

PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'ALU LOCUS PV92



PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5

THERMOCYCLEUR



Logiciel

DIDACTIQUE



EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-14
 - ▶ DÉTERMINATION DE LA PRÉSENCE DE L'INSERTION ALU



INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. FRÉQUENCES GÉNÉTIQUES ET ÉQUILIBRE DE HARDY ET WEINBERG 15-22
2. GÉNÉTIQUE ET ÉVOLUTION DES POPULATIONS HUMAINES 23-33



RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



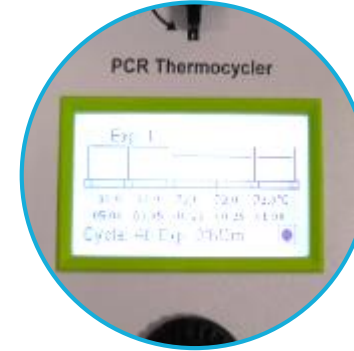
1 Connecter le thermocycleur PCR au secteur



2 Mettre le thermocycleur PCR en fonctionnement



3 Choisir le programme Modèle 1



Thermocycleur PCR
En savoir plus > page 58

Ordinateur

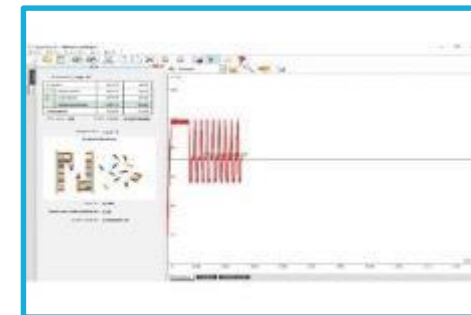
OPTION



4 Connecter le thermocycleur PCR à l'ordinateur



5 Allumer l'ordinateur



6 Télécharger puis lancer le logiciel didactique PCR



MATÉRIEL

> Appareillage

- Balance 0,01 g 1
- Agitateur magnétique chauffant 1
- Support de gel + peigne 1

> Verrerie et petit matériel

- Fiole jaugée 250 mL 1
- Éprouvette graduée 100 mL 1
- Erlenmeyer 100 mL 1
- Verre de montre 1
- Entonnoir 1
- Spatule 1
- Thermomètre 1
- Moule coulage gel 1

> Produits

- Tampon TAE concentré 10X
- Agarose

> À disposition

- 1 pissette d'eau distillée
- Ruban adhésif de peintre
- Gants - Blouse - Lunettes

PRÉPARER LE TAMPON

Verser le contenu du flacon de TAE 10X (25 mL) dans une fiole jaugée de 250 mL



Rincer 3x le flacon à l'eau distillée, verser cette eau de rinçage directement dans la fiole



3 X

Compléter la fiole en eau distillée jusqu'au trait de jauge (250 mL)

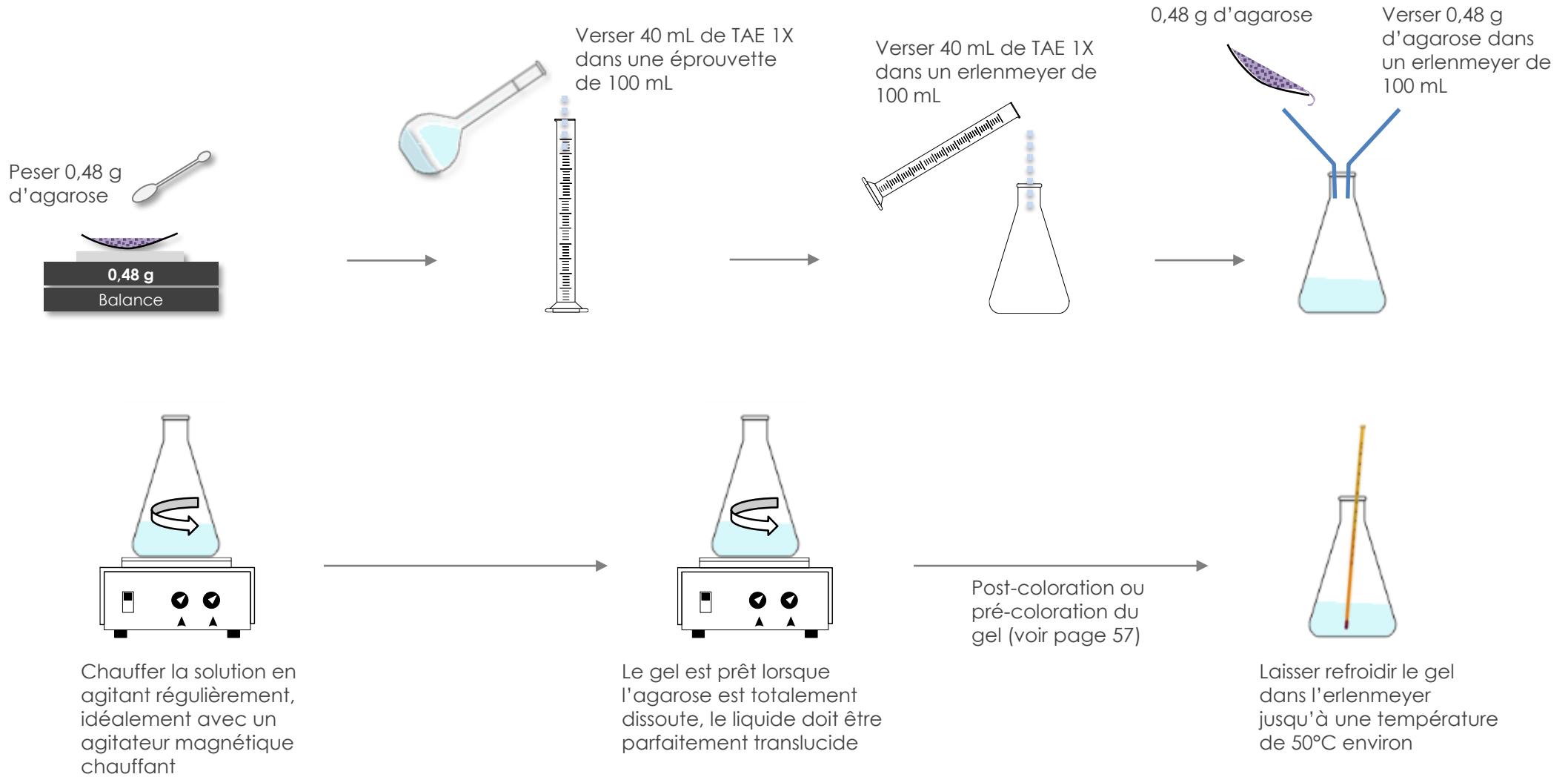


Vérifier le trait de jauge





PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 1,2 %

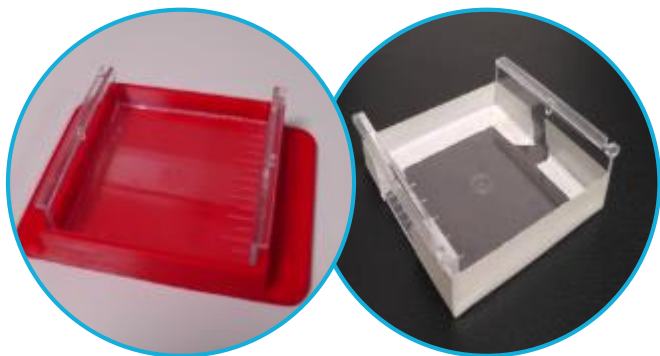


La nouvelle génération de colorants fluorescents facilite grandement les étapes de révélation. En fonction de la résolution de séparation des bandes d'ADN souhaitée, le gel peut être soit pré-coloré, ou alors coloré après la migration.

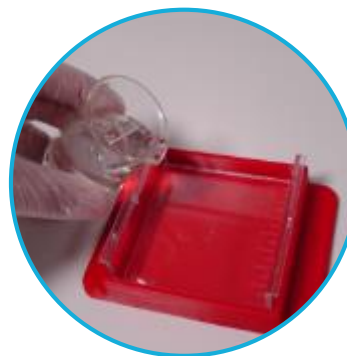


COULER LE GEL D'AGAROSE

Positionner le support du gel dans le moule (ou préparer le support du gel en bouchant ses extrémités à l'aide de ruban adhésif pour peintre). Posez-le sur une surface parfaitement horizontale.



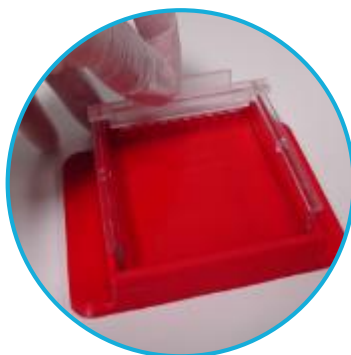
Couler le gel à 50°C dans le support sur une épaisseur de 0,5 cm environ.



Astuce

Si des bulles apparaissent, vous pouvez les faire éclater à l'aide d'un cône pour micropipette avant la solidification du gel.

Poser le peigne à sa place, pour former les puits lors du refroidissement du gel. Laisser le gel refroidir (15 – 20 min), en le mettant au réfrigérateur si nécessaire (ne transporter le support avec le gel que si celui-ci est déjà bien figé).



Une fois le gel complètement solidifié, retirer doucement le peigne dans un mouvement vertical, pour ne pas percer ou fêler les puits.



Astuce

Il est plus facile de retirer le peigne si le gel est immergé dans du tampon (mise en place dans la cuve avant de retirer le peigne).

Le gel peut être utilisé immédiatement ou conservé quelques jours au réfrigérateur dans du tampon de migration TAE 1X (une fois retiré du support).



TP PAS À PAS

Un profil génétique est unique chez un individu ; on utilise, pour le déterminer, deux techniques : la PCR puis l'électrophorèse. La technique de la PCR permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN.

UTILISATION DE LA MUTATION SITUÉE AU LOCUS PV92 DU CHROMOSOME 16 DU GÉNOME HUMAIN PROVOQUÉE PAR L'INSERTION D'ALU.

EXPÉRIMENTATION

> Contextualisation

Les éléments Alu sont une famille d'éléments courts intercalés (SINE) qui se sont intégrées dans les génomes de primates par rétrotransposition au cours des 65 derniers millions d'années, ce qui a entraîné la création d'une série de sous-familles Alu d'âges différents. L'insertion Alu PV92, située sur le chromosome 16, est spécifique à l'homme (Batzer et al. 1994). Cette insertion appartient à la sous-famille la plus récente des séquences Alu (Alu Ya5).

> Hypothèse

Lorsqu'un individu possède, sur un de ses chromosome 16, l'insertion Alu, alors la séquence amplifiée sera plus longue. Ainsi, lors de la migration des séquences par électrophorèse d'agarose, on observera 1 bande correspondant aux deux mêmes longueurs de gène lorsque l'individu est homozygote (avec ou sans l'insertion) et 2 bandes de longueurs différentes lorsque l'individu est hétérozygote.

> Ce que l'on cherche

Comment déterminer le génotype des individus (amplification d'un gène spécifique) ?
Amplifier le nombre de copies de l'ADN de chaque gène par PCR, pour les rendre détectables et identifiables par électrophorèse.

MATÉRIEL

> Matériel par poste

• Thermocycleur didactique	1
• Logiciel didactique	1
• Kit PCR amélogénine	1
• Micropipette 25 µL + cônes adaptés	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	1
• Portoir pour tubes PCR	1
• Cuve à électrophorèse	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	1
• Bécher 50 mL	1
• Transilluminateur	1
• Chambre noire pour transilluminateur	1
• Moule de coulage gel	1

> À disposition

- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN à déterminer
- ADN masculin & féminin
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée





VÉRIFIER AVANT DE COMMENCER LE TP

- > **Le thermocycleur** (page 2)
Programme Modèle 1
- > **Le gel d'agarose 1,2 %** (pages 3 à 5)



METTRE EN ŒUVRE LE TP - 1/7

> Préparer les tubes réactionnels

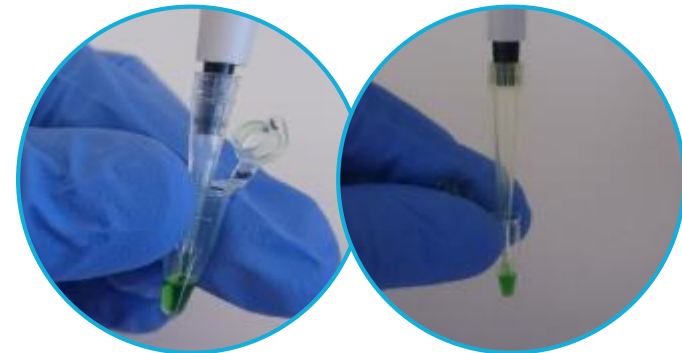


- Manipuler de préférence sur la glace, pour ne pas activer la Taq polymérase prématurément.
- Porter des gants (ou se laver très soigneusement les mains) pour éviter la contamination des échantillons avec de la DNase, enzyme détruisant l'ADN, présente naturellement sur la peau.

1 Annoter le tube (nom de la personne ou Masculin/Féminin, par exemple).



2 **Attention :** changer de cône avant chaque changement de solution. Déposer :
- 25 µL de PCR mix (tube à pastille verte),
- 25 µL de Primer mix (tube à pastille bleue).





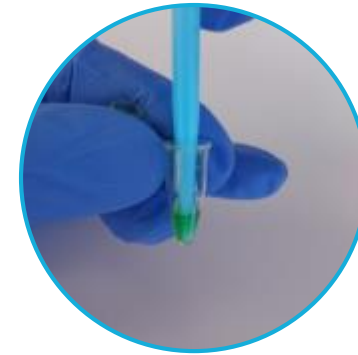
METTRE EN ŒUVRE LE TP - 2/7



- 3 Frotter l'intérieur de la joue d'un individu de sexe masculin avec la pointe stérile, perpendiculairement à la joue, 3 à 4 fois, pour détacher des cellules (sources de l'ADN qui sera amplifié).



- 4 Introduire la pointe dans le milieu réactionnel, remuer doucement puis la ressortir en prenant garde d'emporter le moins de milieu possible.



- 5 Refermer le tube. On utilisera plutôt une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.



