	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μ sat Alpha ³³ P	

Amplification PCR de micro-satellites (SSR) avec marquage radioactif alpha-³³P

Sommaire

1. Objectif.....	1
2. Principe.....	1
3. Consignes de sécurité.....	2
4. Matériel utilisé	4
5. Réactifs	5
6. Opérations préalables	5
7. Protocoles expérimentaux	5
A. Exemple pour un tri de primers :	8
B. Tableau de calcul.....	9
8. Hygiène et élimination des déchets.....	10

1. Objectif


La PCR de marqueurs de l'ADN de type microsatellites (SSR) avec marquage radioactif ³³P par utilisation de α -³³P-dCTP, suivie d'une séparation par électrophorèse, permet la mise en évidence de loci spécifiques dans des ADN.

L'ensemble de l'expérimentation est réalisable dans le laboratoire "P33" d'Agap.

2. Principe

→ Utilisation de α -³³P-dCTP pour le marquage radioactif de l'ADN amplifié durant une PCR de type microsatellite (SSR): des nucléotides CTP marqués sont incorporés durant la synthèse de l'ADN ; le phosphore marqué radioactivement est celui en position α .

Note: Un autre système de marquage radioactif utilise le γ -³³P-ATP : durant une étape précédant la PCR, on réalise un transfert du phosphore en position γ , marqué radioactivement, vers l'extrémité 5' de l'ADN des séquences amorces (primers) des microsatellites SSR. Marquage et PCR se font donc en deux étapes distinctes. Cette méthode est l'objet d'une autre fiche de protocole.

	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μsat Alpha³³P	

La PCR avec $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP est particulièrement utilisée en "tri de primers" (*screening*) : avant d'étudier une population, généralement la descendance d'un croisement, on testera les primers sur les 2 parents ou un échantillon représentatif, pour repérer les SSR présentant un polymorphisme entre les parents ou au sein de l'échantillon. Etant donné que le nombre d'ADN étudiés est alors très petit, parfois seulement 2, le marquage avec $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP des amorces est difficilement réalisable en raison de trop petits volumes à pipeter.

La séparation des ADN générés dans un gel d'acrylamide par électrophorèse sur cuve verticale et l'autoradiographie sont traités dans une autre fiche mode opératoire.

Le radio-isotope ^{33}P est nettement moins dangereux à manipuler que ^{32}P , qui en revanche présente un signal plus intense à quantité égale. Les protocoles seraient peu différents avec l'isotope ^{32}P .

3. Consignes de sécurité

La nocivité des produits utilisés dans le labo P33 intervient à 2 niveaux :

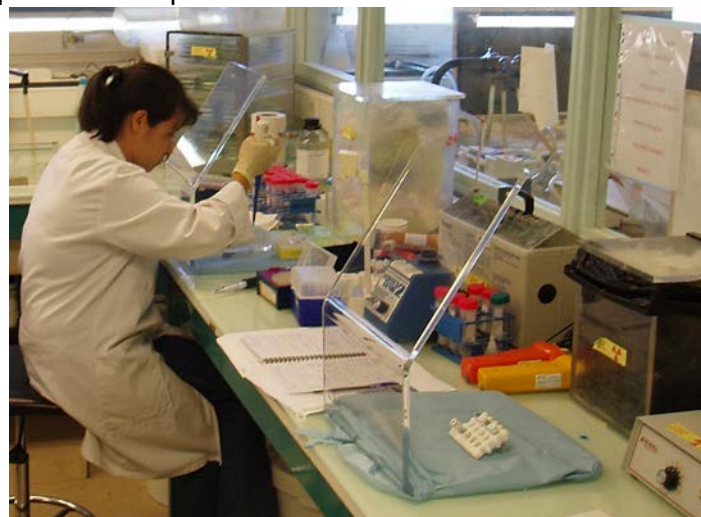
- radioactivité
- chimie s.s.


Il conviendra donc de se protéger spécifiquement vis-à-vis de ces 2 risques.

L'utilisation de générateurs de haut voltage en environnement humide induit également un risque, mais qu'on peut considérer comme bien contrôlé par les systèmes de protection au niveau des équipements eux-mêmes et des circuits d'alimentation.

