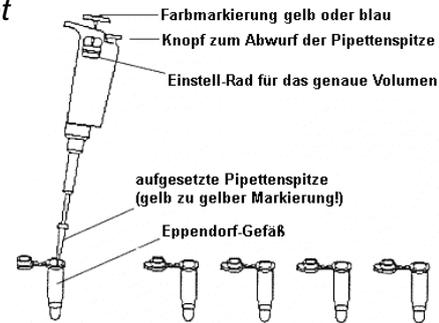


## ADN - Empreintes génétiques

„ ...parce que tôt ou tard nous trouverons le coupable !“

**Entraînement :** Laissez-moi tout d'abord vous expliquer la manipulation et le fonctionnement des micropipettes : mettez le cône (en plastique) au bout de la pipette et exercez-vous à prélever de faibles quantités (10, 4, 2 µl).



...et maintenant, c'est parti ! :

**1. Annotez** quatre „Eppis“ (Eppendorf-Gefäße = tubes Eppendorf) avec les lettres A, B, C, T.  (= Abréviations pour les noms des suspects A-à-C) et respectivement l'échantillon d'ADN du coupable (T) (ADN trouvé sur le lieu du crime = Tatort))

**2. Prélevez et mettez** les substances suivantes dans les 4 „Eppis“

↓ Réactifs (substances à prélever)	Vos „Eppis“ →	Couleur du couvercle du flacon	A	B	C	T
1. Tampon B		vert	2 µl <input type="checkbox"/>			
<b>Rappel: Il faut changer le cône de la pipette après chaque prélèvement *)</b>						
2. Enzyme de restriction 1 (HindIII)	<del>AAGCTT</del> <del>TTCGAA</del>	bleu	2 µl <input type="checkbox"/>			
3. Enzyme de restriction 2 (BamHI)	<del>GGATCC</del> <del>CCTAGG</del>	rouge	2 µl <input type="checkbox"/>			
4. eau stérile (H <sub>2</sub> O)		blanc	4 µl <input type="checkbox"/>			
5. ADN (toujours un seul prélèvement d'ADN par „Eppis“ et cela en très petite quantité!!!!!!)		jaune	Anton 10 µl <input type="checkbox"/>	Berti 10 µl <input type="checkbox"/>	Curil 10 µl <input type="checkbox"/>	Tatort 10 µl <input type="checkbox"/>

\*) Si nécessaire, la préparation peut aussi être centrifugée entre deux étapes de remplissage. Les différentes étapes de prélèvement peuvent être effectuées dans le désordre, Notez vous juste quelle substance a déjà été introduite, par exemple en cochant la case .

**3. Centrifugez** les 4 „Eppis“ pendant 10 secondes.

(Veuillez positionner les „Eppis“ en diagonale, afin qu'il n'y ait pas de déséquilibre dans la centrifugeuse.)

**4. Mélangez** le contenu des „Eppis“ en les tapotant du bout des doigts (cf.: image ci-contre), **centrifugez** à nouveau pendant 10 secondes et **incubez** les préparations pendant 50 minutes dans le « thermo-bloc » à 37°C (Niveau 3,4)



**5. Fabrication du gel**

**Pesez 0,4 g d'agarose** dans le tube en verre (mettez la tare) et **diluez** l'agarose dans

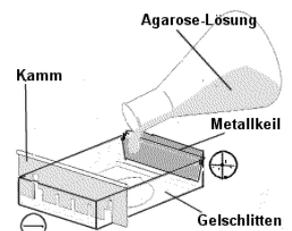
**40 ml de tampon TAE** (=TAE Puffer-frisch → Solution préparée).

**Chauffez** la solution obtenue dans le micro-onde, jusqu'à ce qu'elle soit claire – observez le processus par la vitre, la solution ne doit pas bouillir (environ 1 min).

**6. Faire couler** le gel refroidi à environ 50°C (chaleur limite au toucher) délicatement dans le bac à électrophorèse (préalablement préparé) et **posez** le „peigne à puits côté de l'électrode noire (pôle négatif) dans le gel encore fluide (le durcissement du gel dure environ 30 minutes.)

