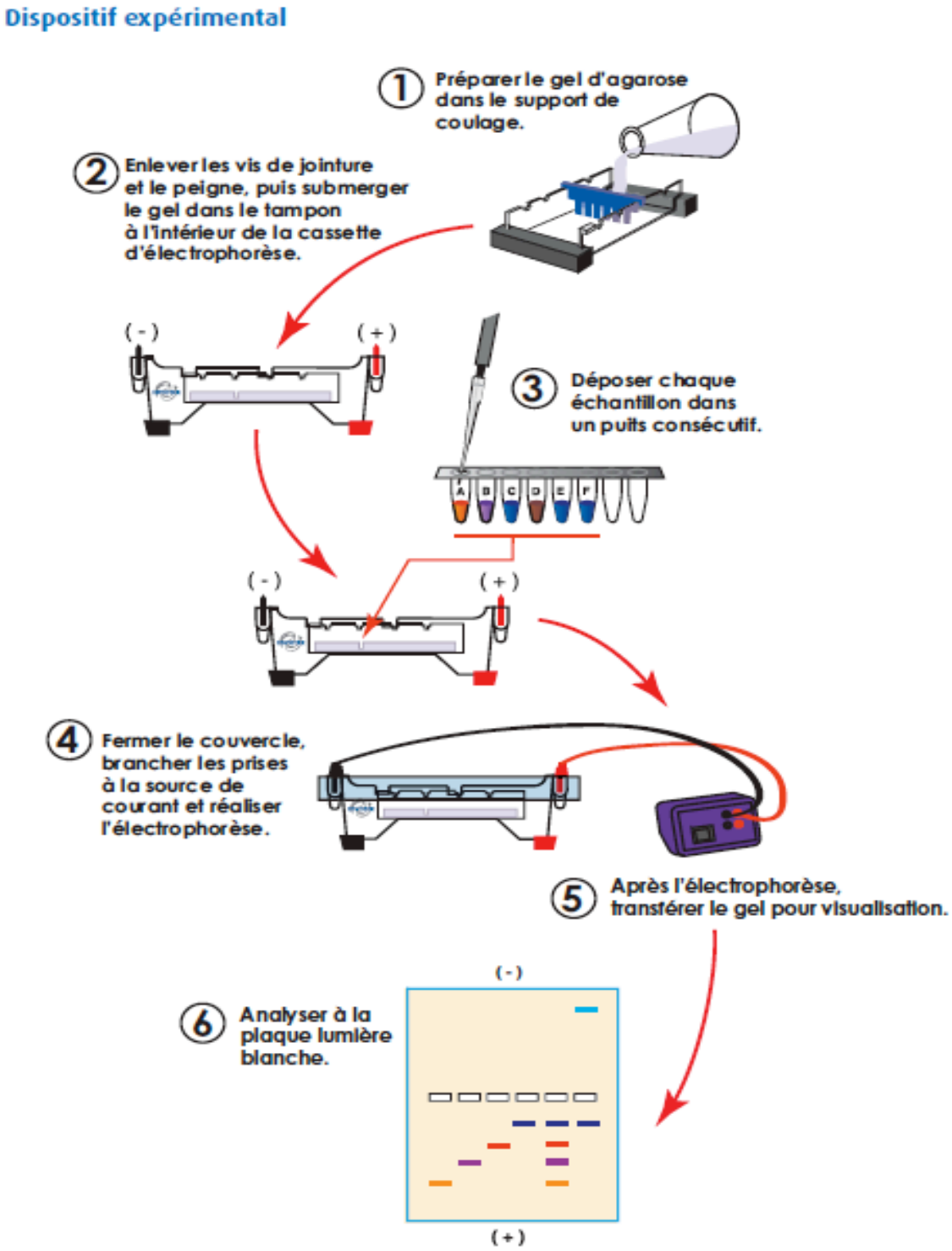
Séance 4 : Empreintes génétiques

Enfilez votre blouse ; chaussez des lunettes de protection ; portez des gants.

Ci-dessous figurent les grandes étapes d'un test ADN



Tournez la page SVP.

Mise en pratique de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

- Mélangez tampon TBE et agarose à raison de 1 g d'agarose pour 100 mL de tampon dans un bécher.
- Allumez le bec électrique sur 6 ;
- Faites fondre l'agarose tout en agitant de temps à autre pour homogénéiser le mélange.
- Eteignez le bec électrique lorsque le mélange est translucide. *(attention, c'est très chaud !)*
- Laissez refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (environ 60 °C).
- Placez les joints fournis avec la cuve pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.
- Réglez le niveau pour que le support de gel soit horizontal.
- Coulez lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.
- Laissez refroidir 10 minutes à température ambiante puis 15 minutes au réfrigérateur ;
- Puis, enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

Protocole de dépôt des échantillons d'ADN

- Prélevez 10μl avec une **micropipette** réglée sur le **volume approprié** en changeant de cône à chaque prélèvement. (suivez les instructions du prof)
- Remplissez les puits en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette. (Changez de cône à chaque fois !)
- Placez le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la **cathode - (pôle noir).**
- Remplissez la cuve de tampon TBE (réutilisable plusieurs fois) en versant délicatement : le tampon doit en aucun cas recouvrir le gel pour éviter les fuites d'ADN vers le tampon.
- Fermez la cuve, brancher les fils et mettre sous tension.
- Laissez migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ **55 min** à 100 V pour un gel de **80 mm** dans une minicuve).
- Coupez l'alimentation, débrancher les connections et récupérer le gel dans son support.

