

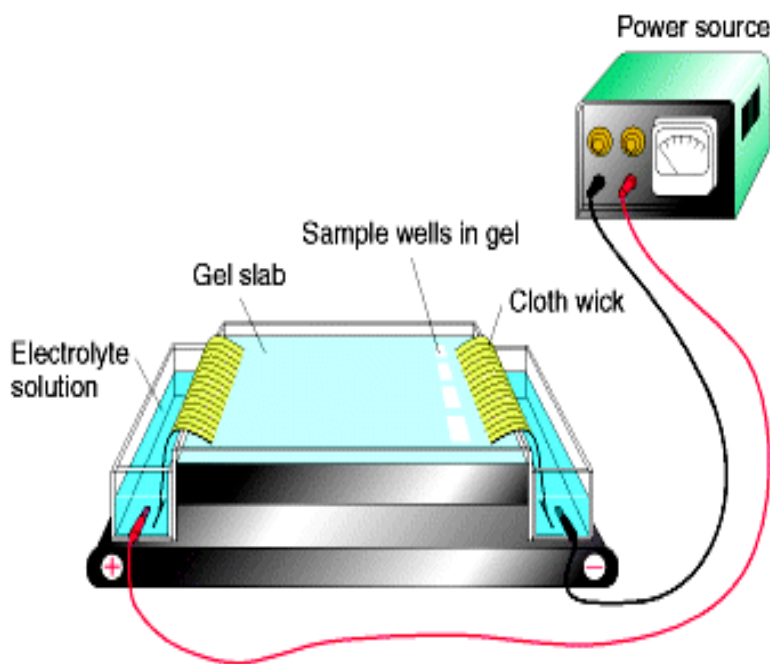


**Département : Biologie-Chimie-Géologie**

**Filière : Sciences de la Vie**

**Manuel des TRAVAUX PRATIQUES**

**Module : Biologie Moléculaire (M32-SVI5)**



**RESPONSABLE : Pr. Khalil HAMMANI**

**Année Universitaire 2018-2019**

## Sommaire

Avant Propos .....	2
Equipements et Matériels d'un laboratoire de Biologie Moléculaire .....	3
Utilisation des pipettes .....	3
Manipulation I : Extraction de plasmides .....	5
Manipulation II : Dosage de l'ADN .....	9
Manipulation III : Digestion enzymatique .....	10
Manipulation IV : Electrophorèse des Acides Nucléiques .....	12
Annexes .....	14
Unités de Mesures .....	14
Cartes des Plasmides .....	15

## Avant Propos

### **Objectifs Généraux du module :**

Les objectifs généraux de ce module sont :

1. La bonne connaissance de la structure et des propriétés des acides nucléiques.
2. L'assimilation des grands principes de base impliqués dans la transmission et la réparation du matériel génétique, ainsi que l'expression des gènes et sa régulation.
3. L'assimilation des principes de la manipulation des acides nucléiques

### **Objectifs des Travaux Pratiques :**

Les séances de travaux pratiques de Biologie Moléculaire visent à initier l'étudiant de la Filière des Sciences de la Vie aux techniques de base de biologie moléculaire. L'étudiant doit être capable d'interpréter des résultats expérimentaux obtenus par les techniques les plus courantes de biologie moléculaire ou à l'exploration de matériel génétique, en général, par les laboratoires de biologie.

La réussite de cette pratique est étroitement liée à une préparation préalable de chacune des séances. Cette préparation se résume en une lecture attentive et une compréhension d'avance des manipulations à faire. Les techniques utilisées sont claires et simples, mais nécessitent néanmoins une attention et un sérieux. Chaque séance doit donc être préparée à l'avance et une note de préparation et participation (comptant au moins à 25%) sera attribuée à chaque étudiant.

A la fin des travaux pratiques, les étudiants doivent **rédiger un compte rendu concernant l'ensemble des séances.**

**Remerciements :** Nous tenons particulièrement à remercier Pr M. ElHassouni Mohamed de la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz et Fr A. Ibrahim Azeddine de la Faculté de Médecine de Rabat pour leur aide très précieuse à élaborer ce manuel.

## Equipements et Matériels d'un laboratoire de Biologie Moléculaire

Avant le début de la première séance des travaux pratiques, les étudiants doivent effectuer le tour du laboratoire pour reconnaître les équipements qu'ils seront amenés à utiliser : **Système de Distillation d'eau, Centrifugeuses (Cliniques, Microcentrifugeuse, Microcentrifugeuse réfrigérée), Balances, Appareil d'électrophorèse (Horizontal, Vertical), Appareil de transfert des gels, Générateur d'électricité, Bains Marie, Incubateurs, Vortex, Spectrophotomètre, Micropipettes, Cuvettes, Réfrigérateur, Tubes eppendorf, Boîtes de Petri, Gants, Milieu de culture liquide et solide, ...**

Dans son rapport, l'étudiant devra faire un petit descriptif de chaque matériel utilisé dans le paragraphe Matériel et Méthodes.

### Utilisation des pipettes

*Dans cette partie, l'étudiant devra apprendre à utiliser les micropipettes pour mesurer de très petits volumes de l'ordre du  $\mu\text{l}$  et s'assurer de l'exactitude de son pipetage.*

#### **1-Les différents types de pipettes:**

En biologie et génétique moléculaires, il est très fréquent de travailler avec des volumes relativement faibles (de l'ordre du microlitre ;  $\mu\text{l}$ ). Trois types de micropipettes automatiques seront utilisés lors de ces séances de travaux pratiques.

**P20:** Pipette automatique qui permet de prélever un volume allant de (1) à (20)  $\mu\text{l}$ .

**P200:** Pipette automatique qui permet de prélever un volume allant de (20) à (200)  $\mu\text{l}$ .

**P1000:** Pipette automatique qui permet de prélever un volume allant de (200) à (1000)  $\mu\text{l}$ .

Chaque micropipette présente un cadran de lecture avec trois chiffres :

**Sur la P20 :** Le nombre maximum que l'on peut afficher sur le cadran est (200). Il correspond à un volume de 20,0  $\mu\text{l}$  (on divise le nombre lu par 10)

**Sur la P200 :** Le nombre maximum que l'on peut afficher sur le cadran est (200). Il correspond à un volume de 200  $\mu\text{l}$  (on lit directement le volume affiche).

