

Kit étude de l'ADN du suspect

Réf. ADNSUSP

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- ⚠ Stocker** l'ensemble du colis suivant les conditions :
 - Les tubes d'ADN se conservent à -20°C ⚠
 - Le reste des composants à 4°C ⚠
- Avant toute manipulation, étudier les conseils de sécurité**

COMPOSITION (pour 8 binômes)

- 1 sachet contenant :
 - Un tube à bouchon rouge contenant 125 µl d'ADN (relevé sur la scène du crime)
 - Un tube à bouchon vert contenant 125 µl d'ADN (indice n°1)
 - Un tube à bouchon bleu contenant 125 µl d'ADN (indice n°2)
 - Un tube à bouchon noir contenant 125 µl d'ADN (indice n°3)
 - Un tube à bouchon orange contenant 125 µl d'ADN (indice n°4)
- 1 flacon de 400 ml d'Azur A prêt à l'emploi
- 1 sachet d'agarose (2g)
- 100 ml de Tampon TAE 10X

MATERIEL NECESSAIRE

- Ethanol absolu
- Eau distillée
- Cuve à électrophorèse d'ADN avec moule à gel et peigne à gel 6 puits et alimentation pour cuve à électrophorèse
- Flacons d'un litre
- Gant anti-chaueur ou moufle de préhension
- Micro-onde ou éventuellement bain-marie
- Micropipettes et cônes pour micropipettes
- Gants

OBJECTIFS COGNITIFS

Ce kit propose de réaliser une électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose afin de comparer l'ADN extrait de la salive retrouvée sur une scène de crime à l'ADN de quatre suspects.
Ce kit permet par ailleurs d'introduire le concept de PCR.

RAPPELS

L'expérience à réaliser dans ce kit est techniquement simple. Les élèves coulent les gels d'agarose, déposent l'ADN dans ces gels afin de le faire migrer au travers du polymère d'agarose, puis interprètent l'apparition des bandes et leur disposition dans le gel. Ils déterminent ainsi si l'un des profils ADN correspond à celui du suspect trouvé sur la scène du crime.

Les connaissances scientifiques permettant d'effectuer cette expérience repose sur la compréhension de la méthode de PCR et comment celle-ci est utilisée pour générer des profils génétiques et ainsi identifier des individus.

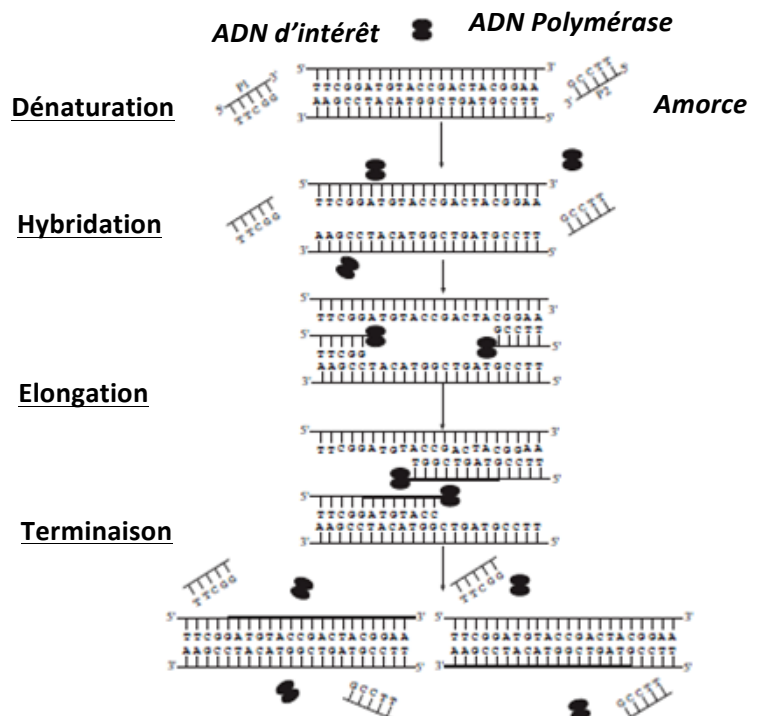
La réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

La réaction en chaîne par polymérase est utilisée pour obtenir une quantité importante de copies d'un fragment d'ADN défini, à partir d'une quantité infime de celui-ci.

