

## **A RECEPTION DU COLIS :**

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
  - Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :
- Ouvrir le carton, ↓ Placer les éléments suivants au congélateur à - 20°C ↓

### **COMPOSITION pour 32 tests (32 élèves, jusque 36 élèves)**

- Mélange miniPCR MASTER MIX, Load-Ready™ comprenant (700 µL) :
  - La Taq polymérase
  - dNTP
  - Tampon PCR avec Mg2 +
  - Colorant de chargement sur gel
- PTC Primer Mix 3X (500 µL)
- Echantillons à amplifier (100 µL de chaque) :
  - Suspect A
  - Suspect B
  - Témoin H
  - Témoin D
- 100 bp DNA Ladder, Load-Ready™ : marqueur de taille 100 pB avec bleu de charge (150 µL)

### **Les réactifs doivent être utilisés dans les 2 mois suivant leur réception.**

Tous les composants de ce kit sont sans danger. Les règles de manipulations en laboratoire s'appliquent toutefois (le port de gants, lunettes et blouse est conseillé).

Tous les résidus peuvent être jetés à l'évier.

## **MATERIEL NECESSAIRE**

- Thermocycleur MINIPCR (ou autre marque)
- Cuve à électrophorèse BLUEGEL (ou autre marque)
- Micro-onde
- Gants anti-chaueur
- Micropipettes : 0.5-10 µl et 2-20 µl

## **AUTRES REACTIFS NECESSAIRES**

- Agarose
- Agent de coloration d'ADN sur gel (Safegreen : 4µl / échantillon soit 128 µl ou GelGreen™ 2µl /25 ml de gel d'agarose)
- Tampon d'électrophorèse sur gel (TBE 1X)
- 80 Microtubes à PCR de 1,5 ou 1,7 ml

Techniques utilisées: PCR et électrophorèse sur gel d'ADN  
Temps requis: 90 min.

## **OBJECTIFS COGNITIFS**

Une introduction parfaite à la PCR et à l'utilisation de preuves ADN dans l'identification personnelle. Dans ce kit, d'une durée de 90 minutes, les élèves aideront les enquêteurs de police à résoudre un mystère criminel en associant des échantillons d'ADN médico-légaux au matériel génétique d'une personne disparue.

Les élèves vont amplifier l'ADN de 4 échantillons (2 ADN de suspects, 2 témoins) par PCR en moins de 45 minutes!

Puis ils effectueront l'électrophorèse des résultats (consommables non compris dans ce kit).

Ce kit permet également de découvrir l'existence de polymorphismes génétiques, la personne disparue étant porteuse d'une mutation sur un gène (gène CFTR, causant la fibrose kystique).

## **SCENARIO**

Missy Baker a disparu. Deux suspects sont détenus par les autorités. Les échantillons de cheveux trouvés dans leurs voitures doivent être analysés par PCR pour déterminer s'ils correspondent à l'ADN de Missy Baker.

Missy Baker porte une mutation par délétion dans le gène CFTR. Nous utiliserons cette mutation rare pour tester expérimentalement si le matériel génétique de Missy Baker correspond aux échantillons d'ADN trouvés dans les voitures des suspects.

