
**Analyse moléculaire de
biomarqueurs — Méthode d'analyse
SSR sur le maïs**

Molecular biomarker analysis — SSR analysis of maize

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TR 17623:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-ac6663c377e1/iso-tr-17623-2015)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-
ac6663c377e1/iso-tr-17623-2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-ac6663c377e1/iso-tr-17623-2015)



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TR 17623:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-ac6663c377e1/iso-tr-17623-2015>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2015

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Principe	1
3 Consommables et équipements	1
4 Mode opératoire	1
4.1 Préparation d'échantillons	1
4.2 Extraction et quantification d'ADN	1
4.3 Amplification par PCR.....	2
5 Liste des marqueurs SSR du maïs validés par une étude intralaboratoire au GEVES	2
5.1 Caractéristiques des SSR.....	2
5.2 Séquences d'amorces des SSR	4
5.3 Profils SSR observés sur les lignées de maïs.....	5

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TR 17623:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-ac6663c377e1/iso-tr-17623-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-ac6663c377e1/iso-tr-17623-2015>

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos – Informations supplémentaires](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-1c6663c377e1/iso-tr-17623-2015).

Le comité chargé de l'élaboration de ce document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, Sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse des biomarqueurs moléculaires*.

Introduction

Les essais d'identification variétale exigent des marqueurs de grande qualité permettant d'obtenir des données reproductibles à l'aide de différents équipements, produits chimiques et réactifs. En conséquence, le présent Rapport technique ne traite que des méthodes d'amplification spécifiques pour le maïs.

Le présent Rapport technique vise à fournir une liste de marqueurs SSR (répétition de séquences simples) et des méthodes d'analyse applicables au maïs. Le jeu de marqueurs SSR a été validé par une étude intralaboratoire au GEVES (Laboratoire BioGEVES, Domaine du Magneraud, BP.52, 17700 SURGERES). Les propriétés et les séquences de ces marqueurs SSR sont accessibles au public sur le site www.maizegdb.org.

Le présent Rapport technique est associé à l'analyse ISO 13495 qui répertorie les différentes étapes de validation de la méthode et définit les critères d'acceptation.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO/TR 17623:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-ac6663c377e1/iso-tr-17623-2015>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TR 17623:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-ac6663c377e1/iso-tr-17623-2015>

Analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthode d'analyse SSR sur le maïs

1 Domaine d'application

La méthode et les marqueurs SSR figurant dans le présent Rapport technique sont destinés aux applications telles que le test de conformité d'hybrides, la caractérisation moléculaire des variétés et le contrôle d'identité variétale.

2 Principe

L'analyse SSR repose sur l'amplification et la visualisation du polymorphisme dû à la variation du nombre de séquences répétées d'un motif de 2 à 5 paires de bases dit microsatellite. La procédure d'analyse SSR comprend les étapes suivantes:

- a) préparation de l'échantillon;
- b) extraction d'ADN;
- c) amplification PCR;
- d) séparation;
- e) révélation des produits PCR.

ITeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TR 17623:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/981ce941-63b8-4457-b7d5-ac0665c377e1/iso-tr-17623-2015>

3 Consommables et équipements

- Microplaque à 96 ou 384 puits
- Réactifs pour PCR (ADN polymérase), tampon, MgCl₂, dNTP, amorces, etc.)
- réactifs d'électrophorèse capillaire
- broyeur
- centrifugeuse pour microplaques
- micropipettes à volume variable
- micro-centrifugeuse pour micro-tubes
- système d'électrophorèse capillaire avec détection de fluorescence
- thermocycleur

4 Mode opératoire

4.1 Préparation d'échantillons

Pour chaque échantillon, des semences, prises individuellement ou en mélange, selon le contexte, sont broyées à l'aide d'un broyeur approprié (par exemple, IKA A10 ou Retsch MM301).

4.2 Extraction et quantification d'ADN

a) Prélever une aliquote de chaque broyat homogène. La quantité nécessaire dépend du protocole d'extraction mis en œuvre.

b) Extraire de l'ADN à l'aide du protocole interne ou d'un équivalent.

