



# Génétique

## Electrophorèse d'ADN

Réf : 117 225

**Kit Drépanocytose pour électrophorèse d'ADN**

Français – p 1

Version : 3212



## 1 Introduction

La drépanocytose est la maladie génétique et héréditaire la plus répandue dans le monde. Elle affecte le gène  $\beta$  de la globine (Hb). Les individus atteints par la maladie possèdent des cellules sanguines déformées.

Cette activité pratique se présente sous la forme d'un diagnostic familial. Elle permet de travailler concrètement sur les notions d'allèles, de dominance allélique, et de mutations génétiques.

Plus d'info sur le site de l'institut INSERM :  
<https://www.inserm.fr/dossier/drepanocytose/>

### ❖ Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de tailles différentes migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de maillage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

Le kit se présente sous la forme de solutions d'ADN prêt à déposer dans le gel. **Les solutions d'ADN sont calibrées et ne nécessitent aucune préparation.** Ces solutions contiennent le tampon de charge et les colorants témoins de migration.

**Format 40 élèves (20 binômes) :**

**20 tests complets soit 80 dépôts à analyser**

1 test correspond à :

- 1 dépôt Parent 1
- 1 dépôt Parent 2
- 1 dépôt Enfant 1
- 1 dépôt Enfant 2

**+ 10 dépôts Echelle de poids moléculaire (jusqu'à 10 gels)**

1 dépôt échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes

Dont migration électrophorèse : 15 - 20 minutes

## 2 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

- Tube parent 1 HbA / HbS 175  $\mu$ L
- Tube parent 2 HbA / HbS 175  $\mu$ L
- Tube enfant 1 HbA / HbA 175  $\mu$ L
- Tube enfant 2 HbS / HbS 175  $\mu$ L
- Marqueur de taille 90  $\mu$ L

Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose

Tampon TAE

Colorant ADN

Réf. 107646 : cette référence regroupe tous les consommables indispensables pour réaliser 10 mini gels d'agarose pour système compact avec fluorescence PhorEasy ou MiniOne.  
(Agarose 4 g/ TAE 10 x 200 mL / colorant GelGreen 30 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

## 3 Principe de l'expérience

### 3.1 Scénario

L'électrophorèse va mettre en évidence la relation génotype/phénotype pour 4 membres d'une même famille (fictive). Les deux parents et l'enfant 1 ne sont pas atteints par la maladie. En revanche, l'enfant 2 est atteint par la drépanocytose.

L'électrophorèse a pour objectif de mettre en évidence le site de restriction enzymatique qui permet de caractériser l'absence d'une mutation sur un locus précis (1 base) et de remonter au phénotype moléculaire.

Dans ce scénario, pour chaque test, on dispose de 4 tubes d'ADN, correspondant chacun à un individu. L'ADN à analyser est présenté comme le résultat d'une amplification par PCR du fragment du chromosome 11 qui cible une portion du gène β-globine, suivi d'une digestion enzymatique par Bsu361, dont la coupure peut différencier les allèles A et S.

### 3.2 Le gène de la β-globine

Séquence complète de 1608 pb composée de 3 exons  
Séquence codante est de 444 pb

[HBB hemoglobin subunit beta \[Homo sapiens \(human\)\] - Gene - NCBI \(nih.gov\)](#)

Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p14 Primary Assembly  
NCBI Reference Sequence: NC\_000011.10

Homo sapiens hemoglobin subunit beta (HBB), mRNA  
NCBI Reference Sequence: NM\_000518.5  
GenBank Graphics  
>NM\_000518.5:51-494 Homo sapiens hemoglobin subunit beta (HBB), mRNA

```
ATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGG
CAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGAGGCCCTGGGCAGGCTGCTG
GTGGTCTACCCCTGGACCCAGAGGTTCTTGAGTCCTTGGGGATCTGTCC
ACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAACGGTAAGGTGAAGGCTCATGG
CAAGAACTTCAGGCTCCTGGCAACGTGCTGGCTGTGTGCTGGCCAT
CACTTGCAAGAATTCAACCCACCAAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTG
GTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCCACAAGTATCACTAA
```

En position 17- 21 de sa séquence codante :\*

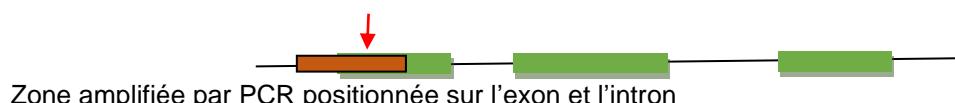
- L'allèle normal de la  $\beta$ -globine présente la séquence CTGAG,
- L'allèle drépanocytaire présente la séquence CTGTG (Adénine est remplacée par la thymine)



### 3.3 L'enzyme Bsu 361

l'enzyme Bsu36I coupe l'ADN au niveau de la séquence spécifique CCTNAGG. Cette coupure du fragment gène  $\beta$ -globin (531bp) génère 2 fragments de 331pb et 200 bp

Le gène est composé de 3 exons le site restriction est situé dans l'exon



Zone amplifiée par PCR positionnée sur l'exon et l'intron

À la lecture des résultats, les élèves peuvent déterminer le génotype de chaque individu (hétérozygote / homozygote) et, associé au phénotype (forme des globules rouges), identifier la relation de dominance allélique.

