



Mini laboratoire
d'empreintes génétiques
Guide de l'élève

Cat# M3004TAE

Version 100223-FR



Table des matières

Sécurité au laboratoire	2
Objectifs et contexte	3
Questions préalables	4
Partie I : L'électrophorèse	5
Partie II : Résultats	8
Partie III : Analyse des données	9
Annexe A - Qu'est-ce que l'électrophorèse sur gel ?	10

Sécurité au laboratoire

1. Portez des blouses, des gants et des lunettes de protection dans la mesure du possible.
2. Soyez prudent avec tous les équipements électriques tels que les machines PCR et les unités d'électrophorèse.
3. Chauffer et verser de l'agarose fondu présente un risque d'éclaboussures. Soyez prudent lorsque vous manipulez des liquides chauds. Porter des lunettes de protection et des gants pour éviter les brûlures.
4. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir manipulé du matériel biologique et des produits chimiques.

Objectifs et contexte

Objectifs

Développer une compréhension des principes de l'électrophorèse. Obtenir des données, analyser les résultats et en déduire une conclusion probable concernant la filiation en utilisant les empreintes génétiques et la technologie de séparation de l'ADN.

Contexte

Chaque individu est unique, mais votre ADN contient des indices génétiques de votre patrimoine. Ces indices se trouvent dans les régions non codantes de l'ADN, où les mutations aléatoires sont relativement fréquentes. Comme ces changements mineurs n'affectent généralement pas les gènes essentiels à la survie, les variations se transmettent des parents à la progéniture. Au fil des générations, ces changements s'accumulent et les régions de l'ADN développent des modèles distincts. Pour analyser ces régions d'ADN, les scientifiques utilisent une méthode de profilage génétique appelée empreinte génétique. L'empreinte génétique tire parti de ces séquences héritées et les utilise pour identifier les similitudes génétiques entre certains individus. Cette technologie permet d'identifier les liens familiaux au niveau génétique et de lever les incertitudes sur la lignée.

Dans la méthode la plus traditionnelle de prise d'empreintes génétiques, l'ADN est d'abord prélevé et isolé. S'il n'y a pas assez d'ADN, il peut être amplifié (répliqué) à l'aide de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Une fois que l'on a obtenu suffisamment d'ADN, celui-ci est digéré ou "coupé" par des enzymes de restriction.

Ces enzymes reconnaissent des séquences d'ADN particulières appelées sites de restriction, et la longueur de l'ADN entre ces sites de restriction varie d'une personne à l'autre en fonction des gènes dont elle a hérité. Une fois la digestion terminée, l'ADN est analysé à l'aide d'une technique de séparation de l'ADN appelée électrophorèse sur gel (pour plus d'informations sur l'électrophorèse sur gel, voir l'annexe A).

Lorsqu'il est séparé par électrophorèse sur gel, un motif de bandes est créé pour l'ADN de chaque individu en fonction de la taille des fragments. Ce motif peut ensuite être comparé aux motifs d'autres individus. Plus les bandes sont similaires, plus la probabilité que les individus soient apparentés est élevée. Les techniques d'empreintes génétiques sont utilisées dans de nombreux domaines, de la criminalistique à la recherche de paternité, en passant par les soins de santé et la recherche.

Scénario

Depuis trois ans, une équipe de chercheurs suit et étudie trois groupes différents de baleines à bosse au cours de leur migration hivernale annuelle au large des côtes d'Hawaï. Les baleines à bosse étant une espèce menacée, l'équipe a tenté d'observer leur comportement afin d'essayer de comprendre leurs stratégies de reproduction. La chasse commerciale intensive à la baleine au cours de la première moitié du XXe siècle a provoqué un goulot d'étranglement au sein de la population, appauvrissant considérablement le patrimoine génétique de ces baleines. Les efforts de conservation ayant permis d'augmenter le nombre de baleines, la détermination de la diversité génétique des populations est devenue de plus en plus importante afin de suivre la santé de l'espèce et d'assurer sa survie.

La naissance récente d'un baleineau femelle nommé Luna a donné à l'équipe de recherche l'occasion de recueillir davantage de données sur les comportements d'accouplement des

baleines. En observant le comportement d'allaitement, ils ont déjà pu associer Luna à sa mère. Ils ont également réduit le nombre de pères à l'un des trois candidats possibles en se basant sur les observations faites au cours de la saison d'accouplement précédente, mais ils n'ont pas encore pu établir un lien définitif entre Luna et son père. À l'aide d'une technique d'empreinte ADN, vous allez les aider à déterminer quelle baleine est le père de Luna !

