



## KIT GENES DANS UN TUBE

### Réf. 910 078

#### Objectifs de l'expérience

Le but de l'expérience est d'extraire rapidement l'ADN soi-même des cellules de la joue, de visualiser l'ADN et de stocker l'ADN dans un gène dans un collier Tube™.

#### Table des matières

• Composants de l'expérience	Page 2
• Equipements nécessaires	Page 3
• Informations générales	Page 4
• Procédures de l'expérience	
○ Vue d'ensemble de l'expérience	Page 6
○ Isolation de l'ADN des cellules des joues	Page 7
○ Questions d'études	Page 8
• Guide de l'instructeur	
○ Préparations préalables	Page 9
○ Expériences d'extension facultatives basées sur l'enquête	Page 10
○ Résultats attendus	Page 11
○ Réponses – Questions d'études	Page 11

## Composants de l'expérience

Conservez les composants ci-dessous à température ambiante.

Composants	Validation (✓)
Tampon de lyse	<input type="checkbox"/>
Protéase	<input type="checkbox"/>
Tris-tampon	<input type="checkbox"/>
Solution FlashBlue™	<input type="checkbox"/>
Sachets de sel	<input type="checkbox"/>

## REACTIFS ET FOURNITURES

Conservez les composants ci-dessous à température ambiante.

Composants	Validation (✓)
Tubes transparents pour l'isolement de l'ADN	<input type="checkbox"/>
Tubes pour micro centrifugeuse avec bouchons	<input type="checkbox"/>
Petites pipetes de transfert	<input type="checkbox"/>
Pipetes de transfert calibrées	<input type="checkbox"/>
Colliers "String for Genes in a Tube™"	<input type="checkbox"/>
Gobelet en plastique jetable	<input type="checkbox"/>

**Cette expérience est conçue pour 26 isolations d'ADN.**

Tous les composants de l'expérience sont destinés à des recherches éducatives seulement. Ils ne conviennent pas à un usage diagnostic ou à titre médicamenteux et ne peuvent être administrés ou consommés par des humains ou des animaux.

## Equipements nécessaires

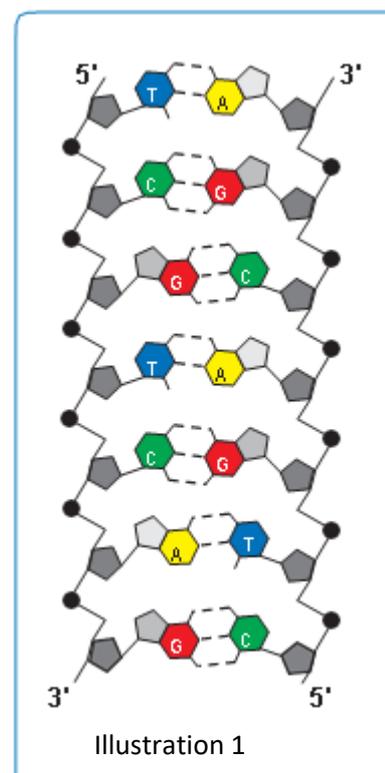
- Un congélateur/ de la glace froide 95% Éthanol ou alcool isopropylique (alcool à friction)
- Un bain-marie
- Des supports pour tubes à essai
- De la glace et des seaux à glace
- Des gants de laboratoire jetables
- Une centrifugeuse

## Informations générales

Tous les organismes vivants sont composés de cellules. Les organismes peuvent être soit unicellulaires, comme les bactéries, ou alors composés de nombreuses cellules différentes. Les organismes complexes, comme l'homme, sont composés de milliards de cellules différentes. Les cellules eucaryotes et procaryotes contiennent toutes deux un "code génétique", c'est-à-dire un schéma directeur du fonctionnement de la cellule. Ce code génétique est transmis de génération en génération lorsque la cellule ou l'organisme se reproduit. Les cellules eucaryotes contiennent des organites, qui sont des structures spécialisées, individuellement enfermées dans une cellule et ayant une fonction spécifique. Par exemple, les mitochondries sont responsables de la production d'énergie et les lysosomes sont responsables de la dégradation des déchets. En 1868, un biologiste du nom de Friedrich Miescher a montré que le noyau, un organite majeur des cellules eucaryotes, contenait un matériau qu'il a nommé acide nucléique. Bien que cette découverte soit intéressante, c'est presque 100 ans plus tard que ce matériel dans le noyau a été reconnu comme le porteur du code génétique.

