

DEPISTER UNE MUTATION A L'AIDE DES ENZYMES DE RESTRICTION*Version pour cuve à électrophorèse LONZA « Flashdock »*

Fiche sujet – candidat

La dystrophine est une protéine présente sous la membrane cellulaire de toutes les fibres musculaires. Elle est indispensable au maintien de l'architecture de ces fibres. Des mutations peuvent apparaître dans certaines parties du gène codant la dystrophine et engendrer des pathologies plus ou moins graves (dont les myopathies de Duchenne et de Becker).

Une enzyme de restriction catalyse la coupure de l'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction. Chaque enzyme de restriction reconnaît ainsi un site spécifique.

On cherche déterminer si un allèle du gène codant la dystrophine, digéré par l'enzyme de restriction Xho1, a subi ou non une mutation.

Matériel :

- ordinateur et logiciel ANAGENE, fichier ADN1et2.edi, contenant les séquences de deux allèles du gène étudié (ADN1 : allèle muté et ADN 2 allèle de référence) à charger à partir du répertoire sauve d'ANAGENE
- une micropipette et deux embouts (ou équivalent), chronomètre
- cuve à électrophorèse LONZA « Flashdock » et alimentation en courant continu, cassette « Flashgel » remplie de gel prête à l'emploi
- une « solution » d'ADN hydrolysé par Xho1 et une solution contenant un marqueur de taille

Activités et conditions des activités	Capacités et principaux critères d'évaluation	Barème
1. Justifier de l'utilité d'une électrophorèse de l'ADN hydrolysé en même temps que d'un marqueur de taille (<u>répondre pendant la migration de l'électrophorèse</u>).	Comprendre la manipulation	3
2. Mettre en œuvre le protocole fourni en suivant les indications de la fiche technique. Appeler l'examineur pour vérification	Réaliser une manipulation en suivant un protocole	5
3. Ouvrir le fichier ADN 1et2.edi, dans le logiciel ANAGENE puis traiter les deux séquences d'ADN du gène étudié par l'action de l'enzyme de restriction Xho 1 (site de coupure à 6 bases) pour obtenir la carte de restriction de ces deux ADN. Appeler ensuite l'examineur pour vérification et obtenir éventuellement les résultats d'une l'électrophorèse de secours	Utiliser un logiciel de traitement de données	3
4. Réaliser un tableau de comparaison des fragments d'ADN de l'électrophorèse (nombre et taille) à ceux obtenus après traitement des allèles du gène étudié par Xho1 avec ANAGENE	Présenter des données sous forme d'un tableau	5
5. Déduire de l'ensemble de ces résultats* si l'allèle du gène étudié a subi une mutation.	Adopter une démarche explicative	2
6. Gérer le poste de travail, le ranger en fin d'épreuve.	Gérer et organiser le poste de travail et respecter les consignes de sécurité	1

***Rappel : On notera que les fragments inférieurs à 200 pb (0,2 kb) sont peu visibles ou invisibles sur le gel d'électrophorèse**

DEPISTER UNE MUTATION A L'AIDE DES ENZYMES DE RESTRICTION*Version pour cuve à électrophorèse LONZA « Flashdock »*

Fiche protocole – candidat

Principe de l'électrophorèse : en milieu basique, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Soumises à un champ électrique, elles migrent, dans un gel conducteur, de la cathode (borne négative) vers l'anode (borne positive). La distance de migration par rapport à la ligne de dépôt est caractéristique de la taille et de la charge de la molécule.

Le marqueur de taille est une solution de morceaux d'ADN de tailles connues :

Tailles des fragments de l'échelle de poids moléculaire en nombre de paires de bases (pb) :

8000, 6500, 3600, 2500, 2100, 2000, 1600, 1400, 1200, 980, 970, 600, 500, 430, 390, 345, 300 pb

On notera que les fragments inférieurs à 200 pb (0,2 kb) sont peu visibles ou invisibles sur le gel d'électrophorèse

Protocole de réalisation d'une électrophorèse cuve à électrophorèse LONZA « Flashdock »

NB : Organiser votre plan de travail pour manipuler proprement et en respectant les règles de sécurité.

PREPARATION DE LA CUVE

1. **Préparer** la cassette avec les gants : enlever l'autocollant de protection blanc recouvrant la cassette ;
2. **Inonder** les puits avec de l'eau distillée, **incliner** la cassette pour éliminer l'excès d'eau et **essuyer** avec un papier absorbant, sans toucher les puits ;
3. **Placer** la cassette sur l'appareil ; les fils doivent rester débranchés lors de la manipulation suivante ;

DEPOT D'ADN

ATTENTION Il faut réaliser les dépôts en stabilisant le mouvement par calage des coudes sur la paillasse et veiller à ne pas percer le fond du puits ; changer les embouts entre chaque dépôt ;

4. **Déposer** avec une micropipette une solution d'ADN dans un puits sans débordement : la cuve utilisée nécessite un volume d'ADN de 4 µL ;
5. **Déposer**, de la même manière, dans un deuxième puits à côté du précédent la solution d'ADN correspondant au marqueur de taille ;
6. Si le dépôt ne paraît pas satisfaisant (débordement par exemple), un second essai peut être réalisé dans les puits situés à côté, dans ce cas, bien **repérer** les puits conservés pour l'électrophorèse ;

MISE EN ROUTE DE L'ELECTROPHORESE ET MIGRATION (la migration doit avoir lieu juste après les dépôts)

7. **Brancher** la cuve au générateur et **faire migrer à V**.
8. **Mettre en route l'éclairage** et observer la migration. La source de lumière possède sa propre alimentation (fiche à l'arrière de l'appareil - ne jamais éclairer en absence de cassette sur l'appareil). Durée maximale de la migration = 8min .