### **Le Gène Du Régulateur Transmembranaire De La Fibrose Kystique (CFTR)**

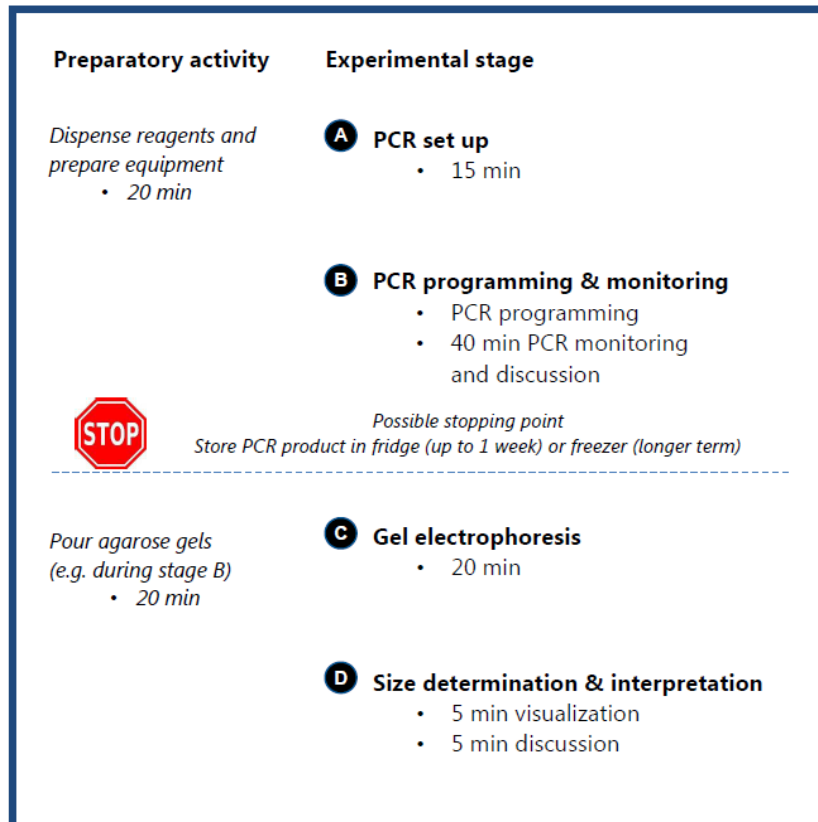


*Modèle 3D de la protéine du régulateur transmembranaire de la fibrose kystique*

La fibrose kystique peut être causée par des mutations du gène CFTR, qui code une protéine de canal impliquée dans le passage des ions chlorure à travers la membrane cellulaire.

Une protéine CFTR défectueuse empêche le corps de transférer de l'eau et du sel vers et depuis les cellules. Cela provoque des sécrétions, qui sont normalement minces et liquides chez les personnes en bonne santé, à devenir épaisses et collantes. Des sécrétions épaisses obstruent les organes et les empêchent de fonctionner correctement, entraînant souvent des complications respiratoires pouvant être fatales.

## MANIPULATION



## PCR : MISE EN PLACE

- Décongeler les tubes contenant les amorces et les échantillons d'ADN en les plaçant à température ambiante.
- **Idéalement placer les élèves par groupes de 4** (sinon diviser les quantités de tubes par 2 si vous travaillez en binômes) ils effectueront 4 réactions de PCR.
- Etiqueter et distribuer six tubes comme suit:
  - ✓ 2X EZ PCR Master Mix : 75 µl
  - ✓ 3X Crime Lab Primer Mix : 50 µl
  - ✓ Suspect A ADN : 5 µl
  - ✓ ADN du suspect B : 5 µl
  - ✓ ADN de contrôle H : 5 µl
  - ✓ ADN contrôle D : 5 µl
- Chaque groupe de laboratoire utilisera au minimum:
  - ✓ Micropipettes (nous recommandons la gamme 2-20µL)
  - ✓ Cônes de micropipette jetables et un petit gobelet ou une tasse pour les jeter
  - ✓ 4 tubes PCR (200 µl)
  - ✓ Un marqueur permanent (à pointe fine)

## MANIPULATION ELEVE

### 1. Mise en place de la PCR : préparation des tubes

A. Identifier au marqueur, sur le coté des tubes, 4 tubes de PCR (tubes de 200 µl) par groupe de laboratoires.

- ✓ 1 tube «A»: «ADN de cheveux» extrait de la voiture du suspect A
- ✓ 1 tube «B»: «ADN de cheveux» extrait de la voiture du suspect B
- ✓ 1 tube «H»: «ADN de contrôle» provenant d'un individu en bonne santé
- ✓ 1 tube «D»: «ADN témoin» d'un mutant de délétion CFTR

**NB :** Identifiez également chaque tube avec le nom du groupe sur la paroi latérale

- Ajouter les réactifs suivants dans chaque tube :

	A	B	H	D
ECHANTILLON ADN	5µl	5µl	5µl	5µl
MASTER MIX	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
PRIMER MIX	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
<b>Volume final</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>

**NB :** pour travailler avec 36 élèves vous pouvez réduire de 1/5 chaque réactif : 4µL d'ADN, 12 µL de Mix et 8 µL de primer. La réaction fonctionne très bien.