**Sur la P1000 :** Le nombre maximum que l'on peut afficher sur le cadran est (100). Il correspond à un volume de 1000  $\mu\text{l}$  (on multiplie le nombre lu par 10).

#### **2- Exactitude des mesures avec les micropipettes**

*Chaque étudiant doit utiliser les micropipettes jusqu'à ce qu'il soit confiant de l'utilisation parfaite de cet instrument. La mesure de l'exactitude des micropipettes est basée sur le fait que la densité de l'eau pure est de 1 gramme par ml à 25°C.*

##### **Matériel :**

- Micropipettes, P10, P100 et P1000, et les cônes correspondants.
- Balance standard.
- Tubes eppendorf de 1,5 ml.
- Eau ultra pure.

##### **Procédure :**

1. Pesez chaque tube sur la balance analytique.
2. Pipetez des volumes précis en utilisant les micropipettes appropriées.
3. Pesez les tubes remplis en utilisant la même balance de l'étape 2.
4. Soustrayez le poids du tube vide du poids du tube avec de l'eau pour calculer le poids de l'eau.

5. Comparez votre valeur à la valeur prévue en calculant la différence en pourcent. (Les valeurs prévues sont basées sur le fait que la densité de l'eau pure est de 1 gramme par ml à 25°C.)

\* **Poids de l'eau = Poids (tube + eau) – Poids du tube**

\* **% Erreur =  $\frac{\text{Pds. de l'eau} - \text{Valeur attendue}}{\text{Valeur attendue}} \times 100$**

// = Valeur Absolue

**Use of the Micropipet**  
The most common and easiest way to use your PIPETMAN.

1. Hold the pipet in a nearly vertical position. Depress the plunger smoothly to the first stop position.
2. Immerse the end of the pipet tip in the liquid. Allow the plunger to move up smoothly to the rest position. Wait one second.
3. Depress the plunger smoothly to the first stop position. Wait one second.
4. Depress the plunger to the second stop position.

Volume	Immersion depth
1 $\mu\text{l}$ to 100 $\mu\text{l}$	2 - 3 mm
101 $\mu\text{l}$ to 1000 $\mu\text{l}$	2 - 4 mm
1.001 ml to 10 ml	3 - 6 mm

# Manipulation I

## Extraction de plasmides

### 1- Définition de plasmides :

Un plasmide est un élément génétique extrachromosomique et autonome formé par une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire. Les plasmides sont des molécules autorépliquatives (leur réplication est indépendante de celle du chromosome de la cellule hôte) et dispensables (dans les conditions normales sans aucune pression de sélection, la cellule peut survivre sans ces plasmides). Chaque plasmide est maintenu dans la cellule hôte en un nombre de copies stable et caractéristique, ce nombre reste stable d'une génération à l'autre et est contrôlé d'une génération à une autre.

Les plasmides se répliquent selon plusieurs modes. Certains plasmides se répliquent par un mode bidirectionnel, d'autres par un mode bidirectionnel séquentiel; d'autres encore se répliquent selon un mode unidirectionnel. Il existe aussi des plasmides qui se répliquent en cercle roulant.

### 2- Expansion des plasmides :

De nos jours, il existe un grand nombre de plasmides procaryotiques et eucaryotiques. Ces plasmides sont largement utilisés en génie génétique, principalement pour l'introduction de nouveaux caractères aux cellules hôtes et l'amplification de séquences d'ADN. On distingue plusieurs catégories de plasmides :

\* **Plasmides cryptiques:** qui ne codent pour aucune fonction apparente autre que leur propre réplication

\* **Plasmides dégradatifs ou métaboliques:** qui renferment généralement des opérons codant pour des enzymes capables de dégrader des sources de carbones non usuelles comme les hydrocarbures

\* **Plasmides de résistance aux métaux lourds:** ces plasmides codent en général pour des protéines qui permettent de bloquer la pénétration des métaux lourds ou leur refoulement des cellules. La cellule hébergeant ce type de plasmides peut donc survivre en présence de concentrations relativement élevées de métaux lourds.

\* **Plasmides colicinogéniques:** ce type de plasmides confère aux bactéries qui les hébergent de développer une immunité contre les colicines et d'en produire contre d'autres germes.

\* **Plasmides de résistances aux antibiotiques:** nombreux sont ces plasmides qui portent des gènes de résistance aux antibiotiques. Le mécanisme de cette résistance diffère selon les plasmides; certains codent pour des enzymes qui détruisent l'antibiotique en question, d'autres codent pour des enzymes qui l'empêchent de pénétrer ou qui le refoulent à l'extérieur.

<i>Gène</i>	<i>Résistance</i>	<i>Protéine codée</i>	<i>Mode d'action</i>
<i>Cm<sup>R</sup></i>	Chloramphénicol	Acétyltransférase	Acétylation de l'antibiotique
<i>Sm<sup>R</sup></i>	Streptomycine	Adényltransférase Phosphotransférase	Adénylation et phosphorylation
<i>Sp<sup>R</sup></i>	Spectinomycine	Adényltransférase	Adénylation
<i>Tc<sup>R</sup></i>	Tétracycline	Tet. protéines	Exclusion de l'antibiotique
<i>Ap<sup>R</sup></i>	Ampicilline	Beta-lactamase	Hydrolyse des pénicillines

#### Mode de fonctionnement de certains gènes de résistance aux antibiotiques codés par certains plasmides.

Au cours de ces séances de travaux pratiques, nous aurons à utiliser des plasmides qui confèrent une résistance à la tétracycline ou à l'ampicilline.

L'ampicilline est un antibiotique bactériostatique (arrête la croissance des cellules sans les tuer) qui inhibe certaines enzymes membranaires impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne.