On sait maintenant que le code génétique est porté sous la forme d'acide désoxyribonucléique (ADN). L'ADN est composé d'unités glucidiques désoxyribose et de bases azotées. La structure de l'ADN a été déterminée par James Watson, Francis Crick et Rosalind Franklin en 1953. Ils ont déterminé que l'ADN était une structure à double hélice, ce qui signifie qu'il ressemble à une échelle tordue. Les côtés de cette échelle sont constitués d'hydrates de carbone désoxyribose qui sont liés entre eux par des liaisons covalentes très fortes. Ces côtés sont communément appelés l'épine dorsale sucre-phosphate et servent de support aux échelons. Les barreaux de l'échelle sont en fait une paire de bases azotées maintenues ensemble par des liaisons hydrogène, avec une base de chaque côté (cf. illustration 1). Les bases azotées sont l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). En raison de leur structure, chaque base ne peut se connecter qu'à une seule autre base. Les paires de bases des bases azotées sont A-T et G-C. Ainsi, s'il y a un seul brin d'ADN de l'ordre de A-C-T-G, le brin opposé sera T-G-A-C.

Au cours du processus de division cellulaire, l'ADN fournit les informations nécessaires pour se copier (se répliquer), ce qui entraîne la transmission de l'information génétique à la génération suivante de cellules. L'ADN fournit également les instructions nécessaires à la fabrication de protéines pour diverses fonctions cellulaires. Certaines de ces protéines et enzymes sont impliquées dans la synthèse de l'ADN lui-même, comme la protéine ADN polymérase. En plus de la synthèse, les ADN polymérases ont la capacité d'éditer l'ADN nouvellement synthétisé afin de détecter d'éventuelles erreurs dans la correspondance des paires de bases et d'aider à réparer l'ADN qui est endommagé pendant la vie de la cellule. Ces dommages à l'ADN peuvent être dus à l'exposition à des substances cancérogènes et à des facteurs environnementaux tels que les rayons X et les UV du soleil.



Le génome humain est constitué de 2,9 milliards de paires de bases. Sur ce total, seules 5% environ codent pour des protéines, telles que celles mentionnées ci-dessus. Les 95% restants sont appelées séquences non codantes. De manière controversée, l'ADN non codant était autrefois appelé "ADN poubelle". Cependant, les scientifiques comprennent aujourd'hui que même si l'ADN ne code pas pour une protéine spécifique, il est toujours important pour la fonction biologique. Par exemple, l'ADN non codant peut réguler la création de protéines en fonctionnant comme une piste d'atterrissage spécialisée pour des enzymes comme l'ADN polymérase ; l'ADN non codant peut également maintenir les chromatides sœurs ensemble en aidant à former un centromère.

L'ADN est situé à l'intérieur du noyau des cellules. Pour y accéder, les cellules doivent être ouvertes ou lysées. L'ADN des chromosomes peut alors être libéré, isolé et purifié. L'extraction de l'ADN est souvent la première étape des expériences de biologie moléculaire et de biotechnologie. L'ADN extrait est soluble dans l'eau et apparaît donc comme une solution claire. En revanche, l'ADN est insoluble dans les solutions salines et dans l'alcool où il précipitera pour former des fibres blanches.



Les procédures de purification de l'ADN comprennent généralement la précipitation avec de l'alcool en présence de sel. La solution d'ADN est soigneusement recouverte d'alcool. Comme les alcools tels que l'alcool à friction (alcool isopropylique) ont une densité inférieure à celle de l'eau, une deuxième couche se forme au-dessus de la solution d'ADN. Une tige de verre ou un agitateur peut être utilisé pour enrouler l'ADN à l'interface des deux phases liquides et séparer l'ADN de la solution (cf. illustration 2). L'ADN apparaîtra comme une masse visqueuse et coagulée qui peut être recueillie sur un agitateur ou une

tige de verre. La quantité d'ADN enroulé varie et est une conséquence de l'intégrité de l'échantillon d'ADN.

