

### A RÉCEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :

- ⚡ Placer le sachet noté 0 à **- 20°C** ⚡
- ⚡ Placer le flacon de rouge ponceau et l'agarose à **température ambiante**
- Laisser le flacon de tampon tris Glycine et l'acide éthanoïque à **température ambiante**

Attention : Ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation générale des produits du kit de 6 mois.

- Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

### COMPOSITION pour 48 dépôts (24 binômes max) sur 6 ou 8 gels :

- 2 g d'agarose (QSP 200 ml de gels à 1% de 3 mm d'épaisseur)
- 1 flacon noté « tampon tris Glycine 10X »
- 1 sachet noté 0 de 2 microtubes à stocker à **- 20 °C** contenant :
  - 1 microtube à bouchon de couleur rouge de 300µL de solution d'hémoglobine A
  - 1 microtube à bouchon de couleur mauve de 300µL de solution d'hémoglobine S
  - 1 microtube à bouchon blanc de bleu de dépôt 10X
- 1 flacon de 500 ml de rouge ponceau prêt à l'emploi
- Acide éthanoïque à 5%

### MATÉRIEL NÉCESSAIRE :

- Pipettes de 10/20 ml
- Poire à pipeter ou Pipump
- Fiole de 1 L
- Flacon de 1 L
- Balance
- Erlenmeyer (ou flacon) de 250 ml (pour préparer les gels)
- Feutres permanents
- Gants
- Lunettes de protection
- Microtubes Eppendorf + portoirs
- Récipient pour bains de coloration et de décoloration
- Cuves à électrophorèse + générateurs (cuves Bluegel Conseillées)
- Micropipettes 2-20 µL + embouts
- Eau distillée
- Poubelles de table

### OBJECTIFS COGNITIFS

L'utilisation du kit repose sur la situation de prédiction médicale recréée artificiellement compte tenu de l'interdiction d'utiliser des prélèvements d'origine humaine en travaux pratiques. On considère une famille fictive dans laquelle l'hémoglobine drépanocytaire est présente et pour laquelle on souhaite établir les génotypes des individus et l'arbre généalogique de façon à évaluer la probabilité que la maladie se manifeste chez un enfant à naître. Les hémoglobines des parents et de leurs enfants sont reconstituées à partir des solutions fournies. Ces dernières sont préparées chez Sordalab à partir de cristaux d'hémoglobine qui garantissent l'absence de tout germe pathogène dans les solutions. L'hémoglobine des individus hétérozygotes est reconstituée en mélangeant un volume de chacune des deux solutions A et S tandis que l'hémoglobine des individus homozygotes correspond à chacune des deux solutions A et S fournies qui sont utilisées directement. Le kit fournit également le reste du matériel consommable nécessaire pour réaliser l'électrophorèse.

**RAPPELS**

**Introduction générale sur la drépanocytose, les hémoglobines et l'électrophorèse :**

La drépanocytose ou anémie falciforme est l'hémoglobinopathie héréditaire la plus répandue dans le monde : elle affecte plusieurs centaines de milliers de personnes dont plus de 5 000 en France.

Dans cette maladie, lorsque la pression partielle en oxygène est faible, comme dans les capillaires périphériques, l'hémoglobine des sujets atteints a tendance à polymériser en longues fibres rigides qui déforment les globules rouges en leur conférant une forme de faucille qui les empêche de passer dans les capillaires les plus fins, freinant ou bloquant leur circulation.

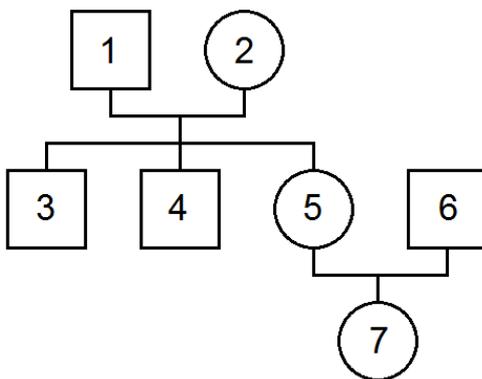
L'hémoglobine anormale, S (*sickle*), ne diffère de l'hémoglobine normale, A, que par un seul acide aminé de la chaîne bêta en position 6 (acide glutamique remplacé par valine). Les deux allèles ne diffèrent que par un codon.

