

NB : Il s'agit d'une simulation à partir d'ADN de synthèse (non humain) il ne s'agit donc pas des vraies séquences.

A RECEPTION DU COLIS :

Vérifier la composition du colis indiquée ci-dessous

Tous les composants doivent être conservés congelés à -20 ° C pour un stockage à long terme

COMPOSITION

Le kit de laboratoire de génétique miniPCR™ pour drépanocytose contient :

- échantillon d'ADN de Jacqueline Robinson 150 µl (ADN de synthèse)
- échantillon d'ADN de Cory Robinson 150 µl (ADN de synthèse)
- échantillon d'ADN de Samuel Robinson 150 µl (ADN de synthèse)
- échantillon d'ADN de Marie Robinson 150 µl (ADN de synthèse)
- ADN échelle 100 µl

Le matériel est suffisant pour 16 binômes, ou au moins 32 étudiants. **On constitue des groupes de 2 binômes, chaque élève du groupe déposera un ADN.**

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

Autres réactifs nécessaires

- Agarose
- Agent de coloration d'ADN sur gel (Safegreen ou GelGreen™)
- Tampon d'électrophorèse sur gel (TBE 1X)
- Microtubes de 1,5 ml

Techniques utilisées: électrophorèse sur gel d'ADN

Temps requis: un 45 min.

OBJECTIFS COGNITIFS

Établir des liens entre génotype et phénotype

- Identifier comment la composition en acides aminés affecte la structure de la protéine
- Relier les modifications de la séquence de l'ADN et des acides aminés aux maladies humaines
- Développer une compréhension des techniques de base utilisées pour étudier la génétique
- polymorphismes codés dans l'ADN
- Se familiariser avec les polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP) et leurs applications pratiques en biomédecine

Informations générales

Dans ce kit, les étudiants se voient présenter les antécédents médicaux d'une famille fictive et doivent s'efforcer de faire le diagnostic génétique. La famille représentée dans ce kit, la famille Robinson, a deux enfants, dont un a obtenu un résultat de test initial indiquant une possible drépanocytose.

La drépanocytose est une maladie génétique héréditaire pouvant entraîner de graves problèmes de santé, notamment: nombre réduit de globules rouges (anémie), d'infections répétées et d'épisodes de douleur dus à des blocages de vaisseaux sanguins. La cause de ces symptômes et d'autres est un changement structural de l'hémoglobine, la protéine responsable du transport de l'oxygène dans les globules rouges et de la source de la couleur rouge de votre sang. Le changement d'acides aminés dans l'une des chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine peut changer la vie de nombreuses personnes.

Les protéines sont des polymères pliés complexes constitués d'acides aminés. Une protéine normale consiste en une chaîne de monomères d'acides aminés allant de quelques dizaines à plusieurs milliers d'acides aminés. Cette longue chaîne se plie dans une structure tridimensionnelle très spécifique et complexe. Cette structure en trois dimensions est maintenue par plusieurs types d'interactions entre les acides aminés et d'autres molécules environnantes dans lesquelles se trouve la protéine. Les interactions dépendent de l'hydrophobicité (attraction relative de l'eau) des acides aminés. Les protéines dissoutes dans une solution aqueuse (à base d'eau), comme le cytoplasme, présentent généralement des chaînes latérales d'acides aminés hydrophiles (attirées par l'eau) sur la surface extérieure de la protéine. Ces protéines ont des chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes (hydrofuges) à l'intérieur de la protéine où ils sont protégés de la solution environnante.

L'hémoglobine est ce type de protéine. L'hémoglobine est un tétramère, ce qui signifie qu'elle est composée de quatre protéines plus petites, ou sous-unités, ou chaînes polypeptidiques, qui se réunissent pour former la protéine finale. Les quatre sous-unités sont deux sous-unités d'alpha-globine et deux sous-unités de bêta-globine. Chaque sous-unité peut se lier à une molécule d'oxygène et, de cette manière, l'hémoglobine est responsable de la distribuer l'oxygène dans tout le corps.

La drépanocytose résulte d'une simple substitution d'un seul acide aminé dans les sous-unités bêta-globines de la protéine hémoglobine. Un acide aminé hydrophile (acide glutamique) est remplacé par un acide aminé hydrophobe (valine) en sixième position de la chaîne polypeptidique de la bêta-globine. Ce changement de valine en acide glutamique ne modifie pas la structure globale de la molécule, mais signifie qu'un seul acide aminé hydrophobe est maintenant en contact direct avec l'eau à l'extérieur de la protéine d'hémoglobine.

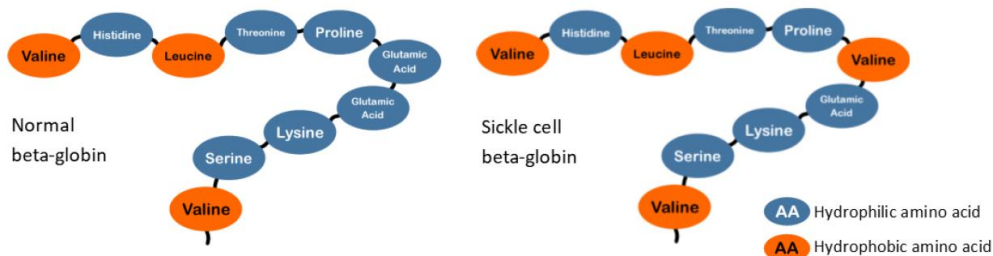


Figure 1: Les dix premiers acides aminés de la beta-globine normale (à gauche) et de la beta-globine de drépanocytose (droite).