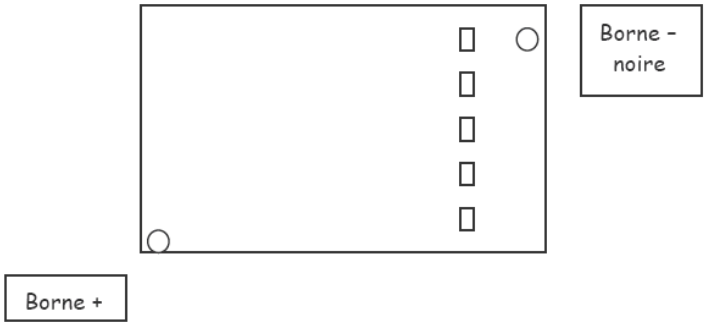
Révélation des bandes d'ADN

Attention, le gel doit être manipulé avec soin car il est très fragile.

- Recouvrir le gel avec le colorant.
- Laisser agir de **1 h à une nuit** puis vider le colorant (qui peut être réutilisé). Les bandes d'ADN apparaissent en bleu.

Les gels sont observables à ce stade mais on peut vouloir décolorer le fond pour améliorer la qualité des photographies.

- Rincer dans l'eau distillée pendant quelques heures en changeant l'eau de temps en temps.
- Photographier le gel avec un appareil numérique ou le scanner.



Exercice sur un test ADN

On étudie le gène X par électrophorèse.
Ce gène possède 2 allèles, A et B dont la séquence de nucléotide est différente.
On recherche la présence de ces allèles chez trois individus.
Pour cela, on utilise une enzyme de restriction MOB I qui coupe avant la séquence GATC.

1. Retrouver la séquence de reconnaissance de l'enzyme MOB I dans la séquence des deux allèles du gène X.
2. Colorier en rouge puis en bleu les séquences obtenues.
3. A l'aide de l'étude de la séquence des allèles et du résultat de l'électrophorèse, déduisez quels sont les allèles de chaque individu.

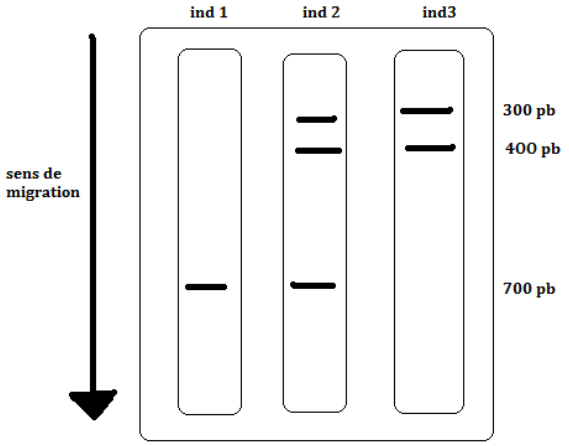
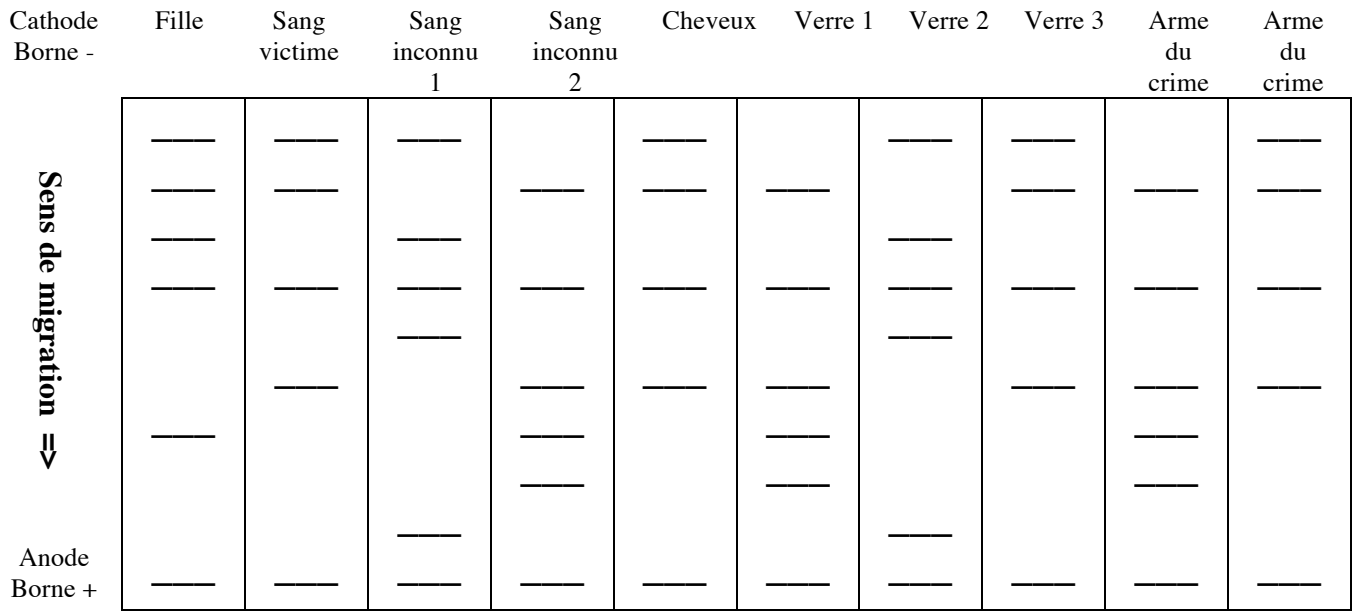
Allèle A :

ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCCGATC
TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGGCTAG

Allèle B :

ATACG GGATCCGAGCTCTCGTTCGTCTGCAGAAATTCC GATC
TATGCCCTAGGCTCGAGAGCAAGCAGACGTCTTTAAGGCTAG

Résultat de l'électrophorèse



Résultats de l'électrophorèse d'ADN retrouvés sur la scène de crime