

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 l'allèle du gène étudié, digéré par l'enzyme de restriction Xho1, a subi ou non une mutation.**

**Matériel :**

- ordinateur et logiciel GENIEGEN, 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 de GENIEGEN, fiche technique GENIEGEN
- une micropipette et deux embouts (ou équivalent), papier noir, chronomètre, gants
- cuve à électrophorèse, support rempli de gel avec puits
- tampon d'électrophorèse TBE
- 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. <b>Justifier</b> de l'utilité d'une électrophorèse de l'ADN hydrolysé de l'utilisation conjointe d'un marqueur de taille ( <u>répondre pendant la migration de l'électrophorèse aux questions 1 et 3</u> ).	<b>Comprendre la manipulation</b>	3
2. <b>Mettre</b> en œuvre le protocole fourni en suivant les indications de la fiche technique. <b>Appeler l'examineur pour vérification</b>	<b>Réaliser une manipulation en suivant un protocole</b>	5
3. <b>Ouvrir</b> le fichier ADN 1et2.edi, dans le logiciel ANAGENE puis <b>traiter les deux séquences</b> 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. <b>Appeler ensuite l'examineur pour vérification et obtenir les résultats d'une l'électrophorèse de secours</b>	<b>Utiliser un logiciel de traitement de données</b>	3
4. <b>Réaliser</b> 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	<b>Présenter des données sous forme d'un tableau</b>	5
5. <b>Déduire de l'ensemble de ces résultats</b> si l'allèle du gène étudié a subi une mutation.	<b>Adopter une démarche explicative</b>	2
6. <b>Gérer</b> le poste de travail, le <b>ranger</b> en fin d'épreuve.	<b>Gérer et organiser le poste de travail et respecter les consignes de sécurité</b>	1

**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 400 pb sont invisibles sur le gel d'électrophorèse**

**Remarque :** la migration nécessitant plus de temps que la durée réservée à l'épreuve, des résultats sont fournis

### PROCOLE DE REALISATION D'UNE ELECTROPHORESE

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

#### **PREPARATION DE LA CUVE**

1. **Poser** la cuve sur le papier noir (les puits dans le gel seront plus visibles) ;
2. **Placer** le gel dans la cuve sans le casser, bien parallèlement aux côtés de la cuve, les puits devant être du côté de la cathode (borne négative) ;
3. **Verser** le tampon TBE dans les deux compartiments de la cuve, le gel doit être tout juste recouvert (environ 1mm au dessus du gel) ; **En fin de remplissage, pour bien surveiller la montée du niveau du tampon, regarder le gel par le côté.**

#### **DEPOT D'ADN**

ATTENTION Il faut réaliser les dépôts en stabilisant le mouvement par calage des coudes sur la pailleuse 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
5. **Déposer**, de la même manière, dans un deuxième puits à côté du précédent, 5  $\mu$ L de 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 DE LA MIGRATION (la migration doit avoir lieu juste après les dépôts)**

7. **Brancher** la cuve au générateur et **faire migrer** à ..... volts ; pendant environ ..... min, le pôle négatif (= cathode) doit être du côté du dépôt ;
8. **Vérifier** le bon déroulement de l'électrophorèse : de la buée doit apparaître sur le couvercle dans les cinq premières minutes si le générateur et la cuve sont bien alimentés. **Appeler** l'examineur si ce n'est pas le cas.