

NOTICE TECHNIQUE



Empreintes génétiques: ADN hydrolysés

Réf.APBG : K06ED1

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

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

Rédaction Déc. 2006, version 1206-3

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 des ADN hydrolysés qui illustrent l'analyse de polymorphismes au travers des empreintes génétiques. Les premiers profils génétiques dans les années 1980, ont été pratiqués grâce à des endonucléases de restriction.

Ces quatre ADN hydrolysés sont prêts à être déposés sur gel pour être comparés entre eux. L'un d'eux étant une empreinte génétique de référence, à comparer à celles de 3 suspects. Les profils obtenus correspondent exactement à la version «Empreintes génétiques» du kit universel (Réf. DT-03): «Empreinte et diagnostic génétiques: polymorphismes de restriction». Les réactifs qui permettent l'obtention de ce profil sont identiques à ceux fournis dans le kit précédemment décrit.

Grâce à cette version simplifiée du kit, l'élève se contente de déposer uniquement les échantillons d'ADN sur gel d'agarose en vue de l'analyse et de l'interprétation des empreintes génétiques.

Les réactifs ont été spécifiquement conçus afin de simplifier les différentes étapes du kit «Empreinte et diagnostic génétiques: polymorphismes de restriction» lors de l'examen de l'évaluation des capacités expérimentales. Bien entendu l'usage de ces réactifs, pour cette épreuve, est préférentiellement destiné aux enseignants ou établissements qui ont réalisé, au cours de l'année, l'expérimentation intégrale.

1-2 Méthodologie

Il s'agit de travaux pratiques comportant une phase expérimentale simplifiée, 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.

2- PRESENTATION DU KIT

Ce kit présente des réactifs qui sont prêts à être déposés sur un gel d'agarose 1 % à 1, 2% maximum. Les réactifs sont fournis de sorte à réaliser 20 dépôts de 20 µl pour chaque échantillon.

2-1 Constitution du kit

- ADN du suspect A 450 µl (ADN1);
- ADN du suspect B 450 µl(ADN2) ;
- ADN du suspect C 450 µl(ADN3) ;
- ADN lieu du crime 450 µl (ADN4);
- 1 tube 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 de 4 mois à 2 - 8 °C ou 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 ;
- Cuve à électrophorèse ;
- Appareil photo Polaroid® Gelcam pour biologie moléculaire(option);
- Portoirs pour tubes Eppendorfs®;

3-2 Consommables

- Embouts pour micro-pipettes 200 µl;
- tubes de type Eppendorfs®;

3-3 Réactifs complémentaires nécessaires

Tous les réactifs nécessaires pour réaliser une électrophorèse en gel d'agarose, de 1 à 1,2%.

Voir Kit: Préparation d'un gel d'agarose réf.: DT-06

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'agarose pour l'électrophorèse avant la séance de travaux pratiques. Se référer à votre procédure et protocole interne au laboratoire.

- **Préparation des solutions:**
Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'instant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.

4- PREPARATION DE L'EXPERIMENTATION

4-1 Préparation préalable de la séance

Pour chaque poste, préparer des échantillons d'au moins 20 microlitres de chaque ADN et 5 microlitres de marqueur de taille.

- 1 x 20 µl d' ADN du suspect A ;
- 1 x 20 µl d' ADN du suspect B ;
- 1 x 20 µl d' ADN du suspect C ;
- 1 x 20 µl d' ADN lieu du crime;
- 1 x 5 µl de marqueur de taille;

4-2 Déroulement de la séance

- **Manipulation par les élèves**

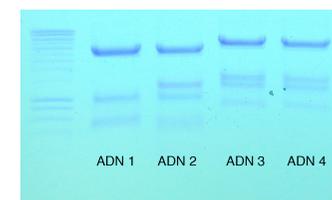
Les élèves déposent directement 20 µl de chaque ADN dans un puits de gel d'agarose traditionnel à 1 -1,2 %. Seulement 5 µl de marqueur de taille suffisent. La révélation des fragments d'ADN se fait après une migration à 100 volts pendant 30 minutes ou 135 volts pendant 20 minutes.

Pour la coloration de l'ADN se référer à votre procédure et protocole interne au laboratoire.

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

Résultats attendus Photo de gel coloré à l'azure A

Résultats des empreintes génétiques



Suspects A B C lieu du crime

Interprétation des résultats:

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:

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.

Mesures d'hygiène: se laver les mains avant et après l'expérimentation;

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».

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: info@ecole-adn.fr
www.ecole-adn.fr