Questions préalables

1. Qu'est-ce que l'ADN et que fait-il ?
2. Qu'est-ce qu'un chromosome et combien de copies en possède-t-on dans chacune de ses cellules ? De qui viennent-ils ?
3. Quelle quantité d'ADN partagez-vous avec chacun de vos parents ? Quelle quantité d'ADN partagez-vous avec vos frères et sœurs ?
4. Quelles sont les caractéristiques ou les propriétés de l'ADN ?

Partie I: Electrophorèse

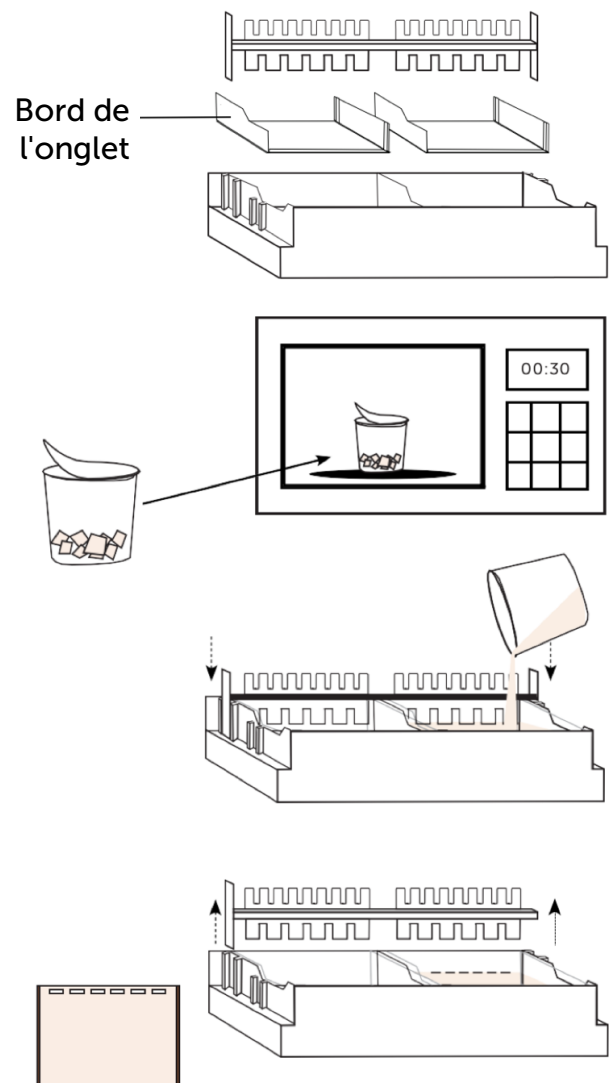
Materials

- 1 Système de coulage MiniOne
- 1 Système d'électrophorèse MiniOne
- 1 Coupelle agarose GreenGel™ (1%)
- 5 aliquotes d'échantillons d'ADN
- Le tampon de migration TAE (135 mL)
- 1 micropipette (2-20µL)
- 5 Embouts de micropipettes


Bien	Nom de l'échantillon	Volume de chargement
1	Femme L	10 µL
2	Femme M	10 µL
3	Homme A	10 µL
4	Homme B	10 µL
5	Homme C	10 µL
6	Vide	10 µL