Radioactivité : l'isotope 33 du phosphore, ^{33}P ou 33P, est utilisé pour le marquage de l'ADN ; la radiation émise par le ^{33}P est de type β (beta), avec demi-vie de 25.4 jours, énergie maximum de 0.249 Mev (100%), distance d'action dans l'air de 46 cm, dose-limite annuelle (ALI) 3 mCi. C'est en fait une radioactivité relativement peu dangereuse, mais un contrôle extrêmement strict des activités en manipulation du 33P et dans la zone concernée est obligatoire et indispensable :

- ✚ la zone de manipulation directe dans le laboratoire P33 est limitée à 2 emplacements avec écran plexi sur une paillasse de la salle

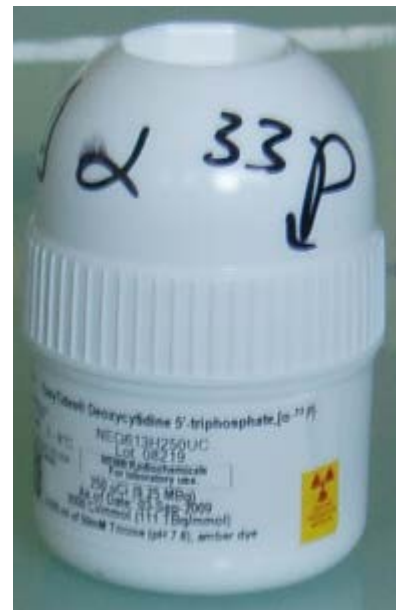


	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μsat Alpha^{33P}	

- interdiction de manger, boire ou fumer dans le laboratoire ; pas de pipetage bouche
- les conteneurs à ³³P sont stockés dans le réfrigérateur ; ils sont marqués d'une croix une fois vides



- l'utilisation correcte de ces matières radioactives est l'objet d'une formation ; en particulier :
 - S'assurer toujours qu'il s'agit du bon produit, car il y a aussi les flacons de $\gamma^{33}\text{P-ATP}$
 - Sortir le flacon en verre de l'emballage protecteur en plastique au moment de pipeter, pour éviter de souiller cet emballage, qui ne serait alors plus protecteur




- ✚ les manipulations se font à l'abri des écrans plexi et sur un matériau absorbant (film de paillasse bleu)
 - blouse et gants obligatoires

- ✚ contrôle et décontamination éventuelle de la zone de travail doivent être réalisés avant et après les manipulations

- le contrôle s'effectue avec le compteur Geiger ; le nettoyage peut être réalisé avec du papier-éponge, éventuellement imbibé du nettoyant spécifique
- les déchets vont dans des conteneurs spéciaux en plexi pour tous les matériels (jetables) souillés ; un stockage permettra ensuite d'attendre que la radioactivité ait naturellement décré jusq'au seuil de non-dangerosité ; pour les déchets liquides (essentiellement les solutions utilisées pour les électrophorèses), des bidons en plastique sont utilisés
- la norme en terme d'intensité à risque est un seuil de 3x le bruit de fond ambiant (atmosphère non contaminée), mesuré avec le compteur Geiger

Tout incident doit être signalé immédiatement pour être géré conformément à la réglementation : avertir en particulier l'ingénieur-sécurité responsable.

	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μsat Alpha³³P	

Risques chimiques : certains produits chimiques utilisés sont potentiellement dangereux ou très dangereux. Précisions :

- formamide (synonymes carbamaldehyde, methanamide) : composant du "bleu-formamide" (90% formamide, 0,02% xylène cyanole, 0,02% bleu de bromophénol, 25 mM EDTA) ; irritation des voies respiratoires, risque d'effets sur le système nerveux central, cause irritation oculaire et cutanée, risque d'effets sur la reproduction et sur le fœtus, nocif si avalé, inhalé ou absorbé par la peau, hygroscopique ; organes-cibles: système nerveux central, foie, yeux, système reproducteur, peau, muqueuses
- bleu de bromophénol, xylène cyanole, EDTA, MgCl₂, Tris-HCl, KCl, glycérol : présents en faibles concentrations et modérément ou peu irritants ou toxiques
- Taq, dNTP : enzymes (protéines) ou acides nucléiques non toxiques ou irritants.