- 6 Déposer le tube dans le thermocycleur. Répéter les étapes 1 à 6 précédentes en prélevant l'ADN d'un individu de sexe féminin. Préparer également discrètement un tube réactionnel contenant l'ADN à déterminer (masculin ou féminin).





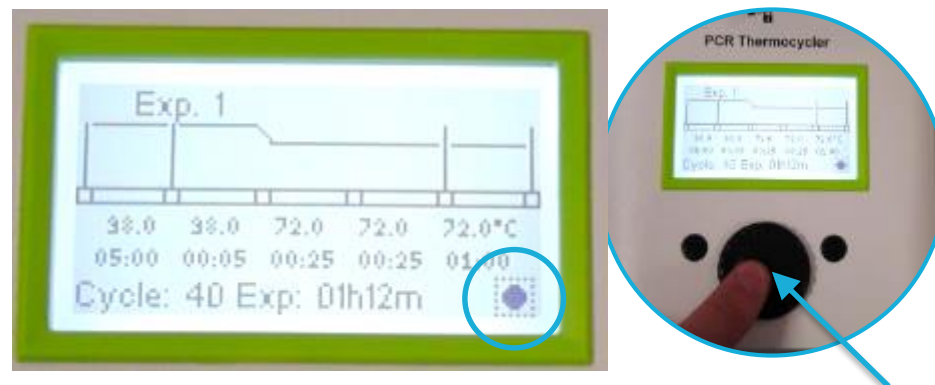
METTRE EN ŒUVRE LE TP - 3/7

> Amplification

- 1 Une fois tous les tubes en place dans le thermocycleur, fermer le couvercle.



- 2 Placer le curseur sur ● et appuyer sur OK pour lancer le programme Modèle 1.



> Préparer l'ADN amplifié

Une fois l'amplification terminée, récupérer les tubes. Dans chaque tube, ajouter 2 μ L de DNA release (tube à pastille rouge). Mélanger par pipetage doux.



Astuce

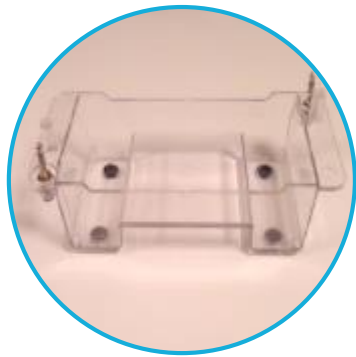
En fin de cycle, les tubes peuvent être stockés à 4 °C pendant 48 heures.



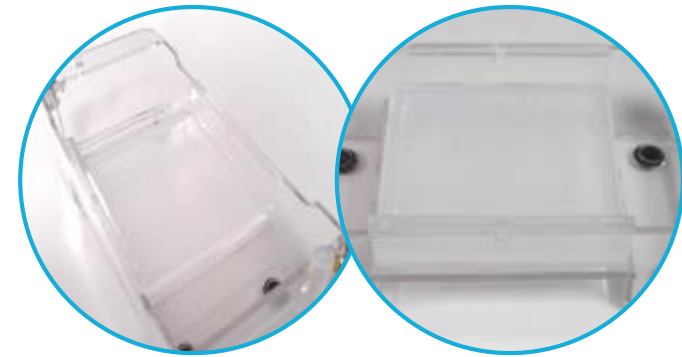
METTRE EN ŒUVRE LE TP - 4/7

> Préparer le dispositif pour électrophorèse

- 1 Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale.



- 2 Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative).



- 3 Remplir la cuve de TAE 1X jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 mm.





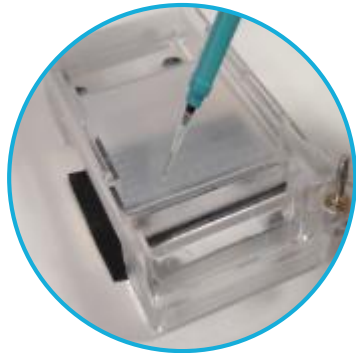
METTRE EN ŒUVRE LE TP - 5/7

> Dépôts

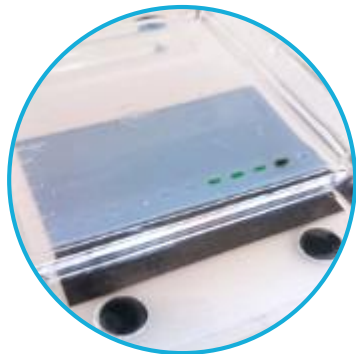


- Avant tout, s'assurer que le DNA release a bien été ajouté aux produits de PCR dans les tubes.
- Changer de cône à chaque changement de produit.
- L'ADN est chargé négativement, il migrera vers le pôle positif. Déposer l'ADN près du pôle négatif (cordon électrique noir).

1 1^{er} puit : déposer 10 µL de marqueur de poids moléculaire (tube à pastille jaune).



2 Puits suivants : déposer 8 µL de produit de PCR (1 puit par tube).



Astuce

Pour rendre les puits plus visibles et faciliter les dépôts, il est utile de glisser un morceau de papier noir sous la cuve.

Astuce

Pour éviter les fuites de produit hors des puits et les bulles d'air lors des dépôts, déposer très lentement à mi-hauteur dans les puits et arrêter avant que le cône ne soit entièrement vide (ne pas dépasser la 1^{ère} butée du piston de la micropipette).

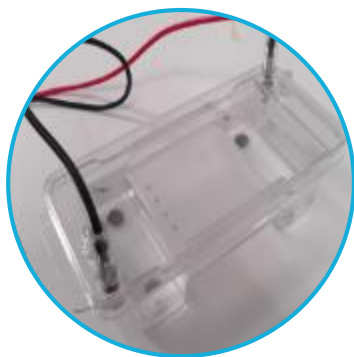




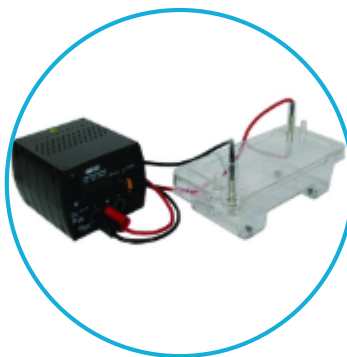
METTRE EN ŒUVRE LE TP - 6/7

> Migration

1 Poser le couvercle sur la cuve.



2 Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité.



3 Régler l'alimentation sur 140 V (ou moins, la migration sera plus propre, mais plus longue).



4 Lancer la migration en mettant l'alimentation sous tension.

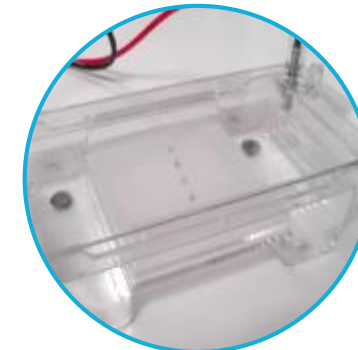
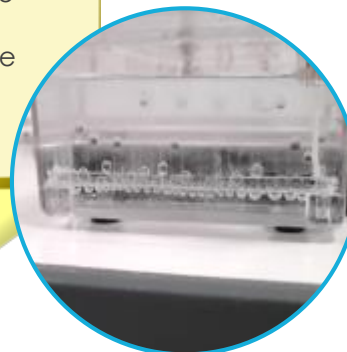


Astuce

Surveiller l'apparition de petites bulles sur les électrodes de la cuve, si elles n'apparaissent pas, c'est que le courant ne circule pas.

Surveiller le départ du colorant témoin de migration. S'il part dans le mauvais sens (vers l'arrière du gel, au risque de sortir de celui-ci) mettre immédiatement hors tension et inverser les branchements sur l'alimentation avant de relancer la migration.

5 Une fois le front de migration (visible grâce au colorant) arrivé aux 2/3 ou 3/4 du gel (environ 20 à 30 min à 140V), mettre le circuit hors tension pour stopper la migration et sortir le gel de la cuve pour le colorer.





METTRE EN ŒUVRE LE TP - 7/7

> Coloration (post-coloration)

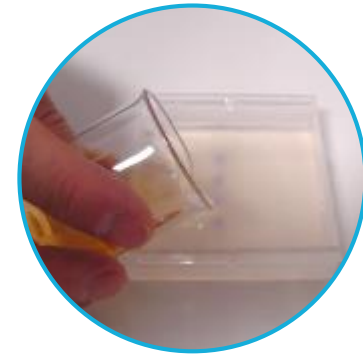
1 Préparer la solution du bain de coloration. Dans un bécher, verser 4,5 μ L de GelGreen[®] pour 25 mL d'eau distillée.



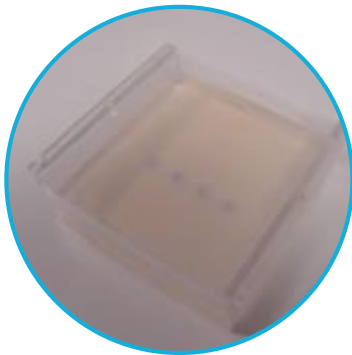
2 Si le TP a lieu plus tard (2h max.), protéger le bécher de la lumière à l'aide d'un aluminium.



3 Verser le contenu du bécher dans une petite cuve pour limiter au maximum les volumes morts.



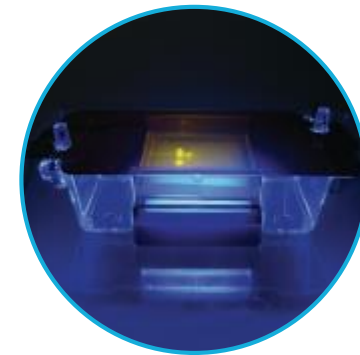
4 Faire tremper le gel 30 minutes, en couvrant d'un aluminium ou protéger de la lumière sous la chambre noire.



Astuce

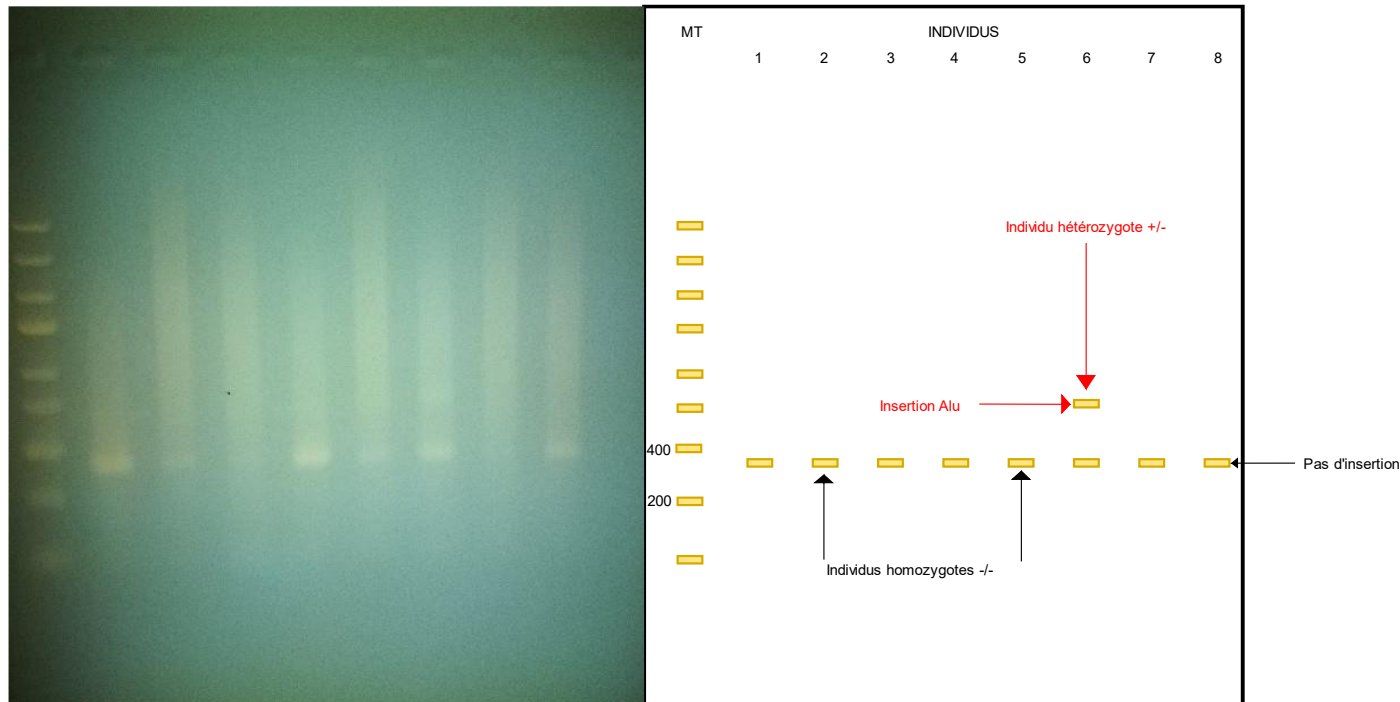
Pour économiser du colorant ou si on ne dispose pas de petit récipient adapté au gel, après l'électrophorèse il suffit d'entourer le gel et son support d'un film étirable type Parafilm[®] M pour étanchéifier les côtés ouverts puis on dépose 10 mL de solution additionnée de 2 μ L de GelGreen[®] pendant 30 à 45 minutes à l'obscurité.

5 La lecture s'effectue sur le transilluminateur .





EXEMPLES DE RÉSULTATS



EXPLOITATION DES RÉSULTATS



> Analyse

L'ADN des individus 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 8 contient 2 séquences de tailles similaires : les individus sont homozygotes et ne possèdent pas l'insertion. L'ADN de l'individu 6 contient 2 séquences de taille différentes : l'individu est donc hétérozygote et possède, sur un de ses allèles, l'insertion Alu

> Conclusion

La PCR a permis l'amplification du nombre de copies de l'ADN de la séquence contenant l'insertions Alu PV92. Puis, l'électrophorèse a permis de différencier 2 fragments de gènes, de longueurs différentes, confirmant la diversité génotypique des individus étudiés.

Au sein d'une population, il existe alors une diversité génétique qui peut être mise en évidence.

PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'ALU LOCUS PV92



PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5

THERMOCYCLEUR



Logiciel

DIDACTIQUE



EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-14
 - ▶ DÉTERMINATION DE LA PRÉSENCE DE L'INSERTION ALU



INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. FRÉQUENCES GÉNÉTIQUES ET ÉQUILIBRE DE HARDY ET WEINBERG 15-22
2. GÉNÉTIQUE ET ÉVOLUTION DES POPULATIONS HUMAINES 23-33



RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



INVESTIGATION 1 > FRÉQUENCES GÉNÉTIQUES ET ÉQUILIBRE DE HARDY ET WEINBERG

MISE EN SITUATION PÉDAGOGIQUE

L'insertion Alu PV92, située sur le chromosome 16, est spécifique à l'homme (Batzer et al. 1994). Cette insertion appartient à la sous-famille la plus récente des séquences Alu (Alu Ya5) (Batzer et al. 1996b).

Les éléments Alu affectent le génome de plusieurs manières, provoquant des mutations d'insertion, des recombinaisons entre éléments, la conversion de gènes et des altérations de l'expression des gènes. Les polymorphismes liés à l'insertion d'Alu sont intéressants dans l'étude de la génétique des populations humaines et de la génomique comparative des primates car ces insertions sont des marqueurs génétiquement neutres de descendance identique avec des états ancestraux connus. (Batzer et Deininger 2002)

CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 1/5

> Les fréquences génétiques et l'équilibre de Hardy et Weinberg

L'ensemble des contraintes qui s'exercent sur la population va déterminer sa constitution génétique et l'importance des variations génétiques qu'elle présente constituent son potentiel évolutif. Les différents croisements qui se produisent dans la population vont déterminer les fréquences relatives des génotypes. La constitution génétique de la population peut être définie par la distribution des gènes sur différents loci. (Lodé 1998)

Les fréquences génotypiques sont déterminées par les modes de croisement et pour qu'une répartition de caractères se fasse selon les lois de probabilité mathématique, il faut que les croisements se déroulent de manière aléatoire dans la population. C'est l'hypothèse de la **panmixie**.

Le modèle fondamental de la génétique des populations correspond à un équilibre des fréquences génotypiques attendus dans une descendance en fonction des fréquences alléliques parentales, c'est l'**équilibre de Hardy et Weinberg**.

Ce modèle énonce que, de générations en générations, et dans des conditions stables, les fréquences des allèles à un locus donné restent constantes.

Les facteurs qui modifient la structure génétique de la populations altérant l'équilibre de Hardy et Weinberg peuvent dès lors être considérés comme des **processus évolutifs**. Ces facteurs peuvent venir perturber les fréquences génotypiques ou même modifier les fréquences alléliques. Les changements de fréquences alléliques constituent des événements majeurs de l'évolution mais des modifications importantes des fréquences génotypiques peuvent également avoir des implications considérables

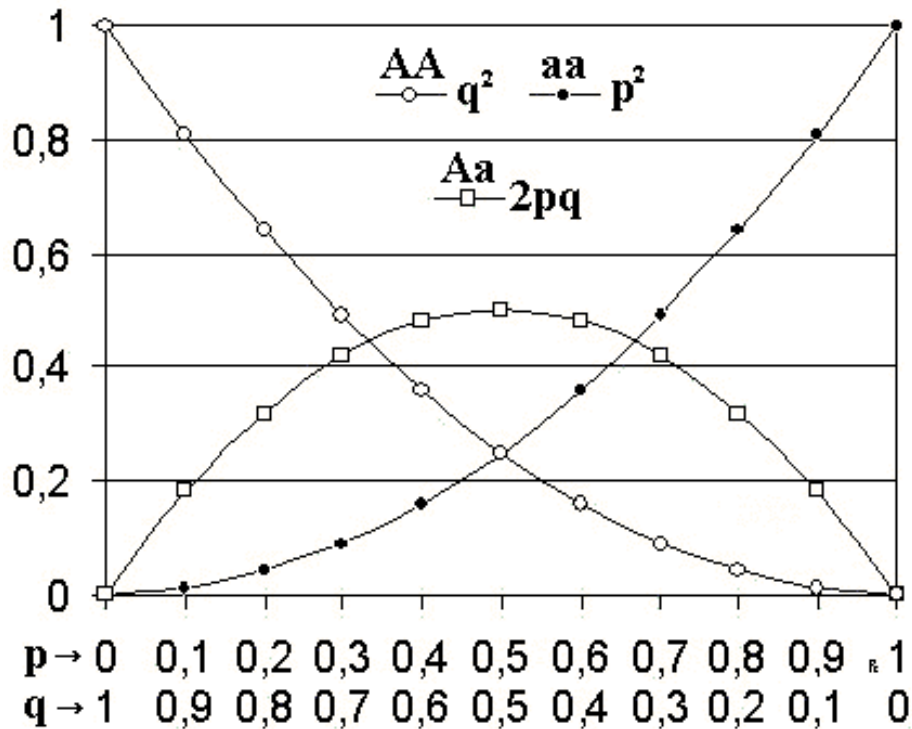
L'évolution peut donc être définie comme un changement durable dans une population provoqué par une altération des conditions qu'équilibre (Lodé 1998)



CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 2/5

Pour mesurer les écarts entre la distribution observée et la distribution théorique on pratique un test d'équilibre ou test du χ^2

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$



Graphique représentant la répartition des fréquences génotypiques en fonction des fréquences allélique sous équilibre de Hardy et Weinberg



CE QUE L'ON CHERCHE

> Hypothèse

L'insertion Alu est présente chez certains individus d'une population. L'étude des fréquences alléliques et génétiques de la population permet de tester si la population étudiée est en équilibre selon le modèle mathématique de Hardy et Weinberg.

METTRE EN ŒUVRE LE TP

Mise en œuvre et interprétation identique au TP pas à pas (pages 6 à 14)

Pour résumer

- > Préparer les tubes réactionnels
 - 25 µL de PCR mix (tube à pastille verte),
 - 25 µL de Primer mix (tube à pastille bleue),
 - Frottis buccaux d'individus féminins et masculin.
- > Amplification
 - Lancer le programme Modèle 1.
- > Préparer l'ADN amplifié
 - Ajouter 2 µL de DNA release (tube à pastille rouge).
- > Préparer le dispositif pour électrophorèse en gel 1,2 % en tampon TAE.

MATÉRIEL

> Matériel par poste

• Thermocycleur didactique	1
• Logiciel didactique	1
• Kit PCR amélogénine	1
• Micropipette 25 µL + cônes adaptés	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	1
• Portoir pour tubes PCR	1
• Cuve à électrophorèse	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	1
• Bécher 50 mL	1
• Transilluminateur	1
• Chambre noire pour transilluminateur	1
• Moule de coulage gel	11

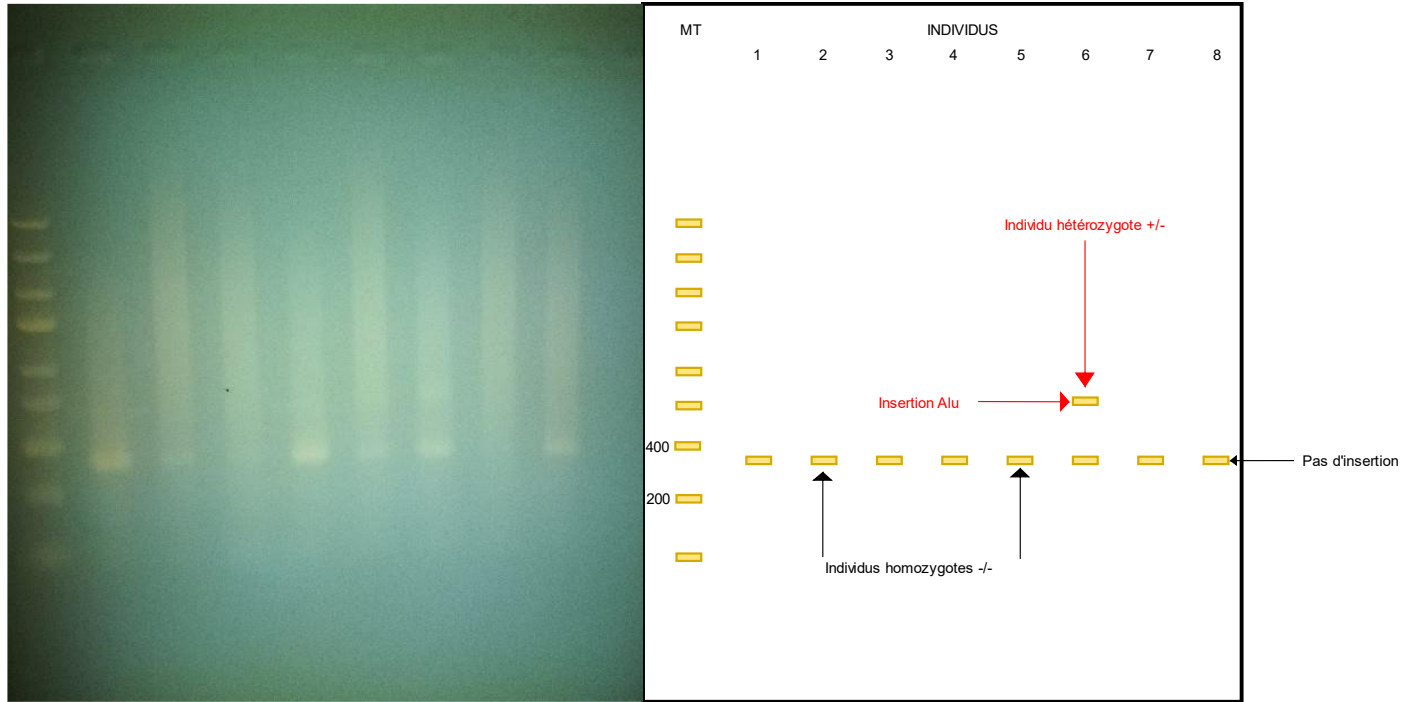
> À disposition

- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN masculin
- ADN féminin
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée





EXEMPLES DE RÉSULTATS



EXPLOITATION DES RÉSULTATS (1/4)

La PCR amplifie un segment de 415 pb si l'insertion n'est pas présente. Si elle l'est, l'insertion sera de 715pb (Allèle « + » : insertion d'Alu ; Allèle « - » : pas d'insertion d'Alu)

Résultats :

Génotype	Nombre d'élèves concernés	Nombre d'allèle « + »	Nombre d'allèle « - »
+/+	0	0	0
+/-	1	1	1
-/-	7	0	14
Total	8	1	15



EXPLOITATION DES RÉSULTATS 2/4

Calcul de la fréquence de l'allèle « + » :

$$f(+) = \frac{1 \text{ allèles } +}{16 \text{ allèles totales}} = 0,0625$$

Calcul de la fréquence de l'allèle « - » :

$$f(-) = \frac{15 \text{ allèles } -}{16 \text{ allèles totales}} = 0,9375$$

→ Fréquences génotypiques : Comment la distribution des génotypes Alu dans votre classe se compare-t-elle à celle des autres populations ?

Pour cette analyse, vous devez calculer une fréquence de génotype, le pourcentage d'individus au sein d'une population ayant un génotype particulier.

$$p^2 = f(+) \times f(+) = 0,0625^2 = 0,0039$$

$$q^2 = f(-) \times f(-) = 0,9375^2 = 0,8789$$

$$2pq = 2 \times f(+) \times f(-) = 2 \times 0,0625 \times 0,9375 = 0,1172$$

Population	n	PV 92		
		Frequency of Alu	Het	SE
European-Americans	45	0.178	0.296	0.052
African-Americans	43	0.209	0.335	0.051
Hispanics	44	0.523	0.505	0.009
Afro-Caribbeans	42	0.143	0.248	0.055
Swiss	43	0.198	0.321	0.052
Bretons	45	0.267	0.396	0.044
French Acadians	45	0.178	0.296	0.052
Greek Cypriots	50	0.250	0.379	0.044
Turkish Cypriots	33	0.333	0.451	0.040
Nigerians	11	0.091	0.173	0.101
Pygmies	34	0.309	0.433	0.044
French	44	0.227	0.355	0.049
Alaska Natives	42	0.619	0.477	0.026
Greenland Natives	42	0.607	0.483	0.024
Average heterozygosity (Het)			0.423	
Standard error (SE)			0.011	
G _{st}			0.132	

Les fréquences calculées sont bien inférieures aux fréquences présentées dans le document ci-dessus. La variation des résultats est probablement due à la taille très petite de la population



EXPLOITATION DES RÉSULTATS 3/4

Le modèle fondamental de la génétique des populations correspond à un équilibre des fréquences des génotypes attendues dans une descendance en fonction des fréquences alléliques parentales, c'est l'équilibre de Hardy et Weinberg. Le modèle de Hardy et Weinberg constitue une loi d'inertie et énonce que, de génération en générations et dans des conditions stables, les fréquences des allèles à un locus donné, restent constantes, de la même manière que les fréquences génotypiques qui y sont liées.

En principe et selon certaines conditions, la fréquence des allèles est conservée indéfiniment tant qu'elle n'est pas perturbée par des phénomènes évolutifs.

Afin de déterminer si la population un changement durable par une altération des conditions d'équilibre, il est possible de mesurer les écarts entre la distribution observée et la distribution théorique des génotypes d'une population. On pratique alors un test d'équilibre ou test de χ^2 .

→ Calcul des génotypes attendus :

$$p^2 \times \text{population totale} = 0,0039 \times 8 = 0.0312$$

$$q^2 \times \text{population totale} = 0,8789 \times 8 = 7.0312$$

$$2pq \times \text{population totale} = 0,1172 \times 8 = 0.9376$$

Génotype	<i>N. observé (O_i)</i>	<i>N. attendu (E_i)</i>	$\frac{(N. \text{observé} - N. \text{attendu})^2}{N. \text{attendu}}$
++	0	0,0312	0.0312
+-	1	0,9376	0,0041529
--	7	7,0312	0.00013849
Total	8	8	0,03549135





EXPLOITATION DES RÉSULTATS 4/4



$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Dans le test du χ^2 appliqué aux proportions mendéliennes, le nombre ν de degré de liberté dépend du nombre k de modalités retenues et du nombre r de paramètres estimés.