On peut distinguer les deux hémoglobines par leur mobilité électrophorétique. La caractérisation et la comparaison de diverses protéines peut être aisément réalisée par électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose ou sur gel d'agarose. En appliquant la technique à l'hémoglobine extraite des globules rouges d'un individu, on peut donc déterminer quelle(s) hémoglobine(s) il possède et en déduire son génotype : hétérozygote, HbA/HbS ou homozygote HbA/HbA ou HbS/HbS. Ainsi, il est possible d'étudier les relations génotype-phénotype mais aussi de construire un arbre généalogique et de faire des prévisions en génétique humaine.

En outre, l'identification des génotypes dans diverses populations permet d'établir la fréquence des allèles et de relier génétique et évolution.

**Exercice proposé :**

Les élèves disposent de tubes témoins contenant l'hémoglobine A et l'hémoglobine S et de tubes numérotés de 1 à 6 correspondants aux hémoglobines des individus d'une famille dont l'arbre généalogique est le suivant :



Après électrophorèse, les élèves doivent déterminer les génotypes des individus 1 à 6 et en déduire les génotypes possibles pour l'individu 7. Des scénarios différents peuvent aussi être envisagés !

**PRÉPARATION**

**I. PRÉPARATION DU TAMPON TRIS-GLYCINE 1X**

(Étape réalisable à l'avance et conservation de la solution à l'abri de la lumière à 4°C pendant 1 mois)

- Versez le contenu du flacon « tampon tris Glycine 10X » dans une fiole jaugée de 1 L
- Remplissez le flacon « tampon tris Glycine 10X » d'eau distillée. Homogénéisez et versez dans la fiole de 1 L
- Complétez la fiole de 1 L avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- Transférez le contenu de la fiole dans un flacon noté « tampon tris Glycine 1X »

Conserver au réfrigérateur à + 4°C pendant 1 mois.

**II. PRÉPARATION DES GELS D'AGAROSE A 1% DE 3 mm D'ÉPAISSEUR**

**Pour réaliser 100 ml de gel d'agarose :**

- Dans un erlenmeyer de 250 ml, pesez 1 g d'agarose.
- Ajoutez 105 ml de tampon Tris-Glycine 1x (105 ml pour tenir compte de l'évaporation). Portez à ébullition au micro-ondes pour dissoudre l'agarose.
- Une fois l'agarose dissous, contrôlez la température avec un thermomètre. Attendez que la température descende à 55°C avant de couler les gels.
- Coulez les gels de manière à ce qu'ils fassent 3 mm d'épaisseur :
  - o Si vous disposez d'une cuve Bluegel, le volume d'un gel est 10 ml
  - o Si vous disposez d'un autre type de cuve, calculez le volume du gel à couler (ex : 18 mL pour des cuves Jeulin).
- Quand les gels d'agarose ont pris, enlevez délicatement les peignes.

**ATTENTION : pour faciliter les étapes de coloration et de décoloration, les gels doivent faire 3 mm d'épaisseur avec des puits de 2 mm de profondeur et d'un volume d'au moins 12 µL.**

Si les peignes fournis avec vos cuves pour la préparation des gels ne permettent pas de couler de tels gels, des fichiers permettant d'imprimer des peignes pour différentes cuves sont disponibles au format STL (impression 3D) sur le site de Sordalab.

Sinon, vous pouvez le faire avec des gels plus épais (standards) mais les étapes de coloration et décoloration seront un peu plus longues.

### III. RÉALISATION DES SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE A DÉPOSER

Pour plus de clarté, vous pouvez noter A le microtube à bouchon rouge du sachet O stocké au congélateur et noter S le microtube à bouchon mauve.