L'hémoglobine change légèrement de conformation lorsqu'elle est liée à l'oxygène. Dans une hémoglobine drépanocytaire, lorsque l'oxygène est présent, l'hémoglobine prend une forme qui provoque l'utilisation de la valine hydrophobe à l'abri de l'eau environnante. Cependant, en l'absence d'oxygène, la protéine change de conformation, exposant la valine au cytoplasme. Dans une seule molécule d'hémoglobine, cette seule modification de l'acide aminé hydrophobe au contact de l'eau ne serait pas un problème important. Le problème se produit lorsque de nombreuses molécules d'hémoglobine dans la même cellule avec la même valine hydrophobe commencent à interagir. L'hydrophobie de la valine signifie que lorsque deux valines provenant d'hémoglobine différentes entrent en contact, elles se collent les unes aux autres. De cette façon, les deux valines sont alors à l'abri du cytoplasme environnant. Comme l'hémoglobine est un tétramère qui contient deux protéines de bêtaglobine, les individus atteints de drépanocytose auront deux valines hydrophobes sur chaque hémoglobine, située sur les côtés opposés de la protéine. Cela signifie que les protéines de l'hémoglobine vont commencer à former de longues chaînes à l'intérieur du globule rouge, réunies par des acides aminés hydrophobes de la valine. Lorsque ces chaînes deviennent assez longues, elles peuvent déformer la forme du globule rouge en leur donnant leur forme de faucille reconnaissable.

Cette forme déformée est ce qui peut causer tant de problèmes de santé à l'individu. Un travail majeur du la rate doit extraire du sang les vieux globules rouges endommagés; les cellules falciformes traversant la la rate peuvent être reconnues comme anormales et extraites du corps. Cela réduit la durée de vie moyenne de globules rouges et le nombre total de globules rouges, rendant la personne anémique. Les cellules falciformes ont également tendance à être beaucoup moins élastiques que les cellules sanguines normales, ce qui, combiné à leur forme anormale, peut causer des blocages des cellules dans les capillaires, les plus petits vaisseaux sanguins du corps. Ces blocages sont appelés comme une crise de drépanocytose. Les crises de drépanocytose ont tendance à être extrêmement douloureuses et peuvent conduire à des dommages permanents des tissus dans la zone du blocage. Lorsque cela se produit dans les capillaires des poumons, on parle de toxicité aiguë. Ce syndrome thoracique peut être extrêmement dangereux. La rate ne supprime pas seulement les globules rouges déformés, elle est souvent elle-même endommagée par la drépanocytose. Comme la rate est au cœur du système immunitaire, cela peut conduire à une augmentation des taux d'infections graves. Pour aggraver les choses, les infections peuvent conduire à des conditions dans le corps qui favorisent la drépanocytose. Ces symptômes apparaissent généralement pour la première fois chez le bébé quelques mois après la naissance.

La drépanocytose est un trait récessif. C'est-à-dire que pour avoir la drépanocytose, une personne doit avoir deux copies de l'allèle drépanocytaire (appelé en abrégé HbS). Les personnes qui possèdent un ou deux exemplaires d'un allèle normal de bêta-globine (HbA) ne seront pas atteintes de drépanocytose. Même si les personnes sont hétérozygotes, celles qui ont un ou deux allèles HbS, ne présentent généralement pas de signes d'anémie falciforme, elles sont censées présenter le trait drépanocytaire, car elles produisent encore une bêta-globine anormale. Dans les globules rouges de ces individus, il existe des molécules d'hémoglobine anormales, des molécules d'hémoglobine normales et des molécules d'hémoglobine présentant une version à la fois normale et drépanocytaire de la sous-unité bêta-globine. Dans ce cas, lorsque la valine hydrophobe de la bêta-hémoglobine anormale sera exposée, les molécules d'hémoglobine commenceront à s'agglutiner, comme c'est le cas chez les personnes atteintes de drépanocytose, mais en raison de la présence de bêta-globine normale, les longues chaînes qui se forment chez les patients atteints de drépanocytose ne se forment généralement pas. En l'absence de longues chaînes d'hémoglobine, ces personnes ne présentent généralement aucun symptôme, bien que

dans les cas extrêmes de manque prolongé d'oxygène, elles puissent présenter certains symptômes de la drépanocytose.

Les protéines drépanocytaires et bêta-globines normales diffèrent par un seul acide aminé. De même, dans le gène de la bêta-globine, les séquences nucléotidiques des allèles normaux et drépanocytaires diffèrent également par un seul nucléotide - un changement de l'adénine en thymine en position 20 de la séquence codante de la bêta-globine .

Prévalence de la drépanocytose

La drépanocytose est le plus souvent rencontrée chez les personnes d'Afrique subsaharienne, ou les personnes dont les ancêtres sont originaires d'Afrique subsaharienne, bien qu'elle se rencontre également à des fréquences plus faibles chez les populations de certaines régions du Moyen-Orient et d'Inde. Cette distribution des allèles drépanocytaires reflète la distribution historique de la maladie infectieuse, le paludisme, qui est transmis par les piqûres de moustiques. Cette occurrence est due au fait que le fait de porter un seul exemplaire de l'allèle drépanocytaire confère une certaine protection contre le paludisme. Avec la migration humaine au cours des cent dernières années, les descendants de ces régions ont apportés l'allèle drépanocytaire dans le monde entier. Aux États-Unis, environ un bébé sur 100 000 naîtra avec une drépanocytose, mais chez les Afro-Américains, le nombre de naissances drépanocytaires est beaucoup plus élevé, environ un sur 365 naissances. On estime qu'un Afro-américain sur 13 présente le trait de la drépanocytaire.

Test de la drépanocytose

Le test génétique le plus simple pour la drépanocytose est réalisé par réaction en chaîne à la polymérase (PCR) et par restriction enzymatique. La PCR est une méthode permettant de créer de nombreuses copies d'une séquence d'ADN spécifique. Dans ce cas, la séquence de la région codante du gène de la drépanocytose. La restriction par digestion est une méthode de découpe d'ADN basée sur une séquence d'ADN définie.

Pour faire une digestion de restriction, on utilise une enzyme qui localise une séquence d'ADN spécifique, généralement de 4 à 8 paires de bases. L'enzyme coupe ensuite l'ADN en deux morceaux. La mutation qui provoque le changement de la bêta-globine à la variante drépanocytaire se trouve au milieu d'un des sites de restriction de l'enzyme. L'allèle normal de la bêta-globine a la séquence CTGAG des nucléotides 17-21 de sa région codante. CTGAG se trouve être la séquence de reconnaissance de l'enzyme Ddel. Quand l'ADN contenant cette séquence est incubée avec l'enzyme Ddel à 37 ° C, l'enzyme coupe l'ADN en deux. Dans l'allèle drépanocytaire, l'adénine (A) de la séquence est remplacée par la thymine (T), ce qui signifie que la séquence est maintenant CTGTG. Cela signifie que l'enzyme ne peut pas couper l'ADN en deux fragments dans l'allèle drépanocytaire.