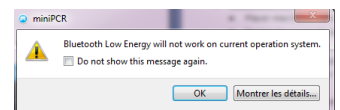
### REMARQUE:

- **Les cônes des micropipettes doivent être changés à chaque pipetage !**
- Aspirer et refouler plusieurs fois avec la micropipette pour bien mélanger les réactifs de PCR.
- Idéalement, passer les tubes à la centrifugeuse
- Boucher fermement les tubes

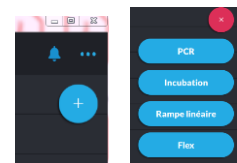
### 2. Réalisation du cycle de PCR

- Placer mes tubes dans le thermocycleur
- Fermez le couvercle de la machine PCR et serrez doucement le couvercle
- Programmation et surveillance de la PCR
  - Ouvrir le logiciel miniPCR

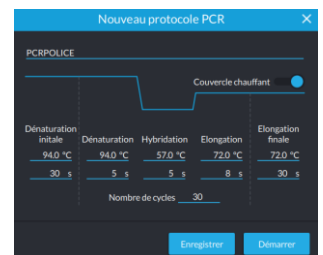
**NB :** quand le logiciel se lance sur un ordinateur le message suivant apparait : cliquer sur OK.



- Cliquer sur le '+' pour créer un programme de PCR
- Choisir PCR
- Entrez un nom pour le protocole; par exemple "PCRPOLICE groupe 1"
- Entrez les paramètres du protocole PCR:



**Dénaturation initiale 94 ° C 30 sec**  
**Dénaturation 94 ° C 5 sec**  
**Hybridation 57 ° C 5 sec**  
**Extension 72 ° C 8 sec**  
**Elongation finale 72°C 30sec**  
**Nombre de cycles 30**



- Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole.
- Cliquez sur "Démarrer" pour lancer le cycle

**NB :** Assurez-vous que l'interrupteur d'alimentation à l'arrière du miniPCR est en position ON

Le logiciel miniPCR permet à chaque groupe de surveiller les paramètres de sa PCR en temps réel et d'exporter les données de réaction pour analyse sous forme de feuille de calcul.

Une fois que la PCR est terminée (environ 45 minutes), l'écran affichera: «Statut: Terminé». Tous les voyants de la machine miniPCR s'allumeront.

Vous pouvez maintenant ouvrir le couvercle miniPCR et retirer vos tubes.

**Attention à ne pas toucher le couvercle en métal qui peut encore être chaud**

Les amplifications peuvent se conserver 1 semaine au réfrigérateur ou 1 an au congélateur. Mais le TP peut se faire en 90 min, donc normalement vous pouvez tout faire en 1 seule séance.

Les amplifications peuvent se conserver 1 semaine au réfrigérateur ou 1 an au congélateur. Mais le TP peut se faire en 90 min, donc normalement vous pouvez tout faire en 1 seule séance.

**NB : Les amplifications peuvent se conserver 1 semaine au réfrigérateur ou 1 an au congélateur.**

### **3. Electrophorèse des résultats de PCR**

Manipulation au SAFEGREEN : ajouter 4 µl de Safegreen dans les tubes d'ADN après amplification (30 µl +4 µl pour obtenir un volume finale de 34µl par tube).

Manipulation au **GelGreen** : il n'y a rien à ajouter avec l'ADN le **GelGreen** se met dans le gel au moment du coulage.

#### **A. Préparer un gel d'agarose à 1,6% en utilisant du TBE 1X**

a. Ajustez les volumes et les poids en fonction de la taille de votre plateau de gel

b. Par exemple, ajoutez 1,6 g d'agarose à 100 ml de tampon d'électrophorèse.

✓ Pour blueGel™: 0,32 g d'agarose dans 20 ml de tampon d'électrophorèse 1X TBE

c. Mélanger les réactifs dans une fiole ou un bécher en verre et agiter pour mélanger

d. NB: Si vous versez plus d'un gel, vous pouvez dissoudre tout l'agarose en même temps (par exemple 3,2 g dans 200 ml pour 10 gels).

