

Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :
115 042

Français – p 1

Kit analyse ADN police scientifique

Version : 4112

1 Introduction

L'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose fait partie des techniques communément utilisées en biologie moléculaire. L'activité proposée permet d'illustrer expérimentalement le polymorphisme génétique des individus au travers d'un test simulé d'identification d'empreinte génétique. La thématique criminalistique fournit un contexte concret pour la réalisation d'une électrophorèse de fragments d'ADN hydrolysés. Ce TP n'a pas l'ambition de présenter la véritable technique de l'empreinte génétique mais il permet d'aborder les notions de polymorphisme de restriction, de marqueur génétique.

❖ Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de taille différente migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

2 Objectifs

- Réalisation d'un gel d'agarose. Avant la séance d'électrophorèse.
- Séparation des fragments par électrophorèse. 1h à 1h 30
- Révélation non spécifique des fragments séparés. 15 à 30 min

3 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

- 1 tube ADN suspect 1 170 µL
- 1 tube ADN suspect 2 170 µL
- 1 tube ADN suspect 3 170 µL
- 1 tube ADN scène de crime (ADN d'un des suspects) 170 µL
- Marqueur de taille 75 µL

Consommables pour réaliser 5 électrophorèses :

- Agarose (type II) 4,5 g
- Tampon TAE 10X 125 ml
- Colorant azur A 160 mg

Matériels complémentaires :

- Alimentation électrique 75/140V
- Cuve à électrophorèse ADN-Protéines

4 Mode opératoire

Durée de préparation : Préparation du gel, coulage, montage, migration, coloration, décoloration : 2 heures.

4.1 Préparation des solutions

❖ Préparation du tampon TAE 1X:

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 300 mL (gel + tampon migration).
- Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 1125 ml d'eau distillée, bien mélanger.

❖ Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 0,6% :

- Verser 83 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 250 mL.
- Peser 0,5 g d'agarose de type II dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète. S'assurer que l'agitation est maintenue constante afin de permettre une bonne homogénéisation du produit et d'éviter la formation de bulles dans le gel.
- Attendre le refroidissement de la solution (léger épaissement) et préparer le support (moule de coulage) comme suit.
 - a. Boucher les 2 extrémités du support de gel, utiliser les embouts hermétiques pour cuves ou disposer 2 morceaux d'adhésif pour peintre, un à chaque extrémité ouverte du support de gel pour le fermer complètement. S'assurer que l'adhésif utilisé est suffisamment résistant pour éviter la perte de la solution, et ce notamment si le gel est trop chaud et un peu trop liquide.
 - b. Positionner le peigne sur le support en utilisant les encoches prévues à cet effet.
 - c. Placer le plateau de moulage parfaitement à l'horizontale.
 - d. Lorsque la température de la solution atteint 50°C, la verser lentement et à vitesse constante au centre du plateau de moulage. Arrêter lorsque le niveau arrive juste au-dessous de la jonction dents-reste du peigne. Laisser ensuite le gel se figer 10 min à la température de la salle, puis 10 à 15 min au réfrigérateur. Enlever ensuite le peigne en le tirant bien verticalement : les puits apparaissent. Retirer le papier adhésif

Les gels peuvent être stockés au réfrigérateur dans du tampon TAE 1X

❖ Préparation de l'ADN

- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.
- Avant la séance, décongeler les tubes Eppendorf.

Idéalement décongeler les contenant environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis plonger les dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par

chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau et d'autre part d'éviter la nouvelle formation de bouts collés. Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une pipette automatique, déposer 10 μL d'ADN dans chaque puits en évitant que le puits ne déborde. Veiller à ne pas perforer le fond des puits.

Quantités pour réaliser 10 tests et 5 électrophorèses

- 1 x 15 μL d'ADN du suspect 1 ;
- 1 x 15 μL d'ADN du suspect 2 ;
- 1 x 15 μL d'ADN du suspect 3 ;
- 1 x 15 μL d'ADN lieu du crime ;
- 1 x 15 μL de marqueur de taille ;

Quantités pour réaliser 15 tests et 10 électrophorèses

- 1 x 10 μL d'ADN du suspect 1 ;
- 1 x 10 μL d'ADN du suspect 2 ;
- 1 x 10 μL d'ADN du suspect 3 ;
- 1 x 10 μL d'ADN lieu du crime ;
- 1 x 7,5 μL de marqueur de taille ;