Ainsi les fréquences phénotypiques attendues comportent $k-1$ degré de liberté, puisque la k^{ie} fréquence est déterminée par le choix des autres puisque leur somme est égale à 1.

Mais il faut également soustraire l'estimation des fréquences alléliques r puisqu'elles sont déduites de $r-1$, soit un nombre ν de ddl égale à $(k-1) - (r-1)$ où ici $k=3$ (génotypes) et $r=2$ (allèles) d'où $\nu = 1$ (ajustement à la loi binomiale)

Pour $\nu = 1$ et un seuil de tolérance de 0.05 (5%), le χ^2 doit être inférieur à 3,841 pour qu'il n'y ai pas de différences significative.

Or le $\chi^2 = 0.036 < 3.841$, nous devrions pouvoir conclure que les fréquences génotypes de cette population ne sont pas significativement différentes de ce que nous pourrions attendre dans une population en équilibre d'Hardy et Weinberg

Or, dans le cas de petits échantillons (< 40), la distribution des valeurs ne suit plus une loi normale et le test du χ^2 doit être corrigé (correction de Yates) selon la formule :

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(|n_o - n_t| - 0,5)^2}{n_t}$$

Génotype	N. observé (n_o)	N. attendu (n_t)	$\frac{(n_o - n_t - 0,5)^2}{n_t}$
++	0	0,0312	7,031
+-	1	0,9376	0,20
--	7	7,0312	0,031
Total	8	8	7,27

Donc le $\chi^2 = 7,27 > 3.841$, nous pouvons conclure que les fréquences génotypes de cette population sont significativement différentes de ce que nous pourrions attendre dans une population en équilibre d'Hardy et Weinberg.

La population n'est donc pas en équilibre et ne suit pas les conditions de cet équilibre.

PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'ALU LOCUS PV92

THERMOCYCLEUR



Logiciel

DIDACTIQUE



PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5



EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-14
 - ▶ DÉTERMINATION DE LA PRÉSENCE DE L'INSERTION ALU



INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. FRÉQUENCES GÉNÉTIQUES ET ÉQUILIBRE DE HARDY ET WEINBERG 15-22
2. GÉNÉTIQUE ET ÉVOLUTION DES POPULATIONS HUMAINES 23-33



RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



INVESTIGATION 2 > GÉNÉTIQUE ET ÉVOLUTION DES POPULATIONS HUMAINES

MISE EN SITUATION PÉDAGOGIQUE

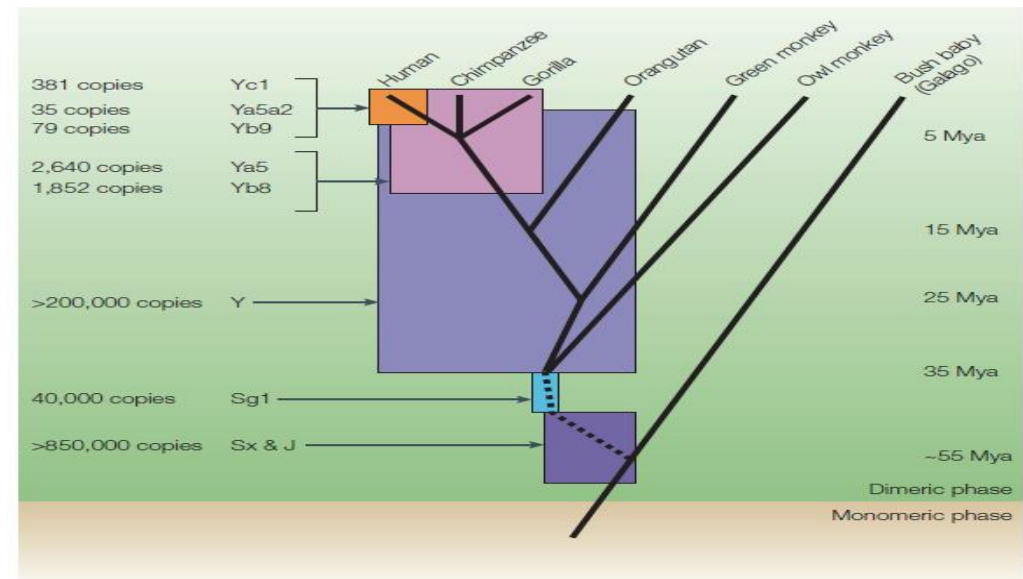
L'insertion Alu PV92, située sur le chromosome 16, est spécifique à l'homme (Batzer et al. 1994). Cette insertion appartient à la sous-famille la plus récente des séquences Alu (Alu Ya5) (Batzer et al. 1996b). Les éléments Alu affectent le génome de plusieurs manières, provoquant des mutations d'insertion, des recombinaisons entre éléments, la conversion de gènes et des altérations de l'expression des gènes. Les polymorphismes liés à l'insertion d'Alu sont intéressants dans l'étude de la génétique des populations humaines et de la génomique comparative des primates car ces insertions sont des marqueurs génétiquement neutres de descendance identique avec des états ancestraux connus. (Batzer et Deininger 2002)

CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 1/5

Les éléments Alu sont une famille d'éléments courts intercalés (SINE) qui se sont intégrées dans les génomes de primates par rétrotransposition au cours des 65 derniers millions d'années, ce qui a entraîné la création d'une série de sous-familles Alu d'âges différents. Les éléments Alu sont les Sines les plus abondants, ce qui en fait le plus abondant de tous les éléments mobiles du génome humain. En raison de leur nombre élevé de copies, la famille des gènes Alu comprend plus de 10% de la masse du génome humain et, comme les séquences Alu s'accumulent de préférence dans les régions riches en gènes, elles ne sont pas uniformément réparties dans le génome humain

Ces séquences peuvent être classées en groupes de membres de sous-famille apparentés partageant des substitutions communes (Batzer et al. 1996b).

Les branches principales de la sous-famille (J, S et Y) semblent être apparues à différentes périodes de l'évolution des primates. Ainsi, les éléments Alu ont contribué à l'évolution des génomes de primates, mais ils contribuent également jusqu'à 0,4% des maladies génétiques humaines (insertions directes d'éléments Alu dans les gènes et événements de recombinaison homologue inégale entre les répétitions Alu)(Deininger et Batzer (1999)



Doc : L'expansion des éléments Alu chez les primates.

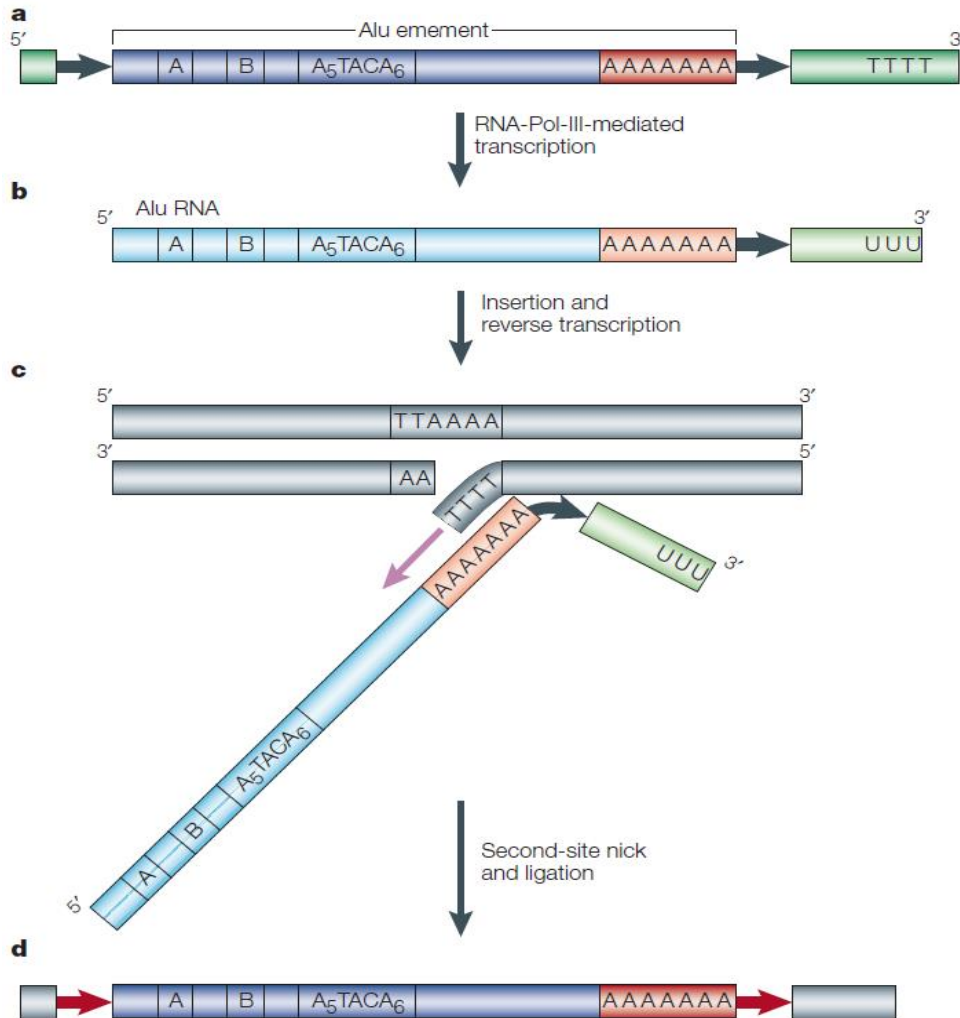
L'expansion des sous-familles Alu (Yc1, Ya5a2, Yb9, Yb8, Y, Sg1, Sx et J) se superpose à un arbre en évolution de primate. L'expansion des différentes sous-familles d'Alu porte un code de couleur indiquant les moments de l'amplification maximale. Les nombres approximatifs de copies de chaque sous-famille Alu sont également notés. Mya = millions d'années.



INVESTIGATION 2 > GÉNÉTIQUE ET ÉVOLUTION DES POPULATIONS HUMAINES

CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 1/5

L'élément Alu est issu de la retrotransposition de petit ARN stables essentiels dans la cellule, transcrit par l'ARN polymérase III. Ces ARN seraient des copies réarrangés et dédoublés de l'ARN 7SL



La longueur d'une séquence Alu est d'environ 300 pb en fonction de la queue de poly A.

La moitié 5' contient un promoteur d'ARN polymérase III (boîtes A et B)

Le nombre de séquences Alu augmentent par rétrotransposition (transcription inverse d'un transcrit d'ARN pol III dérivé d'Alu)

Seules les séquences ancestrales d'Alu semblent être capables de transposer efficacement. Le promoteur présent ne semble pas être suffisant, ainsi, la plupart des nouvelles copies d'Alu dans le génome sont des reliques fossiles ne permettant pas une nouvelle rétrotranspositions.

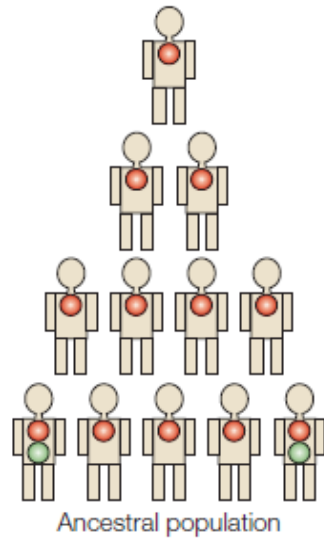
Les mutations qui s'accumulent dans les gènes sources sont ensuite héritées par leurs copies. Par conséquent, la famille Alu humaine est composée de plusieurs sous-familles distinctes d'âges génétiques différents qui sont caractérisées par une série hiérarchisée de mutations





INVESTIGATION 2 > GÉNÉTIQUE ET ÉVOLUTION DES POPULATIONS HUMAINES

CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 3/3

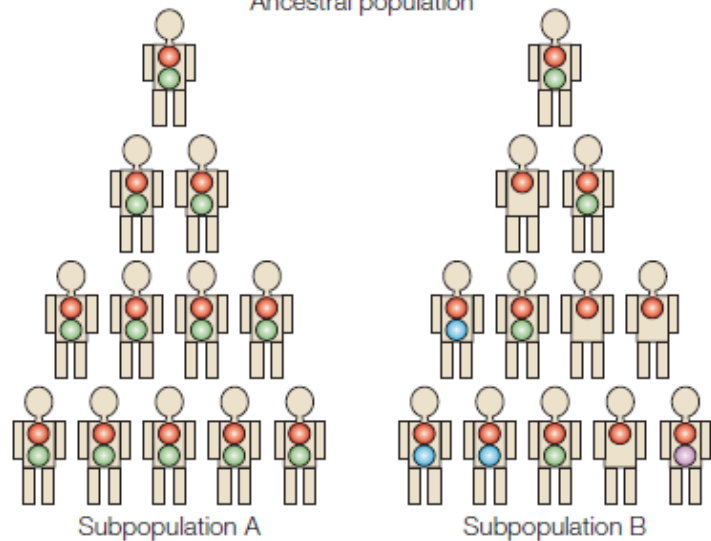


Les insertions d'Alu polymorphes sont particulièrement utiles dans l'étude de la génétique des populations.

Premièrement, puisque la probabilité de rétroposition indépendante sur le même site chromosomique exact est pratiquement nulle (6), tous les locus portant une insertion Alu particulière sont dérivés d'un événement unique et sont donc identiques. Les insertions Alu reflètent donc précisément les relations entre les population.

Deuxièmement, l'état ancestral des insertions Alu est l'absence d'insertion; ainsi, l'insertion d'un élément Alu au niveau d'un locus particulier est un évènement évolutif (mutation).

Connaître l'état ancestral et l'orientation du changement mutationnel facilite l'analyse des relations entre populations (ce qui n'est pas possible pour d'autres types de locus).



Document : Propagation d'une insertion Alu.

La population humaine ancestrale est indiquée en haut, et deux sous-populations distinctes sont présentées ci-dessous.

Une insertion Alu monomorphe (rouge) est partagée par tous les membres de la population. Plusieurs polymorphismes d'insertion Alu sont également présentés, notamment un polymorphisme d'insertion Alu à fréquence intermédiaire dans les populations ancestrales et sous-populations (en vert), un élément spécifique à la population (bleu) et un insert de novo dans la sous-population B (mauve).