#### A. Version 6 gels d'agarose :

La quantité d'hémoglobine fournie dans le kit est idéale pour préparer 6 gels avec 8 échantillons par gel :

- 2 témoins HbA et HbS.
- Les hémoglobines des individus 1 à 6.

*NB : le bleu de dépôt contient du glycérol, il sert à augmenter la densité des solutions d'hémoglobines pour éviter qu'elles se diluent dans le tampon lors des dépôts. De plus, le bleu de dépôt permet de visualiser l'avancée de l'électrophorèse.*

#### I. Préparation des solutions d'hémoglobine :

- a. Notez un microtube A.
  - Prélevez à la micropipette 144 µL de HbA (bouchon rouge) et versez-les dans le tube A.
  - Prélevez à la micropipette 16 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez-les dans le tube A.
  - Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.
- b. Notez un microtube S.
  - Prélevez à la micropipette 144 µL de HbS (bouchon mauve) et versez-les dans le tube S.
  - Prélevez à la micropipette 16 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez-les dans le tube S.
  - Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.
- c. Notez un microtube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 144 µL de HbA (bouchon rouge) et versez les dans le tube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 144 µL de HbS (bouchon mauve) et versez les dans le tube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 32 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez les dans le tube A/S.
  - Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.

#### II. Aliquotage des solutions d'hémoglobine :

Dans notre scénario, les individus 1, 2, 3 et 6 sont hétérozygotes HbA/HbS, l'individu 4 est homozygote HbA/HbA et l'individu 5 est homozygote HbS/HbS.

Pour chaque gel, les élèves disposent de 2 tubes témoins notés A et S ainsi que 6 tubes contenant les hémoglobines des 6 individus. Chaque tube contient 12 µL de solution d'hémoglobine.

#### a. Aliquotez les solutions d'hémoglobines :

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6
Tube A	12 µL					
Tube S	12 µL					
Tube 1 (A/S)	12 µL					
Tube 2 (A/S)	12 µL					
Tube 3 (A)	12 µL					
Tube 4 (S)	12 µL					
Tube 5 (A/S)	12 µL					
Tube 6 (A/S)	12 µL					

Ces tubes se conservent à - 20 °C pendant 6 mois

#### B. Version alternative 8 gels d'agarose :

Il est aussi possible de préparer 8 gels d'agarose. Cependant, les élèves ne pourront faire migrer que les hémoglobines de 4 individus sur le même gel.

#### 1. Préparation des solutions d'hémoglobine :

- a. Notez un microtube A.
  - Prélevez à la micropipette 162 µL de HbA (bouchon rouge) et versez les dans le tube A.
  - Prélevez à la micropipette 18 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez les dans le tube A.
  - Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.
- b. Notez un microtube S.
  - Prélevez à la micropipette 162 µL de HbS (bouchon mauve) et versez les dans le tube S.
  - Prélevez à la micropipette 18 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez les dans le tube S.

- Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.
- c. Notez un microtube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 126 µL de HbA (bouchon rouge) et versez les dans le tube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 126 µL de HbS (bouchon mauve) et versez les dans le tube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 28 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez les dans le tube A/S.
  - Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.

## 2. Aliquotage des solutions d'hémoglobine :

Pour chaque gel, les élèves disposent de 2 tubes témoins notés A et S ainsi que 4 tubes contenant les hémoglobines des 4 individus. Chaque tube contient 12 µL de solution d'hémoglobine.

- Aliquotez les solutions d'hémoglobines :

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6	Gel 7	Gel 8
Tube A	12 µL							
Tube S	12 µL							
Tube 1 (A/S)	12 µL			12 µL	12 µL	12 µL	12 µL	
Tube 2 (A/S)	12 µL	12 µL			12 µL	12 µL	12 µL	12 µL
Tube 3 (A)	12 µL	12 µL	12 µL			12 µL	12 µL	12 µL
Tube 4 (S)	12 µL	12 µL	12 µL	12 µL			12 µL	12 µL
Tube 5 (A/S)		12 µL	12 µL	12 µL	12 µL			12 µL
Tube 6 (A/S)			12 µL	12 µL	12 µL	12 µL		

*Ces tubes se conservent à - 20 °C pendant 6 mois.*

## C. Version alternative 10 gels d'agarose :

Il est aussi possible de préparer 10 gels d'agarose. Cependant, les élèves ne pourront faire migrer que les hémoglobines de 3 individus sur le même gel.