La résistance à l'ampicilline se fait par la synthèse d'une enzyme nommée Bêta lactamase, qui hydrolyse le noyau bêta lactame de l'ampicilline la rendant ainsi inactive. Les deux plasmides utilisés lors de ces séances de travaux pratiques confèrent tous les deux une résistance à l'ampicilline.

La tétracycline est un antibiotique bactéricide (qui tue les cellules de façon irréversible). Cet antibiotique pénètre dans les cellules, se lie à une protéine de la petite sous unité des ribosomes et bloque ainsi la translocation de ces organites le long du messager. La traduction de toute protéine se trouve ainsi bloquée et la cellule meurt.

La résistance à cet antibiotique se fait, dans le cas du gène de résistance porté par le plasmide pBR322, par l'expression d'un petit peptide de 399 aa. Ce peptide est sécrété et bloque les sites par lesquels la tétracycline pénètre dans les cellules.

### **3- Taille des plasmides :**

La taille des plasmides est très variable, allant de quelques kilobases (cas des plasmides de la série pUC chez *E. coli* ou du plasmide 2 $\mu$  chez la levure) à des centaines de kilobases (cas de certains plasmides dégradatifs chez *Pseudomonas*).

### **4- Classification des plasmides chez les bactéries :**

Il existe des plasmides spécifiques des procaryotes et ceux spécifiques des eucaryotes. Certains plasmides sont manipulés artificiellement pour pouvoir répliquer chez les deux, on parle de *plasmides navettes*.

Plusieurs modèles de classification des plasmides bactériens ont été proposés mais le plus approprié reste celui basé sur le mode de leur réplication et de transfert entre cellules hôtes. Il a été montré que deux plasmides possédant une même origine de réplication ne peuvent pas coexister de façon stable dans une même bactérie. Ces deux plasmides sont dits **incompatibles** et appartiennent au même groupe d'incompatibilité.

Après classification des différents plasmides, il existe actuellement une centaine de groupes d'incompatibilité.

### **5- Extraction des plasmides :**

Afin d'étudier les caractéristiques physiques d'un plasmide donné ou de déterminer sa fonction, il est souvent nécessaire de l'extraire et de le purifier à partir de la cellule hôte. Les protocoles expérimentaux d'extraction des plasmides diffèrent selon la nature de la cellule qui les héberge (procaryote ou eucaryote ; Gram+ ou Gram-.....).

### **Partie pratique:**

En pratique, l'ADN plasmidique doit être extrait et séparé de l'ADN nucléaire, pour cela, on fait généralement appel à l'une des techniques suivantes :

\* Technique de lysat clair: utilisée pour obtenir de grandes quantités d'ADN.

\* Technique de lyse alcaline: utilisée pour obtenir de grandes quantités d'ADN plasmidique à partir d'un clone bactérien.

Au cours de ce travail pratique, on purifiera indépendamment deux plasmides nommés pUC 18 et pBR322 à partir d'une souche d' *E.coli* par la méthode de lyse alcaline selon un protocole modifié de la méthode décrite par Bimoboin et Doly (1979). Son principe est basé sur les différences structurales entre un plasmide et un fragment d'ADN chromosomique. Les deux types d'ADN sont dénaturés par l'addition d'un milieu alcalin. Après renaturation de ce milieu, seul l'ADN plasmidique se renature tandis que l'ADN chromosomique précipite avec les protéines bactériennes.

## **1- Solutions utilisées :**

### **Solution I :**

- \* *Glucose 50 mM (pH 8.0).*
- \* *Tris HCl 25 mM.*
- \* *EDTA 10 mM (pH 8.0).*

Cette solution assure une isotonicité pour les cellules (assurée par le glucose) et prévient la dégradation des acides nucléiques par d'éventuelles nucléases (grâce à l'EDTA qui est un agent chélateur des ions bivalents comme les ions Mg<sup>++</sup> ou Mn<sup>++</sup> nécessaires pour le fonctionnement des nucléases).

**NB : un volume de 10 ml de la solution I est généralement préparée par un étudiant du groupe et est suffisant pour le reste du groupe. Les solutions stock sont: Glucose: 1M; Tris HCl: 1M et EDTA 0,5M (pH 8.0).**

**Chaque étudiant doit être en mesure de faire les dilutions et de calculer les volumes de ces trois solutions mères nécessaires pour préparer la solution I.**

### **Solution II :**

- \* *NaOH 0.2 N (fraîchement diluée à partir d'une solution stock 10 N).*
- \* *SDS 1%.*

**La solution II assure la lyse alcaline des cellules grâce à l'action du détergent SDS en milieu alcalin. Comme pour la solution I, 10 ml de la solution II seront préparés par un étudiant pour tout le groupe.**

### **Solution III :**

*\*Acetate d'ammonium 7.5 M :*

Cette solution de sel d'ammonium permet de précipiter les débris cellulaires et les acides nucléiques de haut poids moléculaire. Cette solution sera fournie prête à l'emploi par l'enseignant.

### **Solution IV :**

*\*Solution TE:*

Cette solution contient l'EDTA pour réduire l'action éventuelle des nucléases qui risquent de contaminer les préparations d'ADN, en plus, le Tris HCl permet de maintenir un pH adéquat pour les plasmides.

- \* *Tris HCl 10 mM (pH 8.0)*
- \* *EDTA 1 mM (pH 8.0)*

**Cette solution est aussi préparée au préalable par l'enseignant.**

## **2- Récupération des cellules bactériennes :**

Deux cultures différentes de la souche d'E.coli DH5-alpha seront fournies aux étudiants. La première a été transformée par le plasmide pUC 18 et la seconde par le plasmide pBR322. Ces deux souches ont été mises en culture dans un milieu sélectif grâce à la présence de l'ampicilline. Dans ces conditions, seules les cellules qui maintiennent le plasmide peuvent pousser.