La différence selon que l'ADN a été coupé ou non peut être observée sur un gel d'électrophorèse.

Vivre avec la drépanocytose

La plupart des personnes présentant un trait drépanocytaire (hétérozygote pour l'allèle drépanocytaire) mèneront une vie normale, et n'éprouveront jamais de symptômes. De temps en temps, des athlètes ou d'autres personnes subissent des exercices aérobiques extrêmes ou l'exercice dans des environnements extrêmes leur fera éprouver des symptômes. Les personnes présentant le trait drépanocytaire doivent être prudents dans ces circonstances.

Les patients atteints de drépanocytose, d'autre part, ont des symptômes toute leur vie et ont une durée de vie réduite en conséquence. Aux États-Unis, où la drépanocytose est systématiquement testée tôt dans la vie, la plupart des patients atteints de drépanocytose peuvent espérer vivre jusqu'à l'âge adulte, avec une durée de vie comprise entre 40 et 60 ans. Dans les pays moins développés, les taux de mortalité infantile dus aux complications avec la drépanocytose sont significativement plus élevés.

La fréquence et l'intensité des symptômes douloureux chez les patients drépanocytaires varieront considérablement entre individus, mais seront généralement gérés par des médicaments contre la douleur. Les enfants atteints de drépanocytose sont antibiotiques pendant plusieurs années pour lutter contre les infections fréquentes pouvant souvent conduire à la mortalité infantile. Les enfants sont également vaccinés contre la pneumonie à pneumocoque, l'un des tueurs les plus courants d'enfants atteints d'anémie falciforme.

Grâce à une surveillance assez simple, la plupart des personnes atteintes de drépanocytose peuvent mener une vie relativement normale.

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la drépanocytose, de sorte que les patients peuvent être contraints de gérer ces symptômes pendant toute leur vie.

Expérimentation :

Il s'agit d'une simulation à partir d'ADN de synthèse (non humain) il ne s'agit donc pas des vraies séquences.

Analyse des échantillons d'ADN d'une famille de quatre personnes qui ont été soumises à des tests génétiques pour l'anémie falciforme. L'ADN fourni représente un produit de PCR de 400 paires de bases amplifié à partir du gène de la bêta-globine. Ce produit de PCR a été incubé en présence de la restriction enzyme Ddel à 37 ° C. Le kit consiste à analyser les échantillons d'ADN sur un gel d'électrophorèse afin de déterminer si les membres de la famille sont porteurs de la mutation de la drépanocytose et évaluer en outre s'ils sont affectés par drépanocytose ou trait de drépanocytose.

Longueur des bandes attendues

Hémoglobine Normale : 150, 250 ; Drépanocytose Trait : 150, 250, 400 ; Drépanocytose : 400

Vocabulaire important

Polypeptide: Une chaîne d'acides aminés. Lorsqu'un polypeptide est plié dans un tridimensionnel très spécifique

forme on l'appelle une protéine.

Hémoglobine: Protéine présente dans les globules rouges qui se lie à l'oxygène et la transporte dans l'organisme.

L'hémoglobine est composée de quatre sous-unités protéiques plus petites, de deux sous-unités de bêta-globine et de deux sous-unités d'alphaglobine.

Bêta-globine: Une des deux chaînes polypeptidiques de la globine qui forment la protéine hémoglobine. Une mutation dans La bêta-globine est responsable de la drépanocytose.

Alpha-globine: Une des deux chaînes polypeptidiques de la globine qui forment la protéine hémoglobine. L'alpha-globine est non affecté par la mutation de la drépanocytose.

Tétramère: Une molécule composée de quatre sous-unités plus petites.

Hydrophobe: manque d'affinité pour l'eau. Les molécules hydrophobes ont tendance à être non polaires et à ne pas avoir de charge.

Hydrophile: Attiré par l'eau. Les molécules hydrophiles ont tendance à être polaires ou à avoir une charge

Famille Robinson:

La famille Robinson a été référée à des tests génétiques et une consultation après que leur fille en bas âge, Marie, a été identifiée dans la routine dépistage possible de la drépanocytose.

Jacqueline: Jacqueline est une femme de 32 ans née à Port-au-Prince, Haïti. Elle a immigré aux États-Unis avec sa famille à l'âge de 5 ans. Elle ne rapporte aucun antécédent médical anormal autre qu'une migraine occasionnelle.

maux de tête. Elle a trois soeurs, qui sont toutes en bonne santé.

Le frère aîné de Jacqueline est décédé d'une pneumonie à l'âge de 1 an alors que la famille vivait toujours en Haïti. Jacqueline est d'origine africaine. Jacqueline ne croit pas qu'elle a déjà été testée pour la drépanocytose.

Cory: Cory est un homme de 32 ans qui est né et a grandi aux États-Unis. Cory ne rapporte rien d'anormal dans ses antécédents médicaux. Cory a deux sœurs aînées, elles n'ont rien d'anormal dans leurs antécédents médicaux. Cory est principalement d'ascendance africaine. Cory n'a jamais été testé pour la drépanocytose.

Samuel: Samuel est un garçon en bonne santé de 4 ans. Jacqueline rapporte que sa grossesse avec Samuel était normale et qu'il n'a pas eu de maladie majeure. Samuel n'a pas montré d'anomalies dans ses dépistages courants.

Marie: Marie a 2 mois. Jacqueline rapporte que sa grossesse avec Marie était normale. Un programme de dépistage prénatal a révélé de faibles niveaux de l'hémoglobine dans le sang de Marie et elle a été référée à des tests de suivi. Un second test sanguin n'était pas concluant.

ORGANISATION DE LA SEANCE

Ce kit est conçu pour être terminé en une seule période de 45 minutes (à l'aide de blueGel™). On constitue des groupes de 2 binômes, chaque élève déposera un ADN.

