

Kit étude de l'ADN du suspect

Réf. ADNSUSPSG

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 AM contenant :
 - o Un tube à bouchon rouge contenant 125 µl d'ADN (relevé sur la scène du crime)
 - o Un tube à bouchon vert contenant 125 µl d'ADN (indice n°1)
 - o Un tube à bouchon bleu contenant 125 µl d'ADN (indice n°2)
 - o Un tube à bouchon noir contenant 125 µl d'ADN (indice n°3)
 - o Un tube à bouchon orange contenant 125 µl d'ADN (indice n°4)
- 1 sachet d'agarose (4g)
- Flacon contenant la quantité de poudre de TBE suffisante pour obtenir 1L de TBE 1X.

NB : Le TBE 1X (concentration utilisée par les élèves) ne présente aucune toxicité de part sa dilution. Le TBE étant plus adapté pour le fonctionnement de la cuve BLUEGEL, nous avons décidé de livrer ce kit avec ce tampon.

MATERIEL NECESSAIRE

- Ethanol absolu
- Eau distillée
- Cuve à électrophorèse BlueGel ou cuve standard avec générateur 70V et transilluminateur
- Flacon (singulier) de 1L
- Flacon de 500 mL supportant le micro-ondes
- 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.

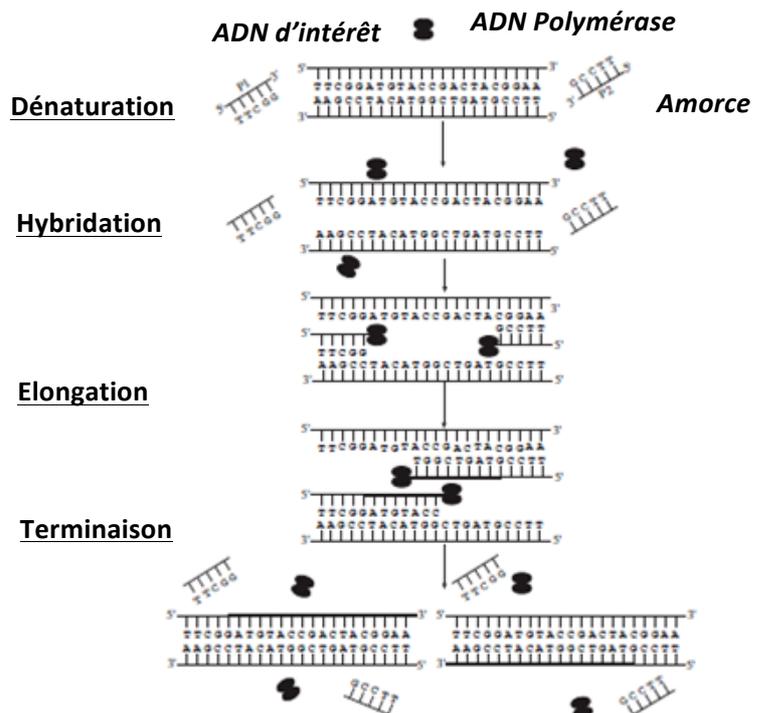
La réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

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

Informations pour organiser au mieux le TP :

Type de cuve	Nb de gels	Nb de puits	Q à déposer / puits (µl)	% agarose des gels
BlueGel	4	9*	15	2 %
		13*	8	
Standard	4	6	20	0,8 %
		8	15	

* Possibilité de faire 2 lignes de dépôts, soit 18 ou 26 puits par gel.

Préparation du tampon TBE 1X :

- Ajouter 100 ml d'eau directement dans le flacon sans transférer la poudre. Puis transférer l'ensemble dans un flacon de 1L et compléter en ajoutant 900 ml d'eau. Le TBE 1X (concentration utilisée par les élèves) ne présente aucune toxicité (pas de pictogrammes) de part sa dilution.
- Opération réalisable à l'avance : conservation 3 à 6 mois à + 4°C dans un flacon bouché)

Préparation pour 4 gels d'agarose 2 %

(Opération réalisable à l'avance : gel pouvant être conservé quelques semaines à + 4°C dans un flacon bouché) :

- Transvaser le contenu du sachet noté agarose contenant 4 g d'agarose dans un flacon de 500 mL passant au micro-ondes
- Ajouter 220 mL de tampon TBE 1X préparé au point 1 "NB" : la quantité de tampon utilisée tient compte de l'évaporation due au passage au micro-onde.