**Retirez** délicatement le peigne après environ 20 minutes !

**Regardez l'heure !**



## -Partie théorique -

**7. Suivez les explications et la démonstration** vous expliquant comment remplir les puits réalisés dans le gel et **exercez-vous** sur les gels préalablement préparés.

**En plaçant** les cales noires en dessous des puits, vous aurez plus de contraste.

**8. Sortez** les „Eppis“ (A, B, C, T) du bain marie et **ajoutez** respectivement **4 µl** de colorant (couleur du couvercle du flacon : blanc) en plus

**Centrifugez** les „Eppis“ rapidement.

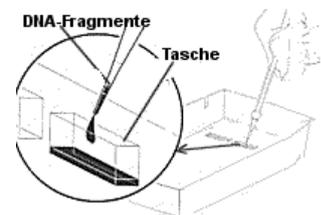
**9. Recouvrez** le gel durci complètement de solution de **tampon TAE-recyclée**.

**10. Prélevez** dans chaque „Eppi“ environ **8-9 µl** et **déposez** le contenu de la pipette dans les poches du gel.

**Videz** les pipettes à cette occasion seulement jusqu'au **premier niveau**

**Remplissez** avec chaque échantillon **deux poches**, ( il y a 16 poches et respectivement 24 µl à disposition).

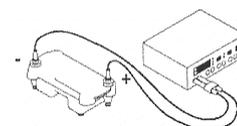
Commencez d'un côté et notez vous dans quel(s) puits se trouve chaque échantillon.



**11. Reliez** le bac à électrophorèse au générateur de tension, **mettez** ensuite l'appareil sous tension **100V** et **réglez** le pour une durée de 45 minutes.

**Mettez l'ensemble sous tension**.

(L'électrophorèse est finie, lorsque la couleur du front initial (pôle négatif) a atteint l'autre extrémité du bac (pôle positif)).



## -Pause-

**12. Retirez** le gel du bac et **faites le glisser** prudemment dans un récipient vide (où il pourra être coloré)

**Reversez** le tampon TAE (**TAE-Puffer**) du bac à électrophorèse dans sa bouteille initiale (**TAE Puffer - recycled Flasche**).

**13. Coloration : Attention !** Le colorant colore très intensivement les habits et la peau. ( portez des gants !!)

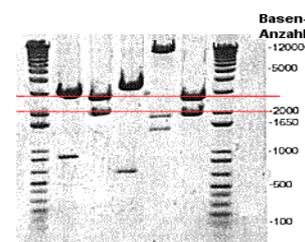
**Colorez** le gel en le **recouvrant** de solution colorante d'ADN recyclée (**DNA-Färbelösung – recycled**) pendant **10 minutes**.

**14. Décoloration : Reversez** la solution colorante dans sa bouteille initiale,  **couvrez** le gel d'eau chaude, **bougez** le récipient afin d'accélérer la décoloration et **changez l'eau** 3-4 fois.

**...c'est maintenant que ça devient intéressant :**

**14. Exploitation : Identifiez** votre coupable par la comparaison des différentes bandes et **présentez** votre résultat au professeur dans le silence comme le fait un véritable expert.

**15. Rangement : Veuillez jeter** tous les „Eppis“ et cônes à pipette (en plastique) utilisés à la poubelle. **Lavez et séchez** tout le matériel et **rangez** le ensuite dans l'armoire. Merci.



BioValley College Lab / NaT-Working-Biologie  
am Kant-Gymnasium Weil am Rhein – Ingo Kilian  
gefördert von Novartis, Interpharma  
und dem Regierungspräsidium Freiburg  
Experimente von Dr. Jan Brix und Dr. Chris Meisinger vom Institut  
für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Freiburg  
[www.biovalley-college.net](http://www.biovalley-college.net) / [www.nat-working-biologie.de](http://www.nat-working-biologie.de)