Consignes générales en laboratoire P33:

- gants et blouse obligatoires ; interdiction de manger ou boire
- interdiction de sortir des matériels pouvant être contaminés par de la radioactivité, hors conteneurs spéciaux
- utiliser les poubelles prévues pour chaque type de déchet
- contrôler et nettoyer les éventuelles souillures des équipements par la radioactivité
- signaler les incidents de contamination radioactive
- nettoyer les éventuelles taches, éclaboussures, d'acrylamide, afin d'éviter qu'après séchage des produits puissent se disperser ensuite sous forme de poussières qui contamineront l'air (que nous respirons) ; éventuellement signaler des chutes de produits à terre ou toute contamination importante du local pour qu'un nettoyage soit réalisé.



En cas de problème électrique:

- un interrupteur général de sécurité est installé sur un mur de la salle d'électrophorèse


4. Matériel utilisé

Principaux équipements :

- thermocycleurs (PTC, Programmable Thermal Controller)

Equipements complémentaires :

- micropipettes, pipette à répétition, pipette multicanal, eppendorfs, plaques PCR 96 puits (pas d'autre format pour les PTC présents)
- réfrigérateur, congélateur
- mini-centrifugeuse
- sondes Geiger

	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μ sat Alpha ³³ P	

5. Réactifs

Nom du réactif	Formule chimique et caractéristiques
α^{33} P-dCTP	2'-deoxyCytidine 5'-triphosphate α^{33} P (3000Ci/mmol, 10mCi/ml), dCTP avec phosphore isotope radioactif 33P en position alpha
formamide (dans le bleu-formamide)	synonymes carbamaldehyde, methanamide, CH ₃ NO, MW 45.04
bleu de bromophénol	3,3',5,5'-Tetrabromophenol sulfonphthalein; 4,4'-(3H-2,1-benzoxathiol-3-ylidene)bis[2,6-dibromophenol] S,S dioxide
xylène cyanole	synonymes xylene cyanole FF, cyanol FF, MW 538.61
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate, C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₁₀ Na ₂ , MW 372.20
MgCl ₂	magnesium chloride, MW 95.2
Taq polymerase	protéine, taille 835 aminoacides
ADN, dNTP	acides nucléiques

Voir les fiches correspondant à ces différents produits pour leur toxicité et les précautions réglementaires.

A titre indicatif :


Nom du réactif	Toxicité	Protection cutanée	Protection oculaire	Protection respiratoire
α^{33} P-ATP	danger radioactif éviter tout contact et exposition rapprochée et/ou prolongée	X		
formamide (dans le bleu-formamide)	toxique risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant			

6. Opérations préalables

- ADN étudié prêt, dosé suivant protocole
- Primers prêts : dilution spéciale à 2 μ mole/l pour ce type de PCR
- Réserver les équipements : PTC en particulier ; chacun indique pour la semaine suivante les souhaits de nombres de PTC sur le tableau collé à la porte du laboratoire P33 ; les négociations, si nécessaires, ont lieu le jeudi matin 10h
- Commander la radioactivité pour la semaine suivante (attention congés et fériés!) : jeudi matin dernier délai ; le α^{33} P-ATP est beaucoup moins utilisé que le γ^{33} P-ATP, les quantités commandées sont moindres et les stocks également ; les surplus auront moins de chances d'être utilisés si on en a commandé en excès.

7. Protocoles expérimentaux

Le protocole ci-dessous concerne les méthodes pour PCR de marqueurs de type micro-satellites avec marquage ³³P (phosphore isotope 33 radioactif) des segments d'ADN synthétisés, par incorporation de α^{33} P-dCTP, sur ADN extrait de plantes, pour, ultérieurement, séparation par électrophorèse et visualisation par autoradiographie.

