

Identification des allèles au sein d'une famille atteinte de drépanocytose

Matériel par binôme

Dispositif MiniOne avec alimentation intégrée.

- 1 cuve à électrophorèse[®]
- 1 support avec 2 plateaux pour coulage de 2 gels + 2 peignes de 6 ou 9 dents (on utilisera ici le côté 6 dents)
- 1 coupelle de gel d'agarose 1% TAE (gel green)
- 1 solution tampon TAE 120 ml (dilution à 1%)
- 1 écran de protection UV avec ouverture pour visualiser, filmer ou photographier
- 1 micropipette (2-20 μ l) + 1 boîte de cônes
- 1 poubelle pour déchets biologiques
- 1 chronomètre

- Kit ADN réparti en microtubes (type Eppendorf) :

- Marqueur de taille M 5 μ l
- Échantillon II.1 - 15 μ l
- Échantillon II.2 - 15 μ l
- Échantillon II.3 - 15 μ l
- Échantillon II.4 - 15 μ l

Matériel en commun

1 micro-ondes

Sécurité :

Bien respecter les règles de sécurité du branchement des appareils d'électrophorèse



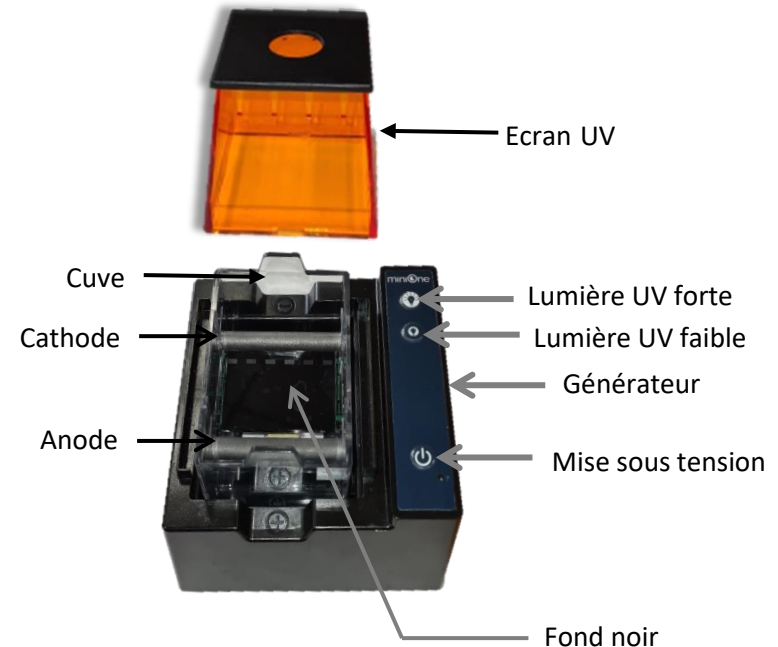
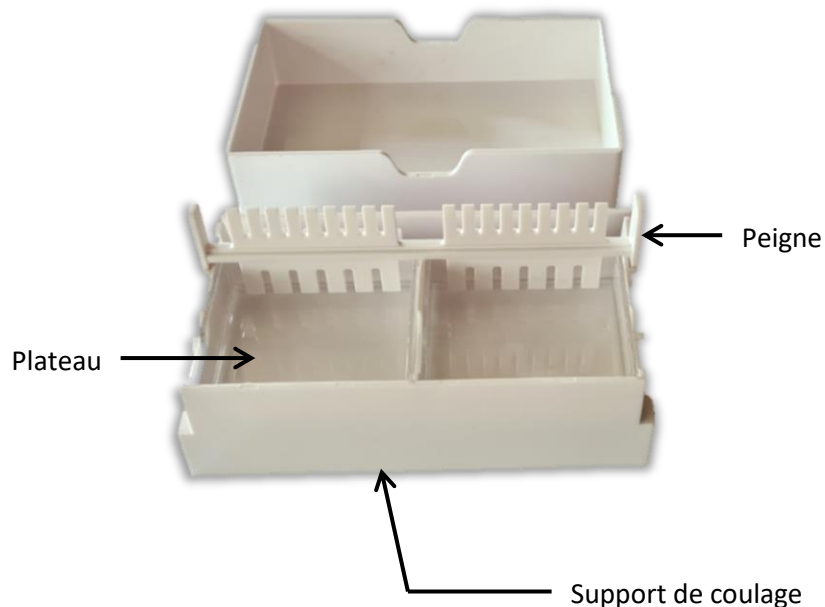
Précautions de la manipulation :

- **L'appareil ne doit pas être déplacé lors des dépôts et de la migration.**
- **Ne pas débrancher l'appareil pendant toute la durée de la migration.**



Kit de coulage

Système de l'électrophorèse MiniOne[®]



