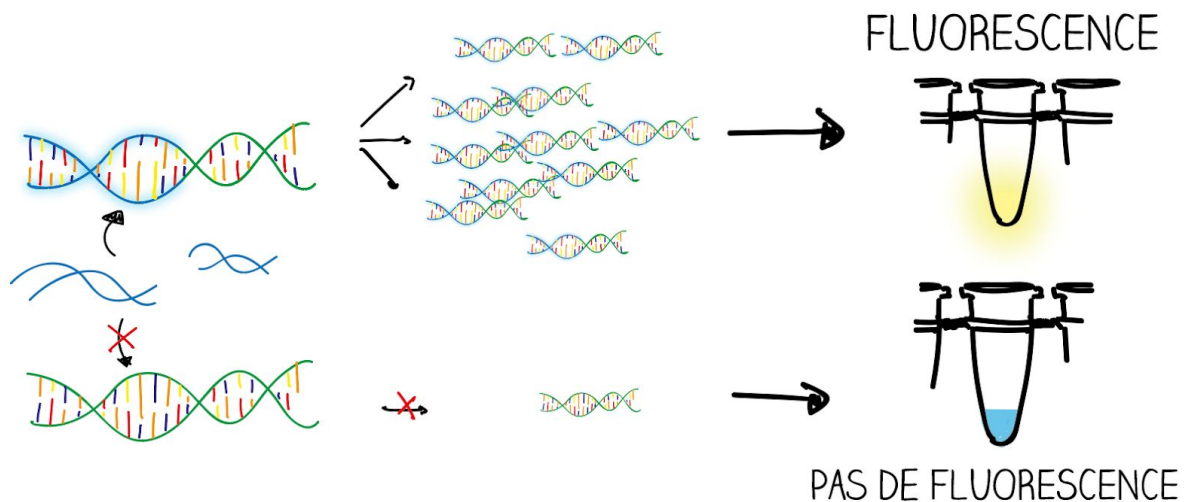


2) Extraire l'ADN de nos échantillons

Pour savoir si notre aliment contient des OGMs nous allons rechercher la présence de séquences d'ADN provenant d'une modification génétique. Une étape cruciale est donc l'extraction de l'ADN contenu par l'aliment. Cette extraction est opérée par broyage puis chauffage.



