



NOTICE TECHNIQUE

Empreintes et Diagnostic Génétiques Polymorphismes de restriction



Réf. : DT-03

Conception, réalisation, production :
École de l'ADN - 30015 Nîmes, www.ecole-adn.fr

Édition :
APBG - 69356 Lyon, www.apbg.org

Produit français, fabriqué à Nîmes (Gard) conforme à la réglementation européenne.

Rédaction oct 2013, version 1309-RL

1- PRESENTATION

1-1 Principe

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) fait partie des méthodes de biologie moléculaire les plus employées. Cette technique permet de révéler des marqueurs génétiques, ces courtes séquences d'ADN qui diffèrent selon les individus, les espèces ou les genres. À la différence des cartes de liaison génétique qui ont longtemps reposé sur des mutations identifiées grâce à leurs effets sur le phénotype, le polymorphisme de restriction s'adresse indifféremment à des séquences d'ADN codant ou non codant.

Le polymorphisme de restriction est basé sur la spécificité des enzymes de restriction en matière de reconnaissance d'une courte séquence d'ADN et de l'hydrolyse qu'elles y opèrent. De nombreux marqueurs génétiques dépendent ainsi de la manière dont de petites différences dans une séquence d'ADN peuvent modifier le profil de coupure par des enzymes de restriction.

Les applications de cette technique sont multiples, elle peut être à la fois utilisée dans le cadre de l'identification d'un individu ou de la recherche d'une anomalie génétique à l'origine d'une pathologie.

Ce kit, dans sa conception, propose la réalisation de profils de restriction sur une série d'ADN polymorphes selon différents protocoles. Ainsi, il est possible d'illustrer les différentes applications, qu'il s'agisse des empreintes génétiques, d'identification variétale, du diagnostic de maladies génétiques ou enfin de phylogénie moléculaire.

Dans ce kit sont fournis quatre ADN et deux enzymes de restriction. Selon les protocoles proposés, les combinaisons d'endonucléases et d'ADN aboutissent, après hydrolyse, à des profils de restriction différents dont les interprétations permettent d'illustrer les différentes applications de base de ces outils moléculaires.

1-2 Méthodologie

Il s'agit de travaux pratiques comportant une phase expérimentale importante menée directement par l'élève avec des exigences de rigueur, d'habileté et de respect des principes d'hygiène et de sécurité.

Une telle phase pratique se replace dans l'ensemble d'un raisonnement scientifique expérimental. Cette méthodologie, alliée à une technique, correspond très bien à l'optique du programme et des objectifs de seconde, première S et de terminale S.

De plus, ce contact avec des aspects correspondant réellement à des processus de biotechnologie concourt à une orientation positive vers des études scientifiques, en particulier dans le domaine des sciences de la vie.

2- PRESENTATION DU KIT

Ce kit présente des réactifs qui permettent de réaliser à la fois les deux types de manipulations, empreintes génétiques et diagnostic de pathologie. Le choix de chaque manipulation incombe à l'enseignant, il est important de noter que les réactifs sont fournis de sorte à réaliser :

- Soit 50 manipulations complètes en empreintes ;
- Soit 50 manipulations en diagnostic de pathologie.

Cependant il est important de remarquer que l'ensemble de réactifs permet de réaliser à la fois 25 manipulations de chaque thématique (25 essais en empreintes et 25 essais en diagnostic).

2-1 Constitution du kit

- 1 x « ADN 1 » 630 µl ;
- 1 x « ADN 2 » 630 µl ;
- 1 x « ADN 3 » 320 µl ;
- 1 x « ADN 4 » 320 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Xho I de 205 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Pst I de 410 µl ;
- 1 tube de 450 µl de tampon prêt à l'emploi ;
- 1 tube de tampon de charge 1,1ml.
- 1 tube de marqueur de taille 50 µl ;

2-2 Caractéristiques et conseils d'utilisation des réactifs

Tous les réactifs sont directement prêts à l'emploi ;
Les réactifs doivent être maintenus à 2 – 8°C ; conservés à cette température ils ont une stabilité d'au moins :

- 12 mois à 2 – 8 °C pour l'ADN, le tampon et le marqueur.
- 4 mois à 2 – 8 °C pour les enzymes.