Il y a quatre étapes:




A. Préparation du gel d'agarose (avant ou pendant les cours)

B. Distribuer les réactifs (avant le cours)

C. Séparer l'ADN par électrophorèse sur gel (en classe)

D. Visualiser l'ADN et interpréter les résultats (pendant le cours)

Activité FACULTATIVE avant le laboratoire: s'entraîner au micropipetage

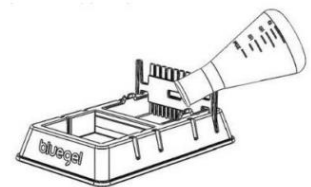
Preparatory activity	Experimental stage
Dispense reagents and prepare equipment • 10 min 	A Prepare agarose mix and pour gels • ~15 min until gel solidified
	B Load DNA samples • 5 min
	C Run gels and visualize DNA • 20-30 min run • Visualization during run
	D Size determination & interpretation • 5 min • Discuss results 

1. **Décongeler les tubes** contenant les réactifs en les plaçant à température ambiante. Chaque groupe (= 2 binômes) analysera 4 échantillons d'ADN et un marqueur de poids d'ADN.
2. **Pour chaque groupe (= 2 binômes), distribuer quatre microtubes.** Les élèves les identifient (au marqueur) avec les noms indiqués ci-dessous, et vont pipeter les volumes indiqués:
 - A. Manipulation au SAFEGREEN :
ajouter 3 µL de safegreen dans les tubes d'ADN (15 µL +3 µL pour obtenir un volume finale de 18µL par tube).
 - B. Manipulation au GREENGEL :
il n'y a rien à ajouter avec l'ADN le **GREENGEL** se met dans le gel au moment du coulage.
3. **Électrophorèse sur gel**
 - C. Préparer un gel d'agarose à 1,5% 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 1,5 g d'agarose à 100 ml de tampon d'électrophorèse.
 - ✓ Pour blueGel™: 0,3 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 g dans 200 ml pour 10 gels).
 - e. Chauffez le mélange à l'aide d'un micro-ondes 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 GreenGel, ajoutez maintenant 5 µL pour 50 ml de gel**

Vous pouvez également travailler avec le SAFEGREEN : 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.

Attention vous ne pouvez pas utiliser GreenGel 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.



D. Electrophorèse sur gel dépôts 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. Dépôts des 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 3µL de SAFEGREEN dans chaque échantillon
- ✓ Bien homogénéiser, puis déposer 15µL d'échantillon dans les puits
 - Puits 2: 15 µL de l'échantillon Jacqueline
 - Puits 3: 15 µL de l'échantillon Cory
 - Puits 4: 15 µL de l'échantillon Samuel
 - Puits 5: 15 µL de l'échantillon Marie

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. Dépôts des échantillons d'ADN sur le gel en cas d'utilisation du GreenGel :

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 Jacqueline
- Puits 3: 15 µL de l'échantillon Cory
- Puits 4: 15 µL de l'échantillon Samuel
- Puits 5: 15 µL de l'échantillon Marie

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 cuve à électrophorèse
- 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 de charge 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.

E. 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 100 à 300 paires de bases (pb) de l'échelle d'ADN à 100 pb.

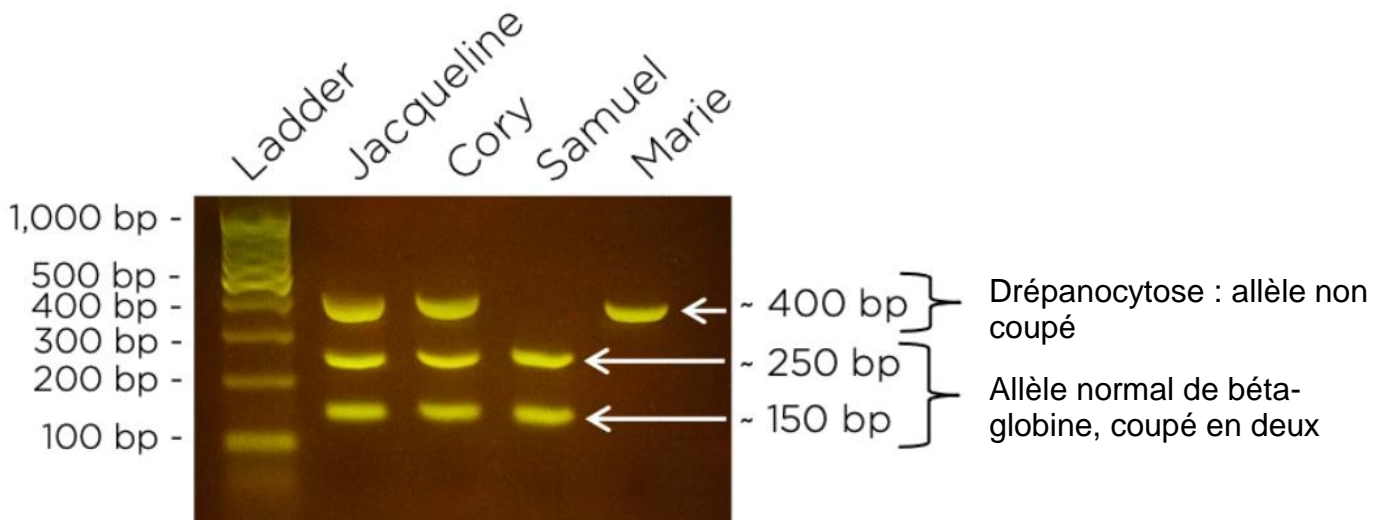
a. Faites migrer plus longtemps si nécessaire pour augmenter la résolution

b. Le marqueur de poids doit 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

4. Résultats attendus:



TRAVAUX PREPARATOIRES: QUESTIONS D'APRES LES INFORMATIONS FOURNIES.