La réaction de PCR consiste en une réplication d'ADN in vitro. Celle-ci est possible grâce à l'ajout d'une enzyme de réplication ; l'ADN polymérase, des quatre desoxyribonucléotides triphosphates nécessaire à la synthèse de molécule d'ADN (adénine, cytosine, guanine, thymine), et d'amorces de réplication consistant en de courtes séquences d'ADN simple brin spécifiques de l'ADN d'intérêt. En effet, les amorces sont synthétisées artificiellement de façon à avoir une séquence strictement complémentaire aux extrémités de l'ADN d'intérêt. Pour la réaction de PCR, on ajout un couple d'amorces constitué d'une amorce complémentaire à la région 3' de l'ADN d'intérêt et d'une amorce complémentaire à sa région 5'. La séquence desoxyribonucléotidique du segment d'ADN d'intérêt doit donc être connue.

Le processus de PCR fonctionne selon quatre étapes:

- Le mélange est d'abord chauffé à une température proche de 100°C afin de dénaturer les molécules d'ADN. En effet, les molécules d'ADN d'intérêt sont des doubles brins qui doivent être séparés préalablement à la réplication. De plus, **la dénaturation** assure aussi que l'ADN d'intérêt et les amorces soient dans une configuration linéaire pour faciliter l'étape d'hybridation qui suit.
- Le mélange est ensuite refroidi vers une température de 45 à 60°C selon les couples d'amorces pour permettre leur appariement avec l'ADN d'intérêt ; c'est **l'hybridation**.
- L'ADN polymérase va alors ajouter les desoxyribonucléotides à l'extrémité 3' de chaque amorce en utilisant le brin d'ADN d'intérêt comme matrice de réplication ; c'est **l'élongation**. Cette étape s'effectue à 72°C ; la température optimum de fonctionnement de l'enzyme de réplication ADN polymérase. De cette manière, un nouveau brin complémentaire est formé et on obtient ainsi deux molécules d'ADN double brin identique à l'ADN d'intérêt.
- **Le cycle formé par ces 3 premières étapes est répété entre 30 et 50 fois.** A chaque cycle, le nombre de molécule d'ADN est doublé.
- La dernière étape consiste en **la terminaison** des molécules d'ADN nouvellement synthétisées. Cette étape s'effectue aussi à 72°C et assure que les molécules d'ADN nouvellement synthétisées soient entières et correspondent strictement à la molécule d'ADN d'intérêt.



Utilisation de la PCR pour l'identification génétique

Le génome humain possède environ 3 milliards de paires de bases et la plupart sont identiques chez deux individus. Cela représente une quantité d'ADN trop importante pour être simplement analysé en coupant avec des enzymes de restriction et en faisant migrer sur un gel. Heureusement, les différences dans la séquence d'ADN entre deux personnes sont concentrées à certains endroits sur les chromosomes. Pour réaliser une identification génétique, les scientifiques étudient ces séquences divergentes grâce à différentes techniques dont la PCR.

L'ADN humain contient des séquences répétées (de 3 à 30 paires de bases) dispersées à différents endroits sur les chromosomes. Bien que la localisation de ces séquences répétées et la composition en nucléotides soient identiques chez tout le monde, le nombre de ces répétitions à un endroit donné varie d'une personne à une autre. Le nombre de ces séquences répétées permet donc de réaliser une identification génétique et cela peut être réalisé grâce à la PCR.

Pour cela, de courtes séquences d'ADN (couples d'amorces), spécifiques de ces séquences répétées que l'on souhaite amplifier, sont utilisées lors de la réaction de PCR. Ces amorces sont façonnées afin d'être spécifiques de ces séquences pour chaque chromosome. Lors de la PCR, ces couples d'amorces s'apparient de part et d'autre de la séquence ADN qui doit être amplifiée et spécifiquement à celle-ci. Le produit de cette PCR sera donc le fragment d'ADN d'intérêt situé entre ces deux courtes séquences d'ADN et répété en très grande quantité, produisant ainsi une épaisse bande d'ADN de taille fixe lors de la migration sur gel d'agarose. Le nombre de répétitions des séquences spécifiques, et donc la taille du fragment obtenu par PCR, étant unique pour chaque chromosome de chaque individu, il est donc possible de déterminer à qui appartient l'ADN étudié en comparant le profil de migration du produit de PCR de l'individu X avec celui de suspects connus.