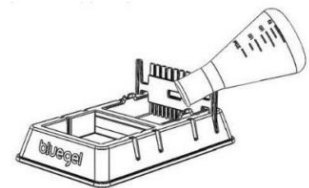
e. Chauffez le mélange à l'aide d'un micro-onde ou d'une plaque chauffante jusqu'à ce que la poudre d'agarose soit dissoute et que la solution devienne claire

f. Soyez prudent, car le mélange a tendance à faire des bulles et est très chaud

g. Laisser la solution d'agarose refroidir pendant environ 2-3 minutes à la température ambiante.

h. Agiter la fiole par intermittence

i. Si vous souhaitez travailler avec le **GelGreen**, ajoutez maintenant 2 µl pour 25 ml de gel



**Vous pouvez également travailler avec le SAFEGREEN, mais il se place dans l'échantillon juste avant les dépôts. Avec ce kit, le résultat est un peu moins bon car il y a déjà une solution de dépôt dans les réactifs MINIPCR, qui diminue un peu la sensibilité du SAFEGREEN. Cela dit, cela reste tout à fait exploitable. Le résultat avec le SAFEGREEN est toutefois meilleur sans solution de dépôt (qu'il remplace) par exemple dans nos kits SORDALAB. Attention vous ne pouvez pas utiliser GelGreen et SAFEGREEN, c'est l'un ou l'autre !**

- j. Versez la solution d'agarose dans le plateau de coulée de gel avec un peigne (le peigne à 13 puits est idéal pour faire plus de dépôts par gel, si vos élèves sont à l'aise pour le dépôt (puits plus petits). Sinon préférez-le côté 9 puits qui fera de plus gros puits.
  - ✓ En cas d'utilisation du peigne à 13 puits : déposer maximum 10 µl
  - ✓ En cas d'utilisation du peigne à 9 puits : déposer maximum 18 µl
- k. Laissez le gel se solidifier complètement (jusqu'à ce qu'il soit ferme au toucher) et retirez le peigne. Typiquement, 10-20 minutes
- l. Placez le gel dans la chambre d'électrophorèse et recouvrez-le de tampon d'électrophorèse 1X TBE.

#### B. Dépôt des échantillons

- a. Assurez-vous que le gel est complètement immergé dans un tampon d'électrophorèse
- b. Assurez-vous qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits (secouez doucement le gel si les bulles doivent être délogées)
- c. Remplissez tous les réservoirs de la chambre d'électrophorèse et ajoutez juste assez de tampon pour couvrir le gel et les puits
- d. Utilisateurs de blueGel™: n'utilisez pas plus de 25 ml de tampon d'électrophorèse.

#### **e. Charger les échantillons d'ADN sur le gel en cas d'utilisation du SAFEGREEN :**

- ✓ **Pour le marqueur de poids moléculaire**, il faut ajouter 2µl de SAFEGREEN pour 10µl de marqueur. Préparer un tube correspondant en fonction du nombre de dépôt de marqueur que vous souhaitez faire (cela dépend du nombre de dépôt que vous faites faire par gel : 1 dépôt de marqueur par ligne de dépôt sur chaque gel est suffisant)
  - Puits 1: 10 µl de marqueur de taille d'ADN
- ✓ **Pour les échantillons** : ajouter 4µl de SAFEGREEN dans chaque échantillon
- ✓ Bien homogénéiser, puis déposer 15µl d'échantillon dans les puits
  - Puits 2: 15 µl de l'échantillon A
  - Puits 3: 15 µl de l'échantillon B
  - Puits 4: 15 µl de l'échantillon H
  - Puits 5: 15 µl de l'échantillon D

**Remarque:** il n'est pas nécessaire d'ajouter un colorant de chargement de gel à vos échantillons.

*En cas d'utilisation du peigne à 13 puits : déposer maximum 10 µl*

*En cas d'utilisation du peigne à 9 puits : déposer maximum 18 µl*

#### **f. Charger les échantillons d'ADN sur le gel en cas d'utilisation du GelGreen :**

*Le colorant est à ajouter dans le gel, les échantillons et le marqueur sont déposés tels que, sans aucun ajout.*