	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μ sat Alpha ³³ P	

Méthode microsatellite alpha³³P – AGAP/labo P33

Les ADN


Deux catégories d'ADNs sont concernés :

→ Primers

- les amorces ou primers SSR sont en général issus de synthèse par des laboratoires spécialisés ; ils sont donc purs et leurs concentrations sont connues
- les primers SSR fonctionnent en couples F (forward) / R (reverse) ou 5'/3'
- les primers neufs sont en général sous forme lyophilisée dans un tube ; on crée une solution de stock à 100 μ M dans de l'eau pure stérile ; puis parfois une solution d'usage à 20 μ M (coton, par ex.) ou moins ; après ajout d'eau à l'extrait lyophilisé, laisser au moins 24h au réfrigérateur
- les quantités des primers SSR utilisées en PCR α^{33} P sont petites puisque très peu d'individus sont testés ; pour un pipetage plus précis, une dilution sera réalisée préalablement (à 2 μ mole/l par ex. pour le coton) ; joindre alors les 2 primers dans un même tube pour économiser temps et matériel
- ces opérations sont à réaliser hors du labo P33.

→ ADN étudié

- généralement obtenu par extraction de tissus végétaux ; il peut être obtenu par diverses méthodes d'extraction (MATAB, CTAB, etc..) avec éventuellement purification, sans affecter les résultats, pour autant que les concentrations en contaminants inhibiteurs de la PCR restent faibles.
- la concentration de travail des ADN étudiés pour les SSR est basse (relativement à celle pour AFLP, par ex.) : 10 ng/ μ l ou moins, dans H₂O stérile ; pour le coton, par ex., 0,2 à 5 ng/ μ l sont utilisés ; de petites quantités d'extrait peuvent donner de meilleurs résultats si éventuellement les extraits ne sont pas très propres, car il y aura alors moins d'inhibiteurs de PCR
- ne pas conserver l'ADN à ces concentrations basses, car l'activité hydrolytique entraînera sa dégradation ; des congélations/décongélations répétées d'ADN faiblement concentré entraîneront également sa dégradation ; maintenir donc un stock concentré (au moins 200 ng/ μ l) et diluer dans de l'eau pure stérile des quantités à utiliser sous des délais brefs, conservées à +4°C
- utiliser des plaques 96 puits en polypropylène transparent
- pour des expérimentations répétant une disposition identique des ADN dans les plaques, préparer à l'avance les plaques en distribuant l'ADN avec des micropipettes à répétition ; mettre ensuite un opercule adhésif et stocker au froid jusqu'à utilisation, réfrigérateur pour quelques jours ou -20°C pour plusieurs semaines (ces opérations sont à réaliser hors du labo P33).

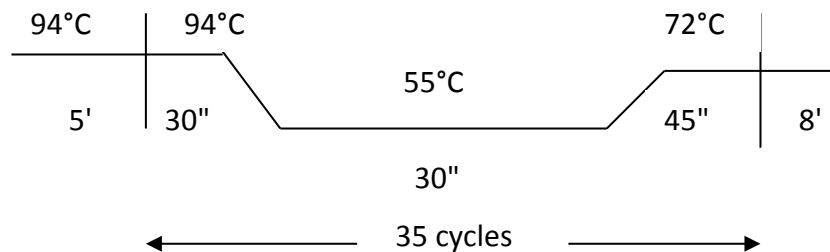
	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μsat Alpha³³P	

PCR ou "polymerase chain reaction"

La PCR de micro-satellites (SSR) avec marquage radioactif $\alpha^{33}\text{P}$ est directe : PCR en présence des 2 amorces de chaque SSR et du $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP (dCTP avec phosphore ^{33}P en position alpha).

La PCR est réalisée selon le principe classique avec la *Taq* polymérase (ADN polymérase thermorésistante de *Thermus aquaticus/Thermus thermophilus*) ; on peut utiliser d'autres polymérases que la *Taq* (dépourvue d'activité exonucléasique 3'-5', donc sans correction d'erreur lors de la copie).


Un programme-type de PCR est schématisé ci-dessous :



Un des paramètres importants est la température d'hybridation, caractéristique de chaque couple de primers ; elle sera un des premiers paramètres à prendre en compte lors de la programmation des thermocycleurs.