Presque tous les tissus ou fluides corporels (à l'exception de l'urine) peuvent être utilisés comme source d'ADN. Les sources les plus courantes d'ADN humain sont des échantillons de cheveux, de cellules de joues, de sang et de salive. Une fois extrait, l'ADN peut être stocké pendant de longues périodes. Diverses méthodes de stockage comprennent la précipitation et le stockage sous alcool à température ambiante ou la réfrigération. L'ADN est souvent ex-traité pour des procédures médicales ou comme preuve laissée sur les scènes de crime, comme les cellules qui sont récupérées des ongles d'une victime. Même quelques cellules déposées par une personne en léchant et en scellant une enveloppe peuvent suffire pour obtenir de l'ADN et identifier le criminel.

Dans cette expérience, l'ADN individuel sera extrait des cellules de la joue et stocké dans un collier "Genes in a Tube". L'ADN isolé à partir de cette expérience peut donc être récupéré et utilisé pour la prise d'empreintes génétiques et l'analyse des gènes d'un individu.

## Vue d'ensemble de l'expérience

### LES OBJECTIFS DE L'EXPERIENCE :

Le but de l'expérience est d'extraire rapidement l'ADN soi-même des cellules de la joue, de visualiser l'ADN et de stocker l'ADN dans un gène dans un collier Tube™.



### LA SECURITE DU TRAVAIL EN LABORATOIRE :

Prenez soin de lire et de comprendre toutes les instructions avant de commencer l'expérience. Si vous avez un quelconque doute, demandez à votre instructeur.

- Portez des gants et des lunettes de protection dans le laboratoire.
- Faire attention lorsque vous manipulerez dans le laboratoire : vous utiliserez des équipements et des composants qui peuvent être dangereux s'ils ne sont pas utilisés et manipulés avec précaution.
- Portez de gants de protection contre la chaleur lorsque vous manipulerez des réactifs chauds comme de l'eau bouillante ou de l'agarose fondue.
- Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche, utilisez les poires à pipeter !
- Lavez-vous bien les mains avec de l'eau et du savon après avoir réalisé l'expérience.
- Les déchets de laboratoire contaminés (solution salivaire, gobelet, pipette, etc.) doivent être désinfectés avec une solution d'eau de Javel à 15 % avant d'être éliminés. Veillez à éliminer correctement tout échantillon biologique conformément aux lignes directrices de votre établissement.

### LES CARNETS DE LABORATOIRE :

Les scientifiques documentent et expliquent tout ce qu'il se passe lors d'une expérience, comme les conditions expérimentales mais aussi les pensées et différentes observations lors du déroulé de celle-ci, et, bien entendu, les informations scientifiques récoltées. Aujourd'hui vous documenterez cette expérience dans un carnet de laboratoire ou sur une feuille vierge.

#### Avant de commencer l'expérience :

- Lisez attentivement l'introduction et le protocole. Utilisez ces informations pour formuler une hypothèse sur cette expérience.
- Estimez quels seront les résultats de votre expérience.

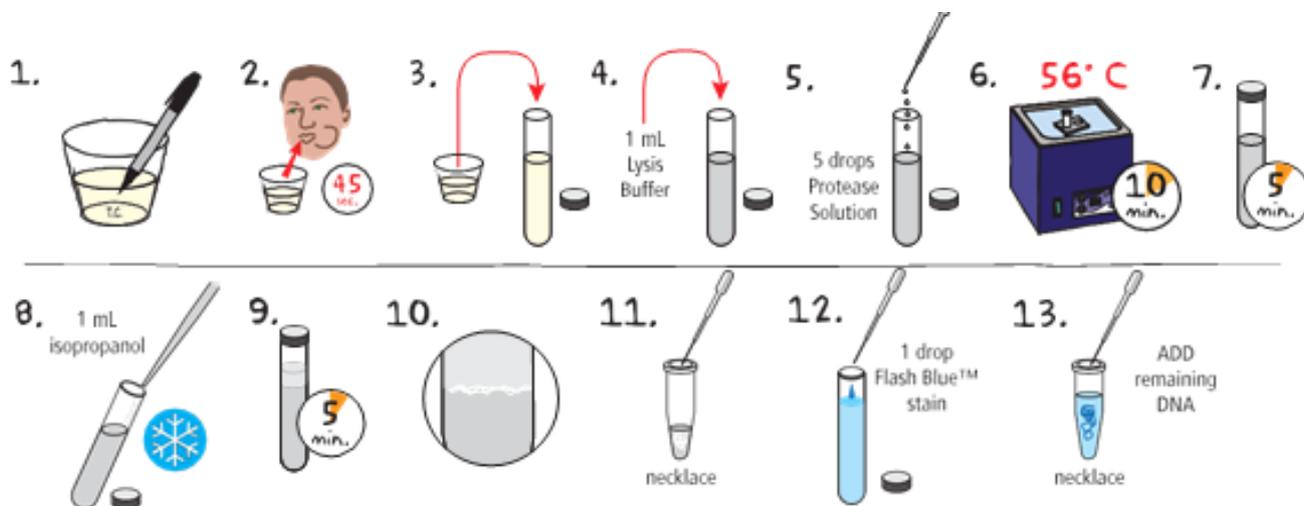
#### Pendant l'expérience :