Gels à 0,8 % (pour la préparation de 4 gels) :

- Peser 1.6 g provenant du sachet noté agarose contenant 4 g d'agarose.
- Les transvaser dans un flacon de 500 mL passant au micro-onde
- Ajouter 220 mL de tampon TBE1x préparé préalablement
- "NB" : la quantité de tampon utilisée tient compte de l'évaporation due au passage au micro-onde.
- Placer le flacon au micro-onde puissance 1000w pendant 1 à 2 minutes
- Utiliser des gants anti-chaueur ou des maniques de préhension pour saisir et manipuler le flacon chaud
- Surveiller toutes les 30 s l'état de la préparation jusqu'à ce qu'elle soit transparente et sans grumeaux
- "NB" : A défaut de micro-ondes, vous pouvez utiliser un bain-marie et surveillant régulièrement le mélange. Mais la fonte est beaucoup plus lente.
- Faire refroidir le mélange fondu jusqu'à une température d'environ 55°C

ATTENTION : la réussite du TP réside à 50% dans la qualité du gel

Vous pouvez couler les gels tout de suite ou bien conserver le flacon de gel bouché à + 4°C pendant 4 semaines maximum.

NB : Coulez les gels jusqu'à mi-hauteur des peignes

MANIPULATION

Mise en œuvre de l'électrophorèse avec la cuve BLUEGEL :

- Enlever délicatement le/les peigne/s.
- Placer le support de gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Un détrompeur sur le support du gel vous empêche de mal positionner le gel.
- Verser 25 ml de tampon TBE 1X dans la cuve jusqu'à recouvrir le gel et remplir les puits (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- Pulvériser du spray anti-condensation sur la partie intérieure du couvercle (orange) puis l'essuyer avec un tissu non pelucheux.

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** les tubes 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.
- Le colorant SAFEGREEN est déjà mélangé à l'ADN, il sert de tampon de charge (alourdit l'ADN) et de colorant.
- Déposer l'ADN (la quantité dépend du peigne utilisé*) 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 9 à 26 dépôts sur le gel en fonction du/des peigne/s que vous avez choisi/s.

Pour le peigne à 9 puits, déposer 15 à 20 μL par puits.

Pour celui à 13 puits, déposez 7 ou 8 μL / puits.

Utilisez 2 peignes par gel pour les migrations rapides (petits morceaux)

- Fermer la cuve à électrophorèse et brancher l'alimentation.
- Mettre en marche l'alimentation en appuyant sur le bouton marche. **Le voyant lumineux doit s'allumer.** Si ce n'est pas le cas, vérifiez que l'appareil est branché au secteur (230V) et que le couvercle est bien fermé.

Dès le début de la migration vous pouvez allumer le transilluminateur et suivre votre migration en temps réel. Pour augmenter le contraste, dépliez et placez la chambre noire sur la cuve en prenant bien garde à ne pas soulever le couvercle orange.

En effet, le soulèvement du couvercle éteint immédiatement la cuve par mesure de sécurité. Il faut donc surveiller que la lumière d'indication de fonctionnement est bien allumée après avoir touché à la cuve. Un arrêt de la cuve pendant trop longtemps fait 'disparaître' l'ADN qui va se diffuser partout.

Mise en œuvre de l'électrophorèse avec une cuve standard

ATTENTION: vérifier que la cuve n'est pas sous tension avant de manipuler.