- Puits 1: 10 µl de marqueur de taille d'ADN
- Puits 2: 15 µl de l'échantillon A
- Puits 3: 15 µl de l'échantillon B
- Puits 4: 15 µl de l'échantillon H
- Puits 5: 15 µl de l'échantillon D

*En cas d'utilisation du peigne à 13 puits : déposer maximum 10 µl*

*En cas d'utilisation du peigne à 9 puits : déposer maximum 18 µl*

- g. Placez le couvercle sur la boîte d'électrophorèse en gel

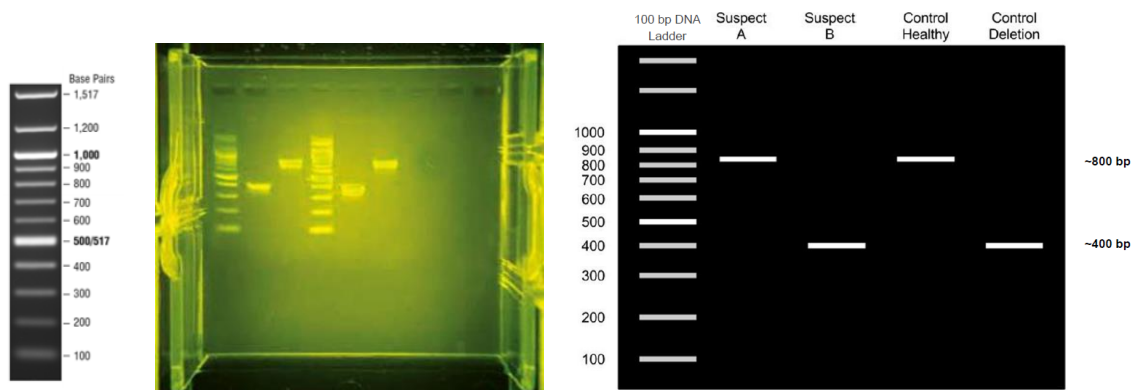


- h. Assurez-vous que les bornes des électrodes sont bien en place
- i. Avec une cuve autre que BLUEGEL : réglez la tension à 100-130V et procédez à une électrophorèse pendant 15 à 20 minutes ou jusqu'à ce que le colorant coloré ait progressé jusqu'à environ la moitié de la longueur du gel
- j. si vous utilisez blueGel™, appuyez simplement sur le bouton «Run». Vous pouvez également allumer la lumière et suivre la migration en temps réel.
- k. Vérifiez que de petites bulles se forment près des bornes dans la boîte
- l. Des temps d'électrophorèse plus longs donneront une meilleure résolution de taille
- m. Une fois l'électrophorèse terminée, mettez l'appareil hors tension et retirez le gel de la boîte.

#### 4. Détermination de la taille et interprétation

- a. Placez le gel sur le transilluminateur à lumière bleue  
Si vous utilisez blueGel™, appuyez simplement sur le bouton de l'illuminateur.  
Si vous utilisez une lampe à UV (déconseillé), couvrez toute la peau exposée et couvrez les yeux avec des lunettes de protection anti-UV.
- b. Vérifier la présence du produit PCR (fluorescent)
- c. Assurez-vous que la résolution de la bande d'ADN est suffisante dans la plage de 400 à 800 paires de bases (pB) de l'échelle d'ADN à 100 pB.
  - a. Faites fonctionner le gel plus longtemps si nécessaire pour augmenter la résolution
  - b. L'échelle d'ADN devrait ressembler approximativement à l'illustration
  - c. Prendre en photo le gel
  - d. Avec BLUEGEL : placer la chambre noire, permet de prendre facilement une belle photo

