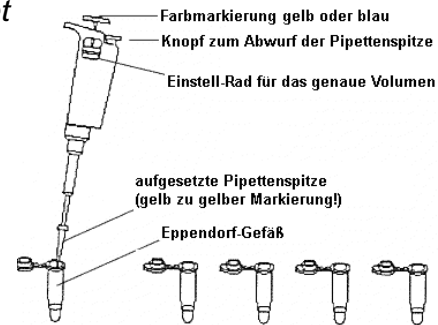


ADN - Empreintes génétiques

„ ...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"/>	2 µl <input type="checkbox"/>	2 µl <input type="checkbox"/>	2 µl <input type="checkbox"/>
Rappel: Il faut changer le cône de la pipette après chaque prélèvement *)						
2. Enzyme de restriction 1 (HindIII)	AAGCTT TTCGAA	bleu	2 µl <input type="checkbox"/>	2 µl <input type="checkbox"/>	2 µl <input type="checkbox"/>	2 µl <input type="checkbox"/>
3. Enzyme de restriction 2 (BamHI)	GGATCC CCTAGG	rouge	2 µl <input type="checkbox"/>	2 µl <input type="checkbox"/>	2 µl <input type="checkbox"/>	2 µl <input type="checkbox"/>
4. eau stérile (H ₂ O)		blanc	4 µl <input type="checkbox"/>	4 µl <input type="checkbox"/>	4 µl <input type="checkbox"/>	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).

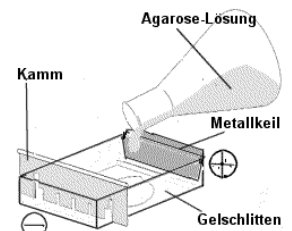
6. Faire couler le gel refroidi à environ 50°C (chaleur limite au toucher)

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 !



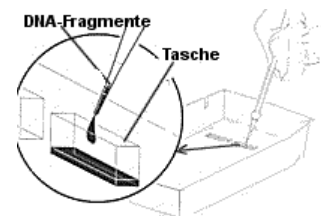
-Partie théorique -

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).

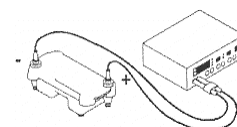
Commencez d'un côté et notez vous dans quel(s) puits se trouve chaque échantillon.



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-

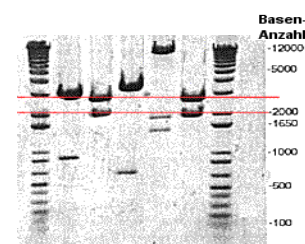
12. Retirez le gel du bac et **faites le glisser** prudemment dans un récipient vide (où il pourra être coloré)

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 / www.nat-working-biologie.de