

TP BMANGG : ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE DE L'ADN DU PLASMIDE pBR322 ET DE L'ADN CHROMOSOMIQUE DU PHAGE λ

Les activités à réaliser au cours de la séance ont pour objectifs :

- ✓ Confectionner un gel d'agarose pour électrophorèse de molécules d'ADN.
- ✓ Connaître le principe et réaliser une électrophorèse de molécules d'ADN en gel d'agarose.
- ✓ Connaître le mode d'action et réaliser des digestions enzymatiques de molécules d'ADN par des enzymes de restriction.
- ✓ Étudier l'influence de la topoisométrie du plasmide pBR322 sur sa migration électrophorétique.
- ✓ Déterminer la taille de l'ADN plasmidique pBR322.

1. RECOMMANDATION TECHNIQUE : PIPETAGE D'UN MICROVOLUME

Le pipetage d'un microvolume doit être réalisé comme suit :

- **Prélever le microvolumes à la surface de la solution à prélever**, puis **relever l'embout conique en le faisant glisser le long de la paroi du microtube** afin d'éliminer les gouttelettes subsistant à sa surface.
- **Vérifier visuellement** la présence du **microvolume dans l'embout conique**.
- **Déposer le microvolume sur la paroi** du nouveau microtube **sous forme de gouttes**.
- Après dépôt de différents microvolumes sur la paroi du nouveau microtube, **centrifuger quelques secondes** pour diriger **les gouttes au fond**.

2. DIGESTIONS ENZYMATIQUES D'ADN (1 seule digestion par étudiant du binôme)

2.1. LINÉARISATION DE L'ADN DU PLASMIDE pBR322 (1 étudiant du binôme)

- Dans un microtube préalablement identifié « pBR322+EcoRI », introduire :
 - 4 μL de la solution de plasmide pBR322 à $0,1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ notée « pBR322 ».
 - 5 μL de tampon pour enzymes de restriction noté « ERB » (*Enzyme Restriction Buffer*).
 - 1 μL de la solution d'enzyme de restriction « EcoRI ».
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant quelques secondes.
- Incuber le microtube à 37°C pendant 45 minutes minimum.
- Placer ensuite le microtube à 68°C pendant 10 minutes.
- Conserver les microtubes « pBR322 » et « pBR322+EcoRI » dans la glace.

2.2. RÉALISATION D'UN MARQUEUR DE TAILLES MOLÉCULAIRES À PARTIR DE L'ADN DU BACTÉRIOPHAGE λ (1 étudiant du binôme)

- Dans un microtube préalablement identifié « Tailles λ +HindIII », introduire :
 - 4 μL de la solution d'ADN du phage λ à $0,1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ notée « ADN λ ».
 - 5 de tampon pour enzymes de restriction noté « ERB » (*Enzyme Restriction Buffer*).
 - 1 μL de la solution d'enzyme de restriction « HindIII ».
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant quelques secondes.
- Incuber le microtube à 37°C pendant 45 minutes minimum.
- Placer ensuite le microtube à 68°C pendant 10 minutes.
- Conserver les microtubes « ADN λ » et « Tailles λ +HindIII » dans la glace.

3. ÉLECTROPHORÈSE DE MOLÉCULES D'ADN EN GEL D'AGAROSE (1 gel par binôme)

3.1. PRÉPARATION DU TAMPON D'ÉLECTROPHORÈSE

Le tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) est fourni 50 fois concentré : **TAE 50X**.

Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA)		
	SGH07	SGH09

→ Préparer **500 mL de tampon TAE 1X** en eau distillée.

Protocole de préparation + précaution(s) à prendre :

3.2. PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'AGAROSE

Préparer **50 mL de solution d'agarose à 0,7 % (m/V)** selon le protocole suivant :

→ Peser une masse d'agarose et l'introduire dans une fiole d'Erlenmeyer.