### 3. Préparation des solutions d'hémoglobine :

- a. Notez un microtube A.
  - Prélevez à la micropipette 171 µL de HbA (bouchon rouge) et versez les dans le tube A.
  - Prélevez à la micropipette 19 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez les dans le tube A.
  - Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.
- b. Notez un microtube S.
  - Prélevez à la micropipette 171 µL de HbS (bouchon mauve) et versez les dans le tube S.
  - Prélevez à la micropipette 19 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez les dans le tube S.
  - Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.
- c. Notez un microtube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 117 µL de HbA (bouchon rouge) et versez les dans le tube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 117 µL de HbS (bouchon mauve) et versez les dans le tube A/S.
  - Prélevez à la micropipette 26 µL de bleu de charge (bouchon blanc) et versez les dans le tube A/S.
  - Homogénéisez la solution avant de l'aliquoter.

### d. Aliquotage des solutions d'hémoglobine :

Pour chaque gel, les élèves disposent de 2 tubes témoins notés A et S ainsi que 3 tubes contenant les hémoglobines des 3 individus. Chaque tube contient 12 µL de solution d'hémoglobine

- Aliquotez les solutions d'hémoglobines :

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6	Gel 7	Gel 8	Gel 9	Gel 10
Tube A	12 µL									
Tube S	12 µL									
Tube 1 (A/S)	12 µL									
Tube 2 (A/S)	12 µL									
Tube 3 (A)	12 µL									
Tube 4 (S)		12 µL								
Tube 5 (A/S)		12 µL								
Tube 6 (A/S)		12 µL								

*Ces tubes se conservent à - 20 °C pendant 6 mois.*

**MANIPULATION :**

Répartissez les élèves en fonction du nombre d'électrophorèses : chaque élève doit réaliser au moins un dépôt.

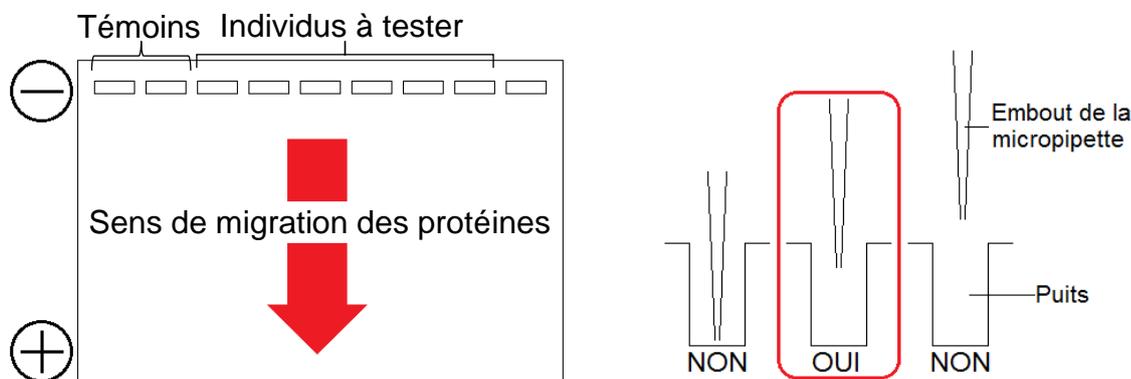
**I. Préparations des cuves à électrophorèse :**

- ✓ Si vous disposez de cuves Bluegel : déposez le gel et ajouter 18 ml de tampon tris-glycine 1X (le tampon recouvre à peine le gel).
- ✓ Si vous disposez d'un autre type de cuve à électrophorèse : référez-vous à la notice de la cuve (gel immergé ou non).