- 1- Mettre 1.5 ml de la culture dans un tube eppendorf stérile puis centrifuger 1 min à 12000 g et à 4°C.
- 2- Le surnageant est éliminé soigneusement du tube en laissant le culot cellulaire aussi sec que possible.

### **3- Lyse alcaline :**

Afin de purifier les plasmides on suivra la procédure suivante :

- 1- Resuspendre le culot bactérien dans 100  $\mu$ l de solution I maintenue au préalable à 4°C. Il est essentiel de s'assurer que le culot bactérien est complètement suspendu.
- 2- Incuber le tube à température ambiante pendant 5 minutes.
- 3- Ajouter par la suite 200  $\mu$ l de la solution II fraîchement préparée puis mélanger soigneusement en inversant le tube eppendorf 3 à 6 fois. Il faut s'assurer que le lysat est devenu clair et visqueux.
- 4- Incuber pendant 5min dans la glace.
- 5- Ajouter par la suite 150  $\mu$ l de solution III fraîche (entre 0 et 4°C). Homogénéiser bien le tube pendant quelques secondes. Le tube est immédiatement placé dans la glace (0°C) pendant 15 min.
- 6-Centrifuger le tube pendant 10 min à 12000 g et 4°C.
- 7- Transférer très délicatement le surnageant dans un nouveau tube eppendorf stérile. Cette étape permet d'éliminer les débris cellulaires et les acides nucléiques de haut poids moléculaire.
- 8-Précipiter les plasmides en ajoutant au surnageant deux volumes d'éthanol (900  $\mu$ l); bien mélanger le contenu du tube et laisser précipiter 15 à 20 min à -20°C.
- 9- Centrifuger le tube pendant 10 min à 12000 g et 4°C.
- 10- Eliminer le surnageant puis inverser le tube sur du papier filtre propre et sécher pendant 10 min à température ambiante.
- 11- Dissoudre délicatement le culot d'ADN (souvent à peine visible) dans 30  $\mu$ l de TE (pH 8). Une portion de cet ADN plasmidique ainsi préparé sera utilisée pour la digestion enzymatique et l'autre moitié sera stockée à -20°C pour la séance d'électrophorèse.



## Manipulation II Dosage de l'ADN

### 1- Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est l'utilisation du dispositif du spectrophotomètre pour mesurer les capacités absorbantes des molécules. Elle peut être employée pour déterminer la concentration et la pureté des molécules biochimiques telles que l'ADN, l'ARN et les protéines qui absorbent le rayonnement électromagnétique à des longueurs d'onde particulières.

### 2- Dosage des acides nucléiques

Pour effectuer par spectrophotométrie directe le dosage d'une solution pure d'acides nucléiques, on utilise l'absorbance des rayons ultraviolets à 260 nm. On considère dans les calculs qu'une mole de nucléotides polycondensés représente 309 grammes. Il faut se placer autant que possible dans des conditions standard de mesure : cuve de 1 cm, solution 1 M (309 mg/ mL), température ambiante,  $[Na^+]$  0,3 M, rapport  $A_{260}/A_{280} \geq 1,80$ .

Dans ces conditions le coefficient d'extinction de l'ADN double brin est de  $6200 A_{260} \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$ , c'est à dire qu'une unité d'absorbance à 260 nm ( $A_{260}$ ) représente 50  $\mu g/mL$ .

Les radicaux aromatiques de certains acides aminés (Phe, Tyr, et surtout Trp) ont la propriété d'absorber la lumière ultraviolette. L'absorption à 280 nm est due principalement aux noyaux phénols des tyrosines, parce que cet acide aminé est plus fréquent que le tryptophane, qui est pourtant beaucoup plus opaque à cette longueur d'onde. L'absorption de la lumière UV à 280 nm est caractéristique des protéines et sert à doser ces protéines lorsqu'elles sont en solution dans l'eau. Le rapport entre les  $DO_{260}/DO_{280}$  permet de déterminer la pureté de l'ADN préparé. Un rapport de l'ordre de 1.8 à 2.0 signifierait que cette ADN est pur.

## Partie pratique

### 1- Matériels

- Solution d'ADN contenant les deux plasmides.
- L'eau ultra pure.
- Spectrophotomètre.
- Cuvettes en quartz.

*La lumière UV comme source de rayonnement électromagnétique exige l'utilisation des cuvettes en quartz parce que les cuvettes en verre (utilisées pour des longueurs d'onde dans le spectre visible) bloquent les UV. ! Les cuvettes de quartz sont à manipuler délicatement car ils sont très chers.*

### 2- Procédure

- 1- Marquez les microtubes de 1.5 ml avec les noms des plasmides.
- 2- Remplir les tubes avec 500  $\mu l$  d'eau ultra pure.
- 3- Pipetez 1  $\mu l$  et 5  $\mu l$  d'ADN dans chaque tube et pour chaque plasmide.
- 4- Complétez avec de l'eau jusqu'à 1 ml. Couvrez les tubes et mélangez.
- 5- Introduisez à la pipette la dilution d'ADN dans la cuvette.
- 6- Ajuster le zéro du spectrophotomètre à 260nm en insérant dans la chambre du spectro une cuvette contenant de l'eau ultra pure comme blanc.
- 7- Lisez la densité optique à 260nm pour tous les échantillons.
- 8- Refaites la même procédure pour les mesures à 280nm.
- 9- Calculez la concentration en ADN en multipliant vos lectures  $DO_{260}$  par le facteur de dilution puis multipliez tout par 50.
- 10- Pourquoi devons-nous nous multiplier par 50 ?
- 11- L'ADN que vous avez préparé est-il relativement pure ?