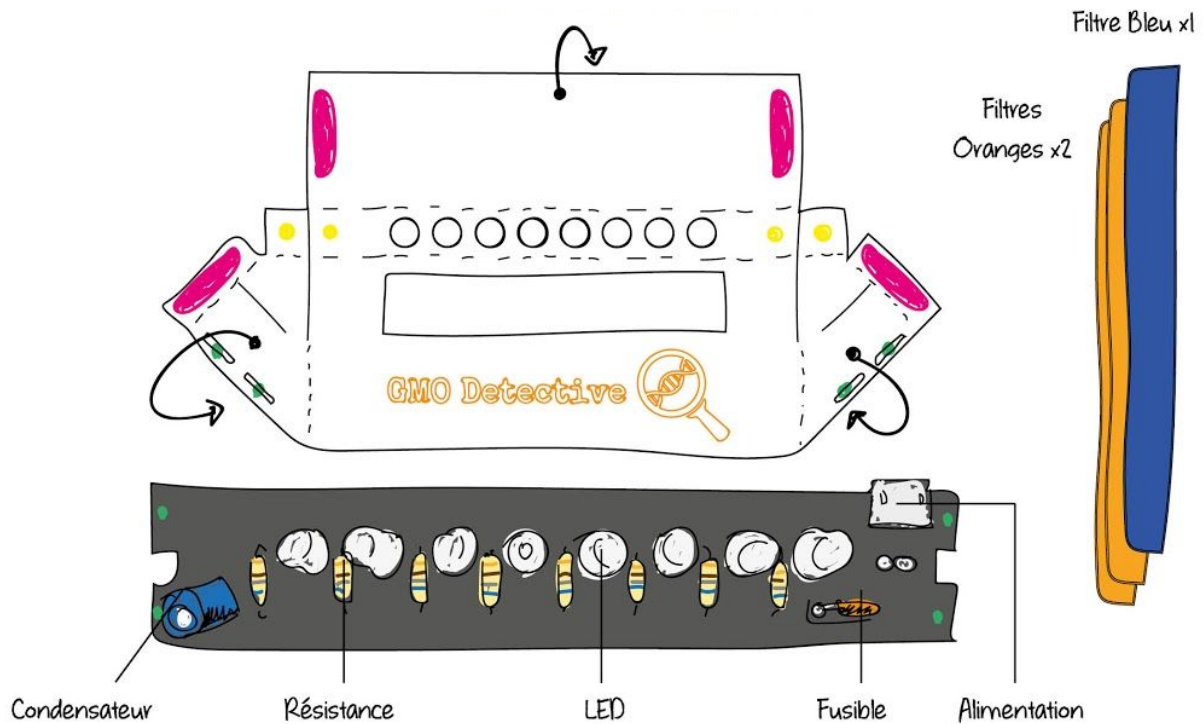
3) Tester la présence d'ADN d'OGM



Ensuite nous utiliserons une **technique d'amplification de l'ADN** appelée LAMP. Les **primers** utilisés lors de cette réaction seront dirigés soit vers un **marqueur génétique** universel aux plantes (servant de contrôle à la bonne extraction de l'ADN) soit vers un marqueur génétique (P35s; Attestant de la présence d'OGM dans notre échantillon) caractéristique d'une plante OGM (illustrée ci dessus). Si le marqueur est présent, il y aura une amplification massive de l'ADN. Si le marqueur est absent, il n'y aura aucune amplification. Les résultats sont finalement observés par **fluorescence** grâce à la présence d'un **fluorochrome** : la fluorescein.

Pour plus d'informations sur les fondements théoriques derrière les notions soulignées et les fondements théoriques utilisés pour la réalisation de cette expérience, veuillez consulter l'annexe.

4) Monter le détecteur de fluorescence



①

PLIE

le patron en papier
sur les pointillés dans le
sens des flèches

②

COLLE

les languettes de
la même couleur
ensemble

③

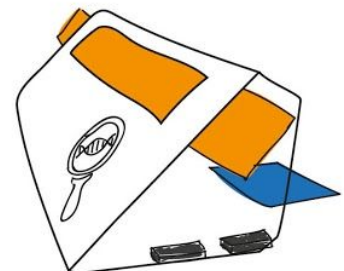
CLIPPE

le circuit imprimé dans
les encoches présentes
dans le portant en
papier

④

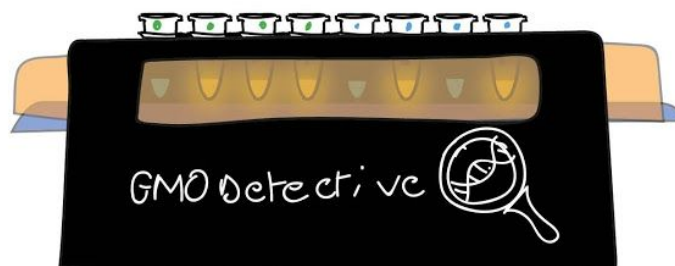
INSÉRER

les deux filtres oranges devant la fenêtre de lecture et le
filtre bleu au dessus des LEDs comme suis



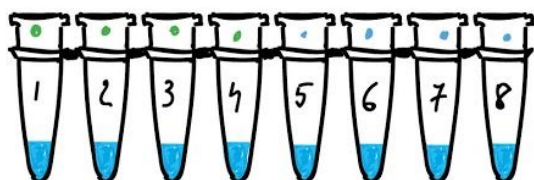
5) Interpréter les résultats

L'interprétation des résultats demande une certaine gymnastique de l'esprit. Pour l'y aider il est important de bien comprendre le contenu de chaque tubes et sa raison d'être.



Dans cet exemple, les témoins fonctionnent parfaitement, les négatifs sont négatifs, les positifs sont positifs, l'ADN des deux échantillons ont été bien extraits, l'échantillon 1 ne contient pas d'OGM alors que l'échantillon 2 en contient.

- 1 - CONTRÔLE NÉGATIF ADN PLANTES : VERIFIE L'ABSENCE DE CONTAMINATIONS DANS LE MIX DE RÉACTION 'PLANTE'
- 2 - CONTRÔLE POSITIF ADN PLANTES : VERIFIE QUE LES RÉACTIFS DU MIX DE RÉACTION 'PLANTE' FONCTIONNENT
- 3 - TEST ÉCHANTILLON 1 ADN PLANTES : TESTE LA PRÉSENCE D'ADN DE PLANTE - VERIFIE QUE L'EXTRACTION A FONCTIONNÉ
- 4 - TEST ÉCHANTILLON 2 ADN PLANTES : TESTE LA PRÉSENCE D'ADN DE PLANTE - VERIFIE QUE L'EXTRACTION A FONCTIONNÉ
- 5 - CONTRÔLE NÉGATIF ADN OGM : VERIFIE L'ABSENCE DE CONTAMINATION DANS LE MIX DE RÉACTION 'OGM'
- 6 - CONTRÔLE POSITIF ADN OGM : VERIFIE QUE LES RÉACTIFS DU MIX DE RÉACTION 'OGM' FONCTIONNENT
- 7 - TEST ÉCHANTILLON 1 ADN OGM : TESTE LA PRÉSENCE D'ADN DE PLANTE OGM DANS L'ÉCHANTILLON 1
- 8 - TEST ÉCHANTILLON 2 ADN OGM : TESTE LA PRÉSENCE D'ADN DE PLANTE OGM DANS L'ÉCHANTILLON 2