Les **principaux ajustements expérimentaux** aux nombreux paramètres d'une PCR portent sur :

- l'adaptation de la température d'hybridation aux primers
- un décément ("touch-down") de température d'hybridation progressif (plus de sélectivité)
- le nombre de cycles (généralement 35-36 cycles au total, au-delà l'activité de la *Taq* est incertaine)
- la durée des étapes d'hybridation et d'extension (par ex. 30 s - 45 s, ou 30 s – 1 mn)
- le volume global de la réaction dans chaque puits : de 25 μl (par ex. 5 μl d'ADN + 20 μl de mix), on peut descendre, pour économiser et sachant qu'on utilisera environ 6 μl pour une électrophorèse, à 15, 12, ou même 10 μl ; 10 μl semble une limite relativement à la répétabilité avec les plaques 96
- la quantité d'ADN initiale, suivant son titre ; pour certaines plantes, des quantités beaucoup plus importantes que dans le tableau ci-dessous sont préconisées ; notons que des quantités réduites limitent les concentrations en inhibiteurs de la PCR présents dans des extraits non purifiés, améliorant considérablement la PCR
- la concentration des primers ; de 0.2 μM en standard, elle peut être augmentée, certains auteurs mettant 0,3, par ex.

	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μ sat Alpha ³³ P	

- le multiplexage, combinaison de différents SSR compatibles au niveau températures d'hybridation des primers et différenciation des bandes après électrophorèse, est possible, sauf dans le cas d'un screening

- l'adaptation de la quantité de Taq selon les caractéristiques de celle effectivement utilisée (à AGAP, normalement, Taq courante évaluée à 2 U et non 5)

Les réactifs et les quantités pour une réaction de base, correspondant à l'amplification d'1 ADN, sont, pour des primers à 2 μ M et un volume de la PCR de 25 μ l/puits dont 5 μ l d'ADN testé et 2x2,5 μ l de primers :

	Conc.	Concentr. finale		μ l / puits
Eau Merck	-	-		9.425
Tampon 10x	10	1	X	2.5
MgCl ₂	50000	500	μ M	0.25
dNTP	2500	200	μ M	2
α^{33} P-dCTP				0.2
Taq	2	0.05	U/ μ l	0.625
Total sauf primers et ADN				15
Amorce F	2	0.2	μ M	2.5
Amorce R	2	0.2	μ M	2.5
ADN	5	1	ng/ μ l	5
Volume total PCR				25


Notes :

- le tampon 10X contient 15 mmol/l MgCl₂, donnant en concentration finale 1.5 mmol/l MgCl₂ ; le MgCl₂ rajouté porte la concentration finale à 2.0 mmol/l MgCl₂
- attention au dosage des primers : 2 μ M/l, donc 1/10 du titre habituel 20 μ M ; il faut donc diluer préalablement les primers, sauf se risquer à pipeter de très petits volumes
- avec α^{32} P au lieu de α^{33} P, mettre 0,15 μ l / puits au lieu de 0.20.

A. Exemple pour un tri de primers :

En pratique, il s'agit le plus souvent de chercher si un polymorphisme existe pour une série de marqueurs microsatellites, entre les 2 parents d'une descendance ; on aura alors, pour 20 SSR étudiés par ex. :

- ADN = 2 parents + F1 (probablement) = 3 individus
- 20 SSR testés
- total 60 puits ; on prépare un mix pour 60+10% = 66 puits
- les primers et l'ADN sont disposés dans les puits adéquats
- le mix est réparti dans les puits + 1 une goutte d'huile au-dessus contre l'évaporation
- lancement de la PCR dans un PTC.

	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μ sat Alpha ³³ P	


Pour faciliter les calculs des quantités suivant les différentes conditions : nombre de SSR à tester, nombre d'ADN, volume total de PCR par puits, concentrations des primers, des ADN, de la Taq, etc., on utilise des tableaux sur feuille de calcul.

B. Tableau de calcul

Le tableau joint, format Excel, permet de calculer les quantités des différents composants de la PCR en ajustant un certain nombre de paramètres.