## 4 Mode opératoire

### 4.1 Préparation des solutions

#### ❖ Préparation du tampon TAE 1X :

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL
- Exemple de préparation pour 1 L de tampon à 1 X :
- Versez 100 ml de TAE 10X dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger

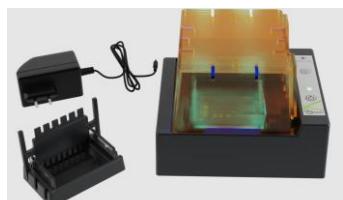
\* En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TAE 1 X à préparer doit être adapté.

#### ❖ Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1,7 % (optimale) :

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,25 g d'agarose dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.  
L'ajouter à l'rlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète).

- S'assurer que la solution est parfaitement translucide.
- Ajouter 2  $\mu$ L de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'rlenmeyer.
- Laisser l'rlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.

\* La concentration en agarose à 1,7 % permet d'avoir une résolution optimale de la séparation des fragments d'ADN. Vous pouvez réaliser un gel à 2 % (cup) et obtenir également des très bons résultats.



Dispositif électrophorèse  
tout en un

#### ❖ Préparation de l'ADN

- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.
- Avant la séance, décongeler les tubes Eppendorf.

Idéalement décongeler les contenants environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis les plonger dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau et d'autre part d'éviter la nouvelle formation de bouts collés.

Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

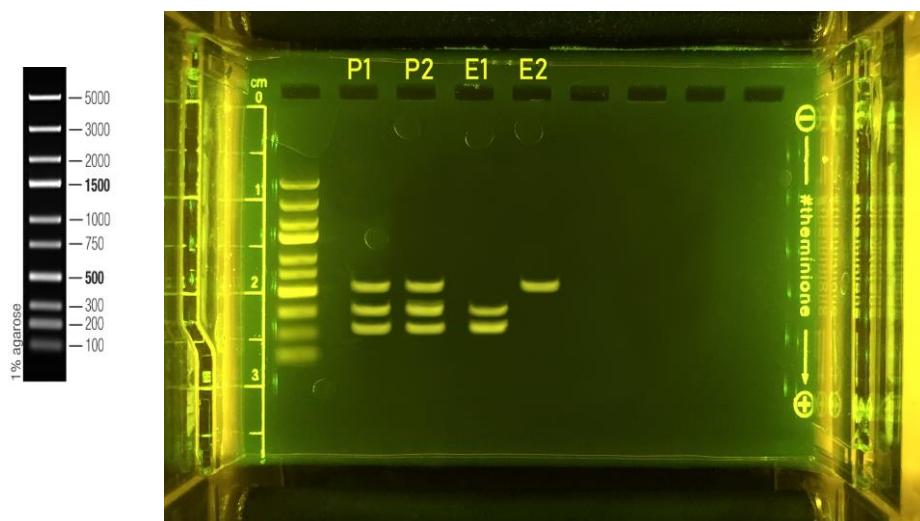
## 4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 µL d'ADN Tubes patients à déposer
- 8 µL pour l'échelle de poids moléculaire

Durée de migration d'environ 20 minutes pour les systèmes compacts

## 5 Résultats et exploitations



L'allèle HbA, non muté, possède le site de restriction spécifique de l'enzyme Bsu361 qui coupe l'ADN le fragment amplifié (531 bp) d'une zone du gène  $\beta$ -globin et génère 2 fragments de 331 pb et 200 pb.

L'allèle HbS, muté, ne possède pas de site de restriction Bsu361 donc le fragment d'ADN n'est pas coupé (531 bp).

Pour les parents 1 et 2, les 3 bandes de tailles différentes indiquent qu'ils sont hétérozygotes pour le gène  $\beta$ -globin avec un allèle HbA (331 pb et 200 pb) et un allèle HbS (531 bp).

Pour l'enfant 1, les deux bandes à (331 pb et 200 bp) indiquent qu'il est homozygote pour le gène β-globin avec deux allèles HbA.

Pour l'enfant 2, l'unique bande à 531 bp indique qu'il est homozygote pour le gène β-globin avec deux allèles HbS.

L'enfant 2 étant le seul à être atteint par la drépanocytose, nous pouvons conclure qu'il existe une relation de dominance allélique et que HbA est dominant sur HbS qui est récessif.

## 6 Bibliographie

"Sickle cell anemia: tracking down a mutation": an interactive learning laboratory that communicates basic principles of genetics and cellular biology Kevin Jarrett,<sup>1</sup> Mary Williams,<sup>1</sup> Spencer Horn,<sup>3</sup> David Radford,<sup>1</sup> and J. Michael Wyss<sup>1,2</sup>  
Sourcebook Of Laboratory Activities In Physiology

GENBANK

[HBB hemoglobin subunit beta \[Homo sapiens \(human\)\] - Gene - NCBI \(nih.gov\)](#)

De novo mutation rates at the single-mutation resolution in a human HBB gene region associated with adaptation and genetic disease

Daniel Melamed 1 2, Yuval Nov 3, Assaf Malik 4, Michael B Yakass 5 6, Evgeni Bolotin 1 2, Revital Shemer 7, Edem K Hiadzi 6, Karl L Skorecki 8, Adi Livnat 1 2- Genome Research 03-2022 : 488-498

## 7 Assistance Technique

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique au 09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé)**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

**JEULIN – S.A.V.**  
468 rue Jacques Monod  
CS 21900  
27019 EVREUX CEDEX France

**09 69 32 02 10\***

\* prix d'un appel local, non surtaxé