Leur stabilité n'est que de 48 heures s'ils sont maintenus à température ambiante.

Il est recommandé de ne pas maintenir les réactifs de façon prolongée à température ambiante.

Ne pas congeler.

Dans tous les cas se référer aux spécifications de stockage mentionnées sur l'étiquette.

3- PROTOCOLE

3-1 Matériels complémentaires nécessaires au laboratoire (non fournis):

- Micro-pipettes ;
- Micro-centrifugeuse de paillasse ;
- Chronomètre ;
- Bain marie ou bain à sec ;
- Cuve à électrophorèse ;
- Plaque de moulage pour gel ;
- Appareil photo Polaroid® Gelcam pour biologie moléculaire (option);
- Portoirs pour tubes Eppendorfs® ;

3-2 Consommables

- Embouts pour micro-pipettes 200 µl ;
- Tubes type Eppendorfs® 200 ou 500 µl.

3-3 Réactifs complémentaires non fournis

(voir Kit DT-06)

- Eau milliQ ;
- Tampon TBE : Tris-Borate 0,045 M ; EDTA 1 mM, pH 8,3 (ex. : 5 X TBE Eppendorfs®) ; s'utilise à la concentration 1X
- Agarose LE Ultra pure (Lonza.) ;
- Bleu de méthylène ou Azure A

3-4 Opérations préalables aux travaux pratiques

- **Stérilisation du matériel et des réactifs**
Aucune stérilisation ni préparation de matériel spécifique.

- **Préparation des gels d'agarose: (voir Kit DT-06)**

Il est conseillé de préparer le gel d'électrophorèse avant la séance de travaux pratiques.

Protocole de préparation du gel :

Le port de gants est impératif en cas d'utilisation de bromure d'ethidium (BET).

Choix de la concentration du gel en % (c'est un pourcentage massique pour un volume donné)

Dans cette expérience le gel doit être à 1 % d'agarose ultrapur.

Méthode de calcul :

masse à peser (m en gramme), pour un volume (v en ml) :

$$m = v \times \text{pourcentage} / 100$$

Exemple de calcul :

gel à 1 % pour un volume de 100 ml

$$100 \times 1 / 100 = 1 \text{ g à peser}$$

- Peser précisément (+/- 0,1g) sur la balance la masse d'agarose dans un erlenmeyer taré ;
- Si nécessaire diluer le TBE en eau distillée de sorte à obtenir du TBE1X ;
- Mesurer le volume de TBE 1 X dans une éprouvette (+/- une demi-graduation) ;
- Ajouter le TBE 1 X à l'agarose et chauffer (micro-onde ou plaque chauffante) de sorte à dissoudre totalement l'agarose ;
- Verser le gel dans les plaques de moulage .

- **Préparation des solutions :**

Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire la distribution selon le protocole choisi.

4- PREPARATION DE L'EXPERIMENTATION

4-1 Préparation préalable de la séance

Pour chaque poste, préparer préalablement la veille ou le jour même les microtubes avec les ADN, les enzymes, et le tampon, en fonction de la manipulation choisie :

Pour réaliser le **diagnostic de pathologie**, fournir par poste :

- 1 x « ADN 1 » 12 µl ; étant l'ADN pathologique
- 1 x « ADN 2 » 12 µl ; étant l'ADN « Sain »
- 1 tube d'Enzyme Xho I de 4 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Pst I de 4 µl ;
- 1 tube de 8,5 µl de tampon;

Pour réaliser les **empreintes génétiques**, fournir par poste :

- 1 x « ADN 1 » 6 µl ; pouvant être identifié comme suspect A
- 1 x « ADN 2 » 6 µl ; pouvant être identifié comme suspect B
- 1 x « ADN 3 » 6 µl ; pouvant être identifié comme suspect C
- 1 x « ADN 4 » 6 µl ; pouvant être identifié comme LC
- 1 tube d'Enzyme Pst I de 8 µl ;
- 1 tube de 8,5 µl de tampon;

4-2 Déroulement de la séance

- **Manipulation par les élèves**

La préparation des échantillons d'hydrolyse se déroule conformément aux tableaux décrits, dans des tubes de 200 ou 500 µl.
Les tubes sont distribués de sorte à réaliser une manipulation complète.