Calcul de la masse d'agarose à peser :

- Ajouter la quantité de tampon TAE 1X adéquate et agiter soigneusement.
- Couvrir avec un couvercle de boîte de Pétri et faire fondre au four à micro-ondes à puissance maximale, en arrêtant toutes les 20 secondes pour agiter.
⚠ **Attention : risque de brûlure** ⚠
- Quand la solution est parfaitement claire, laisser bouillir environ 20 secondes.
- Ajouter à la solution d'agarose le volume de GelRed (révélateur d'ADN) nécessaire sachant que la solution commerciale est à 10 000X et que sa concentration dans la solution d'agarose doit être à 1X.

GelRed			
	SGH05	SGH06	SGH09

Calcul du volume de GelRed à introduire dans le gel en surfusion + précaution(s) à prendre :

3.3. PRÉPARATION DE LA CUVE D'ÉLECTROPHORÈSE ET COULAGE DU GEL

- Sur le support de gel, délimiter avec du ruban adhésif une chambre dans laquelle on peut verser la solution d'agarose.
- Placer le support dans la cuve d'électrophorèse et couler la solution d'agarose en surfusion en commençant du côté où sera placé le peigne (8 puits) et en évitant la formation de bulles d'air.
- Placer immédiatement un peigne (8 puits) à l'extrémité du support correspondant à la cathode.
- Laisser le gel d'agarose se solidifier (environ 20 minutes) puis retirer le ruban adhésif.
- Ajouter le tampon TAE 1X dans la cuve de manière à couvrir le gel par environ 1 mm de tampon.
- Retirer verticalement et délicatement le peigne.

3.4. PRÉPARATION ET DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS

- Dans un microtube préalablement identifié « pBR322+EcoRI+TCh », introduire 10 μL de plasmide pBR322 digéré par l'enzyme de restriction EcoRI.
- Dans un microtube préalablement identifié « Tailles λ +HindIII+TCh », introduire 10 μL du marqueur de tailles moléculaires issu de la digestion de l'ADN du phage λ par l'enzyme de restriction HindIII.
- Ajouter 2 μL de tampon de charge, noté « TCh », dans les microtubes suivants :
 - « pBR322 ».
 - « ADN λ ».
 - « pBR322+EcoRI+TCh ».
 - « Tailles λ +HindIII+TCh ».
- Déposer les échantillons précédemment préparés dans des puits séparés en respectant le plan suivant :
 - Puits n°1 : x
 - Puits n°2 : 8 μL de solution d'ADN plasmidique pBR322.
 - Puits n°3 : 8 μL de plasmide pBR322 digéré par l'enzyme de restriction EcoRI.
 - Puits n°4 : 5 μL de marqueur de tailles moléculaires *EZ Load 500 pb Molecular Ruler*.
 - Puits n°5 : 6 μL de marqueur de tailles moléculaires issu de la digestion de l'ADN du phage λ par l'enzyme de restriction HindIII.
 - Puits n°6 : 5 μL d'ADN du phage λ non digéré.
 - Puits n°7 et n°8 : x

3.5. MIGRATION ET RÉVÉLATION

- Brancher les câbles d'alimentation (puits du côté de la cathode).
- Faire migrer dans les conditions suivantes : **60 V - 150 mA - 50 W - jusqu'à ce que les échantillons aient pénétré dans le gel.**
- Faire migrer dans les conditions suivantes : **100 V - 150 mA - 50 W - pendant au moins 1 heure.**
- Arrêter la migration au plus tard quand le témoin de migration bleu turquoise est à 1 cm du bord du gel.
- Débrancher le générateur.
- Sortir le gel de la cuve avec des gants.
- Placer le gel sur le transilluminateur (table UV).
- Allumer le transilluminateur.
- ⚠ **Attention : les UV sont nocifs pour la rétine** ⚠
- Photographier le gel pour analyse (à insérer dans le compte-rendu).

4. COMPTE RENDU

Q1. Donner le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel d'agarose.

Q2. Déterminer :

- le nombre de site(s) de restriction EcoRI présent(s) dans le plasmide pBR322 et le nombre de fragment(s) d'ADN généré(s) par une digestion de l'ADN plasmidique pBR322 par l'enzyme EcoRI.
- le nombre de site(s) de restriction HindIII présent(s) dans l'ADN du bactériophage λ et le nombre de fragment(s) d'ADN généré(s) par une digestion de l'ADN phagique λ par l'enzyme HindIII.