- Monomorphic Alu element
- Alu-insertion polymorphism
- Population-specific Alu element
- De novo Alu insertion





CE QUE L'ON CHERCHE

> Hypothèse

L'insertion Alu PV92 est une mutation qui se fixe dans les populations et qui permet d'établir les liens (divergence génétique) entre les populations et ainsi, établir un arbre de parenté entre différentes populations humaines.

METTRE EN ŒUVRE LE TP

Mise en œuvre et interprétation identique au TP pas à pas (pages 6 à 14)

Pour résumer

- > Préparer les tubes réactionnels
 - 25 µL de PCR mix (tube à pastille verte),
 - 25 µL de Primer mix (tube à pastille bleue),
 - Frottis buccaux d'individus féminins et masculin.
- > Amplification
 - Lancer le programme Modèle 1.
- > Préparer l'ADN amplifié
 - Ajouter 2 µL de DNA release (tube à pastille rouge).
- > Préparer le dispositif pour électrophorèse en gel 1,2 % en tampon TAE.

MATÉRIEL

> Matériel par poste

• Thermocycleur didactique	1
• Logiciel didactique	1
• Kit PCR amélogénine	1
• Micropipette 25 µL + cônes adaptés	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	1
• Portoir pour tubes PCR	1
• Cuve à électrophorèse	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	1
• Bécher 50 mL	1
• Transilluminateur	1
• Chambre noire pour transilluminateur	1
• Moule de coulage gel	11

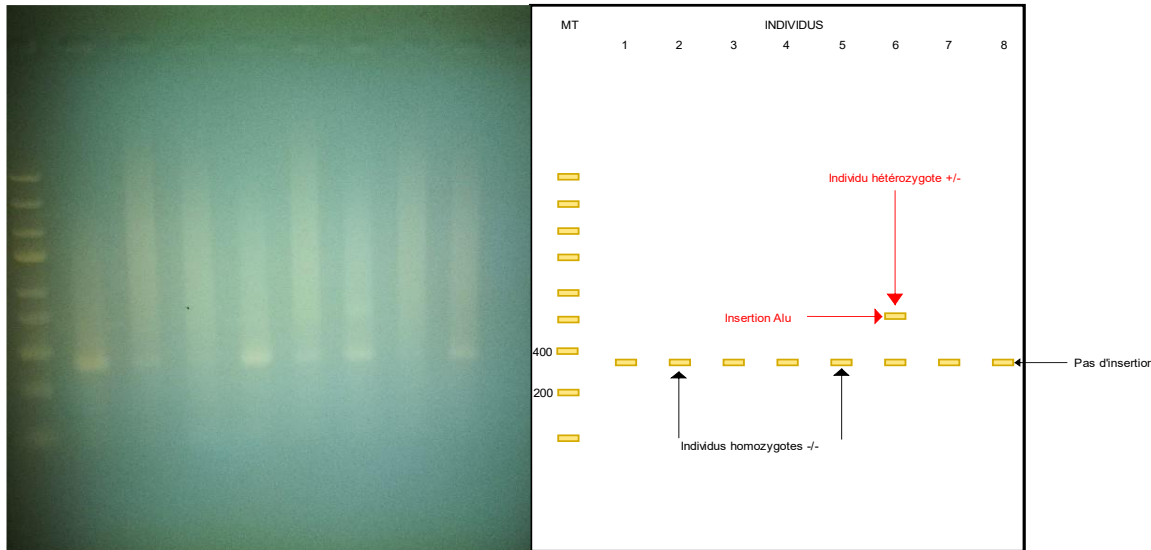
> À disposition

- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN masculin
- ADN féminin
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée





EXEMPLES DE RÉSULTATS



EXPLOITATION DES RÉSULTATS (1/6)

→ **Comparaison de la population « classe » avec la population bretonne de référence**

Calcul de la fréquence de l'allèle « + » :

$$f(+)=\frac{1\text{ allèles }+}{16\text{ allèles totals}}=0,0625$$

Calcul de la fréquence de l'allèle « Alu - » :

$$f(-)=\frac{15\text{ allèles }-}{16\text{ allèles totals}}=0,9375$$

Population bretonne étudiée (Batzer, 1994)

$$f(+)=0.27$$



EXPLOITATION DES RÉSULTATS (2/6)

L'indice de fixation (FST)

Aussi appelé indice de différenciation, c'est un indice permettant de mesurer la différenciation des populations à partir du polymorphisme génétique (Wikipédia)

Calcul d'une distance génétique utilisant F_{st} :

$$F_{st} = \frac{(P_1 - P_2)^2}{2 \times P_{moy}(1 - P_{moy})}$$

P correspond aux fréquences alléliques de l'insertion Alu (f(+)) et Pmoy correspond à la fréquence allélique moyenne

Fréquence de l'allèle « + » dans la population « classe » (P_1)	0.0625
Fréquence de l'allèle « + » dans la population de Bretons (P_2)	0.27
$(P_1 - P_2)$	-0.2075
$(P_1 - P_2)^2$	0.04305
$P_{moy} = \left(\frac{P_1 + P_2}{2}\right)$	0.16625
$F_{st} = \frac{(P_1 - P_2)^2}{2 \times P_{moy}(1 - P_{moy})}$	0.1553

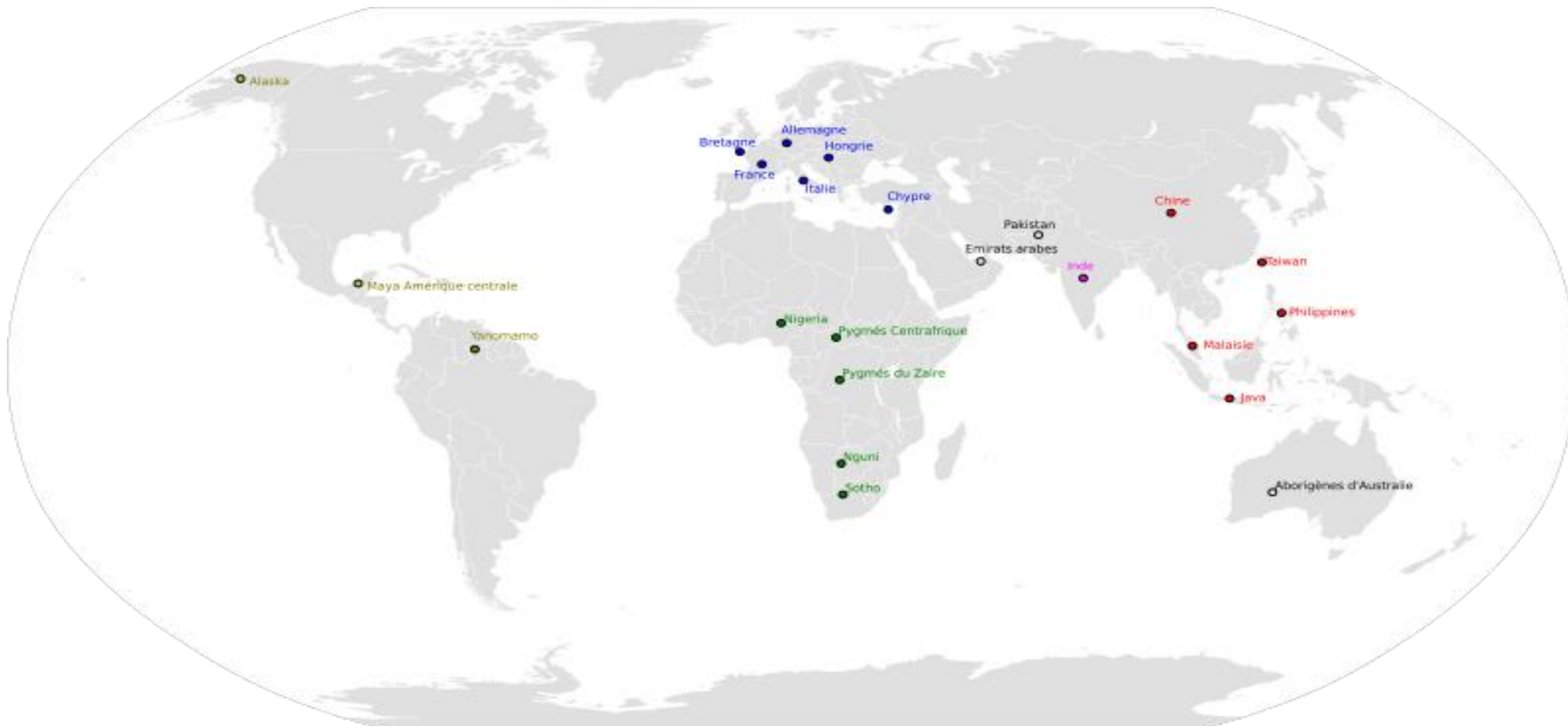
Selon les résultats, il existe une distance génétique entre la population « classe » et la population Bretonne. Pourtant nous pouvons émettre des doutes sur la significativité des résultats dans la mesure où la population classe est très petite et donc l'échantillon peu représentatif.





EXPLOITATION DES RÉSULTATS (3/6)

→ Comparaison de différentes populations mondiales



Carte représentant les différents sites des populations humaines étudiées ci-dessous





EXPLOITATION DES RÉSULTATS (4/6)

L'indice de fixation (F_{st})

A partir du serveur <http://www.bioservers.org>, vous pouvez retrouver les fréquences alléliques dans diverses populations. (Voir fiche technique p43)

- Allez sur le serveur
- Choisissez « Allele server » puis « Enter »
- Choisissez « Manage groups »
- Puis dans « select group type », choisissez « Reference ». Vous pouvez alors choisir les populations dont vous voulez comparer les fréquences alléliques
- Si vous cliquez sur « View », vous pouvez avoir les données brutes
- En sélectionnant plusieurs populations, vous pouvez comparer les populations 2 à 2 par le test du Chi deux (Chi square), la dérive génétique (Genetic Drift), et la distance génétique (F_{st}) mais vous pouvez aussi analyser la fréquence des hétérozygotes ou le chi deux (et donc l'équilibre de la population)

L'indice de fixation (F_{st}), aussi appelé indice de différenciation, est un indice permettant de mesurer la différenciation des populations à partir du polymorphisme génétique (Wikipédia)

Calcul d'une distance génétique utilisant F_{st} :

$$F_{st} = \frac{(P_1 - P_2)^2}{2 \times P_{moy}(1 - P_{moy})}$$

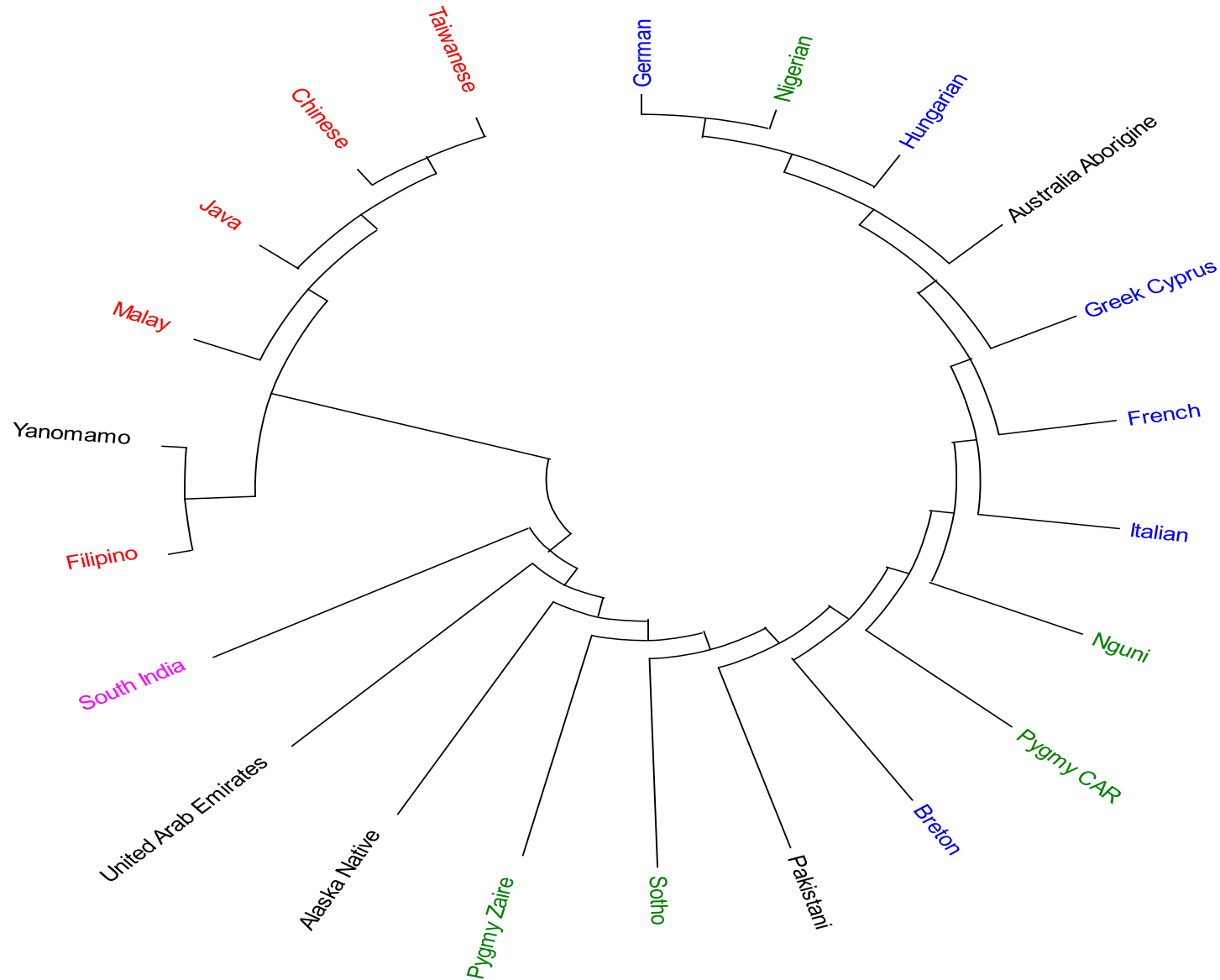
P correspond aux fréquences alléliques de l'insertion Alu ($f(+)$) et P_{moy} correspond à la fréquence allélique moyenne

Les valeurs calculées permettent de construire une matrice des différences génétique puis grâce au logiciel MEGA (voir fiche technique p44), nous pouvons construire un arbre des différences génétiques entre les populations.