L'ADN présent dans ce kit et utilisé pour la migration sur gel a été purifié de façon à simuler des produit de PCR à partir de l'ADN de deux suspects et de deux paires d'amorces spécifiques de ces individus.

PREPARATION

Ce protocole s'adapte à l'utilisation des cuves d'électrophorèse et alimentations Sordalab. Pour tout autre matériel, ajuster les quantités de gel d'agarose à préparer et le procédé de mise en œuvre de l'électrophorèse aux recommandations du constructeur.

Préparation du tampon TAE :

- Diluer les 100ml de TAE 10X dans 900ml d'eau distillée pour obtenir 1L de TAE 1X (pH=8,3).
- Annoter ce flacon TAE 1X.
- Conserver ce flacon à +4°C.

Préparation des 8 gels d'agarose 0,8% :

- Mélanger les 2g d'agarose avec 250ml de TAE 1X préparé précédemment.
- Faire chauffer pendant 2-3 minutes au micro-onde jusqu'à ce que la solution soit complètement homogène et transparente (ne pas couvrir la solution). S'il y a évaporation, ajuster le niveau.
- Utiliser des gants anti-chaueur ou des maniques de préhension pour saisir et manipuler le flacon chaud.
- Laisser refroidir jusqu'à une température d'environ 60°C.
- Fermer hermétiquement les 8 moules à gel aux extrémités avec les butoirs en caoutchouc ou avec du ruban adhésif et placer le peigne 8 puits.
- A l'aide de gants anti-chaueur ou de moufle de préhension, couler l'agarose dans les moules jusqu'à une hauteur correspondant environ à la moitié de la hauteur des dents du peigne. Le gel doit faire environ 5mm d'épaisseur.
- Laisser durcir à température ambiante sur une surface plane et horizontale (le gel doit devenir trouble). Ce gel se conserve une heure à sec ou 24 heures au réfrigérateur dans du TAE 1X

MANIPULATION

Mise en œuvre de l'électrophorèse :

- Enlever délicatement les butoirs et le peigne.
- Placer le moule à gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Prendre garde de positionner les puits du côté des bornes négatives de la cuve à électrophorèse.
- Verser le tampon TAE 1X dans la cuve jusqu'à recouvrir le gel (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).

Dépôt et migration des ADN :

L'ADN à bouchon rouge est l'ADN relevé sur la scène du crime et doit être comparé aux autres ADN indice n°1 à 4.

- Secouer d'**un seul mouvement sec de haut en bas** le tube d'ADN afin de faire retomber tout le liquide dans le fond du tube. Pour récupérer la totalité du liquide il faut centrifuger les tubes quelques secondes à 3000 rpm.
- Déposer 15 µl de chaque ADN à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. Faire doucement et éviter les bulles (attention à bien noter l'ordre des dépôts).
- Déposer une série de 5 échantillons d'ADN différents par gel. Il est possible de réaliser 8 dépôts sur gel.
- Fermer la cuve à électrophorèse et la brancher sur l'alimentation (anode rouge avec anode rouge et cathode noire avec cathode noire).
- Mettre en marche l'alimentation (Attention au voltage choisi : pour l'ADN, choisir 75V). L'ADN, chargé négativement, migre en direction des anodes ; électrodes positives.

ATTENTION : Si les puits n'ont pas été disposés du côté des cathodes ; électrodes négatives, l'ADN va migrer hors du gel.

- Lorsque la bande bleue a migré jusqu'à 1cm de l'extrémité opposée du gel, arrêter l'alimentation et sortir le support contenant le gel.

Coloration et rinçage :

- Verser l'Azur A dans un récipient juste assez large pour y disposer le gel à plat (type cristalliseur de 500ml).
- Sortir le gel de son moule.
- Immerger le gel dans de l'Azur A pendant 5 minutes (le colorant peut être réutilisé).
- Laisser reposer le gel à l'air pendant 5 minutes.
- Placer le gel dans un nouveau récipient.
- Rincer le gel à l'eau du robinet.