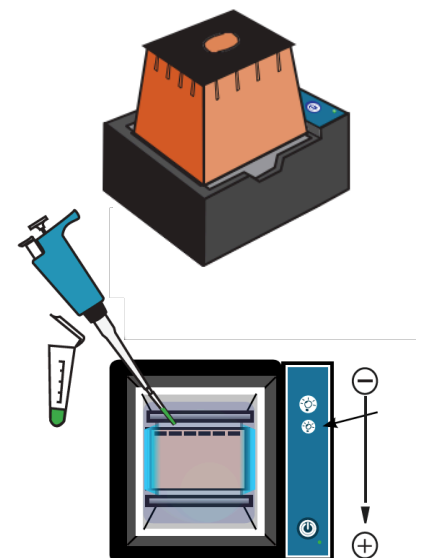
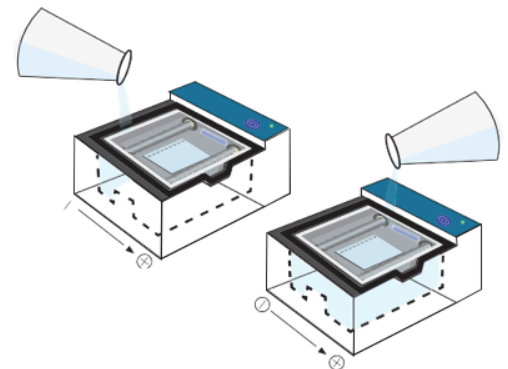
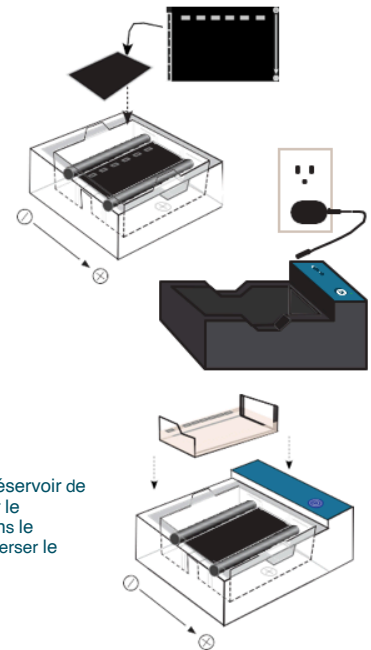
Coulage du gel

1. Placez le support de coulage de gel MiniOne® sur une surface plane et placez des plateaux de gel dans les deux cavités. Pour une orientation correcte du plateau, placez le bord de la languette du plateau sur le côté gauche. Insérez le peigne dans les fentes en haut du support de coulage avec le côté 6 puits vers le bas.
2. Décollez partiellement le film d'une coupelle avec le GelGreen™ et le mettre au micro-ondes pendant 20 secondes. Laissez refroidir pendant 15 secondes. **NE PAS mettre plus de 2 coupelles de gel au micro-ondes à la fois.**
3. **Exigence de sécurité** : La surveillance d'un adulte est requise si les élèves manipulent seuls des coupelles de gel!
4. **Une coupelle de gel sert à fabriquer un gel d'agarose** Versez lentement la solution d'agarose chaude dans un moule. Assurez-vous qu'il n'y a pas de bulles d'air dans la solution d'agarose. Laissez le gel d'agarose se solidifier pendant 10 minutes ou jusqu'à ce qu'il soit opaque. **NE PAS remuer le gel ou faire vibrer le support avant que le temps soit écoulé.**
5. Retirez soigneusement le peigne lorsque le gel est prêt. Retirez le plateau de gel avec le gel solidifié du support de coulage et essuyez tout excès d'agarose du fond du plateau.




Comment charger un gel

1. Assurez-vous que la plate-forme d'observation noire se trouve dans le réservoir de gel. Assurez-vous que les puits sont alignés avec les marques de la plate-forme sur l'extrémité négative.
2. Branchez l'alimentation électrique au secteur et insérez soigneusement l'autre extrémité à l'arrière du générateur MiniOne®.
3. Placez la cuve d'électrophorèse dans le générateur de manière à ce que les électrodes de carbone touchent les rivets dorés et que la cuve soit au niveau du chariot.
4. Placez le plateau avec le gel dans la cuve de gel.
5. Le réservoir de gel ne doit pas contenir de tampon lorsque vous placez le plateau de gel avec le gel dans celui-ci.
6. Allumez la LED bleue de faible intensité en appuyant sur le  bouton du générateur.
7. Mesurez 135 ml de tampon migration TAE et le verser dans un côté de la cuve. Regardez l'air sortir entre le plateau de gel et la plate-forme d'observation. Une fois que l'air a été retiré du dessous du plateau de gel, versez le tampon restant dans l'autre côté de la cuve.
8. Placez le filtre orange sur le générateur.
9. Appuyez sur le bouton marche qui devrait maintenant être un feu vert fixe. Si le voyant vert est allumé, éteignez l'appareil et passez au chargement des gels. Si le voyant vert **clignote**, consultez le guide de dépannage.
10. Assurez-vous que la lumière bleue de faible intensité est allumée. Déposez dans chaque puits les échantillons de volume appropriés à votre activité. Les MiniLabs sont conçus pour utiliser 10 μL par puits. N'oubliez pas de changer les embouts de pipette pour chaque échantillon. **Notez le nom de chaque échantillon correspondant aux puits adéquat pour faciliter l'analyse ultérieure**