- Q3.** Analyser les résultats obtenus sur la piste n°2.
- Q4.** À partir des pistes n°4 et n°5, indiquer, en justifiant, le marqueur de tailles le mieux adapté pour déterminer la taille du plasmide pBR322.
- Q5.** À l'aide d'outils informatiques, tracer la droite d'étalonnage du gel et en déduire la taille du plasmide pBR322.
- Q6.** Commenter et expliquer l'intensité de fluorescence des bandes obtenues pour l'ADN du phage λ digéré par HindIII.

TP BMGG : ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE DE L'ADN DU PLASMIDE pBR322 ET DE L'ADN CHROMOSOMIQUE DU PHAGE λ

DOSSIER SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

- Fiche n°1 : Utilisation des enzymes de restriction**
- Fiche n°2 : Carte du plasmide pBR322**
- Fiche n°3 : Bactériophage λ**
- Fiche n°4 : Électrophorèse d'ADN en gel d'agarose**
- Fiche n°5 : Marqueur de tailles *EZ Load 500 bp Molecular Ruler***

FICHE N°1 : UTILISATION DES ENZYMES DE RESTRICTION**1. CONDITIONS D'HYDROLYSE DES ENZYMES DE RESTRICTION**

Les endonucléases de restriction reconnaissent des **sites de restriction palindromiques** de 4 à 8 paires de bases (pb) dans un ADN double brin. Elles ont donc des **fréquences de coupure différentes**.

Calcul de la probabilité que l'enzyme de restriction Sau3A reconnaisse sa séquence spécifique 5'-GATC-3' et coupe dans une molécule d'ADN contenant 25 % de dAMP, 25 % de dTMP, 25 % de dCMP et 25 % de dGMP :

- Exemples :
- une enzyme reconnaissant un site de 6 pb coupe l'ADN en moyenne toutes les pb.
 - une enzyme reconnaissant un site de 8 pb coupe l'ADN en moyenne toutes les pb.

Lorsqu'on procède à une hydrolyse d'ADN par une endonucléase de restriction, on cherche en général à obtenir une **hydrolyse totale**.

Il sera donc nécessaire d'évaluer la quantité d'enzyme à utiliser en fonction de la masse d'ADN à digérer en 1 heure par exemple.

Une unité d'enzyme de restriction est la quantité d'enzyme de restriction nécessaire pour hydrolyser complètement 1 µg d'ADN défini (ADN du phage λ en général) en 1 heure dans des conditions de salinité, de pH et de température définies (et optimales) dans un volume de 50 µL.

La plupart des solutions commerciales sont à **10 U·µL⁻¹**.

En pratique, on travaille avec un rapport de **2 à 5 U par µg d'ADN**, dans un volume de **10 à 25 µL** sur des **quantités d'ADN de 100 à 500 ng**.

L'incubation se fait à 37°C, et l'arrêt de la digestion est réalisée par chauffage (10 minutes à 68°C) puisque les endonucléases de restriction sont **thermosensibles**.

Le **tampon d'hydrolyse** approprié est en général fourni avec l'enzyme et permet d'obtenir des conditions appropriées de **salinité** et de **pH**.

2. PRÉCAUTIONS LIÉES À LA MANIPULATION DES ENZYMES DE RESTRICTION

Les enzymes de restriction sont des **produits coûteux et fragiles**, ce qui suppose certaines précautions :

- Ces enzymes se conservent à **-20°C**.
- Elles doivent être sorties du congélateur seulement au moment de l'utilisation et **les tubes doivent être placés dans la glace**.
- Tout prélèvement dans la solution stock se fait avec des **gants** et un **embout conique stérile**.
- Il faut **changer d'embout conique à chaque prélèvement** même si on prélève dans le même tube.
- La solution stock est remplacée au congélateur après usage.