**II. Dépôts des échantillons d'hémoglobines :**

Vous disposez de deux solutions d'hémoglobine témoins A et B ainsi que de six solutions d'hémoglobine d'individus à tester (version 6 gels) ou de quatre solutions d'hémoglobine d'individus à tester (version 8 gels) ou de 3 solutions à tester (version 10 gels).

Déposez 10 µL de solution d'hémoglobine par puit. Il faut procéder délicatement !



👁️ **ATTENTION** 👁️ : Changez d'embout de micropipette entre chaque dépôt !

**III. Migration :**

Si vous disposez d'une cuve Bluegel, la migration dure environ 60 min.

Si vous disposez d'un autre type de cuve à électrophorèse, réglez l'alimentation sur 100 V et attendez que le bleu de dépôt ait atteint l'extrémité du gel pour arrêter l'électrophorèse.

**IV. Coloration :**

Sortez le gel d'agarose de la cuve à électrophorèse.

Rincez le gel à l'eau distillée.

Placez le gel dans un récipient (cristalliseur, etc...) et recouvrez de rouge Ponceau (le gel doit être complètement immergé) pendant 10 min en agitant de temps en temps.

Récupérez-le rouge Ponceau dans un flacon (réutilisable).

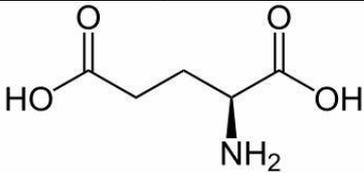
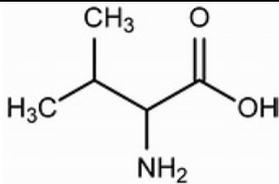
Rincez le gel 5 fois à l'eau du robinet (remplissez et videz le récipient en retenant délicatement le gel).

Recouvrez le gel avec de l'acide éthanoïque à 5% (le gel doit être complètement immergé) pendant 10/20 min en agitant de temps en temps (les résultats sont exploitables après 10 min de décoloration) : visualisez les résultats en plaçant les gels sur un fond noir avec un éclairage rasant.

Il est possible de conserver les gels dans de l'eau du robinet. La décoloration va se poursuivre et sera complète en 24h.

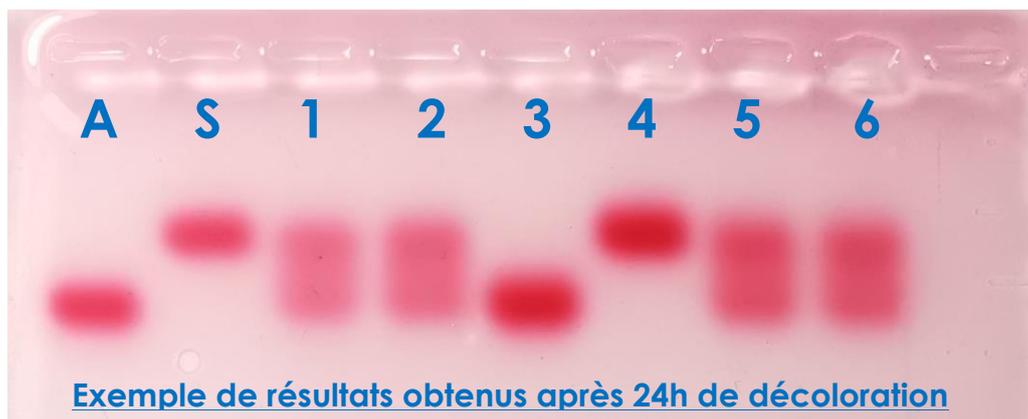
**RÉSULTATS ATTENDUS ET INTERPRÉTATION**

Les deux hémoglobines A et S ne diffèrent que par un acide aminé de la chaîne  $\beta$  (constituée de 146 AA). C'est pourquoi la différence de migration est si faible.