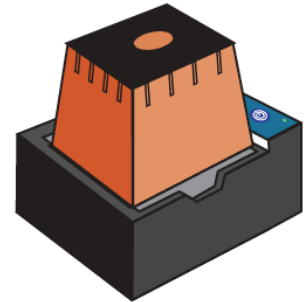


Migration et résultats


1. Une fois que le gel est chargé, ne le déplacez pas. Assurez-vous que l'alimentation électrique est branchée et placez le filtre orange sur le générateur. Allumez l'appareil en appuyant sur le  bouton.

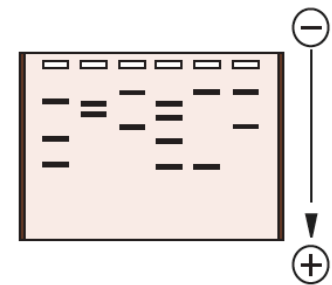
Le voyant vert à côté du bouton s'allume.

- Le voyant vert ne s'allume pas si :
- La cuve n'est pas correctement placée à l'intérieur du générateur.
- Il n'y a pas de tampon dans la cuve.
- Le tampon est trop dilué.
- Le filtre orange n'est pas sur le générateur. Il y a trop peu de tampon de migration.
- L'alimentation électrique n'est pas branchée. Vérifiez en allumant les LED bleues.



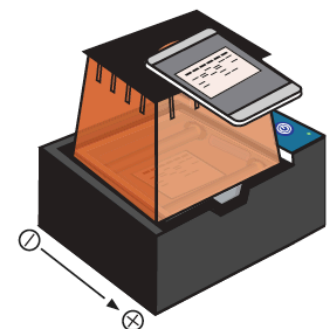
2. Demandez aux élèves de vérifier périodiquement la migration des bandes (toutes les cinq minutes).

3. Laissez le gel migrer pendant **25 minutes** ou jusqu'à ce que la séparation de l'ADN soit suffisante. N'oubliez pas que les petits échantillons d'ADN migrent plus vite, il est donc important de vérifier périodiquement où se trouvent vos bandes. Une fois votre analyse terminée, coupez l'alimentation en appuyant sur le  bouton. Utilisez la basse intensité pour le visionnage pendant la migration. La lumière affaiblit le signal fluorescent de l'ADN.



4. Archivez vos résultats.

Si nécessaire, **essuyez la condensation à l'intérieur du filtre orange avec un chiffon doux**, puis remettez la filtre orange sur le générateur. Allumez la lumière à haute intensité. Placez votre téléphone portable ou votre appareil photo directement sur le filtre orange pour prendre une photo de la migration de l'ADN. Ne pas zoomer, ni de flash car les photos seraient alors floues. (Le filtre orange photo est déjà à la distance focale optimale pour un smart phone.)



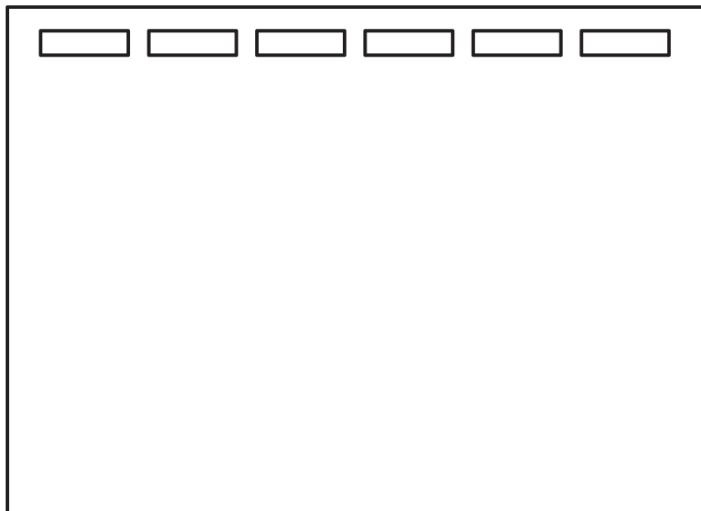
Nettoyage

Note d'instruction : Tous les réactifs de ce laboratoire peuvent être éliminés comme des déchets non dangereux.