- Notez vos observations.

#### Après l'expérience :

- Interprétez les résultats : est-ce que vos données collectées appuient ou contredisent votre hypothèse ?
- Si vous deviez recommencer cette expérience, que changeriez-vous ? Corrigez votre hypothèse pour expliquer ce changement.

## Isolation de l'ADN des cellules des joues



1. **Procurez**-vous une tasse contenant 1 ml de solution saline auprès de votre instructeur. Étiquetez clairement la tasse avec vos initiales ou votre nom.
2. **Rincez**-vous vigoureusement la bouche pendant 45 secondes. Mastiquez doucement l'intérieur de votre joue pour libérer un maximum de cellules (mais pas de sang !). **Crachez** la solution dans la même tasse.
3. À l'aide d'une grande pipette de transfert, **transférez** la totalité de la solution saline dans un tube propre et bouché.
4. A l'aide d'une grande pipette de transfert, **ajoutez** 1 ml de tampon de lyse dans le tube.
5. À l'aide d'une petite pipette de transfert, **ajoutez** 5 gouttes de solution protéase dans le tube. Pipetez de haut en bas afin de bien mélanger.
6. **Incubez** le tube pendant 10 minutes à 56° C.
7. **Retirez** le tube du bain-marie ou de l'incubateur et **laissez reposer** à température ambiante pendant 5 minutes.
8. À l'aide d'une pipette de transfert, orientez le tube à essai à un angle de 45 degrés et **faire couler** doucement 1 ml d'isopropanol glacé sur le côté du tube.
9. **Placez** le tube dans un porte-tubes en position verticale. **Laissez** le tube **reposer** pendant 5 minutes à température ambiante.
10. **Vérifiez** que votre ADN est visible à l'interface alcool/solution de lyse. Certains ADN peuvent apparaître sous la forme d'un matériau filandreuse, de couleur blanc grisâtre. Il peut même contenir des bulles. Ce matériau est votre ADN !
11. À l'aide d'une petite pipette de transfert, **transférez** une petite quantité d'ADN aux gènes dans un collier Tube™.
12. **Colorez** le reste de l'ADN en utilisant une petite pipette de transfert pour **ajouter** une petite goutte de Flash Blue™ au tube à essai.
13. **Transférez** l'ADN restant aux gènes dans un collier Tube™

### Note

FlashBlue™ est une coloration d'ADN qui rendra plus visible l'ADN à l'œil nu. Les branches d'ADN apparaîtront bleu foncé. La solution sera aussi légèrement bleu clair.

## Questions d'études

1. Décrivez l'apparence de l'ADN isolé.
2. Qu'est-ce que contiennent les noyaux de la cellule ?
3. Qu'est-ce que la lyse cellulaire ?
4. Pourquoi l'alcool à friction a-t-il formé une couche sur la solution d'ADN ?

## Guide de l'instructeur

### VUE D'ENSEMBLE GENERALE DE LA PREPARATION DU LABORATOIRE

La taille de la classe, la durée du travail pratique et la disponibilité des équipements sont des facteurs à prendre compte pour planifier et mettre en œuvre cette expérience avec vos étudiants. Ces lignes directrices peuvent être adaptées selon votre situation. Si vous ne trouvez pas les réponses à vos questions dans cette section, diverses ressources sont continuellement ajoutées au site web EDVOTEK. Si vous rencontrez un quelconque problème, merci de contacter le SAV de Sciencéthic.