Note :

- Chaque tube doit être identifié ;
- Pour la préparation des échantillons un embout unique doit être utilisé lors de chaque pipetage.

Voir Tableau 1 pour : Diagnostic de Pathologie
 Voir Tableau 2 pour : Empreintes génétiques

• **Après la préparation des échantillons d'hydrolyse :**

- Centrifugation rapide en micro centrifugeuse (quelques secondes à 4000 – 5000 tours/min) ;
 - Incubation à 37°C pendant 45 minutes ;
 - Ajout par échantillon de 5 µl de tampon de charge (solution orange) ;
 - Dépôt sur gel d'agarose à 1% (voir préparation d'un gel d'agarose) ;
- Pour l'interprétation des résultats du diagnostic de pathologie, l'enseignant déposera par gel 5 µl de marqueur de taille dans un puits.

• **Méthode de dépôt sur gel et électrophorèse**

- Préparer la cuve à électrophorèse ;
- Ajouter du TBE 0,5 X ;
- Déposer le gel, veiller à ce que le gel soit immergé dans le tampon, et les puits entièrement inondés ;
- Déposer dans les puits : 25 µl maximum dans les grands puits, ou 15 µl maximum dans les petits puits ;
- 5 µl de marqueur de taille choisi en fonction de la nature des bandes attendues, à déposer dans un seul puits pour chaque gel ;
- Brancher le transformateur en vérifiant la polarité (- fil noir, + fil rouge) ;
- Migration à 100 volts pendant 30 minutes ou 135 volts pendant 20 minutes (penser à vérifier le sens de migration, le pôle négatif est côté dépôt et le sens de migration se fait vers le pôle positif).

- **Après la migration**

Révéler les fragments par une coloration spécifique type azure A ou bleu de méthylène.

Note

Ces échantillons sont également adaptés pour le système qui utilise les « FlashGel® Cassettes » ; il suffit avec ce système de déposer uniquement **5 microlitres** d'échantillon. Se référer à la notice technique du produit : Réf. DT-FG2 ou DT-FG4.

Dans tous les cas d'utilisation de gels d'agaroses spécifiques se reporter aux spécificités d'utilisation décrites par le fabricant.

Résultats attendus :

• **Résultats pour le Diagnostic de Pathologie :**

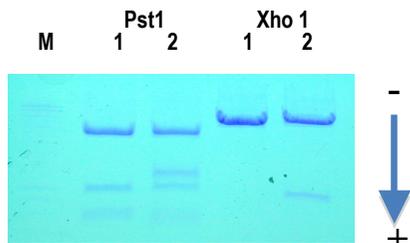


Photo de gel coloré à l'Azure A

Interprétation des résultats :

Il a deux possibilités pour avancer la problématique :

Problématique 1 :

Deux ADN sont coupés par digestion enzymatique, sous l'action d'endonucléases de restriction. Identifiez l'ADN pathologique (ADN 1), sachant que l'un des deux ADN est représentatif de la population saine (ADN 2), et que la pathologie est due, au niveau génétique, à une délétion.

Dans le cadre de cette problématique, il s'agit de regarder les fragments d'ADN qui sont les plus nombreux avec chaque enzyme. Il ressort que les ADN hydrolysés avec les enzymes Pst ou Xho présentent une différence dans le nombre de fragments. Afin d'identifier l'anomalie, compte tenu des informations données dans l'énoncé, il s'agit de compter les fragments. Ils sont plus nombreux pour l'ADN sain que pour l'ADN pathologique. Par conséquent l'ADN ayant perdu du matériel génétique, et donc ayant subi une délétion, est celui considéré comme porteur de la pathologie.

Problématique 2 : Analyse fine de la délétion.

L'ADN 2 est un échantillon issu d'une population saine qui sert de contrôle dans le cadre de pathologie génétique. Que peut-on conclure sur l'ADN 1 ? Quel est l'intérêt d'utiliser deux enzymes ?

L'analyse des résultats se fait de façon similaire à ce qui est décrit précédemment, l'intérêt de deux enzymes se justifie par le contrôle des résultats afin de réélement confirmer une anomalie génétique et permet, à l'aide de la carte de restriction de l'ADN sain (voir ci dessous), d'affiner la détermination de la position de la délétion.