- A partir des valeurs de F_{st} , construisez une matrice de comparaison de la divergence génétique des populations
- Ouvrez un document .txt à partir du bloc note
- Créez un script utilisable par le logiciel MEGA (voir Fiche technique « Création d'un fichier .meg » p 42)
- Enregistrez votre document en format .meg
- A partir du logiciel, choisissez « phylogeny », puis « Construct/test Neighbor-Joining Tree »
- Choisissez alors le fichier que vous avez créé, cliquez sur « OK »
- Vous pouvez choisir la configuration de votre arbre.



EXPLOITATION DES RÉSULTATS (5/6)

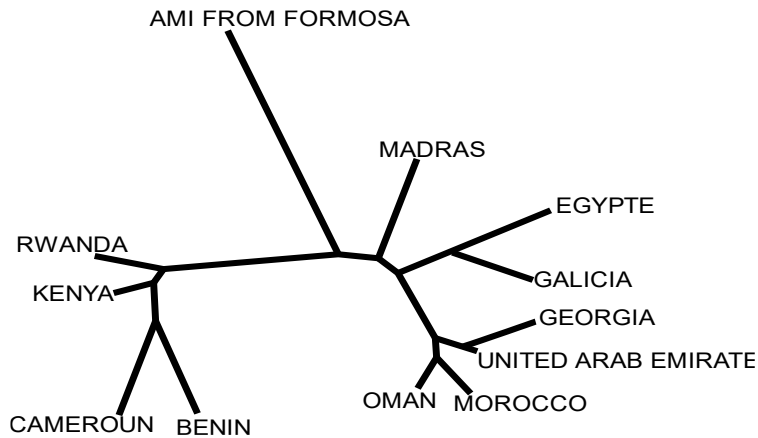


Neighbor-Joining Tree obtenu à partir de la distance génétique (F_{st}) de l'insertion Alu PV92 chez 22 populations humaines.



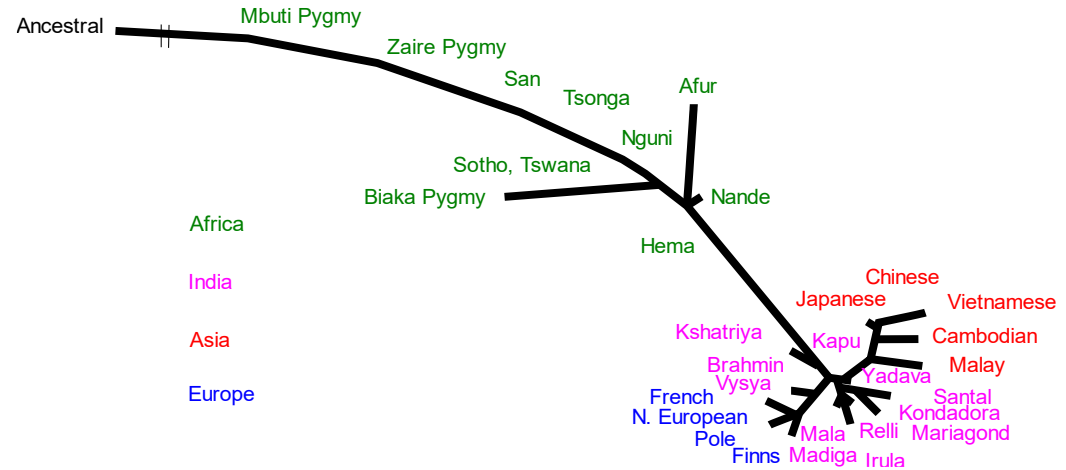
EXPLOITATION DES RÉSULTATS (6/6)

Des études de distance génétique ont été menées sur d'autres populations, voici les résultats :



Neighbor-Joining Tree basé sur une matrice de distance génétique FST.

Les distances génétiques ont été calculées à partir des fréquences alléliques de 24 insertions Alu (à l'exclusion des locus D1, HS4.14 et Sb1912) de 12 populations mondiales. (Terreros et al., 2009)



Neighbor-joining networks of genetic distances, based on 35 polymorphic Alu loci

Que pouvez-vous conclure de la comparaison entre ces résultats et les vôtres ?

La différence des résultats est imputable à l'étude d'une insertion unique (Alu PV 92) et de la taille peu importante des populations. Par contre, les résultats provenant de l'étude de multiples insertions (35) montrent que la fréquence moyenne des insertions d'alu (l'état dérivé) est la plus basse en Afrique mais est plus élevée et similaire en Inde, en Europe et en Asie.

Les « Neighbor-joining networks of genetic distances » sont enracinés en Afrique et montrent que les populations africaines sont séparées des autres populations. La diversité génétique Alu est la plus élevée en Afrique, mais plus faibles et similaires en Europe et en Asie. La répartition des allèles ancestraux est compatible avec l'origine des premières populations humaines de l'Afrique subsaharienne, l'isolement et la préservation d'allèles ancestraux en Afrique et une expansion de l'Afrique vers l'Eurasie.

Cette expansion est caractérisée par des fréquences croissantes d'insertions Alu ainsi qu'une diversité génétique réduite dans les populations non africaines.

Ainsi, ces observations confirment la théorie de l'« Out of Africa » qui défend une origine africaine unique pour tous les Homo sapiens dans le monde.



PROGRAMMES - 1/2



2nd – Programme 2019

Thème 1 : La Terre, la vie et l'organisation du vivant

Biodiversité, résultat et étape de l'évolution

Notion	Connaissances	Capacités
Le échelles de la biodiversité	Au sein de chaque espèce, la diversité des individus repose sur la variabilité de l'ADN : c'est la diversité génétique. Différents allèles d'un même gène coexistent dans une même population, ils sont issus de mutations qui se sont produites au cours des générations. Notions fondamentales : biodiversité, échelles de biodiversité, variabilité, mutation, allèle.	- Caractériser la variabilité phénotypique chez une espèce commune animale ou végétale et envisager les causes de cette variabilité.
La biodiversité change au cours du temps.	La biodiversité évolue en permanence. Cette évolution est observable sur de courtes échelles de temps, tant au niveau génétique que spécifique.	Extraire et mettre en relation des informations montrant des exemples actuels de diversifications génétiques ou de spéciations
L'évolution de la biodiversité au cours du temps s'explique par des forces évolutives s'exerçant au niveau des populations		Réfléchir sur les conséquences de l'apparition aléatoire de mutants sur la dynamique d'une population.





PROGRAMMES - 2/2



1S – Programme de spécialité - 2019

Thème 1 : La Terre, la vie et l'organisation du vivant

Transmission, variation et expression du patrimoine génétique

Notion	Connaissances	Capacités
La réplication de l'ADN		Concevoir et/ou réaliser une réaction de PCR (amplification en chaîne par polymérase) en déterminant la durée de chaque étape du cycle de PCR. Calculer le nombre de copies obtenues après chaque cycle.
Mutation de l'ADN et variabilité génétique	Les mutations sont à l'origine de la diversité des allèles au cours du temps. Selon leur nature elles ont des effets variés sur le phénotype	Recenser et exploiter des informations sur la diversité allélique au sein des populations (par exemple humaine).
L'histoire humaine lue dans son génome	<p>La diversité allélique entre les génomes humains individuels permet de les identifier et, par comparaison, de reconstituer leurs relations de parentés.</p> <p>Grâce aux techniques modernes, on peut connaître les génomes d'êtres humains disparus à partir de restes fossiles. En les comparant aux génomes actuels, on peut ainsi reconstituer les principales étapes de l'histoire humaine récente.</p> <p>Certaines variations génétiques résultent d'une sélection actuelle ou passée.</p> <p>Objectifs : les élèves apprennent que les génomes portent en eux-mêmes les traces de l'histoire de leurs ancêtres. Ces traces s'altèrent avec le temps mais permettent néanmoins de remonter à un grand nombre de générations.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Rechercher et exploiter des documents montrant comment a été déterminée la première séquence du génome humain. - Explorer quelques stratégies et outils informatiques de comparaisons de séquences entre génomes individuels. - Rechercher et exploiter des documents sur les génomes de néandertaliens et/ou de dénisoviens. - Rechercher et exploiter des documents montrant l'existence d'allèles néandertaliens dans les génomes humains actuels.



PRINCIPE DE LA PCR - 1/2



PRINCIPE DE LA PCR : AMPLIFICATION DU NOMBRE DE MOLECULES D'ADN > 10⁹

UN CYCLE

... N CYCLES



T > + 95°C

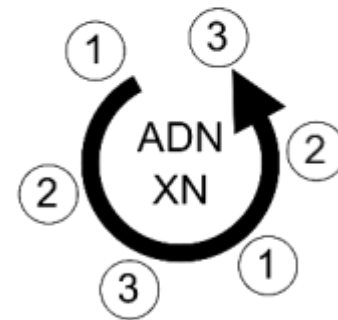
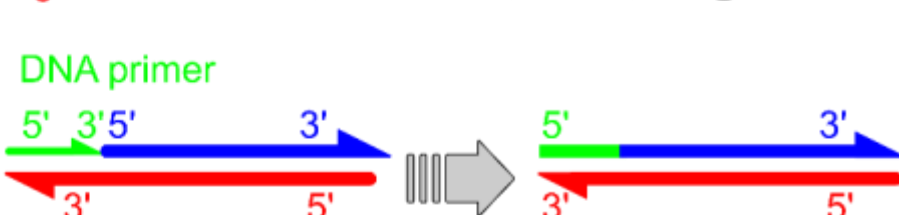
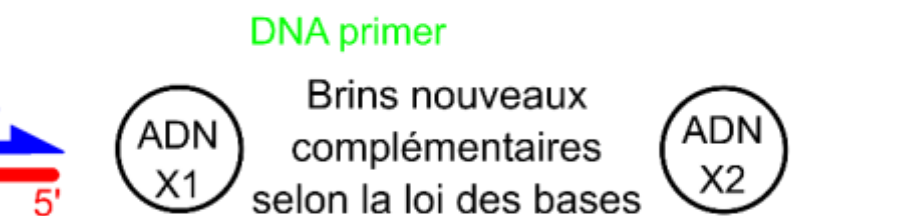
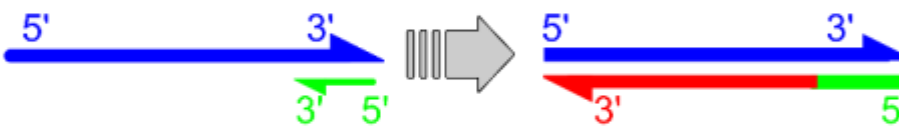
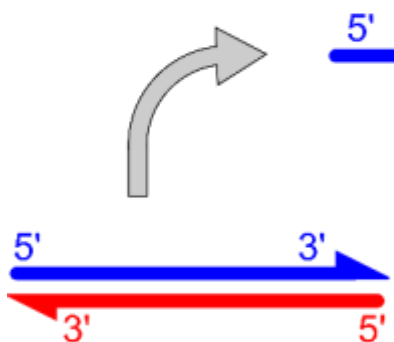
DNA primer
spécifiques au gène

DNA primer

Brins nouveaux
complémentaires
selon la loi des bases

ADN
X1

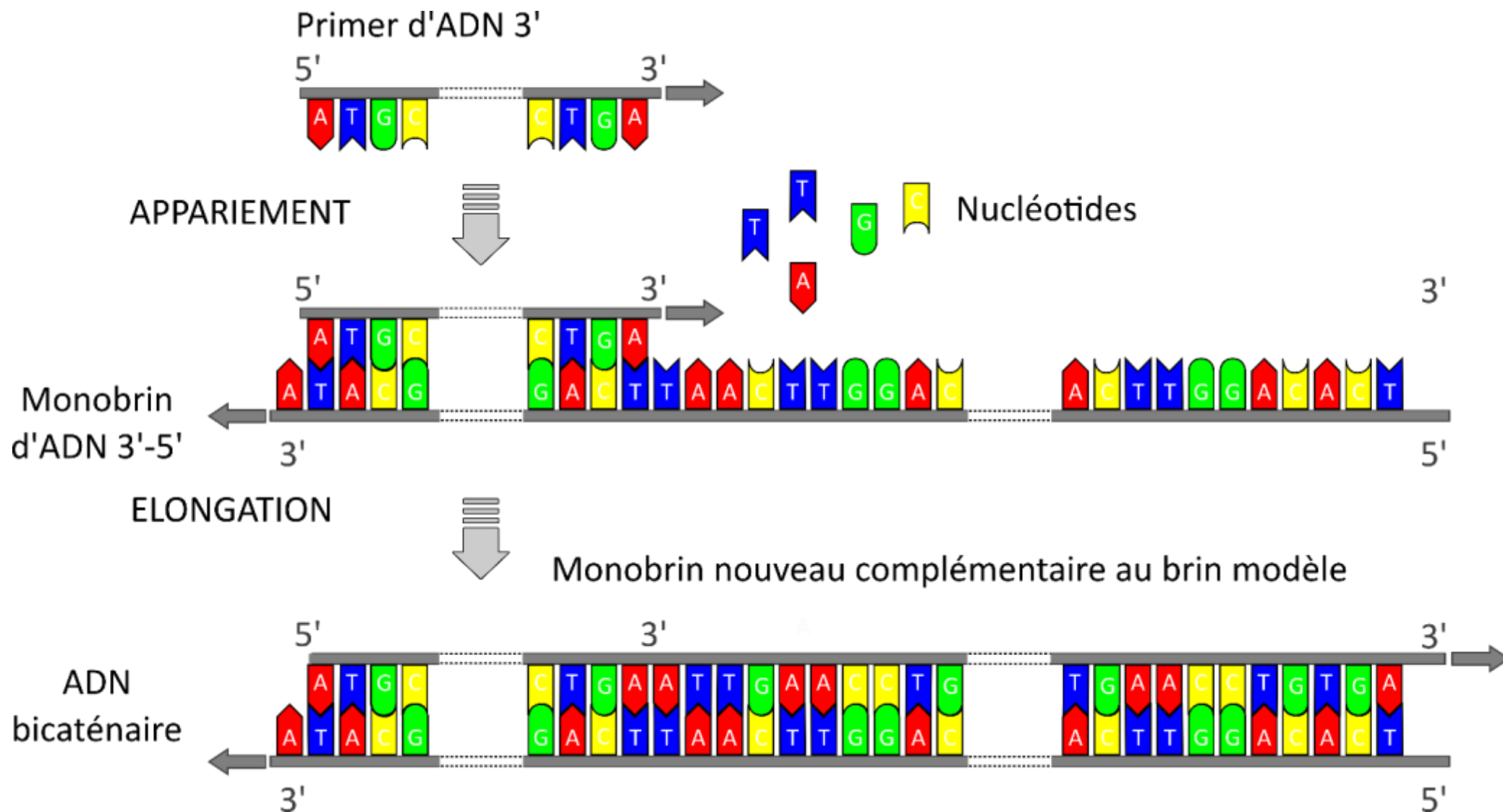
ADN
X2



N > 10⁹!