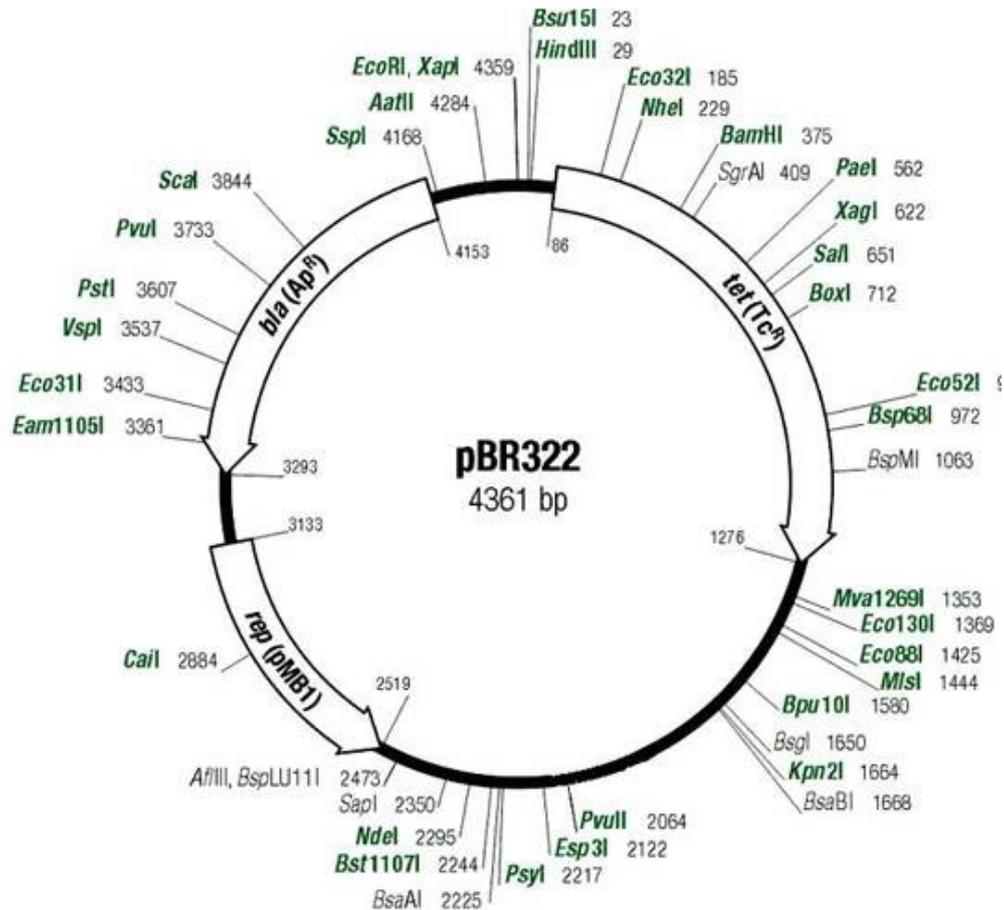
FICHE N°2 : CARTE DU PLASMIDE pBR322

Un plasmide est une molécule d'ADN extrachromosomique, capable de réplication autonome, et non essentiel à la survie de la cellule.

Un plasmide est généralement une molécule d'ADN double brin circulaire.

On les rencontre essentiellement chez les bactéries.

Le plasmide pBR322 est un plasmide **4 361 paires de bases**, dont la carte est présentée ci-après :