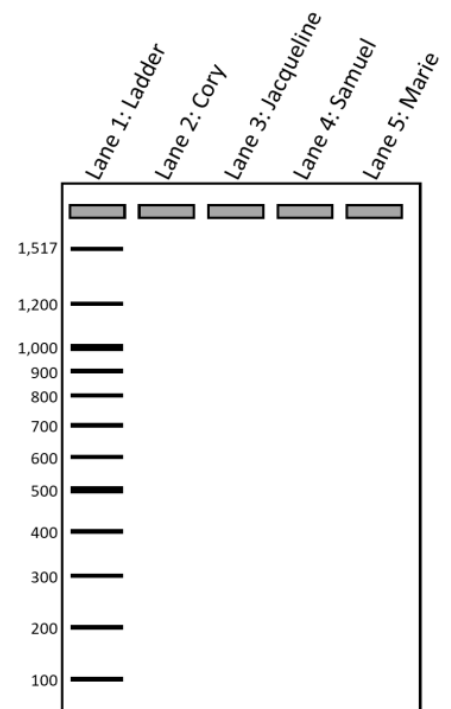
1. L'anémie falciforme est causée par une modification de la protéine d'hémoglobine. Pourquoi alors l'auteur passer tant de temps à parler de la bêta-globine?
2. Décrivez pourquoi la présence d'un acide aminé hydrophobe à l'extérieur d'une protéine peut être problématique.
3. En regardant la figure 1, quels acides aminés espérez-vous normalement trouver à l'abri de l'eau dans la structure tridimensionnelle finale de la protéine? Quels acides aminés prévoyez-vous être exposé à l'eau environnante dans la structure tridimensionnelle finale de la protéine? Justifier la Réponse.
4. Les personnes atteintes d'anémie falciforme produisent des quantités normales d'hémoglobine. Pourquoi alors sont-ils anémiques (trop peu de globules rouges)?
5. Expliquez pourquoi les protéines d'hémoglobine s'agglutinant forment de longues chaînes chez les personnes atteintes de drépanocytose.
6. La lutte contre l'infection dans le corps est le travail des globules blancs et non des globules rouges. Si la maladie affecte les globules rouges, responsables du transport de l'oxygène, pourquoi les patients plus susceptibles à l'infection?
7. Pourquoi la drépanocytose est-elle plus susceptible de se produire lorsque la cellule est pauvre en oxygène?

Laboratoire préliminaire: questions après avoir lu les antécédents médicaux de la famille

8. Après avoir lu les antécédents médicaux de Jacqueline et Cory, voyez-vous des facteurs de risque de drépanocytose?
9. Est-il possible que le frère de Jacqueline soit mort de drépanocytose et que personne d'autre dans sa famille n'ait eu la maladie?
10. Si Marie est atteinte de drépanocytose, que devons-nous savoir sur Cory et Jacqueline?

Laboratoire: Questions pendant l'exécution de blueGel™

1. L'illustration à droite montre une voie à cinq voies
Le puits 1 contient une échelle ADN, montrant à quelle distance des bandes de tailles différentes vont migrer sur un gel. En utilisant les tailles de bande que nous attendons de notre résumé de restriction, prédisez à quoi votre gel ressemblera. Dessinez dans les bandes que vous vous attendez à voir pour chaque individu en fonction des informations dont vous disposez actuellement.
2. Explique tes prévisions.
3. Expliquez la relation entre les trois bandes de tailles différentes que nous espérons voir sur le gel. Si la différence entre les allèles HbS et HbA est un simple nucléotide, comment voyons-nous la différence en regardant des longueurs de fragments d'ADN?



Post-laboratoire: questions après la visualisation de l'ADN

1. Quel est votre diagnostic génétique de chaque membre de la famille Robinson? Indiquer pour chaque membre de la famille si il est atteint de drépanocytose, possède un trait drépanocytaire ou n'est pas affecté par la drépanocytose.

Jacqueline:
Cory:
Samuel:
Marie:

2. De quelle couleur les bandes d'ADN sont-elles apparues sur votre gel? Est-ce que l'ADN est normalement de cette couleur? Expliquer pourquoi c'est coloré ainsi.

Questions utilisant l'analyse des carrés de Punnett et des généalogies.

Utilisez un carré de Punnett pour répondre aux questions suivantes. Utilisez A pour représenter l'allèle HbA normal. Utilisation S pour représenter la drépanocytose, allèle HbS.

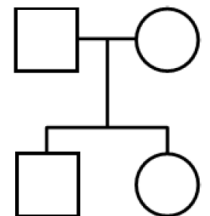


3. Si deux parents ont le trait drépanocytaire, quelle est la probabilité que leur enfant soit atteint de drépanocytose?



4. Si une personne atteinte de drépanocytose a des enfants avec une personne qui ne porte pas l'allèle HbS, peut-elle avoir un enfant atteint de drépanocytose?