NOTE Une étude collaborative a été menée à l'aide du kit QIAGEN DNeasy®¹⁾ 96 Plant

c) Le laboratoire vérifie que la quantité d'ADN extrait permet d'assurer un résultat fiable.

4.3 Amplification par PCR

Conditions optimisées pour le thermocycleur ABI 9700.

a) Préparation du mélange réactionnel pour PCR simplex (voir [Tableau 1](#)).

Tableau 1 — Préparation du mélange réactionnel pour PCR simplex

	Concentration	Volume pour 1X
H ₂ O		3,125 µL
Tampon 10X	1 X	1 µL
dNTP (10 mM)	125 µM	0,125 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	1,2 µL
ADN polymérase (5 U/µL)	0,25 U	0,05 µL
Amorce Forward (10 µM)	0,25 µM	0,25 µL
Amorce Reverse (10 µM)	0,25 µM	0,25 µL
Volume du mélange réactionnel 1X		6 µL
ADN (2,5 ng/µL)		4 µL
Volume final pour PCR		10 µL

b) Conditions d'amplification (Voir [Tableau 2](#)).

Un programme de type « Touchdown » (TD) est utilisé. La température d'hybridation est diminuée de 1 °C par cycle de 64 °C à 55 °C.

Tableau 2 — Conditions d'amplification

	10 cycles			30 cycles				
94 °C	94 °C	TD		94 °C				
10:00	0:30	*	72 °C	0:30		72 °C	72 °C	
		64 °C	0:30		55 °C	0:30	10:00	10 °C
		0:30			0:30			∞

NOTE Les unités de temps (*) du [Tableau 2](#) sont des « minutes:secondes ».

5 Liste des marqueurs SSR du maïs validés par une étude intralaboratoire au GEVES

5.1 Caractéristiques des SSR

Données obtenues à l'aide d'un séquenceur 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) (voir [Tableau 3](#)).

1) QIAGEN DNeasy est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

Tableau 3 — Caractéristiques des SSR

N°	SSR	Bin/Chromosome	Nombre d'allèles observés	Plage des tailles d'allèles estimées (bp) ^a	Indice de diversité de Nei ^b
1	umc1147	1	4	61-86	0,69
2	phi109275	1	6	121-137	0,60
3	phi427913	1,01	5	119-133	0,49
4	umc1885	1,1	3	136-142	0,63
5	phi064	1,11	8	75-110	0,78
6	phi96100	2	4	275-294	0,74
7	phi083	2,04	6	123-136	0,76
8	umc1448	2,04	5	137-161	0,77
9	phi102228	3,04	6	122-133	0,54
10	umc1489	3,07	4	123-135	0,51
11	umc1117	4,04	3	122-135	0,67
12	umc1329	4,06	4	74-92	0,63
13	phi093	4,08	7	281-294	0,63
14	umc1180	4,1	2	99-102	0,47
15	nc130	5	5	139-148	0,48
16	umc1478	5,01	4	134-144	0,62
17	umc1792	5,08	5	115-134	0,74
18	umc1153	5,09	5	101-113	0,71
19	umc1143	6	5	71-82	0,66
20	phi423796	6,01	5	125-137	0,53
21	umc1133	6,01	3	91-105	0,66
22	phi123	6,07	4	141-147	0,66
23	phi089	6,08	4	81-91	0,34
24	umc1545	7	6	70-85	0,75
25	umc1134	7,03	4	75-88	0,61
26	phi116	7,06	4	152-173	0,70
27	umc1304	8,02	2	131-136	0,50
28	phi233376	8,03	6	140-159	0,68
29	bnlg1782	8,05	7	219-236	0,73
30	phi015	8,08	7	82-103	0,45
31	phi032	9,04	3	232-239	0,53
32	bnlg1129	9,08	5	179-202	0,72
33	umc1319	10,01	4	115-124	0,65
34	phi050	10,03	3	82-88	0,61
35	phi084	10,04	2	154-157	0,50
36	umc1061	10,06	8	97-107	0,46

^a Tailles d'allèles observées au GEVES et données à titre d'exemple.

^b L'indice de diversité de Nei a été calculé sur des centaines de lignées de maïs déjà analysées au GEVES.