1. Après avoir recueilli les données et documenté les résultats, retirez la hotte photo et débranchez l'alimentation électrique de la prise et de l'arrière du chariot MiniOne®. Retirez le réservoir transparent du chariot et retirez le gel et le plateau du réservoir.
2. Versez le tampon utilisé dans l'évier ou dans un béccher à déchets. Jetez le gel. Rincez le réservoir en plastique transparent, le plateau à gel, le peigne et le système de coulage avec de l'eau déminéralisée ou distillée. Laissez les cuves sécher à l'air libre avant de les ranger.
3. Utilisez une serviette en papier ou un kimwipe pour essuyer délicatement les rivets dorés du chariot (où les électrodes sont connectées) afin de vous assurer que toute l'humidité a été éliminée. Essuyez tout tampon qui aurait pu se répandre dans le chariot noir. Suivez toutes les instructions supplémentaires données par l'instructeur pour le nettoyage et le stockage.

Partie II: Résultats

A quoi ressemble votre gel ? Enregistrez des images du gel.



Voie 1: _____

Voie 2: _____

Voie 3: _____

Voie 4: _____

Voie 5: _____

Voie 6: _____

Annexe A - Qu'est-ce que l'électrophorèse sur gel ?

L'électrophorèse sur gel est une technique utilisée dans de nombreux domaines scientifiques pour analyser les composants de mélanges chimiques complexes. Les mélanges d'ADN, d'ARN, de protéines ou de colorants peuvent être séparés en leurs composants individuels sur la base de la taille moléculaire et de la charge électrique en utilisant une matrice de séparation dans un champ électrique.

Le gel utilisé dans l'électrophorèse sur gel est un enchevêtrement de polymères formant une matrice tridimensionnelle avec des pores remplis d'eau à travers lesquels les molécules migrent. Une densité plus élevée de polymères crée des pores plus petits. Comme les trous d'un tamis ou d'une passoire, la taille des pores doit être adaptée à la taille des molécules à séparer. Les gels peuvent être fabriqués à partir de différentes substances selon l'application. L'un des matériaux les plus couramment utilisés et les plus efficaces est l'agarose, un polymère extrait d'algues marines. Les gels d'agarose sont formés (ou coulés) en versant de l'agarose fondu dans un plateau où il se solidifie en refroidissant pour prendre la forme souhaitée. Un peigne est placé pendant que l'agarose est fondu, puis retiré après sa solidification pour créer des puits où les échantillons sont chargés.

Après solidification du gel, celui-ci est placé dans un tampon électriquement conducteur entre des électrodes parallèles positives ((+) anode) et négatives ((-) cathode) Une tension est appliquée entre les électrodes, ce qui crée un champ électrique uniforme dans le gel. Les molécules dans les puits commencent à se déplacer sous l'influence du champ électrique : les molécules chargées positivement migrent vers la cathode (-) et les molécules chargées négativement migrent vers l'anode (+).

La vitesse de déplacement d'une molécule dans un champ électrique est déterminée par la force de sa charge électrique par rapport à son poids moléculaire. Cette force est quantifiée comme le rapport entre la charge et la masse. La vitesse de mouvement à l'intérieur d'un gel est également influencée par la taille de la molécule par rapport aux pores du gel. Les polymères dans le gel sont comme une course d'obstacles : les petites molécules se déplacent facilement à travers les pores, voyageant plus vite et plus loin que les grosses molécules volumineuses. Cependant, une grosse molécule peut se déplacer plus rapidement dans un gel qu'une petite molécule lorsque la force de sa charge par rapport à sa masse est nettement plus élevée. La forme peut également affecter la façon dont une molécule se déplace à travers le gel. Les longues molécules de type spaghetti se déplacent plus lentement que les molécules compactes, qui se glissent facilement à travers les pores. Les molécules de même taille, de même forme et de même charge se déplacent ensemble et forment une bande distincte. Si plusieurs types ou tailles de molécules sont présents dans l'échantillon, ils se sépareront les uns des autres et chacun d'eux formera une bande distincte.

miniOne®

S Y S T E M S

 theminione.eu

 +32 475 36 68 34

 info@theminione.eu

FastTaq, GreenGel et PrepOne sont des marques commerciales d'Embi Tec. GelGreen est une marque de commerce de Biotium. MiniOne est une marque déposée de C.C. IMEX.

Brevets délivrés : US 10 641 731 B2, US 20110253541 A1.