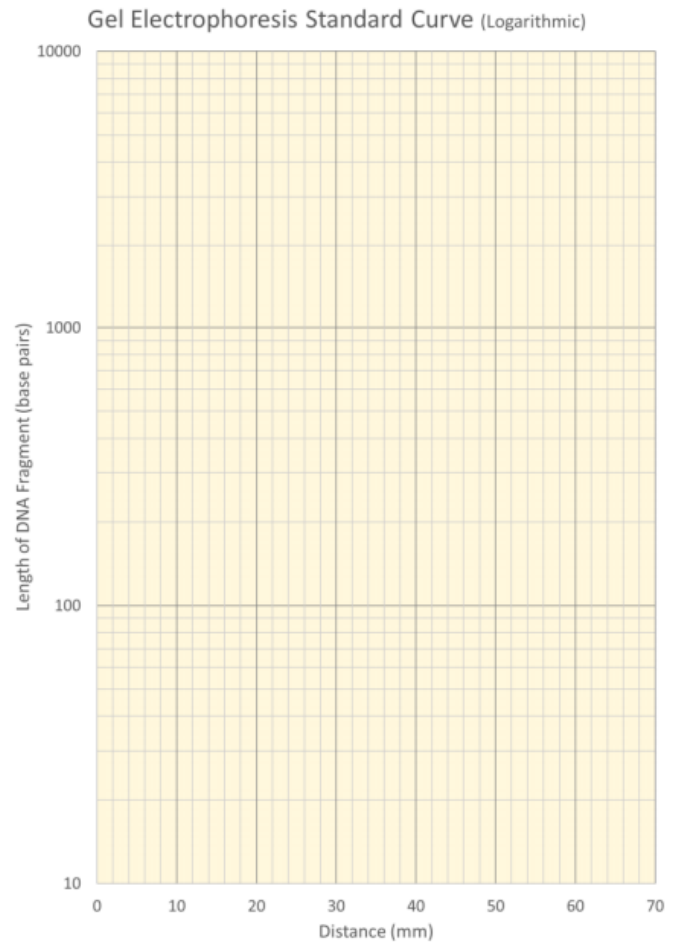
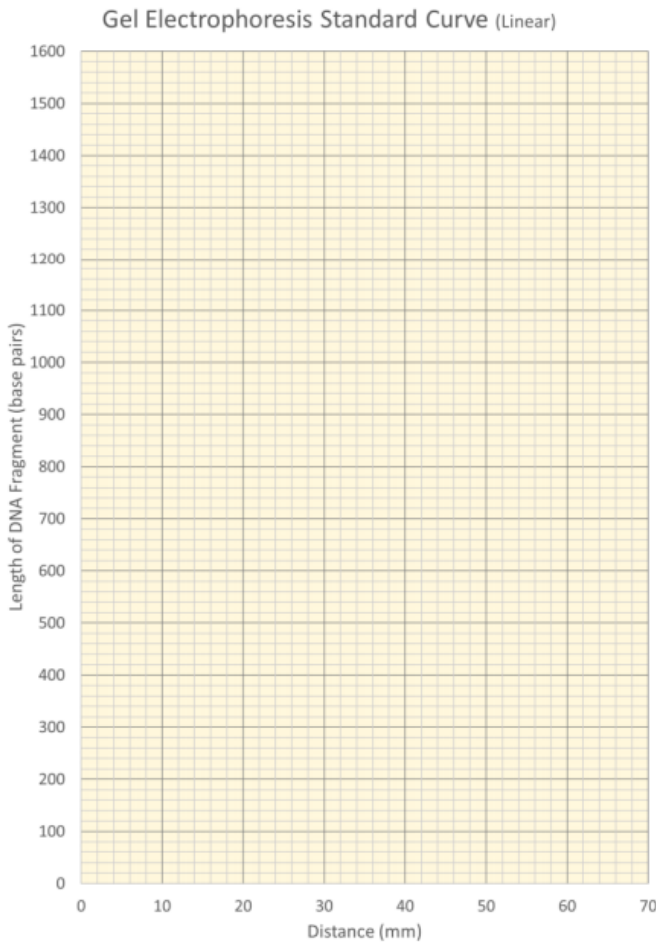
5. Ce qui suit est une généalogie de la famille Robinson qui n'a pas été renseigné. Remplissez la sur la base de vos données obtenues.



6. Montrez dans votre arbre généalogique que la drépanocytose est un trait récessif

7. Ajoutez le reste de la famille de Jacqueline à l'arbre généalogique. Supposer que le frère de Jacqueline était positif pour drépanocytose. Incluez tous les membres de la famille mentionnés et complétez autant d'informations que possible.

Extension: création d'une courbe standard d'électrophorèse



1. En utilisant une règle métrique, mesurez en millimètres la distance entre le bord du puits et le centre de chaque bande dans votre échelle d'ADN.
2. Tracez chaque point sur les deux graphiques ci-dessus. Pour chaque graphique, l'axe des X est la distance parcourue par chaque bande mesurée en millimètres. L'axe des Y est la taille de la bande dans l'échelle de l'ADN.
Visualiser les résultats de l'ADN pour les tailles de bande). Notez que les échelles des axes Y sont différentes pour les deux graphiques.
3. Connectez vos points pour créer une courbe / ligne.

Estimation de la taille de bande inconnue:

4. Choisissez une piste dans votre gel contenant trois bandes (un hétérozygote HbA / HbS).
5. Mesurez la distance parcourue par chaque bande à partir du bord du puits. Cette distance représente la valeur de l'axe X pour la bande inconnue.
6. Utilisez la ligne tracée à l'étape 3 pour estimer la taille des bandes inconnues.

Questions relatives à la courbe standard d'électrophorèse:

1. Décris la différence de forme des lignes que tu as dessinées en traçant tes lignes sur un échelle linéaire versus échelle logarithmique.
2. Pourquoi pensez-vous que lorsque vous créez un graphique comme celui-ci, les gens utilisent généralement une échelle logarithmique?
3. La plus petite bande que vous avez mesurée dans votre échelle d'ADN était de 100 paires de bases. Imaginez que vous avez eu un groupe qui a parcouru 5 millimètres plus loin que votre plus petit groupe. Sur quel graphique serait-il plus facile d'estimer la taille de cette bande?
4. Selon vos estimations obtenues à partir de ce graphique, quelle est la taille des trois fragments de taille inconnue que vous avez mesurée sur votre gel?
5. Expliquez pourquoi une échelle d'ADN ou un autre marqueur de poids moléculaire est nécessaire lors de l'exécution d'agarose des gels.

Extension: Analyse de la séquence codante de la bêta-globine

Les 60 premières paires de bases des allèles HbS et HbA de la bêta-globine humaine sont présentées ci-dessous.

```

ATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAAC
TACCACGTAGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCCCGTTCCACTTG
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
ATGGTGCATCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAAC
TACCACGTAGACTGAGGACACCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCCCGTTCCACTTG
    
```

Utilisez ces séquences pour répondre aux questions suivantes.

1. Il y a deux séquences énumérées ci-dessus. L'un est l'allèle normal de la bêta-globine (HbA) et l'autre l'allèle bêta-globine drépanocytaire (HbS). Pour distinguer les deux séquences, nous utilisons l'enzyme de restriction Ddel. Ddel reconnaît la séquence suivante:



N, dans ce cas, signifie que le nucléotide moyen de la séquence pourrait être l'un quelconque des quatre nucléotides. Les séquences CTAAG, CTTAG, CTGAG et CTCAG seraient toutes coupées par Ddel. La ligne indique exactement où se produit la coupure dans le brin d'ADN.

Identifiez le site coupé dans les séquences ci-dessus : tracez la ligne où l'enzyme de restriction coupe comme vous le voyez ici.

2. Ddel ne coupe que l'allèle HbA (bêta-globine normale). Il ne coupe pas l'allèle HbS (bêtaglobine drépanocytaire). En fonction de l'endroit où vous avez identifié le site de coupe pour Ddel, identifiez le brin correspondant à HbA et qui est HbS.