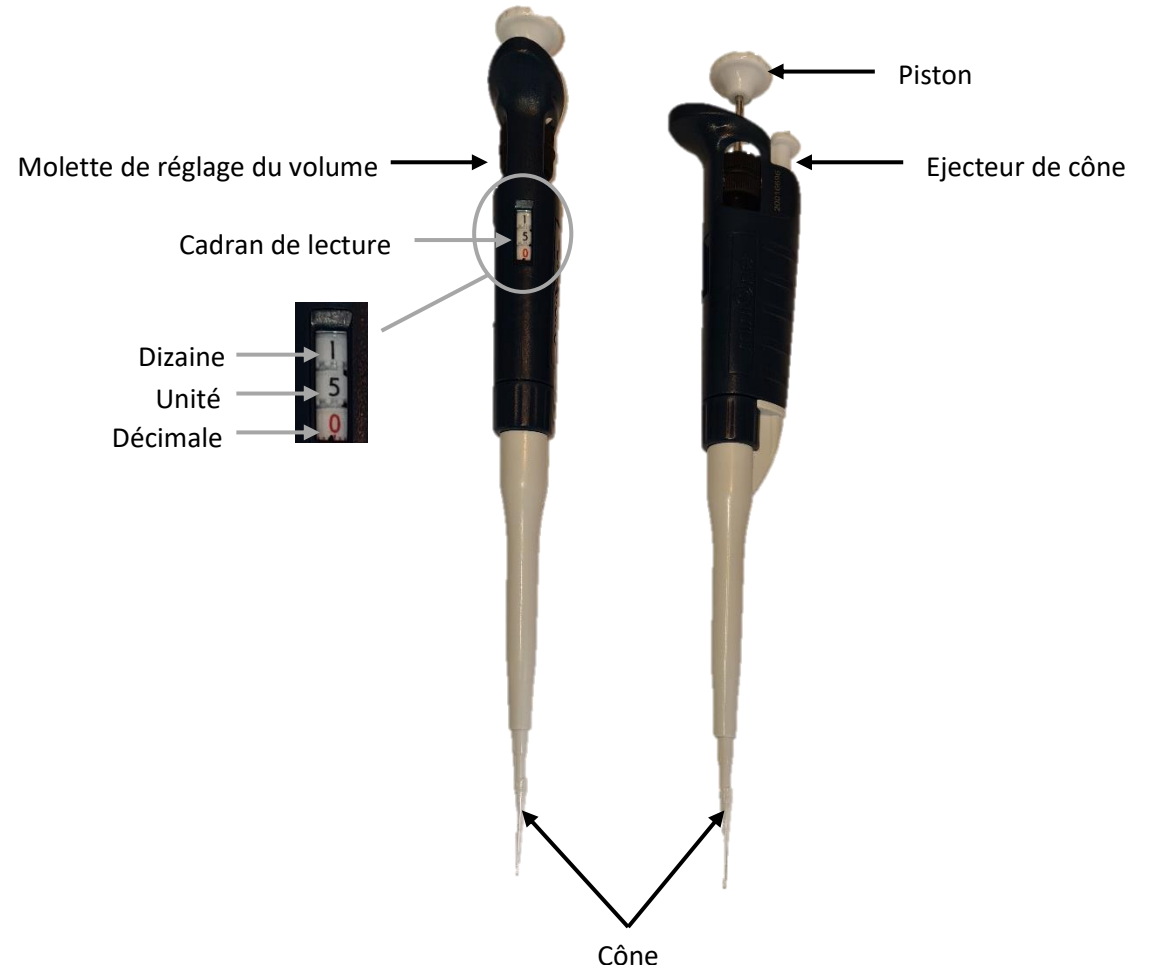
Gel green 1% TAE



Tampon TAE



Micropipette MiniOne®



Principe de l'électrophorèse d'ADN

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.

Préparation de la gélose

- Ouvrir partiellement l'opercule de la coupelle de gel, avant de la faire chauffer au micro-ondes 15 secondes puissance 600 watts.
- Vérifier que la gélose est totalement fondue, sinon la remettre 2-3 secondes supplémentaires.
- Laisser refroidir quelques secondes.

Coulage de la gélose

- Verser le gel délicatement dans un seul plateau.
- Installer le peigne 6 puits (côté grosses dents) dans les encoches du plateau de support de coulage.
- Laisser refroidir totalement la gélose environ 10 minutes.
- Retirer le peigne verticalement pour ne pas briser la gélose.

Préparation de la cuve

- Installer le plateau avec la gélose dans la cuve d'électrophorèse sur le fond noir.
- Verser le tampon TAE de chaque côté de la cuve afin de recouvrir la gélose. (1 mm au-dessus de la gélose).



Attention :

Ne pas verser le tampon directement sur la gélose. Il ne doit pas y avoir de bulles sous la gélose, elle ne doit pas flotter.

Dépôt d'ADN

- Régler la micro pipette sur 5 μ l et prendre un cône propre.
- Prélever le marqueur dans le microtube M et déposer la totalité dans un des puits puis jeter le cône dans la poubelle déchets biologique.
- Régler la micropipette sur 15 μ l pour les autres échantillons.
- Reprendre un nouveau cône pour chaque prélèvement et déposer les différents échantillons dans les puits suivants.
- Faire un schéma pour repérer les dépôts.

Conseil : Il est possible d'utiliser la lumière faible de l'électrophorèse pour effectuer les dépôts.

Migration

- Installer l'écran de protection sur la cuve.
- Mettre en route le générateur 15 minutes.
- Visualiser la migration à l'aide de la lumière intégrée (lumière faible).
- Arrêter le générateur.