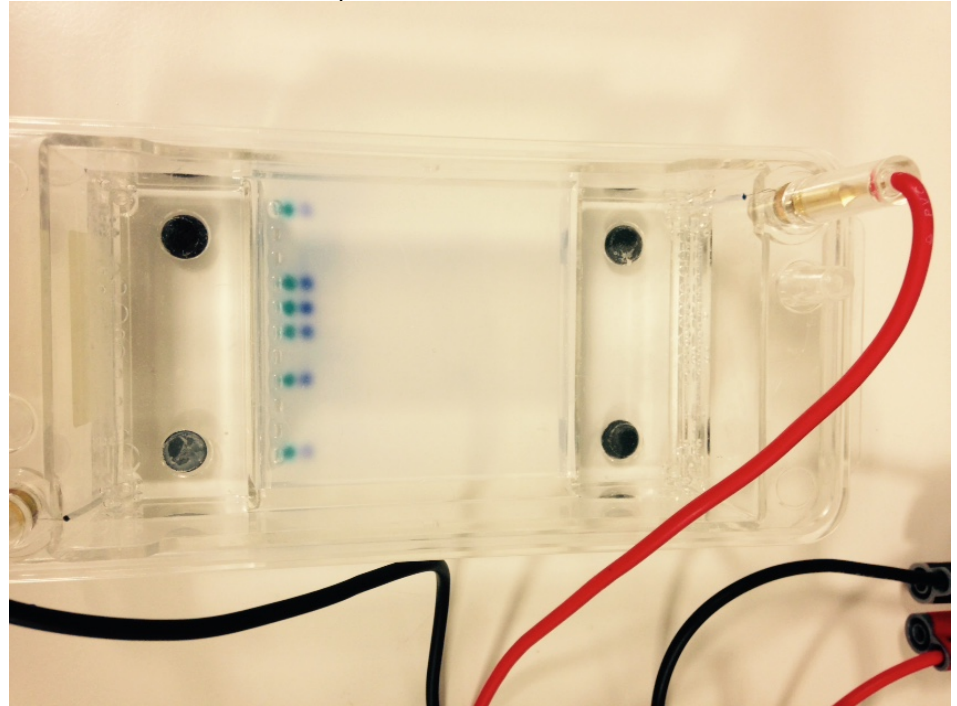
Avec des quantités plus faibles la détection peut être plus délicate pour des élèves de seconde par exemple.

4.3 Mise en route de l'électrophorèse et migration (environ 1 heure 30)

- Poser le support de gel dans la cuve, les puits devant être du côté de la cathode (borne négative).
- Remplir chaque compartiment de la cuve de tampon final TAE. Le tampon vient au contact du gel jusqu'à dépasser les 2/3 de sa hauteur, mais ne le recouvre en aucun cas. Un niveau de tampon trop élevé peut engendrer une intensité supérieure aux limites autorisées par l'alimentation qui disjoncte alors.
- Fermer la cuve à l'aide de son couvercle.
- Respecter la correspondance des couleurs entre les cordons de la cuve et les douilles de l'alimentation.
- Régler la tension de votre alimentation sur 75V ou 100 V suivant votre modèle d'alimentation.
- Raccorder l'appareil au secteur.
- Mettre l'alimentation sous tension. La migration démarre. Vérifier le bon déroulement de votre électrophorèse : de la buée doit apparaître sur le couvercle dans les cinq premières minutes si le générateur et la cuve sont bien alimentés.
- Pour stopper la migration, couper l'alimentation, débrancher la cuve et le cordon secteur.

Si, lors de la mise sous tension, l'alimentation disjoncte, retirer un peu de solution tampon.

La disjonction peut être due à une trop grande conductivité de la solution, provoquant la mise en marche de la protection en court-circuit. Se reporter à la notice de l'alimentation pour le rétablissement de la tension.