PRINCIPE DE LA PCR - 2/2





FABRICATION D'UN GEL D'AGAROSE - 1/3

> Principe

Pour réaliser une électrophorèse, le gel d'agarose représente une solution aisée, rapide, et peu coûteuse.

Fabrication d'un gel à partir de tampon TAE concentré 10 fois et d'agarose. 3 étapes : réalisation du tampon TAE 1X, fabrication du gel et coulage du gel.

Il est tout à fait possible d'utiliser un autre tampon (TBE ou TGV, par exemple).

> Matériel

> Appareillage

- | | |
|----------------------------------|---|
| • Balance 0,01 g | 1 |
| • Agitateur magnétique chauffant | 1 |
| • Support de gel + peigne | 1 |

> Produits

- Tampon TAE concentré 10X
- Agarose

> Verrerie et petit matériel

- | | |
|-----------------------------|---|
| • Fiole jaugée 250 mL | 1 |
| • Éprouvette graduée 100 mL | 1 |
| • Erlenmeyer 100 mL | 1 |
| • Verre de montre | 1 |
| • Entonnoir | 1 |
| • Spatule | 1 |
| • Thermomètre | 1 |

> À disposition

- Eau distillée
- Ruban adhésif de peintre
- Gants - Blouse - Lunettes

> Mode opératoire – Préparation du tampon 1X

Verser le contenu du flacon de TAE 10X (25 mL) dans une fiole jaugée de 250 mL



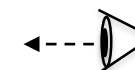
Rincer 3x le flacon à l'eau distillée, verser cette eau de rinçage directement dans la fiole



Compléter la fiole en eau distillée jusqu'au trait de jauge (250 mL)



Vérifier le trait de jauge



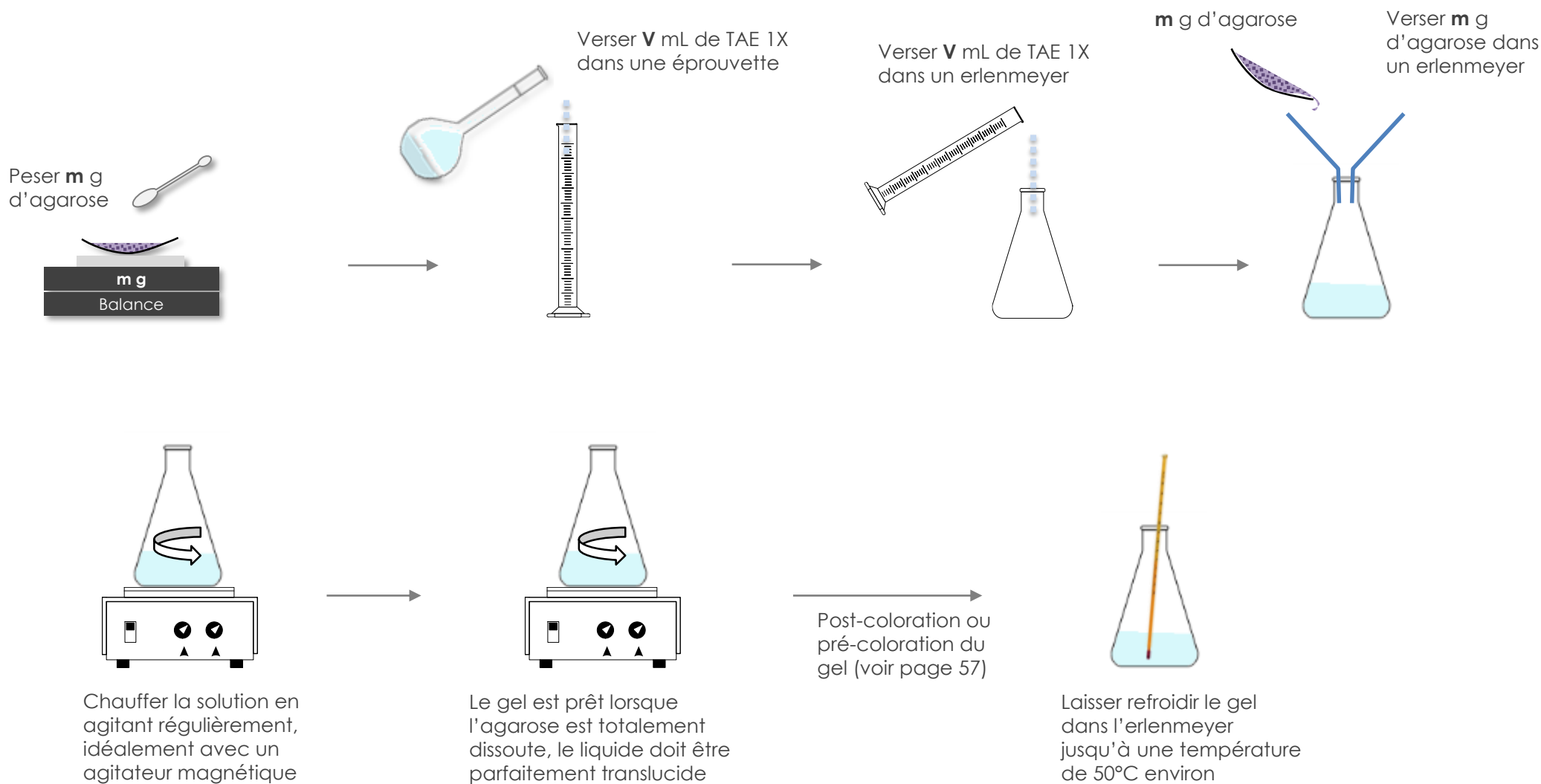


FABRICATION D'UN GEL D'AGAROSE - 2/3

> Mode opératoire – Préparation du gel à X %

Méthode de calcul pour réaliser un gel d'agarose à X % (pourcentage massique) :

masse à peser (**m** en gramme) pour un volume (**V** en mL) ► $m = V \times X / 100$

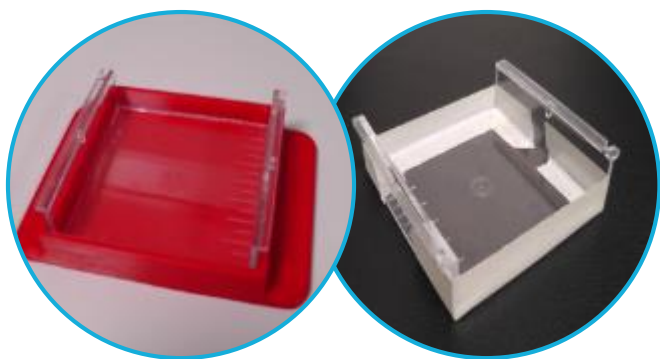




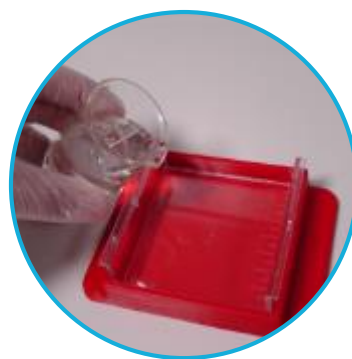
FABRICATION D'UN GEL D'AGAROSE - 3/3

> Mode opératoire – Couler le gel d'agarose

Positionner le support du gel dans le moule (ou préparer le support du gel en bouchant ses extrémités à l'aide de ruban adhésif pour peintre). Posez-le sur une surface parfaitement horizontale.



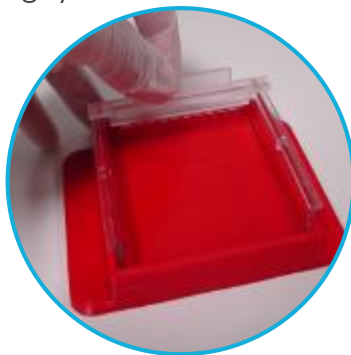
Couler le gel à 50°C dans le support sur une épaisseur de 0,5 cm environ.



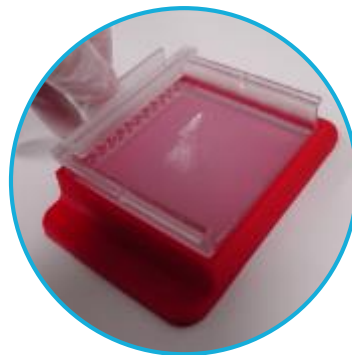
Astuce

Si des bulles apparaissent, vous pouvez les faire éclater à l'aide d'un cône pour micropipette avant la solidification du gel.

Poser le peigne à sa place, pour former les puits lors du refroidissement du gel. Laisser le gel refroidir (15 – 20 min), en le mettant au réfrigérateur si nécessaire (ne transporter le support avec le gel que si celui-ci est déjà bien figé).



Une fois le gel complètement solidifié, retirer doucement le peigne dans un mouvement vertical, pour ne pas percer ou fêler les puits.



Astuce

Il est plus facile de retirer le peigne si le gel est immergé dans du tampon (mise en place dans la cuve avant de retirer le peigne).

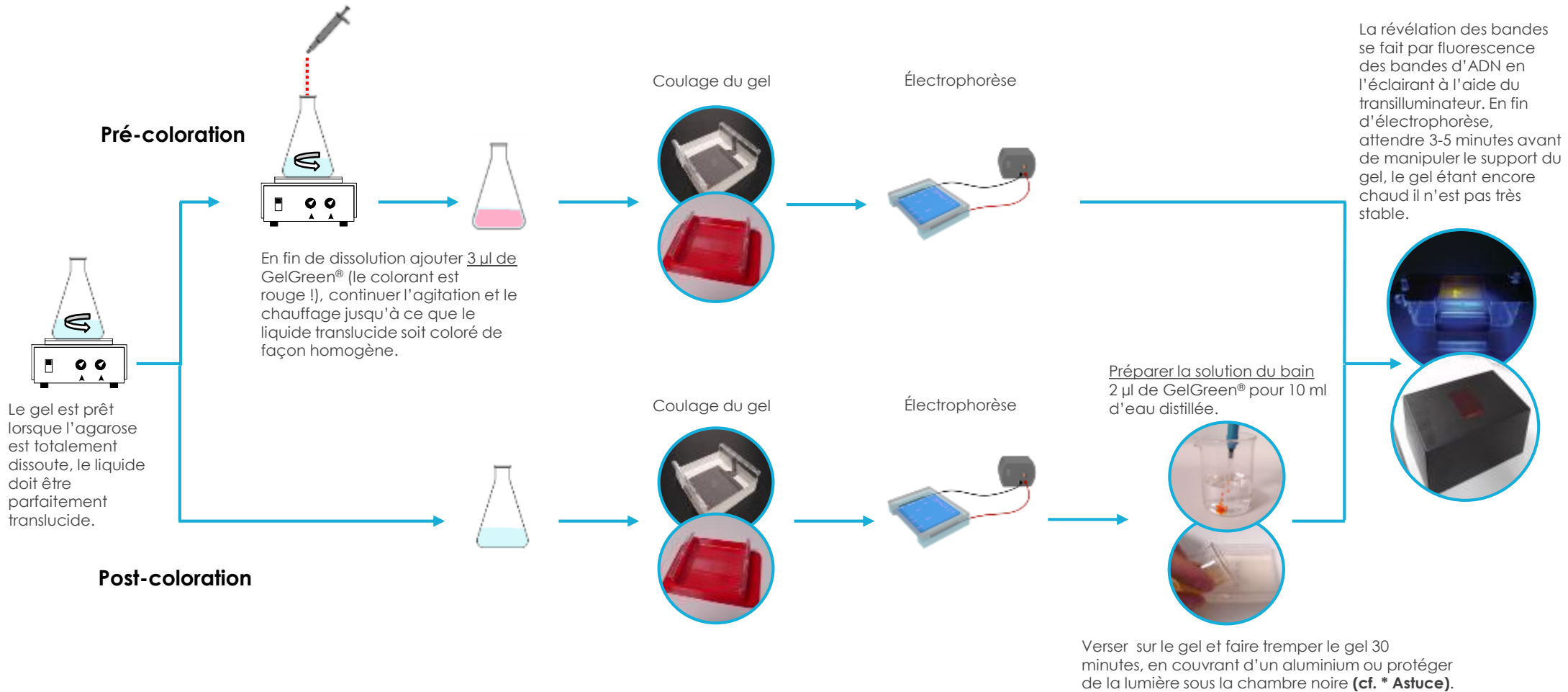
Le gel peut être utilisé immédiatement ou conservé quelques jours au réfrigérateur dans du tampon de migration TAE 1X (une fois ôté du support).



PRÉ-COLORATION / POST-COLORATION DU GEL D'AGAROSE : 2 POSSIBILITÉS

> Pré-coloration : solution rapide (5 minutes après l'électrophorèse) mais moins résolue, à utiliser dans le cas de révélation d'une bande unique ou si les poids des bandes à séparer sont éloignés.

> Post-coloration : solution plus longue (compter 35 min de trempage), par contre la qualité de migration est optimum car le colorant GelGreen® qui est une longue chaîne chromophore se fixe sur l'ADN après l'électrophorèse, il ne gêne donc pas la migration de l'ADN.