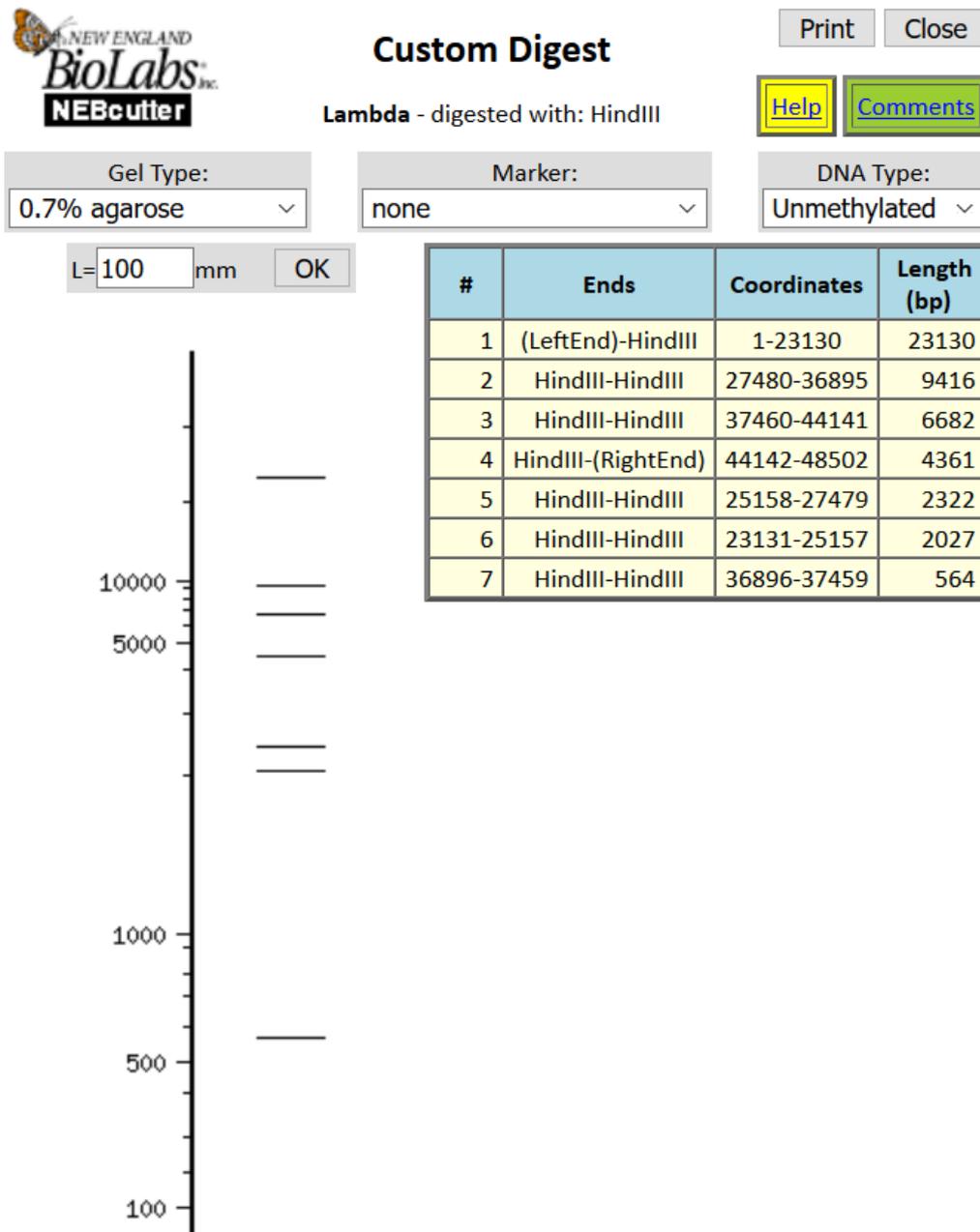
Ce plasmide contient :

- Une origine de réplication : **rep** (issu du plasmide pMB1).
- Un gène de résistance aux β -lactamines (dont l'ampicilline) : **bla**.
- Un gène de résistance à la tétracycline : **tet**.
- des sites de restriction, dont certains sont présents en un seul exemplaire (en gras).

Dans des conditions standards de culture, le plasmide pBR322 peut être présent entre 10 et 20 copies chez *Escherichia coli*.

Ce plasmide, dit de première génération, est utilisé comme vecteur de clonage en génie génétique.

Document n°3 : Étude *in silico* d'une électrophorèse en gel d'agarose de l'ADN du bactériophage λ après digestion par l'enzyme de restriction HindIII (*NebCutter*)



La biologie moléculaire et la biochimie de ce bactériophage sont particulièrement bien connues, ce qui fait qu'il a été largement utilisé comme vecteur de clonage de l'ADN, ainsi que pour permettre l'insertion de séquences d'ADN spécifiques dans le génome d'*Escherichia coli*, grâce au mécanisme d'intégration lysogénique du bactériophage.

FICHE N°4 : ÉLECTROPHORÈSE D'ADN EN GEL D'AGAROSE

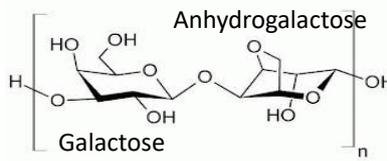
1. PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'ÉLECTROPHORÈSE D'ADN EN GEL D'AGAROSE

L'électrophorèse des acides nucléiques en gel d'agarose est une méthode de base en biologie moléculaire. Elle peut être employée dans un **but analytique** (exemple : détermination de la taille de fragments d'ADN) ou **préparatif** (exemple : contrôle de purification d'un ADN de taille connue).

Elle permet de séparer des fragments d'acides nucléiques de taille comprise entre **0,2 et 50 kpb**.

2. LE SUPPORT : L'AGAROSE

L'agarose est un **polyside linéaire, électriquement neutre** (d'où un très faible courant d'électro-endosmose pour de l'agarose ultra pur).



Les chaînes polysidiques sont maintenues par des liaisons faibles, hydrogène essentiellement.

L'agarose se dissout dans l'eau à ébullition et la solution reste à l'état liquide pour des températures supérieures à 45°C (surfusion). En deçà de 40°C, la solution se solidifie et forme un gel stable mais fragile.

3. FACTEURS DE MIGRATIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES

La migration des molécules d'ADN dans un gel d'agarose dépend :

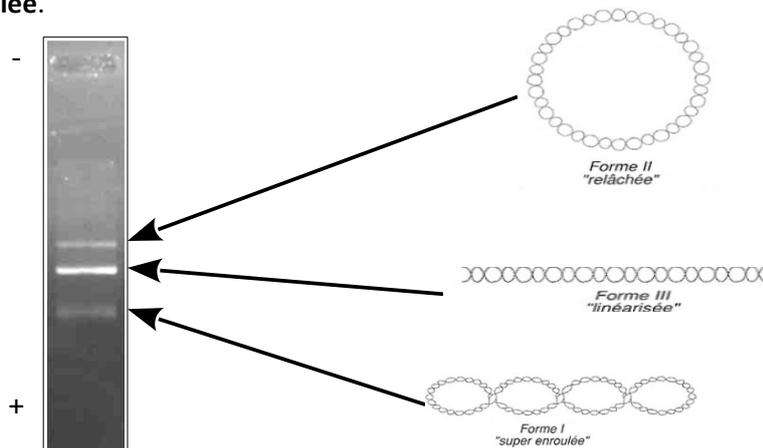
3.1. DES MOLÉCULES L'ADN

À **pH neutre**, les molécules d'ADN sont des **polyanions** du fait des groupements phosphates et migrent donc vers l'anode (pôle positif).

Les molécules d'ADN ont la **même densité de charge q/r grâce aux groupements phosphates**. Les molécules d'ADN ont donc la **même mobilité électrophorétique absolue μ** .

La séparation se fait selon la taille par effet de tamisage lié au support : les molécules d'ADN linéaires migrent d'autant moins loin qu'elles sont longues.

Pour l'**ADN plasmidique**, la migration dépendra également de la **topoisométrie du plasmide : linéaire, relâchée, surenroulée**.



Cependant, la position de ces formes sur le gel peut varier selon le plasmide et les conditions d'électrophorèse.

3.2. DE LA CONCENTRATION EN AGAROSE

Un fragment d'ADN **migre d'autant plus vite que la concentration en agarose du gel est faible**.

Un gel de concentration donnée permet donc de séparer des fragments dont la taille est comprise dans une fourchette définie :

% d'agarose	Domaine de séparation efficace pour de l'ADN bicaténaire, en kpb
0,3	5 – 60
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2	0,1 – 2

3.3. DE LA TENSION DU COURANT ÉLECTRIQUE

On obtient une meilleure résolution lorsqu'on travaille à faibles voltages, idéalement **5V·cm⁻¹ de gel**.

3.4. DU TAMPON DE MIGRATION

On utilise principalement deux types de tampon d'électrophorèse :

- **Tampon TAE (Tris Acétate EDTA)**
- **Tampon TBE (Tris Borate EDTA)**

Le tampon TBE permet une migration plus rapide mais la récupération des fragments d'ADN est plus difficile.

4. LE SUIVI DE MIGRATION

Les échantillons d'ADN sont mélangés à un **tampon de charge** (loading buffer) qui contient :

- un « **alourdisseur** » (glycérol, ficoll ou saccharose) : permet d'entraîner l'échantillon d'ADN au fond du puits.
- des **témoins de migration** : le **bleu de bromophénol (bleu-violet)** migre avec les fragments d'ADN de petites tailles (500 pb pour un gel à 1 %), le **xylène cyanol (bleu turquoise)** qui migre avec les fragments d'ADN de grandes tailles (4 à 5 kpb pour un gel à 1 %).

5. RÉVÉLATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

5.1. UTILISATION DE COLORANTS

5.1.1. MOLÉCULES FLUORESCENTES : exemple du bromure d'éthidium (BET)

Il s'agit d'un agent dont la fluorescence est amplifiée lorsqu'il s'intercale entre les plateaux de bases de l'ADN.

Excité par des UV courts (autour de $\lambda = 300$ nm) grâce à un transilluminateur, il réémet une lumière visible orange. Le gel peut alors être photographié pour analyse.

Le BET est d'une grande sensibilité puisqu'on peut ainsi détecter des quantités d'ADN de l'ordre de 5-10 ng.

Cependant, **il doit être manipulé avec d'extrêmes précautions car il est hautement mutagène**.

On tend actuellement à substituer au BET des molécules fluorescentes moins dangereuses telles que le GelRed ou le SybrGreen.

5.1.2. AUTRES COLORANTS

Il existe des colorants non fluorescents alternatifs au BET.

S'ils ont l'avantage d'être moins dangereux à manipuler, ils sont toutefois moins sensibles et colorent également le support, qu'il est nécessaire de décolorer.

Exemples : Fast Blast, AgNO₃

5.2. RÉVÉLATIONS INDIRECTES

5.2.1. AUTORADIOGRAPHIE

Le marquage radioactif des acides nucléiques se fait généralement par du ³²P.

Les radiations radioactives impressionnent un film photographique placé en regard du gel.

On peut éventuellement quantifier les acides nucléiques en utilisant un densitomètre.

5.2.2. HYBRIDATION AVEC DES SONDÉS MARQUÉES

Cette méthode nécessite un **transfert des acides nucléiques sur un support adapté à la réaction d'hybridation** (exemples : membrane de nitrocellulose ou de nylon).

Après transfert, les molécules double brin doivent être dénaturées.

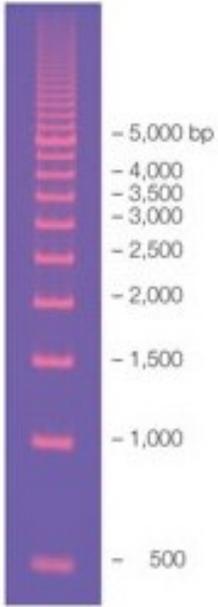
On hybride ensuite avec une sonde marquée radioactivement (sonde chaude) ou avec une enzyme (sonde froide).

Si cette méthode concerne des **molécules d'ADN**, il s'agit d'un **Southern blot**.

Si elle concerne des **molécules d'ARN**, il s'agit d'un **Northern blot**.

Contrairement aux révélations précédentes, il s'agit d'une **révélation spécifique** : on ne révèle que les molécules d'acide nucléique que l'on recherche (dont la séquence est complémentaire à celle de la sonde utilisée).

FICHE N°5 : MARQUEUR DE TAILLES EZ Load 500 bp Molecular Ruler

	<h3>EZ Load 500 bp Molecular Ruler</h3> <p>Catalog Number 170-8354</p> <p>Use Load 5 μl per lane. This loading translates into 400 ng of DNA per lane. Adjustments may be made to the loading volume for different well sizes and desired band intensity. The EZ Load 500 bp molecular ruler can be resolved in agarose gels of up to 2%.</p> <p>Contents 1 vial EZ Load 500 bp molecular ruler, 500 μl supplied in 5% glycerol, 15 mM Tris pH 8.0, 1.5 mM EDTA, 0.04% bromophenol blue, 0.04% xylene cyanole FF.</p> <p>Concentration 80 μg/ml</p> <p>Size 16 bands: 500–8,000 bp in exact 500 bp increments. A visually distinct reference band at 5 kb contains three times the concentration of material found in the other bands.</p>
--	--