Migration en cours

4.4 Arrêt de l'électrophorèse et coloration

- Pendant la durée de la migration, préparer une solution de colorant Azur A pour électrophorèse à 0,4 %. Dissoudre le colorant dans une solution hydro-alcoolique 20% éthanol soit 80 ml éthanol et 320 ml d'eau.
- Arrêter l'électrophorèse lorsque l'indicateur de migration, a au moins parcouru une distance équivalente aux 2/3 du gel (environ 1h/1h20)
- Retirer le support de gel (avec son gel) de la cuve et le déposer dans un cristalliseur.
- Recouvrir avec le colorant et attendre 4 min exactement
- Vider le colorant (qui peut être réutilisé).
- Rincer le gel resté dans le cristalliseur avec de l'éthanol à 70% pour retirer l'excès de colorant pendant quelques secondes.
- Eliminer l'alcool puis rincer à l'eau distillée.
- Décolorer le gel par des bains successifs d'eau distillée jusqu'à apparition des bandes d'ADN.

5 Résultats et exploitations : quelques pistes

Les fragments sont visibles sous-forme de bandes dont l'épaisseur et la distance de migration sont fonction de leur masse en paires de bases.

L'ADN trouvé sur la scène de crime est l'ADN N°2



6 Principe des empreintes génétiques

Le génome déroulé mesure 1,80 avec 3,2 milliards de paires de bases soit 6,4 milliards de nucléotides, il est donc trop long de comparer base à base 2 fragments d'ADN. La technique de comparaison s'appuie sur le **polymorphisme de l'ADN**.

Les gènes (séquences codantes de l'ADN) ne constituent que 5 à 10 % de l'ADN total contenu dans les chromosomes des humains. Pour identifier génétiquement les individus, on n'utilise pas les allèles de ces gènes. On s'intéresse à l'ADN non codant qui représente 90 à 95 % du reste de l'ADN. Celui-ci n'est pas impliqué directement dans l'expression de l'information génétique, les fonctions biologiques sont mal connues, on a cependant découvert que l'ADN non-codant jouait un rôle de régulation et aussi dans le repliement de l'ADN.

En revanche, on sait par l'analyse qu'à proximité des gènes, il existe des séquences non codantes, courtes et extrêmement variables d'un individu à l'autre, appelées « **séquences répétées** ». Ces séquences sont caractérisées par la répétition en tandem d'unités de base composées de deux ou plusieurs nucléotides. Les allèles varient d'un individu à l'autre en fonction du nombre de répétition.

On distingue 2 types de polymorphismes

- Les **mini-satellites** ou **VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats)** séquences répétées en tandem, de 15 à 40 paires de bases. Les zones se transmettent selon le mode mendélien : l'enfant reçoit un allèle de son père et un allèle de sa mère. Les études récentes ont montré que nous aurions 1 500 zones de ce type.

- Les **micro-satellites** ou **STR (Short Tandem Repeats)**, unités répétitives très courte (4 paires de bases en moyenne) et répétées de deux à dix fois au plus. Chaque génome possède plusieurs centaines de STR.

Du point de vue judiciaire, on va retenir deux points importants de l'examen de ces zones variables:

- Plus il y a de concordances des sites polymorphes entre l'échantillon recueilli sur la scène d'investigation et le prélèvement issu de l'individu suspect, moins il est probable que cet indice prélevé sur la scène d'investigation provienne d'un individu différent.

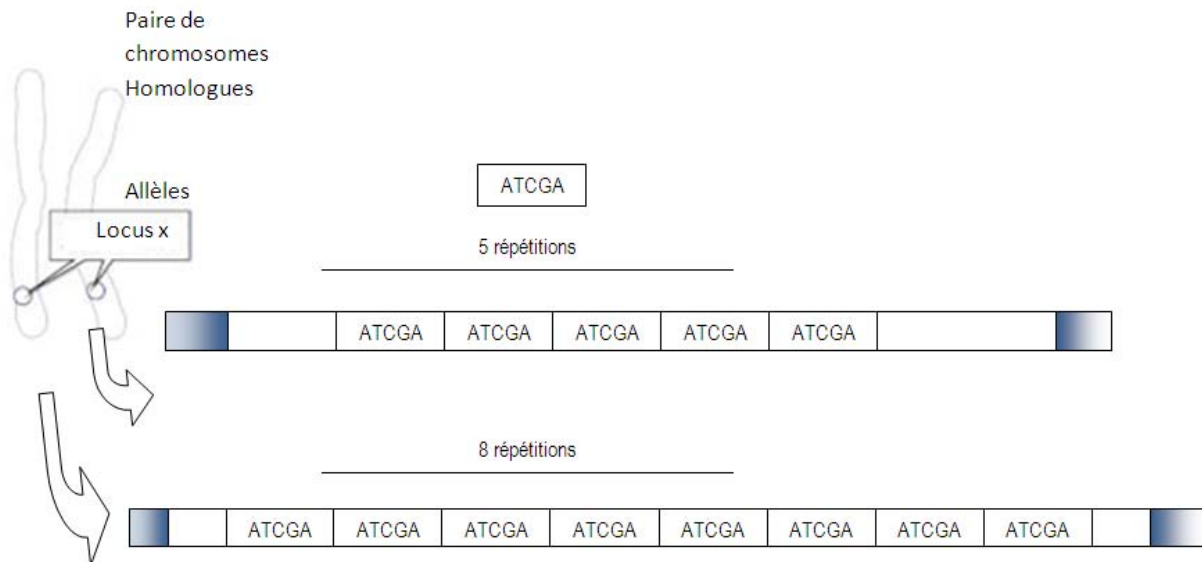
- Par contre la non-concordance avérée d'un seul site polymorphe entre l'échantillon recueilli sur la scène d'investigation et le prélèvement issu de l'individu suspect, conduit à écarter de façon absolue l'individu suspect