- Si les gels ne sont pas déjà dans les cuves, retirer délicatement le peigne des gels : tirer bien dans l'axe pour que les puits calibrés soient bien formés.
- Les puits sont visibles dans le gel.
- Placer le gel dans les cuves, bien immergé dans le tampon. Rajouter éventuellement du TBEx1.
- Vérifier que les puits du gel sont du côté de la cathode (pôle négatif de couleur noire). Retourner éventuellement le gel.

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** les tubes 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.
- Le colorant SAFEGREEN est déjà mélangé à l'ADN, il sert de tampon de charge (alourdit l'ADN) et de colorant.
- Déposer l'ADN (la quantité dépend du peigne utilisé*) 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 6 dépôts de 20 μL par gel avec le peigne bleu 6 puits ou 8 dépôts de 15 μL par gel avec le peigne blanc 8 puits.

- Brancher les générateurs
- Appliquer une tension de 70 à 120 V selon si on veut obtenir une migration précise (70 V) ou rapide et bien moins précise (120V)
- Placer et allumer le transilluminateur sous la cuve

☞☞ **ATTENTION** ☞☞: lancer la migration juste après les dépôts : ne pas attendre que les dépôts diffusent dans les gels.

☐NB☐ : le temps de migration dépend de plusieurs paramètres : plus le gel est épais, plus le temps de migration est important et plus il y a de tampon de migration au dessus du gel, plus la durée de la migration augmente)

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)

Exemple de résultats du kit ADNSUSP (avec la cuve BlueGel)

Indice : 4 3 2 1 scène de crime 4 3 2 1 scène de crime

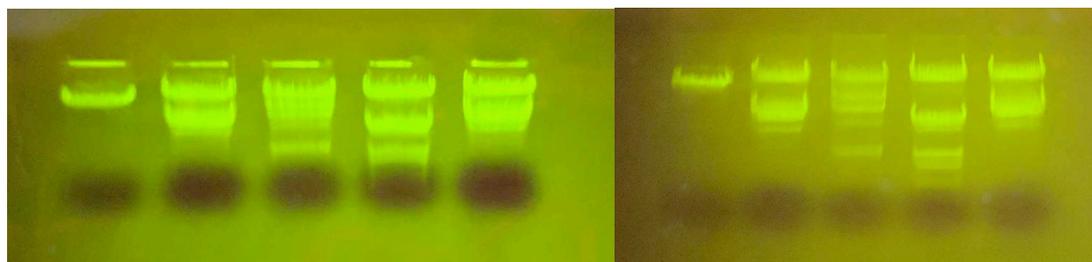


Photo 1

Photo 2

Photo 1 : Durée de migration 15 min : on peut identifier le suspect, la manipe peut être arrêtée pour ce kit.

Photo 2 : Durée de migration 30 min : on peut identifier le suspect, et on voit plus de bandes.

Les durées de migration sont réduites en moyenne de 15 minutes par rapport à l'utilisation avec des cuves standards.

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.

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-chaueur.
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.

Utilisation du SAFEGREEN

Le colorant Safe-Green™ est déjà mélangé aux tubes.

Après l'électrophorèse, voir les résultats avec une lumière bleue et un cache orange.

Extrait de la FDS (à retrouver sur notre site web : www.sordalab.com)

SECTION 2: Identification des dangers

2.1 Classification de la substance ou du mélange

Classification en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008

N'est pas une substance ni un mélange dangereux conformément au règlement (CE) No. 1272/2008.

2.2 Éléments d'étiquetage

Étiquetage en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008

Le produit ne nécessite pas d'étiquetage conformément aux directives de la CE et aux réglementations nationales du pays concerné.

2.3 Autres dangers

Une substance/préparation ne contient aucun ingrédient considéré comme persistant, bioaccumulable et toxique (PBT), ou très persistant et très bioaccumulable (vPvB) à des niveaux de 0,1% ou plus.

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 TBE 1X se conserve pendant 3 à 6 mois à +4°C. Ce tampon est périmé lorsqu'un précipité blanc apparaît au fond du flacon.

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, le SafeGreen et le TBE 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.

Retrouver la vidéo du produit sur notre site web : www.sordalab.com