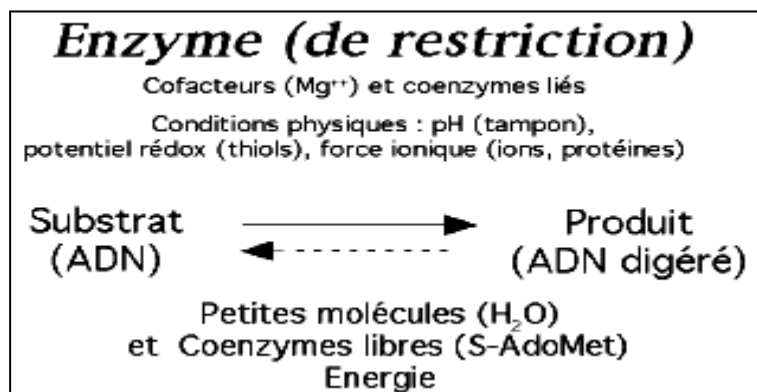
## Manipulation III Digestion enzymatique

### 1- Enzymes de restriction

Les Enzymes de restriction ont été découvertes à partir de 1973. Elles sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence, de 4 à 10pb, et de cliver l'ADN au site reconnu. Ils permettent de fragmenter l'ADN en segments de taille réduite, ou de le couper à tel ou tel site désiré. Certains enzymes coupent le site en son milieu et produisent deux fragments dont les extrémités sont franches. Cependant, la plupart réalisent une coupure dissymétrique : on parle dans ce cas d'extrémités cohésives (chaque fragment possède une chaîne qui dépasse l'autre de quelques bases). Plusieurs centaines de ces enzymes ont été caractérisés : ils reconnaissent une grande variété de sites de coupure.

Les enzymes de restriction sont utilisés pour établir une carte de restriction de toute molécule d'ADN que l'on souhaite caractériser. Cela consiste à déterminer l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, qui vont produire, après "digestion enzymatique" de cette molécule, des fragments de tailles différentes dont la taille pourra être définie par électrophorèse.

### 2- Restriction (réaction générale)



La réaction générale catalysée par les enzymes de restriction implique la présence dans le milieu réactionnel des facteurs suivants :

- Enzyme
- Substrat : ADN double brin non digéré
- Produit : ADN double brin digéré
- Cofacteurs

En général, seul le  $Mg^{++}$  est indispensable. Quelques endonucléases font appel à d'autres cofacteurs. Les enzymes de méthylation ont pour coenzyme la S-Adénosyl-Méthionine (S-Ado-Met). Des facteurs physiques contrôlent aussi ces réactions : pH, potentiel d'oxydoréduction, force ionique. L'énergie libre dégagée par l'hydrolyse est suffisamment importante pour que la réaction ne soit pratiquement pas réversible dans les conditions habituelles.

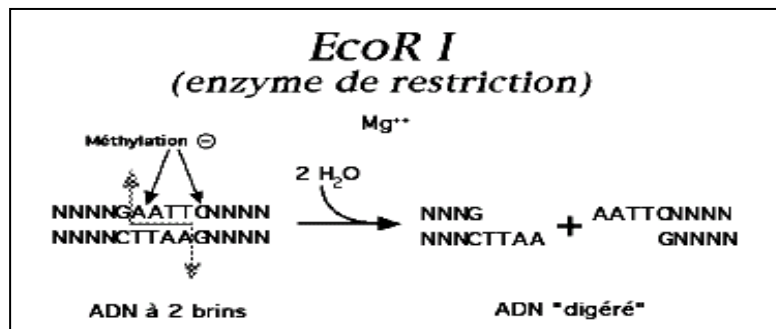
### 3- Restriction à bouts collants/cohésifs : EcoR I

EcoR I est une enzyme de restriction produite par *Escherichia coli*, souche R. Le site de liaison à l'ADN est formé de six paires de nucléotides :



Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons

phosphodiester se fait loin du centre de symétrie du palindrome certaines paires de nucléotides restent non appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts collants ». La méthylation des adénines ou de la cytosine du site d'hydrolyse inhibent la reconnaissance du site par EcoR I. L'ADN de la bactérie ainsi méthylyé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylyé sera hydrolysé.

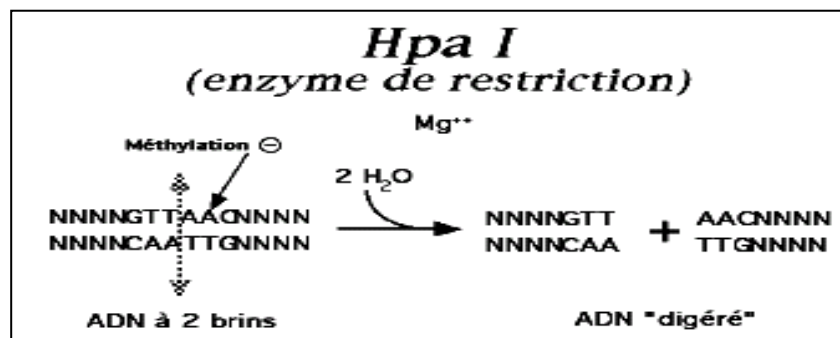


#### 4- Restriction à bouts francs : Hpa I

Hpa I est une enzyme de restriction produite par *Haemophilus parainfluenzae*. Le site de liaison à l'ADN est formé de six paires de nucléotides :



Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait au centre de symétrie du palindrome toutes les paires de nucléotides restent appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts francs ». La méthylation de la deuxième adénine de la séquence inhibe la reconnaissance du site par Hpa I. L'ADN de la bactérie ainsi méthylyé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylyé sera hydrolysé.



### Partie pratique

*Lors de la séance des travaux pratiques, les étudiants recevront une fiche technique de la procédure à suivre qui dépendra des enzymes disponibles dans le laboratoire.*

## Manipulation IV

### Electrophorèse des Acides Nucléiques

#### 1- Electrophorèse sur gel d'agarose

Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées. On peut donc les faire migrer dans un champ électrique : Electrophorèse. La charge relative étant constante, le système de discrimination utilisé est l'effet de filtration du gel (agarose ou polyacrylamide).

L'agarose, normalement sécrétée par certaines algues, est un polymère linéaire dont la structure de base est le 1-4 D-Galactosyl 3,6-anhydro 1-galactose. Les gels d'agarose sont préparés en dissolvant à **chaud** l'agarose dans une solution tampon. En se refroidissant, l'agarose durcit en formant une matrice dont la densité est déterminée par la concentration de l'agarose.

Quand un champ électrique est appliqué à travers le gel, l'ADN négativement chargé à pH neutre, migre vers l'anode. Le taux de migration est déterminé par plusieurs paramètres :

**a-** Sous l'action du champ électrique, les molécules linéaires d'ADN migrent à travers la matrice avec une vitesse inversement proportionnelle au  $\text{Log}_{10}$  du nombre de bases qui les composent.

**b-** Un fragment linéaire d'ADN de taille déterminée migre à des vitesses différentes à travers des gels de concentration différente en agarose. Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité électrophorétique de l'ADN ( $\mu_0$ ) et la concentration du gel en agarose ( $\lambda$ ) selon l'équation :

$$\text{Log } \mu = \text{Log } \mu_0 - Kr \lambda$$

$\mu_0$ : mobilité électrophorétique libre de l'ADN

$Kr$ : coefficient de retardation dépendante des propriétés du gel, de la taille et de la forme des molécules migrantes

**c-** Conformation de l'ADN: Selon sa conformation, une même molécule d'ADN migre de façon différente. Une molécule plasmidique extraite par la méthode de lyse alcaline existe sous trois formes: circulaire surenroulée, circulaire relâchée et linéaire. La mobilité relative de ces trois formes dépend principalement de la concentration du gel en agarose, mais elle dépend aussi de l'intensité du courant appliqué et de la force ionique du tampon. Dans les conditions normales d'électrophorèse, la forme surenroulée migre la première suivie de la forme linéaire. La forme circulaire relâchée migre en dernier, vu l'encombrement stérique qu'elle engendre.

**d-** Intensité du courant: à des voltages faibles à moyens, les molécules d'ADN migrent à des vitesses proportionnelles à l'intensité du courant. Quand cette dernière augmente, la capacité de résolution diminue; surtout pour des molécules de haut poids moléculaire.

Pour obtenir un maximum de résolution pour des fragments d'ADN de plus de 2 Kb, il ne faut pas dépasser 5 V/cm (distance entre les électrodes de la cuve).

**e-** Composition du tampon de migration: la mobilité électrophorétique est affectée par la composition et la force ionique du tampon. Quand la force ionique est très faible ou nulle, la migration devient très lente voir absente. Si la force ionique est très importante, la conductance élevée engendre une surchauffe du système d'électrophorèse (qui risque de faire fondre le gel d'agarose par exemple).

Il existe plusieurs tampons d'électrophorèse (TAE, TBE, TPE), nous utiliserons le TAE.

## Partie pratique

### 1- Préparation des solutions:

- Solution stock TAE 50X, pour 100 ml:

Tris base 24.2 g

Acide acétique glaciale 5.7 ml

EDTA 0.5 M (pH 8) 10 ml

- Solution de bromure d' ethidium :

Bromure d'ethidium 10 ug/ml. Le bromure d'ethidium est dilué dans le tampon de migration TAE 1X ou dans de l'eau distillée à une concentration finale de 10 ug/ml. Le bromure d'Ethidium est un agent cancérigène, il ne sera de ce fait manipulé que par l'enseignant.

-Tampon de dépôt 6X :

025% de bleu de Bromophenol

30% de glycérol

### 2- Préparation du gel :

1- Diluer le tampon de migration TAE 50X pour obtenir la solution à 1X.

2- Peser la quantité d'agarose nécessaire pour préparer 50 ml de gel à 0.7%.

3- Ajouter le tampon TAE 1X dans un Erlenmeyer de 100 ml et porter sous la flamme ou une plaque chauffante jusqu'à dissolution de l'agarose. L'agarose peut être dissoute dans un four micro-ondes.

4- Laisser refroidir la solution du gel à environ 50°C puis la couler doucement sur la plaque du gel tout en évitant la formation de bulles d'air.

5- Installer le peigne qui assurera la formation des puits où seront déposés les échantillons de préparation plasmidique. Il faudra s'assurer que les dents du Peigne ne touchent pas la plaque du gel (laisser environ 2 à 3 mm entre les deux).

6- Laisser durcir le gel pendant 20 à 30 min puis retirer verticalement et délicatement le peigne.

7- Remplir la cuve par le tampon TAE 1X de façon à couvrir à peine le gel.

### 3- Dépôt des échantillons:

Afin de déposer les échantillons d'ADN au fond des « puits », il faut que leur densité soit supérieure à celle du TAE qui couvre le gel. Pour cela, on ajoute à l'échantillon le tampon de dépôt ou de charge (loading buffer). Ce tampon contient du glycérol qui rend le mélange plus dense et un colorant (bleu de bromophenol) qui facilite le dépôt et permet de suivre la migration.

### 4- Electrophorèse:

Appliquer un courant de 50 V aux bornes de l'appareil générateur de façon à ce que L'ADN migre vers l'anode. Le déroulement de l'électrophorèse est contrôlé en suivant le déplacement du bromophenol qui migre en parallèle avec les bandes d'ADN linéaires d'environ 0.5 Kb. La résolution est considérée terminée quand le bleu dépasse les 3/4 du gel.

### 5- Coloration du gel:

Sur le gel, les bandes d'ADN sont invisibles à l'oeil nu, on utilise donc le bromure d'ethidium. Ce colorant, qui s'intercale entre les bases de l'ADN, est fluorescent sous U.V. et permet de visualiser les bandes d'ADN (bandes plasmidiques avec leurs différentes formes).

Le gel est soigneusement retiré de la cuve puis plongé dans l'eau distillée contenant du bromure d'ethidium pendant 20 à 30 min. Après un léger rinçage à l'eau, le gel est porté sous la lampe U.V. pour visualisation des bandes.

### 6- Sur le gel :

1- Comparez la taille des plasmides utilisés et distinguez les différentes formes observées pour chaque plasmide.

2- Analyser les résultats obtenus avec la digestion enzymatique des deux plasmides.

## Annexes

### Unités de Mesures

**Taille:** Les cellules et les macromolécules biologiques sont des entités de très petite taille. Les unités de mesures couramment utilisées sont comme suit:

Unit	Symbol	Notation
Meter	M	$10^0$
Centimeter	cm	$10^{-2}$ M
Millimeter	mm	$10^{-3}$ M
Micrometer or micron	$\mu$	$10^{-6}$ M
Nanometer	nm	$10^{-9}$ M
Angstrom	Å	$10^{-10}$ M

Ainsi un millimètre est un millième (1/1 000) du mètre. Dans le tableau suivant on montre les tailles relatives de certains atomes, molécules, macromolécules, organites et cellules:

Hydrogen atom	1 Å	Bacterium	1 $\mu$ m long
Water molecule	4 Å	Mitochondrion	2 $\mu$ m long
DNA molecule	2 nm wide	Chloroplast	8 $\mu$ m diameter
Myoglobin	4.5 nm diameter	Lymphocyte	12 $\mu$ m long
Actin filament	6 nm	Epithelial cell	30 $\mu$ m height
Lipid bilayer	5 nm	Paramecium	1.5 mm long
Ribosome	30 nm diameter	Frog egg	2.5 mm diameter
HIV	100 nm diameter		

**Volume:** Le volume le plus couramment utilisé en biologie moléculaire est le microlitre ( $\mu$ l), qui est le 1/1 000<sup>ème</sup> du millimètre. Un millimètre est le 1/1 000<sup>ème</sup> du litre.

Unit	Symbol	Notation
Liter	l	$10^0$
Milliliter	ml	$10^{-3}$ l
Microliter	$\mu$ l	$10^{-6}$ l

**Poids:** Le gramme est l'unité de mesure courante utilisée dans le monde de la science. Un gramme est équivalent à 1000 milligrammes. Le poids couramment utilisé en biologie moléculaire est le microgramme ( $\mu$ g) et le nanogramme (ng) pour représenter les concentrations de l'ADN, l'ARN et les protéines.

Unit	Symbol	Notation
Kilogram	Kg	$10^3$ g
Gram	g	$10^0$ g
Milligram	mg	$10^{-3}$ g
Microgram	$\mu$ g	$10^{-6}$ g
Nanogram	ng	$10^{-9}$ g
Picogram	pg	$10^{-12}$ g
Femtogram	fg	$10^{-15}$ g

## Concentration

**Molarité:** C'est une mesure de la concentration, elle est définie par le nombre de moles de substance par litre de solvant. Une mole est définie par le poids moléculaire en grammes (g) d'une substance. Si le poids moléculaire du NaCl est 58,4; ceci veut dire que pour avoir une mole du NaCl, on prend 58,4 g de cette molécule. Par ailleurs, une solution molaire (1M) du NaCl consiste à dissoudre 58,4 grammes dans un litre de solvant. Souvent les volumes préparés sont plus petits que le litre (L), ainsi g/L veut dire la même concentration que mg/ml et µg/µl.

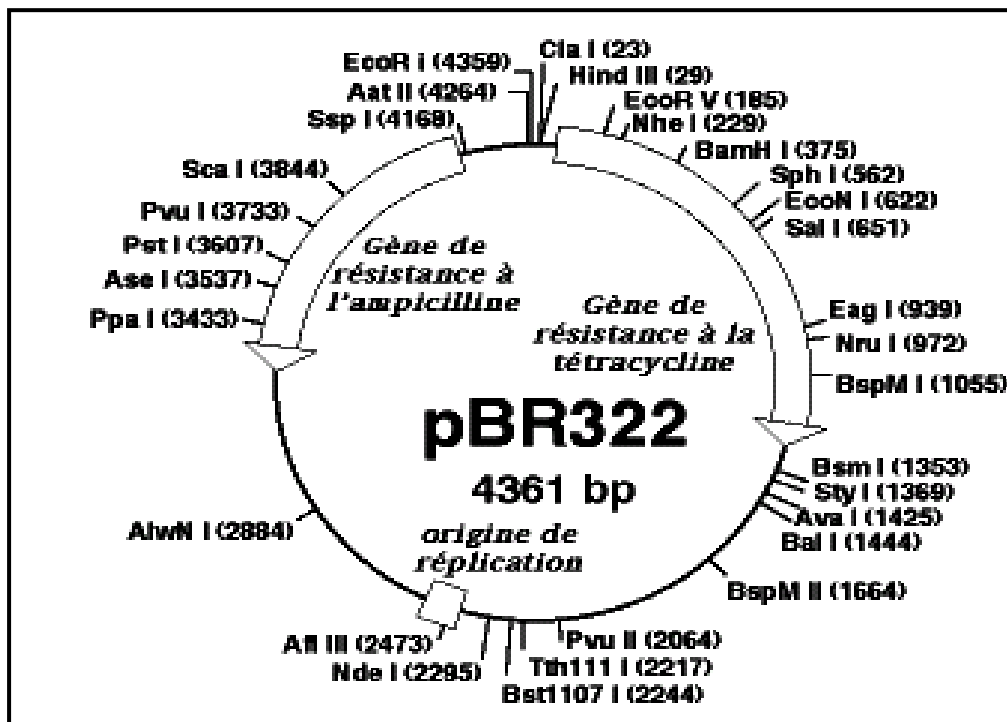
**Solutions exprimées en pourcentages:** Il existe trois manières pour exprimer le %:

- Pourcentage par poids: g de soluté / 100 g du solvant
- Pourcentage poids par volume (w/v): g de soluté/100 ml du solvant
- Pourcentage par volume: ml de soluté/100 ml du solvant

Le pourcentage poids par volume est l'unité la plus couramment utilisée en biologie moléculaire. 30% d'une solution de NaCl correspond à dissoudre 30 g de ce sel dans 100 ml de solvant. Pour les liquides communs comme les alcools (ethanol par exemple), on utilise le pourcentage par volume. Ainsi une solution d'ethanol 70% consiste à ajouter sur 70 ml d'ethanol 100% de l'eau pour atteindre 100 ml.