« L'inclusion s'apprécie en termes de probabilité, l'exclusion en termes de certitude. »

Analyse du polymorphisme des séquences répétées par RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism)

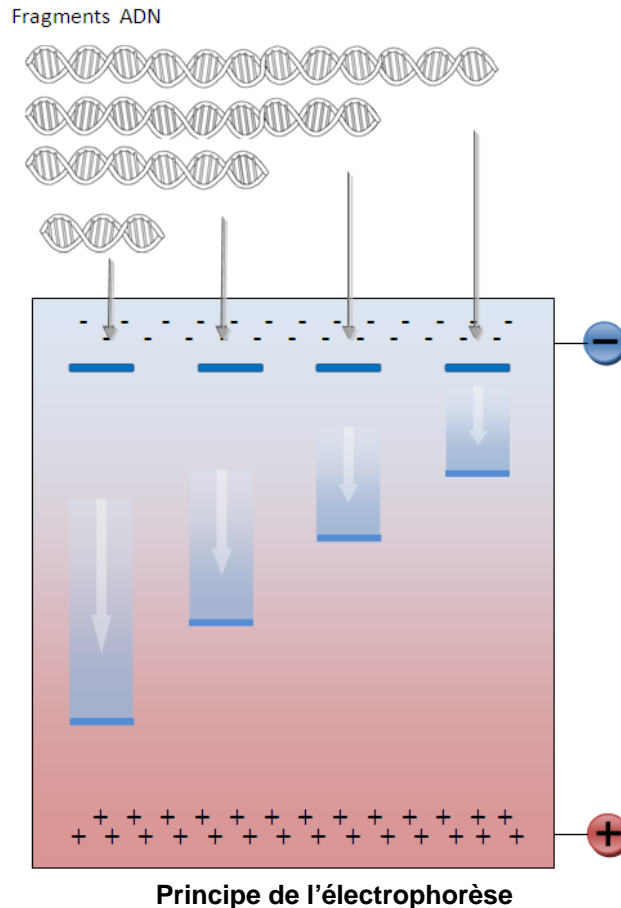
Les **mini-satellites** ou **VNTR** peuvent être détectés par RFLP en utilisant des enzymes de restriction qui coupent un grand nombre de fois le génome mais jamais dans les mini-satellites. Le nombre de répétitions est différent entre individus, il produit des fragments de tailles différentes spécifiques à chaque individu. Ce polymorphisme de longueurs de fragments peut servir à élaborer une empreinte génétique.

Les mini-satellites sont **en nombre variable** suivant les individus. Chaque individu possède deux « allèles » pour chaque séquence répétée qu'il possède.



On sait découper ces séquences à leurs extrémités et les repérer parmi le reste de l'ADN grâce à des sondes. On utilise plusieurs séquences répétées différentes, situées sur des paires de chromosomes différentes pour réaliser une empreinte génétique.

Pour distinguer les fragments correspondant à une même séquence répétée, on les fait migrer dans un gel d'électrophorèse : les fragments les plus courts (possédant le plus petit nombre de séquence répétée) migrent plus loin que les fragments plus longs.



