

# NOTICE TECHNIQUE



## Empreinte et diagnostic génétiques : polymorphismes de restriction

Réf. APBG : K05EDG

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

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

Rédaction janv. 2006, version 106-3

### 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, 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 sont multiples, cette technique peut être à la fois appliquée 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 permis 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 spécialité SVT 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 35 manipulations de chaque thématique (35 essais en empreintes et 35 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 1,1 ml ;
- 1 tube marqueur de taille 50 µl.

#### 2-2 Caractéristique 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 ;
- 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 ;
- Appareil photo Polaroid® Gelcam pour biologie moléculaire (option) ;
- Portoirs pour tubes Eppendorfs® ;
- pH mètre.

#### 3-2 Consommables

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

#### 3-3 Réactifs complémentaires non fournis

- Eau milliQ ;
- Tampon TBE : Tris-Borate 0,045 M ; EDTA 1 mM, pH 8,3 (ex. : 5 X TBE Eppendorfs®) ;
- Agarose LE Ultra pure (USB Co.) ;
- Azure A ou Bleu de méthylène ;
- Ethanoate de sodium.

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

Protocole de préparation du gel :

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

Dans cette expérience le gel doit être à 0,8 % 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 0,8 % pour un volume de 100 ml  
 $100 \times 0,8 / 100 = 0,8 \text{ g à peser}$

- Peser précisément (+/- 0,1g) sur la balance la masse d'agarose dans un erlenmeyer taré ;
- Si nécessaire diluer le TBE en eau milliQ de sorte à obtenir du TBE 0,5 X ;
- 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 ;
- 1 x « ADN 2 » 12 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Xho I de 4 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Pst I de 4 µl ;
- 1 tube de 10 µl de tampon.

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

- 1 x « ADN 1 » 6 µl ;
- 1 x « ADN 2 » 6 µl ;
- 1 x « ADN 3 » 6 µl ;
- 1 x « ADN 4 » 6 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Xho I de 8 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Pst I de 8 µl ;
- 1 tube de 8 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 à la fin du document, dans des tubes de 200 ou 500 µl.

Les tubes sont distribués de façon 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 4 µl de tampon de charge ;
  - Dépôt sur gel d'agarose à 0,8% (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.

##### □ 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 les puits soient entièrement inondés ;
- Déposer dans les puits :
  - 25 µl maximum dans les grands puits ;
  - 15 µl maximum dans les petits puits ;

- 5 µl de marqueur de taille choisi en fonction de la nature des bandes attendues ;

- 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).

##### - Après la migration

Coloration à l'Azure A (plus sensible et plus rapide)

Sortir le gel et le traiter comme indiqué :

- Plonger le gel pendant 5 à 6 min dans une solution d'éthanol à 20° et 0,4 % Azure A.
- Après cette incubation, rincer 2 fois à l'éthanol 70 °, ou alcool à brûler, puis rincer abondamment à l'eau du robinet, laisser dans l'eau une vingtaine de minutes pour visualiser les résultats.
- Pour une meilleure définition, il est possible de laisser au réfrigérateur, les gels une nuit dans de l'eau.

Coloration au bleu de méthylène

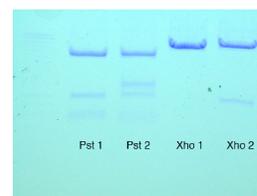
Sortir le gel et le traiter comme indiqué :

- Plonger le gel pendant 15 min dans un tampon éthanoate de Na 0,5 mol/l pH 5,2 à 0,1% de bleu de méthylène ;
  - Après cette incubation, laver 4 fois 10 minutes avec une eau à 40°C +/-1°C ;
- Sont ainsi observés les profils de restriction spécifiques de chaque ADN. Pour supprimer encore la coloration de fond du gel vous pouvez laisser 30 minutes de plus dans une eau à 40°C (éventuellement laisser une nuit décolorer en eau froid une nuit entière).

Remarque : une coloration au BET est fortement déconseillée compte tenu de la nature toxique du réactif.

#### Résultats attendus Photos de gels

##### Résultats pour le Diagnostic de Pathologie



##### Résultats pour les Empreintes génétiques

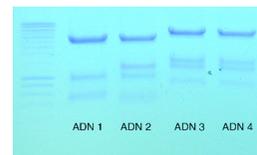


TABLEAU 1 : DIAGNOSTIC DE PATHOLOGIE

| 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        |

#### 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](http://www.ecole-adn.fr/MSDS)

##### Contact commande :

APBG – BP 8337  
69356 Lyon cedex 08  
tel 04 78 74 47 22  
fax 04 78 01 22 14  
E-mail : [apbg@wanadoo.fr](mailto:apbg@wanadoo.fr)  
[www.apbg.org](http://www.apbg.org)

##### Informations Renseignements :

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