

**DIAGNOSTIC PRENATAL D'UNE MALADIE GENETIQUE**

Fiche sujet candidat

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.**

<b>Matériel commun</b> - ordinateur et logiciel ANAGENE, fichier allèle_np.edi , à charger à partir du répertoire sauve d'ANAGENE, fiche technique ANAGENE - une micropipette et trois embouts (ou équivalent) - papier noir, chronomètre, gants		
<b>Electrophorèse avec cuve classique :</b> - cuve à électrophorèse, support rempli de gel avec puits - tampon d'électrophorèse TBE - 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	<b>Electrophorèse avec kit APBG :</b> - 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	
<b>Activités et déroulement des activités</b>	<b>Capacités évaluées</b>	<b>Barème</b>
1. Justifier l'utilisation des deux solutions d'ADN N et P fournies et celle d'un marqueur de taille	<b>Comprendre la manipulation</b>	<b>2</b>
2. .		
3. <b>Mettre en œuvre</b> le protocole de réalisation de l'électrophorèse en suivant les indications de la fiche protocole-candidat. <b>Appeler l'examineur pour vérification</b> Pendant la migration, <b>répondre</b> aux questions.	<b>Réaliser une manipulation selon un protocole</b>	<b>5</b>
4. <b>Ouvrir</b> le fichier allèle_np.edi, dans le logiciel ANAGENE puis <b>traiter les séquences</b> d'ADN par l'action de l'enzyme de restriction RsaI (site à 4 bases) pour obtenir la carte de restriction de ces deux ADN.	<b>Utiliser un logiciel de traitement des données</b>	<b>4</b>
5. <b>Reporter</b> dans un tableau, sur la fiche réponse-candidat, le nombre et la taille des fragments obtenus pour chaque allèle. <b>Appeler l'examineur pour vérification et obtenir un résultat de l'électrophorèse</b>	<b>Représenter des données par un tableau</b>	<b>2</b>
6. <b>Réaliser</b> un schéma d'interprétation des résultats de l'électrophorèse.	<b>Traduire des informations par un schéma</b>	<b>3</b>
7. <b>Déduire de l'ensemble des résultats</b> (électrophorèse et traitement avec ANAGENE) si l'enzyme RsaI permet d'effectuer un dépistage diagnostique de cette maladie génétique.	<b>Appliquer une démarche explicative</b>	<b>3</b>
8. <b>Gérer</b> le poste de travail ; le <b>ranger</b> en fin d'épreuve.	<b>Gérer et organiser le poste de travail respecter les règles de sécurité</b>	<b>1</b>

**DIAGNOSTIC PRENATAL D'UNE MALADIE GENETIQUE**

Fiche protocole –candidat

**PROTOCOLE DE REALISATION D'UNE ELECTROPHORESE**

**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.

**Remarque** : la migration nécessitant plus de temps que la durée réservée à l'épreuve, des résultats sont fournis (gel ou fiche résultats -candidat

**NB : Organiser** votre plan de travail pour manipuler proprement.

**PREPARATION DE LA CUVE**

1. **Poser** la cuve sur le papier noir (les puits dans le gel seront plus visibles)
2. **Glisser** 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)

**DEPOT D'ADN**

ATTENTION Il faut réaliser les dépôts sans débordement en stabilisant le mouvement par calage des coudes sur la paillasse. Veiller à ne pas percer le fond du puits et à 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 .....  $\mu\text{L}$ .
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. 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. Si ce n'est pas le cas, **appeler** l'examineur.
9. Au bout de 30mn, **arrêter** la migration.

**LES TEMPS DE MIGRATION ET COLORATION EXCEDANT 30 MINUTES UN RESULTAT SERA FOURNI PAR L'EXAMINATEUR**

Pendant la migration, **répondre** aux autres 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) :

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.

**DIAGNOSTIC PRENATAL D'UNE MALADIE GENETIQUE**

cuve à électrophorèse LONZA « Flashdock

Fiche protocole – candidat

**PROTOCOLE DE REALISATION D'UNE ELECTROPHORESE**

**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.

**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  $\mu$ L.
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) :

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.