La technique des enzymes de restriction (RFLP) n'est plus utilisée pour les applications pénales car trop lourde techniquement et trop longue pour obtenir des résultats significatifs. On a recourt principalement à l'amplification génique ou Polymerase Chain Reaction (PCR). Celle-ci s'appuie sur l'amplification des micro-satellites ou STR, car ils présentent une expression simple des allèles tout en ayant un fort taux d'hétérozygotie et expriment un nombre suffisant d'allèles. Ainsi à partir d'un échantillon peu abondant (par exemple une goutte de sang), grâce à la technique PCR, on obtient rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN.

7 Trucs et astuces

- Ne pas couler le gel à une température trop élevée, bien attendre son refroidissement. (Vous devez pouvoir poser l'erlenmeyer sur votre main sans vous brûler)
- Ne pas prendre de l'adhésif classique trop collant, vous auriez des difficultés à le décoller et vous endommageriez le gel.

- Bien vérifier la concentration de l'ADN indiquée par le fournisseur avant d'effectuer les dilutions.
- Vous visualisez la migration en observant le déplacement du BBP vers l'anode. Pour cela les tâches doivent avoir quitté les puits de dépôt.
- Le temps de préparation du TP étant long, il est possible de préparer la manipulation à l'avance. Le gel coloré se conserve au moins une semaine à 4°C dans un cristalliseur rempli d'eau distillée.
- Eviter la présence de bulles d'air dans le gel : elles gênent la séparation des bandes, le milieu n'étant pas homogène. Pour cela, au moment du moulage du gel, verser la solution d'agarose doucement et progressivement dans le moule et, au préalable, lors de la dissolution de la poudre d'agarose, régler la vitesse de l'agitateur magnétique de manière à ne pas introduire de bulles d'air dans la solution.
- Si le générateur disjoncte : il s'agit d'un court-circuit dû à un excès de tampon. Retirer à l'aide d'une pipette un petit volume égal de tampon dans chaque cuve, et recommencer le protocole de mise en route de l'électrophorèse.
- Absence de migration du BBP au bout de 15 minutes :
Le générateur n'ayant pas disjoncté, il s'agit d'un manque de tampon dans un ou dans les deux compartiments de la cuve.
Arrêter le générateur, puis à l'aide d'une pipette, ajouter du tampon dans le ou les compartiments.
Recommencer le protocole de mise en route de l'électrophorèse.
- Déplacement non rectiligne des bandes :
Ce problème ne gêne pas la visualisation de l'électrophorèse mais peut handicaper son interprétation.

8 Sécurité

L'électrophorèse utilise des tensions élevées, nécessitant un dispositif de sécurité infailible.

La cuve dispose d'un dispositif de sécurité mécanique interdisant l'accès à l'intérieur de la cuve lorsqu'elle se trouve sous tension. Le retrait du couvercle de la cuve provoque un arrêt immédiat de l'alimentation des électrodes.

D'autre part, les alimentations fournies par JEULIN sont toutes équipées de douilles de sécurité.

Cependant, l'utilisation de ce type de technique nécessite certaines précautions :

- Effectuer toutes les opérations afférentes à des transferts de liquides à des endroits éloignés de l'alimentation. Eviter toute projection d'eau sur le boîtier d'alimentation.
- Optimiser l'utilisation de la longueur des cordons d'alimentation de la cuve en éloignant au maximum la cuve de l'alimentation, notamment lorsque celle-ci est sous tension.
- Bien essuyer la surface externe de la cuve avant de procéder à son raccordement à l'alimentation.
- Ne mettre le dispositif sous tension que lorsque tous les branchements sont effectués, la cuve fermée et les précautions citées précédemment respectées.

9 Entretien

Il faut simplement veiller à bien rincer la cuve à l'eau distillée puis la sécher après usage.

Attention de ne pas détériorer les électrodes qui, très fines, demandent à être manipulées avec certaines précautions.

10 Service après vente

Pour toute question, veuillez contacter notre Support Technique :

JEULIN - SUPPORT TECHNIQUE
Rue Jacques Monod
BP 1900
27 019 EVREUX CEDEX FRANCE
0 825 563 563 *
** 0,15 € TTC/ min à partir d'un poste fixe*



Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France
métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE,
composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr



Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediately to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France

Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux