|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Identification des allèles au sein d’une famille atteinte de drépanocytose** | | | |
| Matériel par binôme  Dispositif MiniOne avec alimentation intégrée.  ®  - 1 cuve à électrophorèse  - 1 support avec 2 plateaux pour coulage de 2 gels +  2 peignes de 6 ou 9 dents (on utilisera ici le côté 6 dents)  - 1 coupelle de gel d’agarose 1% TAE (gel green)  - 1 solution tampon TAE 120 ml (dilution à 1%)  - 1 écran de protection UV avec ouverture pour visualiser, filmer ou photographier  - 1 micropipette (2-20µl) + 1 boite de cônes  - 1 poubelle pour déchets biologiques  - 1 chronomètre  Matériel en commun  1 micro-ondes | - Kit ADN réparti en microtubes (type Eppendorf) :   * Marqueur de taille M 5 µl * Échantillon II.1 - 15µl * Échantillon II.2 - 15µl * Échantillon II.3 - 15µ * Échantillon II.4 - 15µl |  | |
| http://www.aua-signaletique.com/boutique/images_produits/3404-danger-electrocution-z.gif**Sécurité :**  Bien respecter les règles de sécurité du branchement des appareils d’électrophorèse | **Précautions de la manipulation :**   * **L'appareil ne doit pas être déplacé lors des dépôts et de la migration.** * **Ne pas débrancher l’appareil pendant toute la durée de la migration.** | | blouse |  |

|  |
| --- |
| **Kit de coulage Système de l’électrophorèse MiniOne®**  Support de coulage  Plateau  Peigne |
| Cuve  Fond noir  Lumière UV forte  Lumière UV faible  Cathode  Mise sous tension  Générateur  Anode  Ecran UV |

|  |
| --- |
| **Gel green 1% TAE Tampon TAE Micropipette MiniOne ®** |
| Cône  Cadran de lecture  Piston  Ejecteur de cône  Molette de réglage du volume  Dizaine  Décimale  Unité |
| **Principe de l’électrophorèse d’ADN** |
| *En milieu basique, les molécules d’ADN sont chargées négativement. Soumises à un champ électrique, elles migrent, dans un gel conducteur, de la cathode (borne négative) vers l’anode (borne positive). La distance de migration par rapport à la ligne de dépôt est caractéristique de la taille et de la charge de la molécule.* |
| **Préparation de la gélose** |
| * Ouvrir partiellement l’opercule de la coupelle de gel, avant de la faire chauffer au micro-ondes 15 secondes puissance 600 watts. * Vérifier que la gélose est totalement fondue, sinon la remettre 2-3 secondes supplémentaires. * Laisser refroidir quelques secondes. |

|  |
| --- |
| **Coulage de la gélose** |
| * Verser le gel délicatement dans un seul plateau. * Installer le peigne 6 puits (côté grosses dents) dans les encoches du plateau de support de coulage. * Laisser refroidir totalement la gélose environ 10 minutes. * Retirer le peigne verticalement pour ne pas briser la gélose. |
| **Préparation de la cuve** |
| * Installer le plateau avec la gélose dans la cuve d’électrophorèse sur le fond noir. * Verser le tampon TAE de chaque côté de la cuve afin de recouvrir la gélose. (1 mm au-dessus de la gélose).     Attention :  Ne pas verser le tampon directement sur la gélose. Il ne doit pas y avoir de bulles sous la gélose, elle ne doit pas flotter. |
| **Dépôt d’ADN** |
| * Régler la micro pipette sur 5µl et prendre un cône propre. * Prélever le marqueur dans le microtube M et déposer la totalité dans un des puits puis jeter le cône dans la poubelle déchets biologique. * Régler la micropipette sur 15 µl pour les autres échantillons. * Reprendre un nouveau cône pour chaque prélèvement et déposer les différents échantillons dans les puits suivants. * Faire un schéma pour repérer les dépôts.   Conseil : Il est possible d’utiliser la lumière faible de l’électrophorèse pour effectuer les dépôts. |
| **Migration** |
| * Installer l’écran de protection sur la cuve. * Mettre en route le générateur 15 minutes. * Visualiser la migration à l’aide de la lumière intégrée (lumière faible). * Arrêter le générateur. |