

# NOTICE TECHNIQUE



## Diagnostic génétique: ADN hydrolysés

Réf. APBG : K06ED2

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

Edition:  
APBG - BP 8337  
69356 LYON CEDEX 08  
apbg@wanadoo.fr 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 le diagnostic d'une pathologie génétique au travers de l'analyse de profils de restrictions.

La problématique posée est la suivante:

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

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 de l'empreinte génétique.

**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 analyse, 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 de 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

Les ADN 1 et 2 digérés séparément par les enzymes PstI et XhoI

- ADN Sain(2) /Pst I 450 µl;
- ADN Pathol(1) /Pst I 450 µl;
- ADN Sain(2) /Xho I 450 µl;
- ADN Pathol(1) /Xho I 450 µl;
- 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 d'au moins 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 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'enseignant 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 21 microlitres de chaque ADN et 5 microlitres de marqueur de taille.

- 1 x 21 µl ADN Sain /Pst I ;
- 1 x 21 µl ADN Pathol /Pst I ;
- 1 x 21 µl ADN Sain /Xho I ;
- 1 x 21 µl ADN Pathol /Xho I ;
- 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 du diagnostic de pathologie



Pathol/Pst I Sain/Pst I Pathol/Xho I Sain/Xho I

## Interprétation des résultats:

Il a deux possibilités pour avancer la problématique:

Problématique 1:

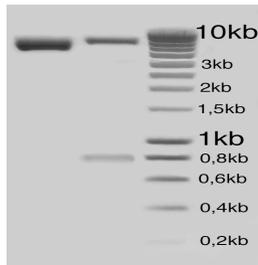
Deux ADN sont coupés par digestion enzymatique, sous l'action d'endonucléases de restriction. Identifiez l'ADN pathologique, sachant que l'un des deux ADN est représentatif de la population saine, et que la pathologie est due, au niveau génétique, à une perte d'ADN (une délétion).

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 réellement 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.



Digestion des deux ADN par l'enzyme Xho + Marqueur de taille:

Carte de restriction des deux ADN:

## 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:

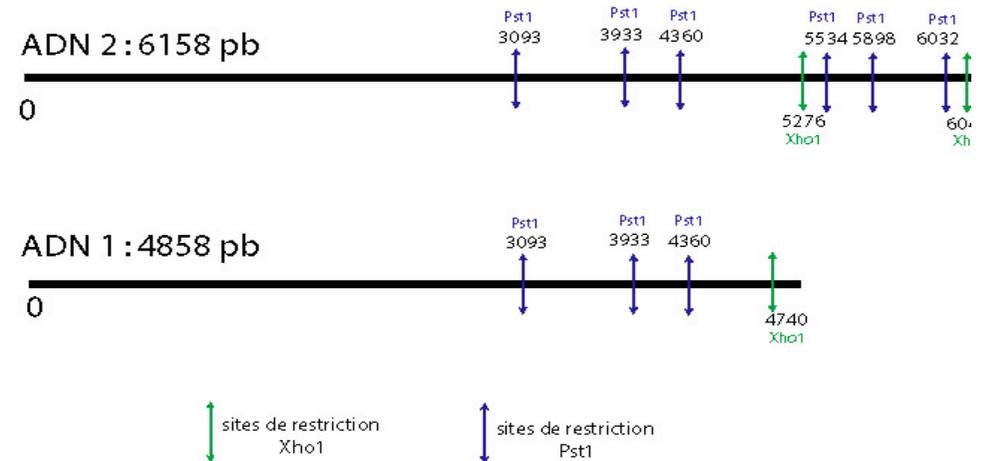
Le port de gants et de la blouse est conseillé.

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».

## Cartes de restriction ADN 1 et 2



### 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