Préparation pour ?	Que faire ?	Quand?	Temps approximatif
Isolation de l'ADN des cellules des joues	Préparer et aliquoter les différents réactifs (saline)	Au maximum 24 heures avant le début de l'expérience	30 minutes
	Préparer et aliquoter le tampon de lyse	Avant le début de l'expérience. OU au congélateur pendant maximum une semaine avant le début de l'expérience	15 minutes
	Equilibrez le bain-marie à 56°C	Avant le début de l'expérience	5 minutes

Bleu = A préparer eu de temps avant le début de l'expérience

Rouge = A préparer juste avant le début de l'expérience

Vert = Flexible

## Préparations préalables

1. Ajoutez 200  $\mu$ l de tampon Tris dans le tube de protéase. Laissez le matériau s'hydrater pendant quelques minutes et transférez la totalité de la quantité dans le tampon Tris restant. Mélangez bien et aliquotez 100  $\mu$ l pour chaque binôme d'étudiants dans les tubes de micro-centrifugeuse. Veillez à placer les tubes sur de la glace jusqu'à ce que vous en ayez besoin.
2. Aliquotez 3 ml d'éthanol ou d'alcool isopropylique pour chaque binôme d'étudiants dans les tubes de micro-centrifugeuse. Placez-les sur de la glace jusqu'à ce que vous en ayez besoin.
3. Aliquotez 200  $\mu$ l de solution de FlashBlue™ pour chaque binôme d'étudiants dans des tubes de micro-centrifugeuse.
4. Aliquotez 1 ml de tampon de lyse dans des tubes de micro-centrifugeuse de 2 ml, soit un tube par élève.
5. Dissolvez les 8 sachets de sel dans 500 ml d'eau potable pour obtenir la solution saline. Aliquotez 1 ml par tasse par élève.  
NOTE : ne pas aliquoter plus de 1 ml car la solution obtenue peut ne pas tenir dans le tube à essai après l'ajout du tampon de lyse et de l'alcool.

**Chaque étudiant doit recevoir** 1mL de tampon de lyse, un tube transparent avec bouchon, trois petites pipettes de transfert, trois grandes pipettes de transfert, un tube et une ficelle pour faire un collier Genes in a Tube et une tasse avec une solution saline d'1mL.

**Chaque binôme d'étudiants doit recevoir** 100 $\mu$ L de la solution protéase, 200 $\mu$ L de la solution FlashBlue™ et 3mL d'alcool glacé (éthanol à 95% ou alcool à friction isopropylique).

## Expériences d'extension facultatives basées sur l'enquête

Incitez vos étudiants à réfléchir aux différents paramètres de l'expérience à modifier et faites-leur prédire l'issue de celle-ci. Vous trouverez ci-dessous plusieurs exemples d'activités facultatives que les élèves peuvent essayer de réaliser.

- Effectuez un contrôle expérimental avec uniquement le tampon de lyse (les cellules des joues ne sont pas ajoutées). Ajoutez la protéase et recouvrez la solution d'alcool. Notez les différences entre ce tube témoin et les tubes à échantillons contenant de l'ADN.
- Effectuez l'isolement de l'ADN et éliminez la protéase et/ou l'alcool des étapes d'isolement. Que se passe-t-il avec l'échantillon d'ADN ?
- Après l'ajout d'alcool, isolez l'ADN par enroulement. L'ADN peut être récupéré en le dissolvant dans de l'eau distillée pendant la nuit, puis en le préparant pour l'électrophorèse sur gel d'agarose (matériel pour l'électrophorèse non inclus).
- Isoler l'ADN et effectuer une PCR sur l'échantillon d'ADN (matériel pour la PCR non inclus).

## Résultats attendus



Les réponses aux questions d'études se trouvent à l'intérieur du kit.

Nous contacter:

Pour toutes questions, veuillez contacter :

**sav@sciencethic.com**

[www.sciencethic.com](http://www.sciencethic.com)