

Un laboratoire d'analyse médicale doit réaliser un test permettant de dépister une maladie génétique. Le gène impliqué existe sous deux formes, un allèle fonctionnel (N) et un allèle muté (P) non fonctionnel présentant une délétion.

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 à déterminer si l'enzyme de restriction RsaI peut être utilisée pour effectuer le dépistage de cette maladie génétique.

Matériel

- cuve à électrophorèse LONZA « Flashdock » et alimentation en courant continu, cassette « Flashgel » remplie de gel prête à l'emploi
- solutions d'ADN correspondant à l'allèle N : N1 coupé par RsaI
- solutions d'ADN correspondant à l'allèle P : P1 coupé par RsaI
- solution d'ADN M : marqueurs de taille ; fragments d'ADN de poids moléculaires connus indiqués sur la fiche- protocole candidat
- ordinateur et logiciel ANAGENE ou GENIEGEN, fichier allèle_np.edi , à ouvrir ou charger à partir du répertoire sauve, fiche technique correspondante
- une micropipette et trois embouts (ou équivalent), papier noir, chronomètre, gants

Activités et déroulement des activités	Capacités évaluées	Barème
1. Justifier l'utilisation des deux solutions d'ADN N et P fournies et celle d'un marqueur de taille.	Comprendre la manipulation	2
2. Mettre en œuvre le protocole de réalisation de l'électrophorèse en suivant les indications de la fiche protocole-candidat. Appeler l'examineur pour vérification Pendant la migration, répondre aux questions suivantes.	Réaliser une manipulation selon un protocole	5
3. Ouvrir le fichier allèle_np.edi, dans le logiciel ANAGENE puis traiter les séquences d'ADN par l'action de l'enzyme de restriction Rsa I (site à 4 bases) pour obtenir la carte de restriction de ces deux ADN. Appeler l'examineur pour vérification	Utiliser un logiciel de traitement des données	4
4. Reporter dans un tableau, sur la fiche réponse-candidat, le nombre et la taille des fragments obtenus pour chaque allèle. Appeler l'examineur pour obtenir un résultat de l'électrophorèse	Représenter des données par un tableau	2
5. Réaliser un schéma d'interprétation des résultats de l'électrophorèse.	Traduire des informations par un schéma	3
6. Déduire de l'ensemble des résultats (électrophorèse et traitement avec ANAGENE) si l'enzyme RsaI permet d'effectuer un dépistage diagnostique de cette maladie génétique.	Appliquer une démarche explicative	3
7. Gérer le poste de travail ; le ranger en fin d'épreuve.	Gérer et organiser le poste de travail respecter les règles de sécurité	1

PROTOCOLE DE REALISATION D'UNE ELECTROPHORESE avec une cuve à électrophorèse LONZA « Flashdock

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.

NB : Organiser votre plan de travail pour manipuler proprement et en respectant les règles de sécurité et utiliser des gants pendant toute la durée de la manipulation.

PREPARATION DE LA CUVE

1. **Préparer** la cassette : 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 les puits adjacents les deux autres solutions d'ADN.
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 volts.
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) : les divers fragments de chaque tube se séparent rapidement (ne jamais éclairer en absence de cassette sur l'appareil). Durée maximale de la migration = 8min.

Appeler l'examineur pour vérification.

9. Pendant la migration, **répondre** aux questions.

INFORMATION COMPLEMENTAIRE

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) de la solution d'ADN M :

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 sont peu visibles sur le gel d'électrophorèse.