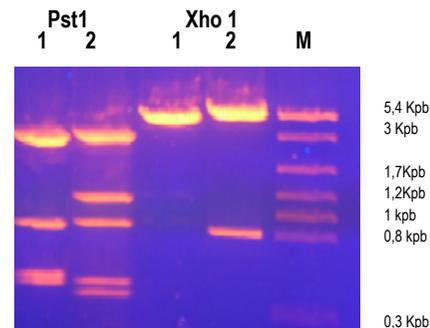


Photo de gel avec le système Flash Gel :

• **Résultats pour les Empreintes génétiques :**

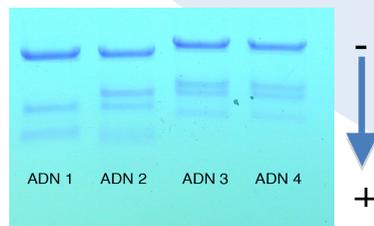


Photo de gel coloré à l'Azure A

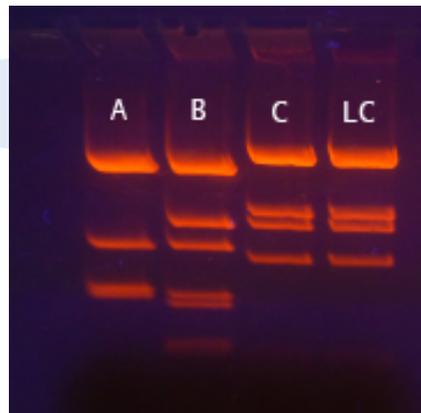


Photo de gel avec le système Flash Gel :

Interprétation des résultats :

L'analyse des résultats d'empreintes consiste à comparer les profils donnés par les ADN des différents suspects A,B,C correspondant respectivement à ADN 1, 2 et 3 , à celui retrouvé sur le lieu d'un crime (ADN 4). Le but étant de déterminer lequel des suspects a laissé des traces biologiques sur le lieu du crime.

Problématique :

Que conclure sachant que ADN 1, ADN 2 et ADN 3 sont des ADN de suspects, A, B, C et l'ADN 4 a été extrait à partir d'un échantillon biologique issu d'une scène de crime.

La comparaison est immédiate, le polymorphisme génétique est traduit par la présence de séquences d'ADN spécifiques et uniques chez tous les individus d'une même espèce. Les profils génétiques avec les fragments sont bien spécifiques de chaque individu.

Le profil génétique issu de l'échantillon biologique de la scène de crime, présente les mêmes caractéristiques que le suspect 3. Il est possible de supposer que ce suspect était présent sur la scène de crime sans pour autant préjuger de sa culpabilité. Bien entendu ces résultats méritent confirmation, la culpabilité du suspect est soumise uniquement à l'autorité judiciaire.

5- CONSIGNES DE SECURITE

Les réactifs qui constituent ce kit pédagogique ne présentent aucun caractère dangereux, toxique ou pathogène. La fiche de sécurité MSDS est disponible, sur simple demande auprès de l'École de l'ADN.

Au début de chaque formation, il est néanmoins important de sensibiliser les élèves aux risques encourus lors des manipulations :

Mesures d'hygiène : se laver les mains avant et après l'expérimentation ;
 Se référer aux mesures de sécurité d'utilisation des appareils électriques et matériels ;

Utiliser les précautions d'usage pour toutes manipulations de produits dangereux ou toxiques.

En cas d'ingestion informez le médecin responsable ou contactez le centre antipoison le plus proche.

Précautions spécifiques :

Le port de gants et de la blouse est conseillé.

Dans le cadre d'une révélation des fragments d'ADN au BET, il est important de veiller à respecter rigoureusement ces recommandations :

- Interdire formellement aux élèves de manipuler le gel d'agarose chargé en BET, (manipulation effectuée par le professeur préalablement formé) ;
- Porter des lunettes de protection en utilisant la table UV ;
- Pour l'élimination du BET chaque établissement doit se référer à sa procédure interne de « traitement des déchets ».