Transcription et traduction

3. Les séquences ci-dessus codent pour les 20 premiers acides aminés de la sous-unité bêta-globine. Cependant, la protéine doit d'abord transcrire la séquence d'ADN en ARNm. Utilisez le brin inférieur de chaque séquence comme brin modèle. Quel

mRNA Codon Table

		Second Position Nucleotide						
		U	C	A	G			
U	UUU	Phenylalanine (Phe, F)	UCU	Serine (Ser, S)	UAU	Tyrosine (Tyr, Y)	UGU	Cysteine (Cys, C)
	UUC		UCC		UAC		UGC	
	UUA	Leucine (Leu, L)	UCA		UAA	STOP	UGA	STOP
	UUG		UCG		UAG		UGG	Tryptophan (Trp, W)
C	CUU		CCU	Proline (Pro, P)	CAU	Histidine (His, H)	CGU	Arginine (Arg, R)
	CUC	Leucine (Leu, L)	CCC		CAC		CGC	
	CUA		CCA		CAA	Glutamine (Gln, Q)	CGA	
	CUG		CCG		CAG		CGG	
A	AUU		ACU	Threonine (Thr, T)	AAU	Asparagine (Asn, N)	AGU	Serine (Ser, S)
	AUC	Issoleucine (Ile, I)	ACC		AAC		AGC	
	AUA		ACA		AAA	Lysine (Lys, K)	AGA	Arginine (Arg, R)
	AUG	Methionine (Met, M) START	ACG		AAG		AGG	
G	GUU		GCU	Alanine (Ala, A)	GAU	Aspartic Acid (Asp, D)	GGU	Glycine (Gly, G)
	GUC	Valine (Val, V)	GCC		GAC		GGC	
	GUA		GCA		GAA	Glutamic Acid (Glu, E)	GGA	
	GUG		GCG		GAG		GGG	

ARNm sera transcrit à partir de chaque séquence?

4. Maintenant que vous avez transcrit l'ADN, utilisez la table des codons de l'ARNm pour traduire l'ARNm.

Quelle sera la séquence d'acides aminés obtenue pour chaque séquence? Encerclez la différence entre les deux séquences d'acides aminés.

5. Comparez cette séquence d'acides aminés à la séquence indiquée dans les «informations générales». Avez-vous remarqué des différences?

Extension: drépanocytose et paludisme

La drépanocytose provoque une maladie à vie et réduit la durée de vie globale. Dans certaines régions d'Afrique, on estime que 90% des enfants nés avec l'anémie falciforme ne vivent pas jusqu'à l'âge de cinq ans. Des allèles qui réduisent ainsi la forme physique d'un individu devraient disparaître des populations au fil du temps par la sélection naturelle. La question est donc de savoir pourquoi l'allèle drépanocytaire (HbS) est-il trouvé à une fréquence aussi élevée dans certaines régions du monde? La réponse est surprenante: le paludisme. Le paludisme est une infection transmissible par le sang transmise par les moustiques. Les parasites qui causent le paludisme proviennent tous du genre *Plasmodium*. *Plasmodium falciparum* est le plus mortel de ces parasites et est également responsable de la plupart des infections paludéennes. Les humains sont infectés quand un moustique les pique, et Plasmodia continue à se reproduire dans les globules rouges humains. Quand une personne infectée est piquée par un moustique, le parasite du paludisme est absorbé et peut ensuite se propager à d'autres personnes. Le paludisme tue plus d'un million de personnes chaque année, principalement des enfants de moins de cinq ans, et infecte plusieurs centaines de millions de personnes supplémentaires, causant des symptômes sévères et perpétuant le cycle de transmission.

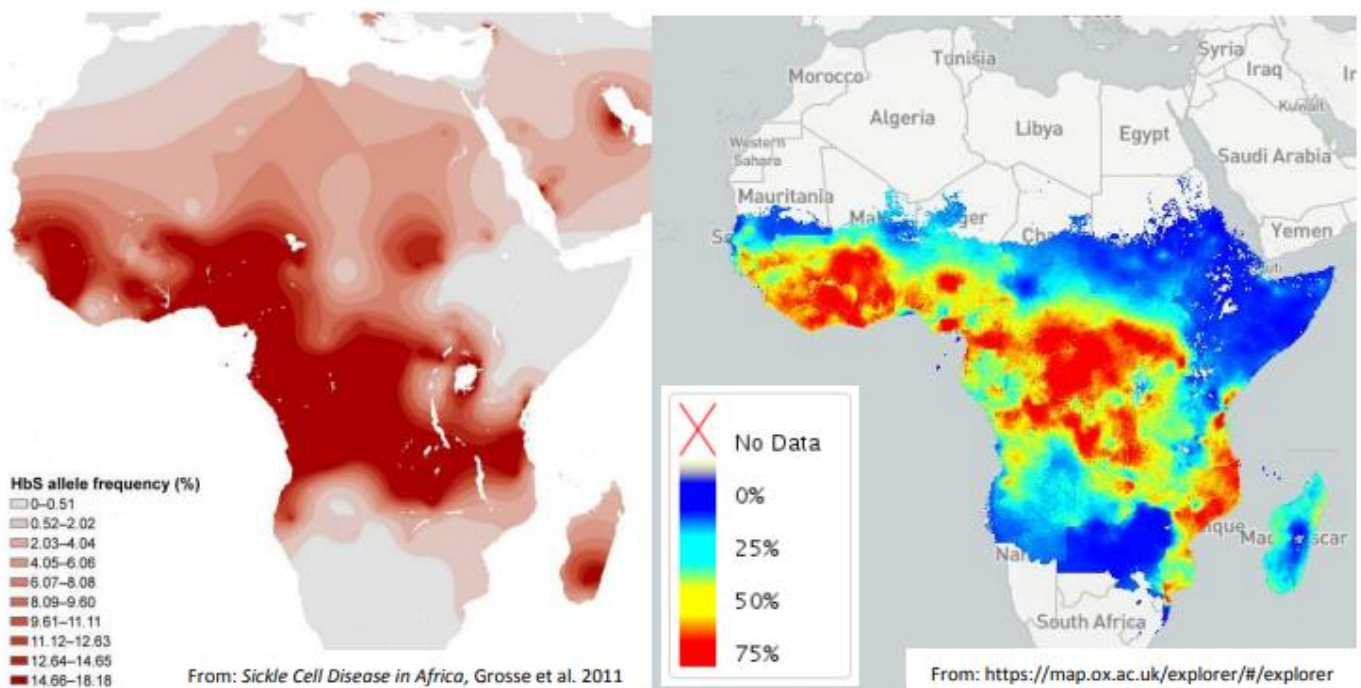


Figure 2.