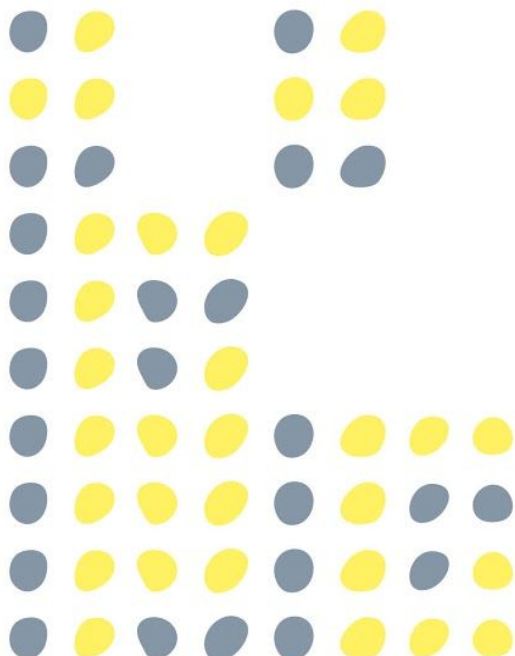
GUIDE D'INTERPRETATION DES RÉSULTATS



Résultat négatif



Résultat positif



OK : Les contrôles négatifs sont négatifs et les positifs positifs

/\ Les contrôles négatifs sont positifs : contaminations possible

/\ Les contrôles positifs sont négatifs : réactifs K.O

OK : L'ADN de plante est détecté : l'extraction a fonctionné

/\ Aucun ADN de plantes n'est détecté : extraction K.O

/\ Extraction échantillon 1 OK ; Extraction échantillon 2 K.O

OK : Les deux échantillons contiennent des OGMs

OK : Les deux échantillons ne contiennent pas d'OGMs

OK : Seul l'échantillon 2 contient des OGMs

/\ On ne peut pas conclure ; Hypothèse : Extraction hasardeuse

Protocole



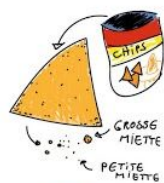
I - EXTRACTION DE L'ADN

GMO Detective



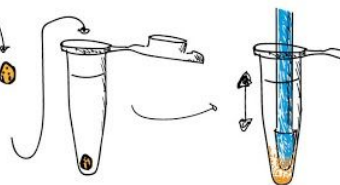
LA PREMIÈRE ÉTAPE POUR SAVOIR SI L'ADN EST D'ORIGINE OGM CONSISTE À EXTRAIRE L'ADN DES CELLULES VÉGÉTALES CONTENU DANS LA NOURRITURE. LES EXPLICATIONS CI DESSOUS VOUS EXPLIQUENT COMMENT PROCÉDER, MAIS AVANT DE COMMENCER, VOICI DEUX RÈGLES D'OR :

- 1 - ATTENTION AUX CONTAMINATIONS : GARDER LES MAINS PROPRES, TOUJOURS UTILISER DES PILONS PROPRES, TOUJOURS UTILISER DES EMBOUTS PROPRES, ETC.
- 2 - TOUJOURS ÉTIQUETER VOS TUBES (VOTRE NOM & SON CONTENU) AVEC UN MARQUEUR INDÉLÉBILE ET WATERPROOF.



①

PRENDRE ENVIRON 0.005 GRAMMES (1-2MM **PAS PLUS**) DE L'ALIMENT À TESTER, PUIS LE PLACER DANS UN TUBE VIDE DE TYPE EPPENDORF 1.5 ML. **ÉTIQUETEZ-LE !!!!** VOUS DEVEZ AVOIR DEUX TUBES EPPENDORF, UN POUR CHAQUE ÉCHANTILLON. POUR VOTRE INFORMATION, 0.005 GRAMME, C'EST GRAND À PEU PRÈS COMME ÇA. (1-2 MM)