La fiche de consigne de sécurité MSDS est disponible en ligne sur le site www.ecole-adn.fr/MSDS

| TABLEAU 1 : DIAGNOSTIC DE PATHOLOGIE | | | | | | |
|--------------------------------------|--------------|-------------|--------|-------------|--------------|--------------|
| Echantillon | ADN | eau stérile | tampon | Enzyme PstI | Enzyme XhoI | Volume final |
| Pst 1 | ADN 1 : 6 ul | 10 ul | 2 ul | 2 ul | - | 20 ul |
| Pst 2 | ADN 2 : 6 ul | 10 ul | 2 ul | 2 ul | - | 20 ul |
| Xho 1 | ADN 1 : 6 ul | 10 ul | 2 ul | - | 2 ul | 20 ul |
| Xho 2 | ADN 2 : 6 ul | 10 ul | 2 ul | - | 2 ul | 20 ul |
| | | | | | | |
| TABLEAU 2 : EMPREINTES GENETIQUES | | | | | | |
| Echantillon | ADN | eau stérile | tampon | Enzyme PstI | Volume final | |
| Suspect 1 | ADN 1 : 6 ul | 10 ul | 2 ul | 2 ul | 20 ul | |
| Suspect 2 | ADN 2 : 6 ul | 10 ul | 2 ul | 2 ul | 20 ul | |
| Suspect 3 | ADN 3 : 6 ul | 10 ul | 2 ul | 2 ul | 20 ul | |
| Lieu du crime | ADN 4 : 6 ul | 10 ul | 2 ul | 2 ul | 20 ul | |

Contact commande

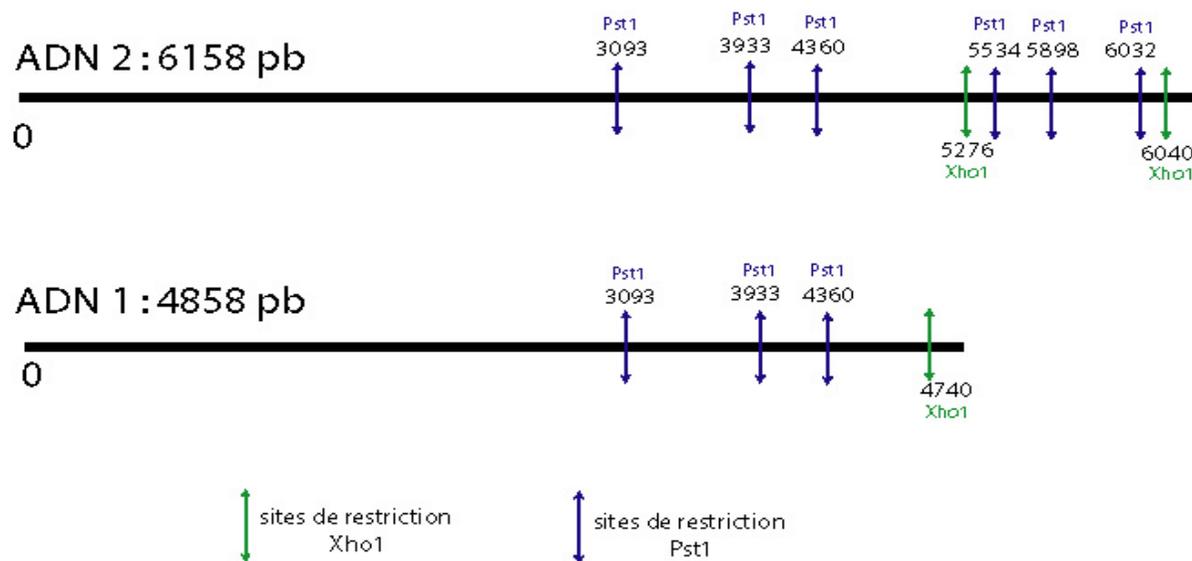
APBG - B.P. 8337
69356 Lyon cedex 08
tel 04 78 74 47 22
fax 04 78 01 22 14
apbg@wanadoo.fr
www.apbg.org

Informations Renseignements

Ecole de l'ADN
19, Grand Rue
BP 81295
F-30015 Nîmes Cedex 1
Tel/fax : +33 (0) 466 67 82 29
E-mail : patrice@ecole-adn.fr
www.ecole-adn.fr

DNATOOLS est une marque déposée par l'école de l'ADN

Cartes de restriction ADN 1 et 2



Action soutenue par

ThermoFisher
SCIENTIFIC



UNION EUROPÉENNE