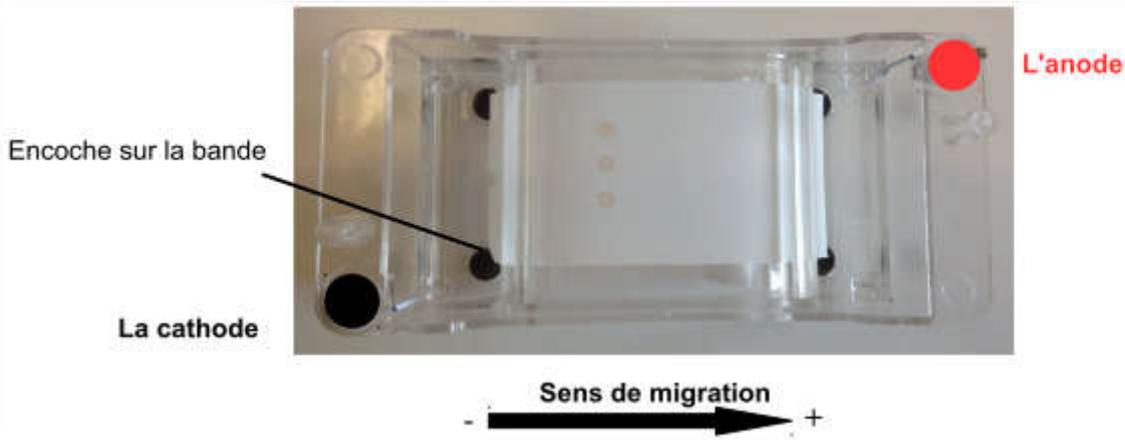


Objectifs		Niveau possible									
<p>- A l'aide d'une technique de biotechnologie, l'électrophorèse qui permet de séparer différents constituants en fonction de leur charge électrique, on étudie une maladie génétique : la Drépanocytose.</p> <p>- Cette étude moléculaire de la maladie permet de faire le lien entre génotype et phénotype.</p> <p>- Une mutation d'une protéine du patrimoine génétique peut conduire à une protéine différente ou bien à une absence de la protéine.</p>		<p>Niveau(x) : -Première S :</p> <p>Thème du BO -La Terre dans l'Univers, la vie et l'évolution du vivant -Expression, stabilité et variation du patrimoine génétique</p>									
Matériel et solutions		Sécurité									
<p><u>Matériel :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 cuve à électrophorèse et son support de bandes - 1 alimentation électrique 140V - 1 micropipette réglée sur 3µL + 3 cônes correspondant - 1 hotte aspirante pour de la récupération des déchets acides - 1 éprouvette graduée - 1 pince fine - 1 paire de gants jetables - 1 paire de lunettes <p><u>Solutions :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 solution de tampon tris-hippurate pH=8,8 - 1 bande d'acétate de cellulose qui trempe dans un bac contenant du tampon tris-hippurate - 1 flacon contenant environ 50mL de colorant rouge ponceau à 0,2% prêt à l'emploi - 1 flacon d'acide acétique à 5 %  - 1 support avec 3 tubes contenant de l'hémoglobine (protéine du sang) provenant de différents membres d'une famille drépanocytaire. <table border="1"> <thead> <tr> <th>N° des tube</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Solutions d'hémoglobine</td> <td>3 µL d'Hb N</td> <td>3 µL d'Hb S</td> <td>1,5 µL d'Hb S + 1,5 µL d'Hb S</td> </tr> </tbody> </table> <p>Hb S : hémoglobine drépanocytaire Hb N : hémoglobine normale</p>		N° des tube	1	2	3	Solutions d'hémoglobine	3 µL d'Hb N	3 µL d'Hb S	1,5 µL d'Hb S + 1,5 µL d'Hb S	<p><u>Fiches toxicologiques de l'INRS des produits utilisés pour la préparation et/ou manipulation :</u> → Acide acétique http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_24</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p>Se référer régulièrement à la fiche FDS de votre fournisseur pour les mises à jour.</p> <p>Précautions de manipulation</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">     </div> <p>Rejet des déchets et recyclage bidons de récupération Effluents acides (acide acétique) Flacon noté « Tampon Tris hippurate » </p>	
N° des tube	1	2	3								
Solutions d'hémoglobine	3 µL d'Hb N	3 µL d'Hb S	1,5 µL d'Hb S + 1,5 µL d'Hb S								
Protocole											
<p><u>Préparation au laboratoire :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Préparer une solution d'acide acétique à 5 %, prévoir 200ml par binôme . - Préparer la solution de tampon de migration en diluant au 1/10ème, le flacon commercial x10 de tampon tris-hippurate <i>Remarque : Prévoir environ 100 mL par binôme.</i> <i>La solution tampon peut être récupérée en fin de TP et réutilisée 1 ou 2 fois suivant son aspect .</i> <p><u>Réalisation de l'expérience :</u> <u>Préparation de la bande d'électrophorèse :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Déposer une bande d'acétate de cellulose pendant 15 minutes dans une barquette plastique contenant de la solution tampon . - Sortir délicatement la bande à l'aide de la pince et enlever l'excès de tampon entre 2 feuilles de papier filtre. - Remplir la cuve à électrophorèse avec la solution tampon utilisée précédemment (environ 40 mL dans chaque compartiment, mesuré à l'aide de l'éprouvette) - Placer délicatement la bande sur le support dans le cuve avec l'encoche vers vous et à gauche (côté cathode, borne noire) - Prendre garde que la bande soit bien horizontale et tendue. 											