#### 5. Résultats attendus:



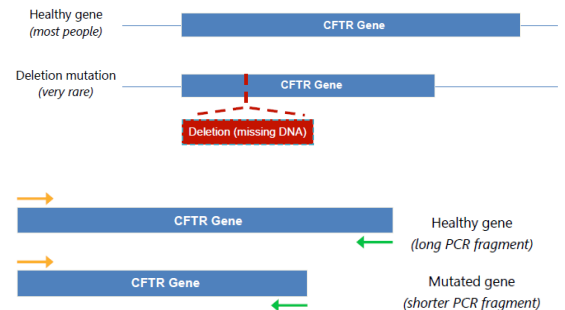
Cette image schématique montre les résultats expérimentaux idéalisés, l'intensité des bandes dépendra de :

- l'efficacité de la réaction PCR
- l'efficacité du chargement de gel
- la qualité des réactifs de détection et du système

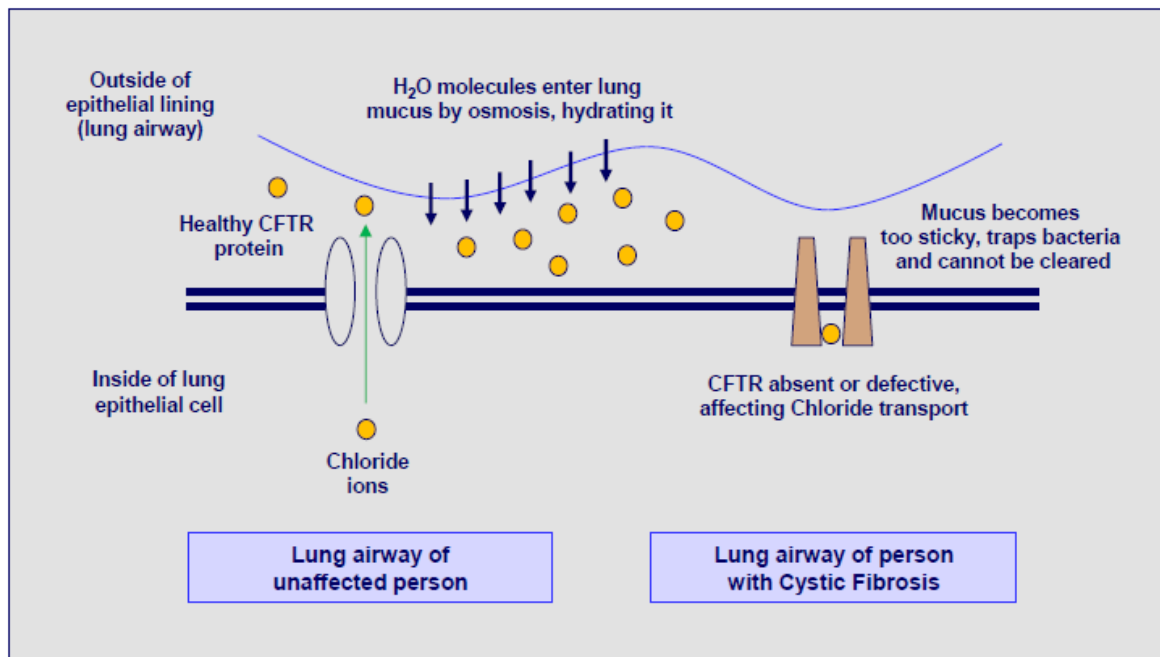
## QUESTIONS D'ETUDE

### 1. Questions avant la mise en place expérimentale

- Qu'est-ce qu'une mutation par délétion? Nous prenons le gène CFTR comme modèle
- Comment la PCR peut-elle aider à détecter une suppression génétique?
  - Pourquoi utilisons-nous des amorces qui s'annellent aux régions encadrant la suppression?
  - Que se passerait-il si les amorces ciblaient la suppression elle-même?
- Comment pouvons-nous identifier d'autres types de mutations génétiques?
  - Les mutations d'insertion ajoutent un morceau d'ADN
  - Les mutations faux-sens changent (remplacent) une paire de bases d'ADN unique
  - Mutations non-sens: mutations faux-sens qui aboutissent à un codon stop
- Quel est le rôle physiologique de la protéine CFTR?
  - Le gène CFTR code pour une protéine de canal ionique de classe transporteur qui conduit les ions chlorure à travers les membranes des cellules épithéliales. En physiologie normale, la protéine CFTR est essentielle pour augmenter la concentration en électrolytes dans le mucus, ce qui entraîne le mouvement de l'eau hors de la cellule par osmose et confère au mucus extracellulaire son hydratation optimale.
  - Par conséquent, le CFTR est nécessaire pour la production de mucus fin et fluide. Le mucus est une substance glissante qui lubrifie et protège la muqueuse des voies respiratoires, du système digestif, du système reproducteur et d'autres organes et tissus.
- Quels sont les effets des mutations génétiques de la fibrose kystique (FK)?
  - Les mutations CFTR interfèrent avec la capacité de la cellule à transporter le chlorure dans l'espace extracellulaire, et donc à réduire l'accumulation d'eau et de sel
  - Les sécrétions de mucus, qui sont normalement minces et liquides chez les personnes en bonne santé, deviennent épaisses et collantes
  - Des sécrétions épaisses obstruent les organes et les empêchent de bien fonctionner
  - Une augmentation de la viscosité des sécrétions cellulaires entraîne souvent des complications respiratoires, voire le décès de nombreux patients atteints de mucoviscidose.







- Combien de mutations différentes de CFTR ont été identifiées?
  - Près de deux mille mutations causant la fibrose kystique ont été décrites