Map A (Left) – Frequency of the HbS allele in Africa.

Map B (Right) – Percentage of 2-10-year-olds infected with *Plasmodium falciparum*, the parasite responsible for malaria, in the year 2000.

Lorsque le parasite du paludisme infecte les globules rouges, il peut provoquer la drépanocytose si la drépanocytose est présente. Pour les personnes qui sont homozygotes pour l'allèle HbS, cela peut être extrêmement dangereux. Chez les individus qui sont hétérozygotes et qui portent un allèle HbS et un allèle HbA, cependant, juste assez de leurs cellules infectées par la drépanocytose pour que la rate les retire du corps, en réduisant leur taux global d'infection par le parasite Plasmodium. Pour cette raison, les personnes atteintes du trait drépanocytaire montrent une certaine résistance au paludisme. Le paludisme continue à toucher ces personnes, mais elles sont moins susceptibles d'en mourir. L'examen des cartes de répartition du paludisme et de la drépanocytose indique avec quelle clarté les deux maladies interagissent. En Afrique, dans les régions où le paludisme est répandu, la drépanocytose est également extrêmement pathogène.

Dans les régions où le paludisme est absent, il en va généralement de même de la drépanocytose. **C'est un cas de ce que l'on appelle l'avantage hétérozygote.** Dans l'avantage hétérozygote, les deux formes de l'homozygote sont, pour une raison quelconque, moins résistantes que l'hétérozygote. Dans le cas de la bêta-globine, une personne homozygote pour l'HbA a une bonne condition physique liée à la fonction sanguine, mais est plus susceptible de mourir du paludisme. Une personne homozygote pour l'HbS est susceptible de mourir de drépanocytose. Les personnes hétérozygotes, cependant, risquent moins de mourir du paludisme et présentent peu ou pas de symptômes de drépanocytose.

Lorsque l'allèle drépanocytaire est rare dans la population, la plupart des allèles HbS se retrouvent chez les hétérozygotes et très peu de personnes contractent la drépanocytose. Dans les régions touchées par le paludisme, ces personnes bénéficieront d'une protection antipaludique et transmettront l'allèle HbS, augmentant ainsi sa fréquence dans la population. À mesure que l'allèle drépanocytaire devient plus commun, de plus en plus d'individus naîtront sous la forme d'homozygotes HbS. Étant donné que la drépanocytose était presque toujours fatale, du moins jusqu'à tout récemment, les individus homozygotes ne transmettaient pas leurs allèles, ce qui réduisait la fréquence de la drépanocytose. Tant que le paludisme est présent, les allèles HbS et HbA resteront équilibrés de cette manière, conduisant à l'autre nom de ce phénomène, un polymorphisme équilibré.

La drépanocytose et le paludisme

1. En regardant les taux de drépanocytose sur la carte A, décrivez quelle région de l'Afrique a le taux les plus élevés de l'allèle HbS?
2. Comparez la carte A à la carte B et expliquez la relation que vous voyez.
3. La traite négrière atlantique qui a amené des millions d'Africains sur le continent américain en général a amené des gens de la côte ouest de l'Afrique centrale. Sachant cela, pensez-vous que la drépanocytose est une préoccupation sérieuse dans les populations afro-américaines?
4. Comme décrit ci-dessus, dans les zones à forte prévalence du paludisme, le trait drépanocytaire peut être à votre avantage. Qu'est-ce qui semble le plus désavantageux dans ces domaines, avoir la drépanocytose ou une hémoglobine normale? Expliquez votre réponse.
5. Sur la base de votre réponse précédente, quel allèle pensez-vous être plus courant dans les populations où le paludisme est présent, l'allèle HbA ou l'allèle HbS?

Extension: Calcul avec Hardy-Weinberg Equilibrium

p = fréquence de l'allèle HbA $p + q = 1$

q = fréquence de l'allèle HbS

$2 + 2pq + q^2 = 1$

1. Dans les populations afro-américaines aux États-Unis, on pense que la fréquence de l'allèle HbS est proche de 0,04. Utilisez l'équilibre de Hardy-Weinberg pour estimer la fréquence de la population américaine qui aura une hémoglobine normale, le trait drépanocytaire et une drépanocytose.

2. Au Nigéria, on estime que 3% des nouveau-nés sont atteints de drépanocytose. Utilisez l'équilibre de Hardy-Weinberg pour estimer p et q pour cette population.

3. En utilisant vos réponses pour p et q du problème précédent, quel pourcentage de la population vous attendez-vous à avoir le trait drépanocytaire, mais pas la drépanocytose?

4. Nous avons utilisé l'équilibre de Hardy-Weinberg pour nous donner des estimations des fréquences attendues de la drépanocytose dans différentes populations. Vous attendriez-vous à ce que les allèles HbA et HbS soient dans un équilibre parfait de Hardy-Weinberg? Pourquoi ou pourquoi pas?

Ressources supplémentaires

Ressources supplémentaires pour les enseignants

GeneEd - Anémie falciforme - Une gamme de ressources gérées par la National Library of Medicine

(NLM) et l'Institut national du génome humain (NHGRI).

https://geneed.nlm.nih.gov/topic_subtopic.php?tid=142&sid=149

Sickle Cell DNA - Jeu simple basé sur une animation flash présentant plusieurs des mêmes concepts génétiques

liés à la drépanocytose comme discuté dans ce kit. <http://edheads.org/page/DNA>

The Malaria Atlas Project - Cartes interactives montrant la distribution du paludisme, du sang associé

les troubles et autres indices liés au paludisme. <https://map.ox.ac.uk/>

Électrophorèse sur gel (via le centre d'apprentissage des sciences génétiques de l'Utah):

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>