**"X":** Souvent pour des solutions utilisées en biologie moléculaire on trouve la désignation "X" après un nombre correspondant à une solution (5X TAE, 20X SSC .... etc). Quand on prépare ces solutions, c'est toujours pratique de préparer un stock concentré, qui sera dilué avec de l'eau lorsque'on veut les utiliser. La majorité des solutions, mais pas toutes, sont utilisées à une concentration 1X.

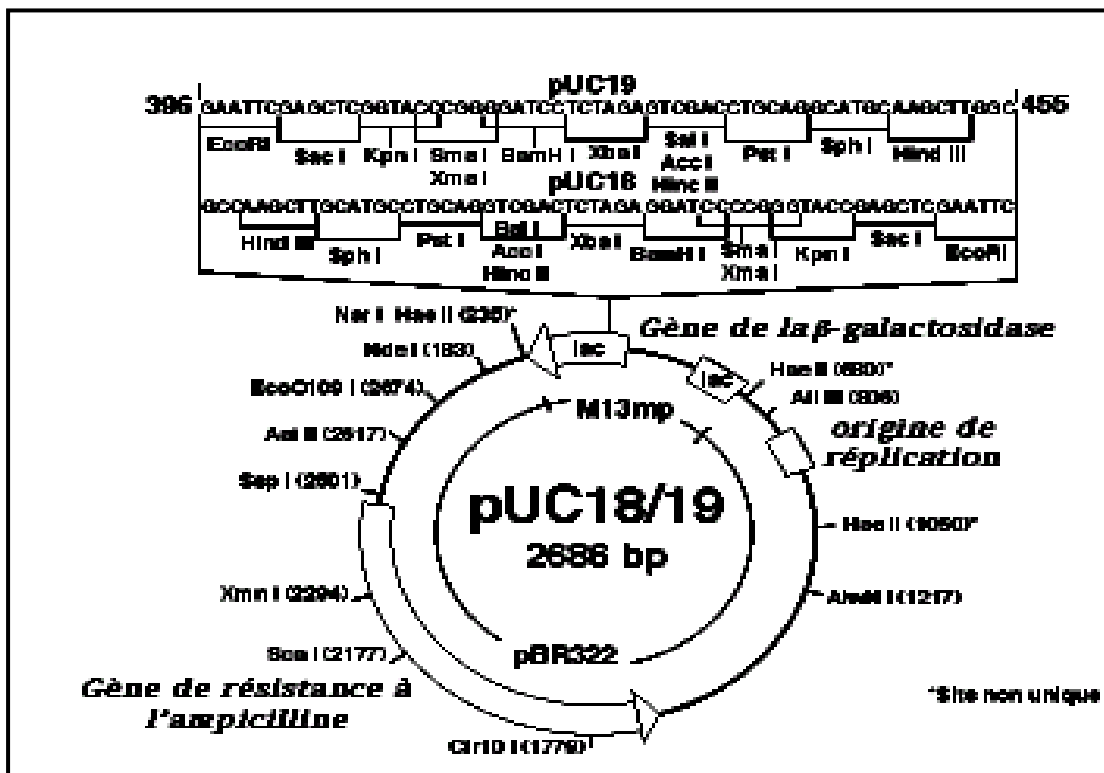
## Cartes des Plasmides pUC18 et pBR322



Carte du plasmide pBR322

- Le plasmide pBR322 est un ADN circulaire double brin de 4361 paires de bases. Par convention le nucléotide n°1 est situé au milieu du site de restriction EcoR I en direction du gène tet<sup>r</sup>.

- Il contient une origine de réplication (2535), un gène de résistance à la tétracycline ( $tet^r$  86-1276) et un gène de résistance à l'ampicilline ( $amp^r$  4153-3293). Le gène  $amp^r$  code pour une protéine ( $\beta$ -lactamase) de 286 acides aminés capable de cataboliser cet antibiotique.
- Le plasmide contient de nombreux sites de restriction répartis sur toute la séquence. Beaucoup de ces sites sont uniques, permettant de transformer l'ADN circulaire en ADN linéaire. Exemple, le site BamH I (position 375) au début du gène  $tet^r$ .
- La digestion par BamH I permet de recombinaison le vecteur avec un fragment de digestion par BamH I d'un ADN à cloner. La ligase du bactériophage T4 permet de recirculariser l'ADN du plasmide. Les cellules transfectées avec un tel plasmide recombinant feront la réplication du plasmide au cours de leur croissance. Elles n'expriment plus le gène  $tet^r$ , mais restent résistantes à l'ampicilline ce qui permet de les sélectionner et d'isoler l'ADN du plasmide ainsi cloné.



**Carte des plasmides pUC18/19**

- Les plasmides pUC18 et pUC19 sont des ADN circulaires double brin de 2696 paires de bases (pb). Ils ont été construits par recombinaison d'un fragment de pBR322 (2250 pb) et d'un fragment de M13 double brin (446 pb) : M13mp18 pour pUC18 et M13mp19 pour pUC19.
- L'ADN issu de pBR322 contient le gène  $amp^r$  qui permet la sélection par la résistance à l'ampicilline. L'ADN issu de M13 contient le promoteur du gène  $lacZ$  suivi d'une séquence modifiée comprenant un polylinker et la séquence de la partie NH<sub>2</sub> terminale du gène de la  $\beta$ -galactosidase. Cette séquence est indispensable pour que la bactérie hôte puisse faire la réaction de cette enzyme (phénomène d' $\alpha$ -complémentation).
- Le polylinker, hydrolysé par une des enzymes de restriction, peut recevoir une séquence d'ADN liée par recombinaison. Dans ce cas, l'expression du peptide complémentaire de la  $\beta$ -galactosidase est interrompue et la bactérie ne pourra plus digérer le X-Gal, ce qui l'empêchera de prendre la couleur bleue caractéristique. Les colonies résistantes à l'ampicilline et de couleur blanche sont donc transfectées par le vecteur recombinant.