Si le gel est très foncé

- Rincer le gel avec de l'alcool à 70% pendant quelques minutes.
- Eliminer l'alcool en rinçant le gel à l'eau du robinet plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit translucide.
- Continuer le rinçage du gel à l'eau du robinet si nécessaire.

Le gel peut se conserver au réfrigérateur pendant deux mois emballé dans un film alimentaire ou dans un récipient en plastique hermétiquement fermé et contenant un fond d'eau (**attention** le gel doit rester juste humidifié, un excès d'eau entraînerait une poursuite de la décoloration).

RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

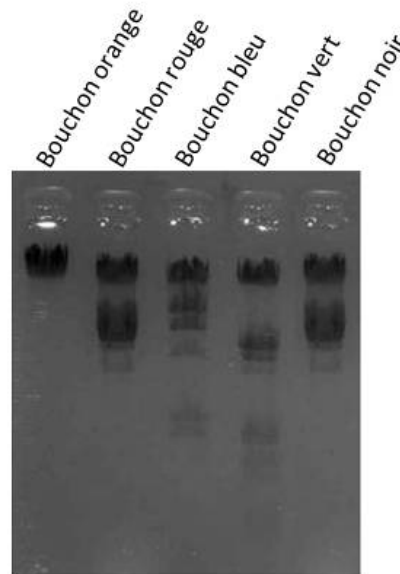
Pour déterminer qui est le tueur, il faut comparer

- Le nombre de bandes obtenu suites à la PCR entre l'ADN indice et les ADN suspects.
- La hauteur de migration des bandes obtenue suites à la PCR entre l'ADN indice et les ADN suspects.

Le nombre de bandes correspond au nombre de fois où la série de répétitions amplifiées existe dans le génome de l'individu. Par exemple si on obtient une seule bande, l'individu présente la série de répétitions sur un seul chromosome. Si on obtient deux bandes, la série de répétitions existe sur deux chromosomes différents ou bien sur un même chromosome mais à deux endroits distincts sur ce chromosome.

La hauteur de migration correspond à la taille des fragments d'ADN amplifié, et donc au nombre de répétitions par série existante dans le génome de l'individu. Les bandes hautes correspondent à des ADN de grande taille et donc à un grand nombre de répétitions par série (une bande = une série). Les bandes plus basses correspondent à des ADN de plus petite taille et donc à un plus petit nombre de répétitions par série.

La migration des ADN suspects et indice contenu dans ce kit doit correspondre au résultat ci-dessous :



D'après ce profil de migration des différents échantillons d'ADN, il apparaît que l'ADN indice étudié correspond à l'ADN du tube à bouchon noir. En effet, le nombre de bandes ainsi que leur hauteur de migration correspondent.

FICHE SECURITE (guide non exhaustif)

- Ne pas inhaler ni ingérer les produits contenus dans ce kit. Eviter les projections dans les yeux. En cas de projection dans les yeux, rincer à grande eau.
Cependant, aucun des produits contenus dans ce kit ne requièrent de précaution particulière.
- Le gel d'agarose chaud peut provoquer des brûlures. Manipuler avec des gants anti-chaleur.
En cas de brûlures, passer la zone atteinte sous l'eau froide pendant 15 minutes.
- Nous vous conseillons de manipuler les colorants avec des gants.

FICHE CONSERVATION

Attention : ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit pendant 3 mois.

Les échantillons d'ADN sont stockés à -20°C pendant 3 mois.

Le tampon TAE x10 se conserve pendant 3 à 6 mois à +4°C. Ce tampon est périmé lorsqu' un précipité blanc apparait au fond du flacon.

Le colorant Azur A se conserve pendant 6 mois à +4°C et à l'abri de la lumière. Ce colorant peut être utilisé pour plusieurs colorations.

L'agarose en poudre se conserve indéfiniment à température ambiante dans un endroit sec. L'agarose en gel se conserve environ un mois à +4°C dans un récipient hermétiquement fermé, type bouteille. Veillez à ajouter un peu d'eau par-dessus le gel de façon à ce qu'il reste toujours humide.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les ADN, l'Azur A et le TAE peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau.

Les tubes de plastiques, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon).

L'agarose peut être jeté à la poubelle.