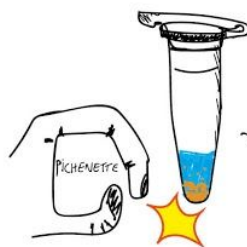
②

À L'AIDE DES PETITS PILONS, BIEN BROYER / ÉCRASER CHACUN DE VOS ÉCHANTILLONS À L'INTÉRIEUR DU TUBE EPPENDORF DE 1.5 ML POUR L'HOMOGENÉISER. **UN PILON PAR ECHANTILLON, NE PAS MÉLANGER !!**



③

À L'AIDE D'UNE MICROPIPETTE MUNI D'UN CONE PROPRE, AJOUTER 60 μ L D'EAU DISTILLÉE (DNASE FREE) DANS LES TUBES EPPENDORF CONTENANTS UN ÉCHANTILLON. SELON VOTRE MATERIEL VOUS POUVEZ FAIRE 3X20 μ L OU 1X60 μ L. ATTENTION À NE PAS CONTAMINER L'EAU AVEC DES RÉSIDUS D'ÉCHANTILLONS !



④

BIEN FERMER LE CAPUCHON DES TUBES EPPENDORF ET MELANGER EN TAPOTANT LE BAS DU TUBE

⑤

FAIRE BOUILLIR DE L'EAU ET LA VERSER DANS UN RÉCIPIENT DE VERRE (BECHER, POT DE YAOURT EN VERRE, ETC)



⑥

RECOUVRIR LE RÉCIPIENT REMPLI D'EAU BOUILLANTE D'UNE FEUILLE D'ALUMINIUM.

⑦

ENFONCER VOS TUBES EPPENDORF AU TRAVERS DE LA FEUILLE D'ALUMINIUM DE MANIÈRE À LAISSER INCUBER SON CONTENU DANS L'EAU CHAUDE

⑧

ATTENDRE 5 MINUTES AVANT DE RETIRER LES TUBES ET PASSER À L'ÉTAPE SUIVANTE



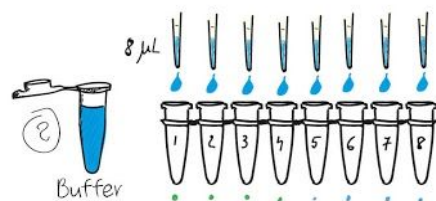
II - RÉACTION D'AMPLIFICATION DE L'ADN

GMO Detective



LA SECONDE ÉTAPE CONSISTE À LANCER LA RÉACTION D'AMPLIFICATION DE L'ADN POUR VÉRIFIER LA PRÉSENCE D'ADN OGM DANS L'ADN EXTRAIT À L'ÉTAPE I. GARDER BIEN EN TÊTE LES DEUX RÈGLES D'OR :

- 1 - ATTENTION AUX CONTAMINATIONS : GARDER LES MAINS PROPRES, TOUJOURS UTILISER DES EMBOUTS PROPRES, ETC.
- 2 - BIEN GARDER EN TÊTE LE CONTENU DE CHAQUE TUBE ET SON UTILITÉ
- 3 - TOUJOURS ÉTIQUETER LES TUBES AVEC UN MARQUEUR INDÉLÉBILE ET WATERPROOF POUR LES IDENTIFIER FACILEMENT

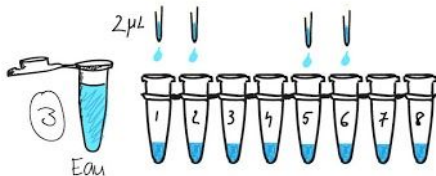


- 1 - CONTRÔLES NÉGATIF ADN PLANTES
- 2 - CONTRÔLE POSITIF ADN PLANTES
- 3 - TEST ÉCHANTILLON 1 ADN PLANTES
- 4 - TEST ÉCHANTILLON 2 ADN PLANTES

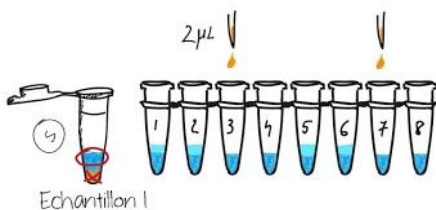
PERMET DE DÉTECHER L'ADN DE PLANTES POUR SAVOIR SI L'EXTRACTION DE L'ADN À ÉTÉ CORRECTEMENT RÉALISÉE.

- 5 - CONTRÔLE NÉGATIF ADN OGM
- 6 - CONTRÔLE POSITIF ADN OGM
- 7 - TEST ÉCHANTILLON 1 ADN OGM
- 8 - TEST ÉCHANTILLON 2 ADN OGM

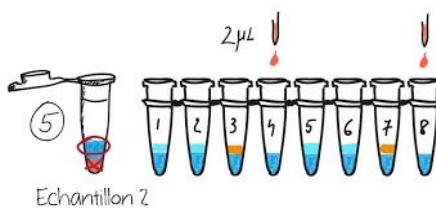
PERMET DE DÉTECHER LA PRÉSENCE D'ADN DE MAIS OU DE SOJA GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉ.



- ① EMPARER VOUS DE LA BANDE DE 8 TUBES PCR. MÊME S'ILS PARAÎSENT VIDE, CES TUBES CONTIENNENT TOUS LES RÉACTIFS DONT VOUS AVEZ BESOIN. MARQUER BIEN VOTRE NOM ET NUMÉROTÉ LES TUBES



- ② REMETTRE EN SUSPENSION LE CONTENU DES TUBES EN AJOUTANT 8 µL DE BUFFER DANS CHACUN DES 8 TUBES



- ③ AJOUTER 2 µL D'EAU DANS LES TUBES DES TÉMOINS NÉGATIFS (1 & 5) ET DANS LES TUBES DES TÉMOINS POSITIFS (2 & 6)

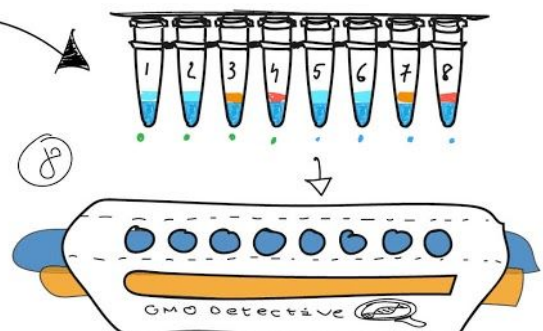
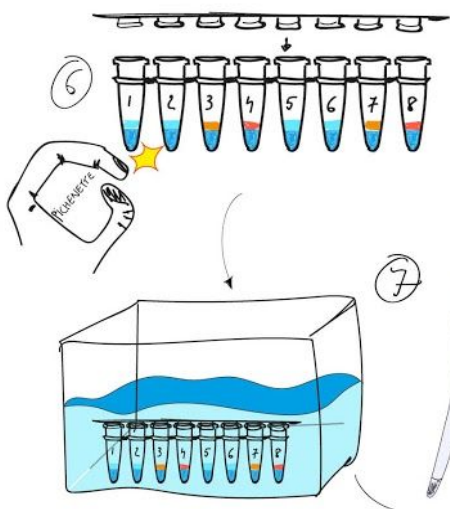
- ④ AJOUTER 2 µL D'ADN DE L'ÉCHANTILLON 1 DANS LES TUBES 3 ET 7

- ⑤ AJOUTER 2 µL D'ADN DE L'ÉCHANTILLON 2 DANS LES TUBES 4 ET 8

- ⑥ (SUPER) BIEN REFERMER LES 8 TUBES ET MÉLANGER BIEN

- ⑦ INCUBER EN IMMERSION TOTALE DANS DE L'EAU À 63°C PENDANT 1H

- ⑧ RETIRER DE L'EAU ET PLACER LES TUBES DANS LE DÉTECTEUR DE FLUORESCENCE POUR VISUALISER LES RÉSULTATS (VOIR FICHE DE MONTAGE DU DÉTECTEUR & FICHE D'INTERPRÉTATION)



Déploiement dans un cadre éducatif

Ce kit OGM a été testé et très apprécié avec les classes de première S (avant la réforme du lycée). La réalisation de cette expérience est suffisamment simple pour être réalisée en classe, le tout est de bien relier la pratique au concept de génétique qui permettra sa compréhension.

Il est possible de réaliser cette expérience en famille ou avec des plus jeunes à condition de ne pas rentrer dans les détails des mécanismes reliés à l'amplification de l'ADN.

Pour la partie pratique le point de vigilance le plus important est la mesure des volumes. Il faut bien choisir ses outils et s'assurer que les élèves savent pipeter. Si c'est la première fois il vaut mieux leur demander de pratiquer avec de l'eau dans un premier temps. Un guide d'utilisation des micropipettes est disponible en annexe.

En classe, nous vous proposons la séquence suivante :

Séance #1	Qu'est ce que l'ADN ? Que sont les gènes ? A quoi servent-ils ?
Séance #2	Que sont les OGMs ? A quoi peuvent-ils servir ? Dans quels domaines ?
Séance #3	La transdisciplinarité en Biologie : Fluorescence, DIY et détection d'OGM.
Séance #4	Utilisation du kit.
Séance #5	Débat autour des OGMs et leur utilisation sous forme de jeux de rôles (voir ci-dessous pour les rôles et la disposition)