PROTOCOLE PCR SSR ALPHA33P						
Protocole PCR SSR alpha33P : calcul Mix Tri SSR pour x ADN x y SSR						
Valeurs en bleu = modifiables. Attention aux formules !	nombre SSR =		10		Vol. Mix pour 1 SSRx 3 ADN +10%	Volume Mix pour 10 SSRx3 ADN +10%
	nombre ADN =		3			
		N = SSRxADN=		30		
	Conc.	Concentr. finale		μ l / puits	μ l pour 3 adn x 1 SSR	μ l p/ 10 SSR x 3 adn
eau Merck QSP				4.77	15.7	157.4
Tampon 10X	10	1	X	1.00	3.3	33.0
MgCl ₂ (50 mM)	50000	500	μ M	0.10	0.3	3.3
dNTP (2.5mM)	2500	200	μ M	0.80	2.6	26.4
alpha33P-dCTP				0.08	0.3	2.6
Taq pol. (2 U/ μ l)	2	0.05	U/ μ l	0.25	0.8	8.3
Total sauf primers et ADN (μ l)				7.00	23.1	231.0
La quantité de mix à distribuer par puits doit être compatible avec la pipette multidistributrice						
Primer F	2	0.2	μ M	1.00	3.3	
Primer R	2	0.2	μ M	1.00	3.3	
Total sauf ADN (μ l)				9.00	29.7	
ADN	5	0.5	ng/ μ l	1.00		
Volume total PCR (μl)				10		
2 possibilités :						
option 1: Répartir 7 μl mix/puits contenant déjà primers et ADN						
option 2: Répartir 9 μl mix/puits avec déjà l'ADN						
- Mettre une goutte d'huile dans chaque puits (contre l'évaporation)						
- Placer dans PTC du labo P33 avec programme adéquat						
Après la PCR :						
Bleu formamide 2 X	2	1		10.0		
Volume final				20.0		
- Noter très lisiblement la date de PCR (sur la languette de l'adhésif)						
- Stocker au réfrigérateur (derrière porte plexi de protection)						
- ou utiliser de suite en électrophorèse (attention à avoir homogénéisé)						

- en document Word : il suffit de "double-cliquer" sur le tableau, puis de le réenregistrer dans un classeur Excel
- ou : télécharger le fichier Excel complet : " CalcPcrSsr.xls " sur le site.

	Mode opératoire P32 P33	
	PCR μ sat Alpha ³³ P	

Notes importantes :

- bien préciser le volume final de la PCR par puits, qui détermine le calcul des quantités de tous les composants ;
- la concentration d'ADN en ng/ μ l est très variable suivant l'espèce végétale et la qualité de l'ADN ; par ex. 0.2 à 1 ng/ μ l pour le coton.
- au nombre réel d'ADN à amplifier, on ajoute en général 10% pour les calculs, en compensation des erreurs dans la distribution et des pertes diverses
- créer à l'avance les plaques PCR avec les ADN disposés dans les puits ; mettre un opercule spécial adhésif ; identifier les plaques ; centrifuger brièvement pour assurer que les échantillons sont au fond des puits ; stocker au réfrigérateur pour quelques jours, au congélateur pour plus longtemps (recentrifuger avant utilisation)
- la distribution du mix dans les puits se fait généralement avec une pipette à répétition, qui permet rapidité et grande précision des quantités ; assurer qu'elle sera disponible et sa batterie chargée
- les PTC du labo P33 n'ont pas de couvercle chauffant et le mix doit être recouvert d'une couche d'huile contre l'évaporation (1 goutte d'huile par puits avec mix PCR d'une plaque 96 puits).
- après amplification, ajouter du bleu-formamide 2X en quantité égale au volume de la PCR par puits ; stocker au réfrigérateur dans compartiment avec porte plexi ; si on va utiliser le jour même, il est impératif d'homogénéiser le mélange PCR+bleu dans chaque puits ; si on utilise le lendemain, une homogénéisation s'opèrera progressivement au cours du stockage..

Tampons :

- tampon de stockage de la Taq : 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 0.1% Triton[®] X-100, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, and 50% glycerol, ou 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol, 0.5% polysorbate 20, 0.5% NP-40, pH 7.4 (25°C)).
- tampon standard PCR Taq 10X : 100mM Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 1% Triton[®] X-100, 15mM MgCl₂
- tampon standard PCR Taq 1X : 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, pH 8.3.

8. Hygiène et élimination des déchets

- Blouse et gants obligatoires, lunettes fortement conseillées suivant les activités menées
- Poubelles et conteneurs spéciaux pour les différentes catégories de déchets, incluant entre autre le verre à recycler

Christopher Viot