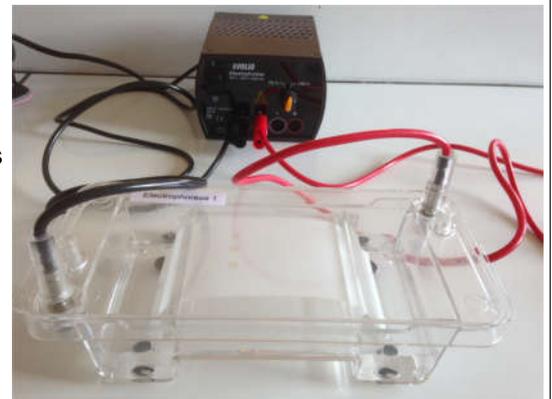


Dépot des échantillons :

- **Prélever** le premier échantillon d'hémoglobine à l'aide de la micropipette réglée sur 3 μ L et muni d'un cône propre
- **Déposer** l'échantillon sur la bande à 1/3 de l'extrémité gauche (cf schéma ci-dessous)
- **Respecter** un ordre des dépôts (cf schéma ci-dessous).
- **Recommencer** la manipulation pour chaque échantillon, avec un nouveau cône à chaque prélèvement, en laissant un espace suffisant pour ne pas risquer la fusion des échantillons qui diffusent légèrement lors du dépôt.
- **Fermer** la cuve et mettre sous tension pendant 45 min à 140V.

Coloration de la bande d'acétate de cellulose :

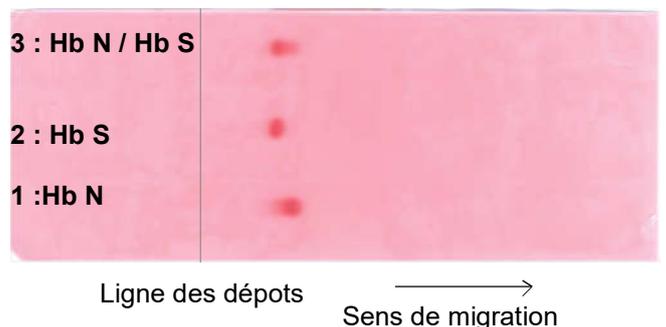
- **Mettre** des gants et des lunettes pour réaliser toutes les étapes suivantes
- **Placer** la bande dans une barquette contenant la solution de rouge ponceau, laisser agir 5 min
- **Décolorer** ensuite la bande dans 3 bains successifs d'acide acétique pendant 3 min.
- **Récupérer** le colorant rouge ponceau dans son flacon, il peut être réutiliser pour les autres groupes.
- **Evacuer** les bains d'acide acétique dans un bidon de récupération d'effluents acides



Photographie du dispositif de migration

Résultats

L'hémoglobine S moins chargée que l'hémoglobine N en raison de la substitution d'un acide glutamique par une valine en position 6 de la chaîne de la bêta globine migre moins loin et peut ainsi être distinguée sur la bande d'acétate de cellulose. Le mélange contenant l'hémoglobine S et N donne une trace plus étendue.



Remarques et ressources complémentaires

- Aide pour l'utilisation de la pipette automatique : <https://www.bioutils.ch/informations-pratiques/utilisation-des-micropipettes>

Information

Auteur: MOUFFLE Florence, Technicienne de laboratoire au lycée Ambroise Paré de LAVAL, le 22/11/2018