* Astuce

- > On peut réutiliser le même bain au moins 2 fois au cours de la même journée (protéger la solution de la lumière).
- > Pour économiser du colorant ou si on ne dispose pas de petit récipient adapté au gel, après l'électrophorèse il suffit d'entourer le gel et son support d'un film étirable type Parafilm® M pour étanchéifier les côtés ouverts puis on dépose 10 ml d'eau déminéralisée additionnée de 2 µl de GelGreen® pendant 30 à 45 minutes à l'obscurité.



CRÉATION D'UN FICHIER « .MEG »

Le script pour créer un document utilisable par MEGA est :

```
«  
#mega  
!TITLE Genetic distance data from n human populations;  
!Format DataType=distance NTaxa=n;  
!Description  
;  
#population_1  
# population_2  
# population_3....  
Valeur1  
Valeur2    Valeur3  
»
```

La valeur 1 correspond à la comparaison des population 1 et 2

La valeur 2 correspond à la comparaison des population 1 et 3

La valeur 3 correspond à la comparaison des population 2 et 3

Etc...

UTILISATION DU SERVEUR « HTTP://WWW.BIOSERVERS.ORG »

CSHL Cold Spring Harbor Laboratory CSHL Home About CSHL Research Education News & Features Campus & Public Events Careers Giving

1

Cold Spring Harbor Laboratory's

BIOSERVERS

Custom Workspaces and Educational Databases for Bioinformatics

This site contains user-friendly tools to launch DNA database searches, statistical analyses, and population modeling from a centralized workspace. Educational databases support investigations of an *Alu* insertion polymorphism on human chromosome 16 and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human mitochondrial control region. This site requires Java, Javascript, and cookies. [Click here](#) to test that you have these features enabled.

SEQUENCE SERVER
Enter DNA sequences, perform multiple sequence alignments, generate phylogenetic trees, and search Genbank by BLAST and keywords. Includes mitochondrial reference data from world populations, ancient humans, and other organisms.

ALLELE SERVER
Enter data on *Alu* PV92, test Hardy-Weinberg equilibrium, and compare human populations by contingency chi-square, genetic drift, and genetic distance. Includes PV92 reference data from more than 40 world populations.

SIMULATION SERVER
Model genetic changes over time to study the effects of drift, selective pressure, and population bottlenecks. The Monte Carlo generator can test 100 or more populations at once and link experiments using different parameters.

ENTER REGISTER
Username: Password: Remember my username and password? **LOGIN**

ENTER REGISTER
Username: Password: Remember my username and password? **LOGIN**

ENTER
No login feature available.

ENTER
You have access to all tools and databases, but your work is not saved between sessions.

REGISTER & LOGIN: Your settings and workspace are saved in our database between sessions. You can also build your own custom databases, according to your own interests.

DNA LEARNING CENTER
© Cold Spring Harbor Laboratory
Noncommercial, educational use only.

Supported by:
[Howard Hughes Medical Institute](#)
[National Science Foundation](#)
[Department of Energy](#)
[Roche Molecular Systems](#)
[Applied Biosystems](#)

2

MANAGE GROUPS

Select time period: 2019 (January - June) Select group type: Reference

Date	Reference	VIEW
<input type="checkbox"/> 04/30/1999	IKung ("Bushmen")	<input checked="" type="checkbox"/> VIEW
<input type="checkbox"/> 09/16/1999	African American	VIEW
<input type="checkbox"/> 09/16/1999	Alaska Native	VIEW
<input type="checkbox"/> 04/30/1999	Australia Aborigine	VIEW
<input type="checkbox"/> 04/30/1999	Breton	VIEW
<input type="checkbox"/> 09/16/1999	Cajun	VIEW
<input type="checkbox"/> 04/30/1999	Chinese	VIEW
<input type="checkbox"/> 04/30/1999	Euro-American	VIEW
<input type="checkbox"/> 04/30/1999	Filipino	VIEW
<input type="checkbox"/> 04/30/1999	French	VIEW
<input type="checkbox"/> 09/16/1999	German	VIEW

OK Cancel

3

SERVER

COMPARE

Chi-Square
Chi-Square
Genetic Drift
Fst Genetic Distance

IKung ("Bushmen") OPEN

African American OPEN

Alaska Native OPEN

Australia Aborigine OPEN

Return to BioServers

4

FST UNBIASED GENETIC DISTANCE Basic Detailed

Fst Unbiased Genetic Distance : 0.01

African American

Total number of alleles: 138
Number of + alleles: 28
Number of - alleles: 110
Frequency of + allele: 0.20
Frequency of - allele: 0.80

Australia Aborigine

Total number of alleles: 198
Number of + alleles: 30
Number of - alleles: 168
Frequency of + allele: 0.15
Frequency of - allele: 0.85

Done

5

FST UNBIASED GENETIC DISTANCE Basic Detailed

Fst Unbiased Genetic Distance : 0.01

African American

Total number of alleles: 138
Number of + alleles: 28
Number of - alleles: 110
Frequency of + allele: 0.20
Frequency of - allele: 0.80

Australia Aborigine

Total number of alleles: 198
Number of + alleles: 30
Number of - alleles: 168
Frequency of + allele: 0.15
Frequency of - allele: 0.85

Frequency of + alleles in population 1 (p1):	0.20
Frequency of + alleles in population 2 (p2):	0.15
Difference in + allele frequency: (p1 - p2)	0.05
Difference in + allele frequency squared: ((p1 - p2) ²)	0.00
Average + allele frequency: (pmax)	0.17
Fst	0.01

To calculate Fst, we use the following formula:

$$F_{st} = \frac{(p_1 - p_2)^2}{2 p_{max} (1 - p_{max})}$$

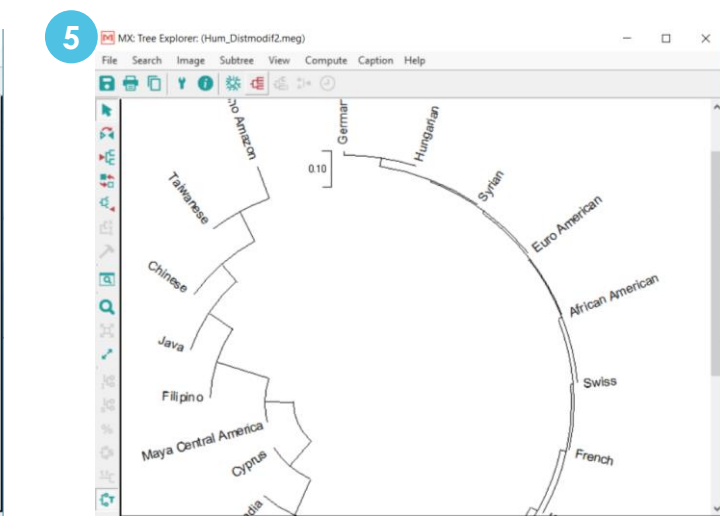
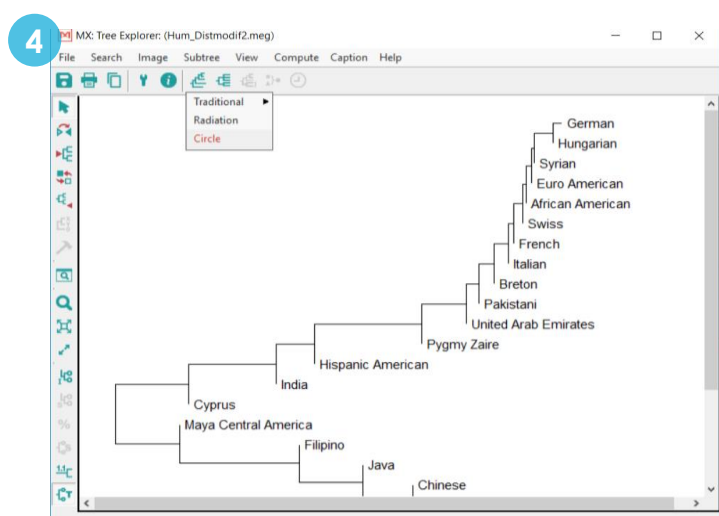
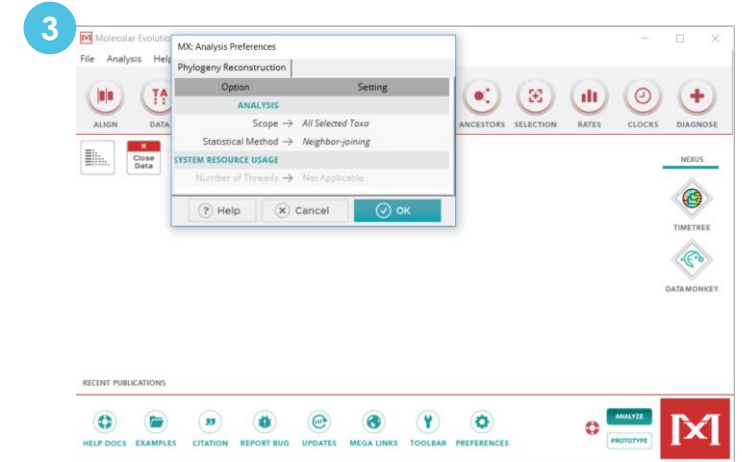
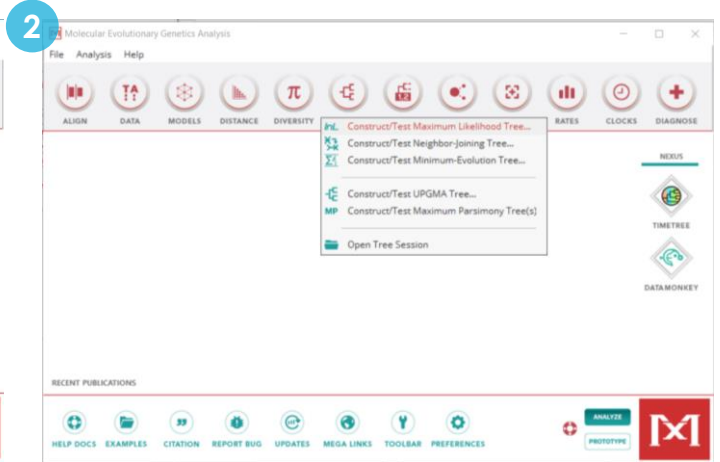
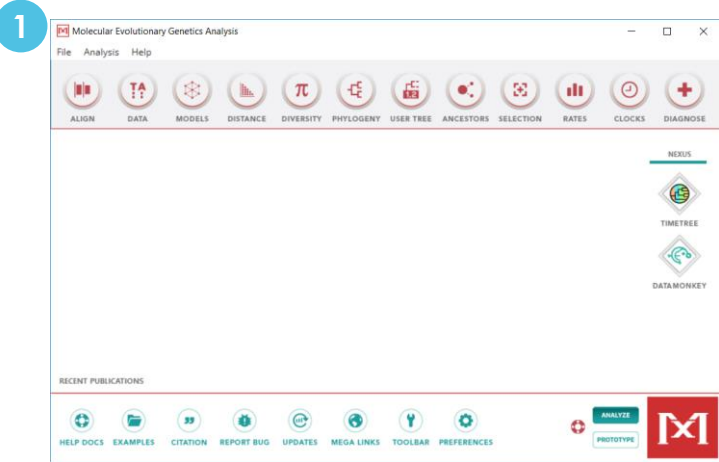
$$= \frac{(0.20 - 0.15)^2}{2 \times 0.17 \times (1 - 0.17)}$$

$$= 0.01$$

Done



UTILISATION DU LOGICIEL MEGA (MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETIC ANALYTICS)



- A partir du logiciel MEGA, choisissez « PHYLOGENY », puis « Construct/Test Neighbor-Joining Tree »
- Choisissez alors le fichier que vous avez créé, cliquez sur « OK »
- Vous pouvez choisir la configuration de votre arbre (ici « circle ») puis cliquez sur « toggle scaling of the tree »



THERMOCYCLEUR DIDACTIQUE - PCR

> Descriptif

Thermocycleur avec écran et molette pour l'affichage et la programmation des cycles.

> Caractéristiques techniques

Capacité : 9 microtubes de 0,2 mL.

Ecran : 128 X 64.

Dimension : 225 x 140 x 100 mm.

Livré avec logiciel didactique de pilotage pour PC à télécharger.

Nombre de programmes enregistrés : 4.

Nombre de programmes personnalisables : 4.

Nombre de cycles de température possibles : de 1 à 99.

Gamme de température : jusqu'à 99 °C.

Précision d'affichage : 0.1 °C.

Précision de la régulation : ± 0.2 °C.





TOUT LE MATÉRIEL NÉCESSAIRE À LA RÉALISATION DE CES TP

> Matériel

• Thermocycleur didactique	591 106	1
• Logiciel didactique	Inclus	1
• Kit PCR variation du gène de l'amélogénine	111 126	1
• Micropipette 25 µL	703 878	1
• Cônes 10 – 200 µL ; Lot de 96	724 108	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL	703 814	1
• Cônes 0,1 – 10 µL ; Lot de 96	724 105	1
• Portoir pour tubes PCR	701 208	1
• Cuve à électrophorèse	591 031	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	281 120	1
• Transilluminateur	527 004	1
• Chambre noire pour transilluminateur	527 010	1
• Balance 0,01 g	701 420	1
• Agitateur magnétique chauffant	701 571	1
• Thermomètre 60°C	253 067	1
• Moule de coulage gel	999 999	1

> Verrerie

• Bécher 50 mL	713 118	1
• Bécher 100 mL	713 119	1
• Fiole jaugée 250 mL	713 041	1
• Éprouvette graduée 100 mL	723 165	1
• Erlenmeyer 100 mL	713 138	1
• Verre de montre Ø 60 mm	713 066	1
• Entonnoir à poudre	723 090	1
• Spatule double inox	703 283	1

> Consommables

• Tampon TAE 10X	107 609	1
• Eau distillée 5 L	107 625	1
• Colorant ADN GelGreen®	107 455	1
• Agarose poudre 25 g	107 032	1

> Sécurité

• Gants taille L – boîte de 100	150 038	1
• Blouse taille L	150 074	1
• Lunettes	150 093	1



> Ensemble Electrophorèse 591 031 + 281 120



> Thermocycleur 591 106