  - La mutation la plus commune,  $\Delta F508$ , résulte d'une délétion de trois nucléotides qui entraîne une perte de l'acide aminé phénylalanine (F) à la 508ème position sur la protéine.
  - En conséquence, la protéine ne se plie pas normalement et se dégrade plus rapidement
  - En savoir plus sur les mutations CFTR: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CFTR>
- Peut-on traiter la fibrose kystique?
  - La fibrose kystique (FK) n'est toujours pas guérie, mais les traitements se sont grandement améliorés au cours des dernières années.
  - Les objectifs du traitement de la mucoviscidose sont de prévenir et de contrôler les infections dans les poumons, en relâchant et en retirant le mucus épais et collant.
  - Le type de mutation CFTR d'un C
  - De nouvelles classes de médicaments plus personnalisés émergent pour traiter la mucoviscidose différemment en fonction de la mutation sous-jacente de la CF chez chaque patient.

## 2. Questions pendant l'exécution du PCR

- Vous attendez-vous à ce que les mutations de suppression dans CFTR soient dominantes? Récessif?
- Qu'advient-il des molécules d'ADN à chaque étape?
  - Dénaturation
  - Hybridation
  - Extension
- Pourquoi devons-nous ajouter une enzyme (ADN polymérase Taq) au mélange PCR?

- Selon vous, quelle température est optimale pour la plupart des enzymes?
  - Qu'est-ce qui rend la Taq ADN polymérase unique?
  - Combien de molécules supplémentaires d'ADN aurons-nous à la fin de chaque cycle?
  - Et à la fin de la réaction PCR?
  - Comment saurons-nous si la réaction de PCR a fonctionné?
  - Et comment pouvons-nous récupérer le produit?
3. Questions après électrophorèse sur gel et visualisation
- Comment pensez-vous que l'enquête a abouti?
  - La preuve suggère-t-elle que A ou B sont coupables?
  - Pourquoi? Quel est le rôle des contrôles expérimentaux?
  - Pensez-vous que la preuve est incriminante?
  - Quelles mises en garde les enquêteurs devraient-ils prendre en compte?
  - Quel type de migration d'ADN aurions-nous observé chez une personne hétérozygote?

#### 4. Ressources additionnelles

- Comprendre les mutations du gène CFTR  
<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CFTR>
- Le projet Innocence  
Consacré à exonérer les individus condamnés à tort par des tests ADN  
<http://www.innocenceproject.org/>
- Historique de l'utilisation de l'ADN dans la résolution de crimes  
<http://www.forensicmag.com/articles/2005/01/evolution-dna-evidence-crime-solving-judicial-and-legislative-history>
- Deutsche Welle: 30 ans d'empreintes ADN  
<http://www.dw.de/from-paternity-to-criminal-cases-dna-fingerprinting-has-been-30-years-of-eureka/a-17911987>