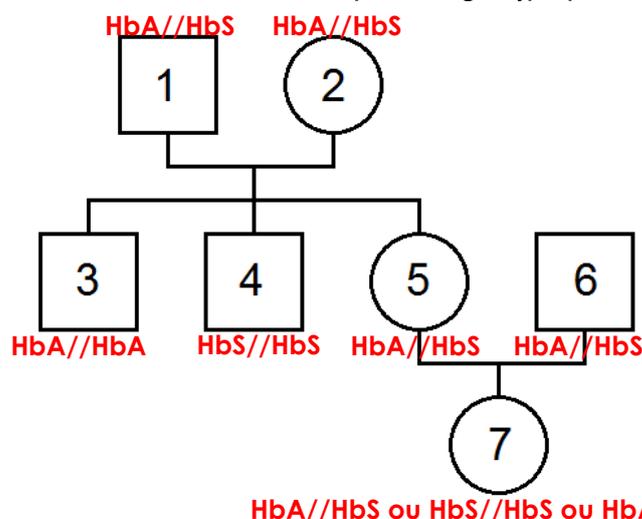
HbA	HbS
Acide glutamique	Valine
	

En conditions natives, les protéines migrent en fonction de leur masse molaire, de leurs charges électriques et de leurs formes. L'hémoglobine A est plus rapide. Pourtant elle possède une masse molaire légèrement plus importante. Ce n'est donc pas le critère dominant. L'hémoglobine A porte une fonction COOH supplémentaire :  
 $\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$  Elle migre plus vite car la migration se fait vers l'anode (+).

**NB** : la différence de migration est très faible.



Avec les dépôts réalisés, les élèves peuvent reconstituer l'arbre suivant et prédire les génotypes possibles pour l'enfant 7 :



Le génotype de l'individu 7 sera HbA//HbS ou HbS//HbS ou HbA//HbA.

**FICHE SECURITÉ (guide non exhaustif)**

L'acide éthanoïque à 5% nécessite le port de gants, de lunettes et d'une blouse.

Le tampon tris Glycine et les hémoglobines ne requièrent pas de précautions d'utilisation particulières. Nous vous recommandons tout de même de manipuler ces avec des gants pour éviter tout danger.

Le colorant rouge Ponceau se manipule avec blouse, gants et lunettes.

- FDS :

<https://www.sordalab.com/RESSOURCES/documents/FR/SR350.pdf>

<https://www.sordalab.com/RESSOURCES/documents/FR/SR036.pdf>



Tampon  
Tris-Glycine 10X



Rouge Ponceau

**FICHE CONSERVATION**

**Le flacon noté « tampon tris Glycine »** doit être stocké à **température ambiante** et est conservable jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette

**Le tampon tris Glycine en solution se conserve à température ambiante ou 4°C** pendant un mois.

**La solution de rouge ponceau** se conserve 6 mois à + 4°C à l'abri de la lumière.

**1 sachet noté 0** de 2 microtubes à stocker de **20 °C** contenant :

- 1 microtube à bouchon rouge de 300µL de solution d'hémoglobine A est conservable 6 mois
- 1 microtube à bouchon violet de 300µL de solution d'hémoglobine S est conservable 6 mois
- 1 microtube à bouchon blanc de bleu de dépôt 10X

La solution d'hémoglobine S et A et le bleu de dépôt se conservent pendant 6 mois à 20 °C

👁 👁 **ATTENTION** 👁 👁 : les températures de conservation doivent être respectées pour que les rées de conservation soient applicables.

**FICHE TRI ET RÉCUPÉRATION**

Les hémoglobines et le tampon tris Glycine peuvent être jetés à l'évier.

Le rouge Ponceau peut être jeté à l'évier mais surtout pas dans un container contenant des bases fortes ou des acides forts.

L'acide acétique doit être jeté dans les containers à acide.

Les tubes en plastique non contaminés avec des produits dangereux peuvent être jetés dans les bacs de récupération plastique.