

Les Acides Nucléiques

Séance 4

d- Techniques d'analyses de l'ADN:

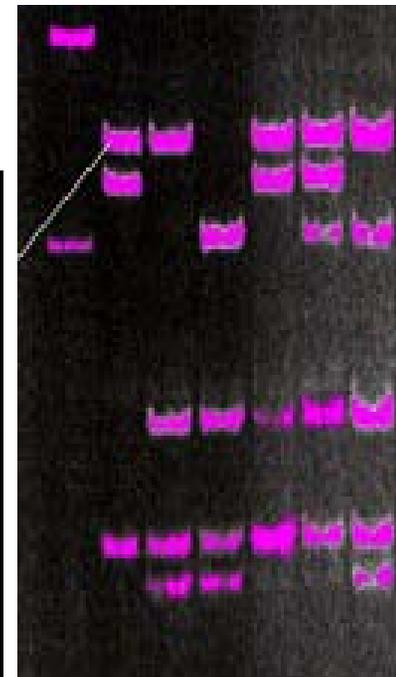
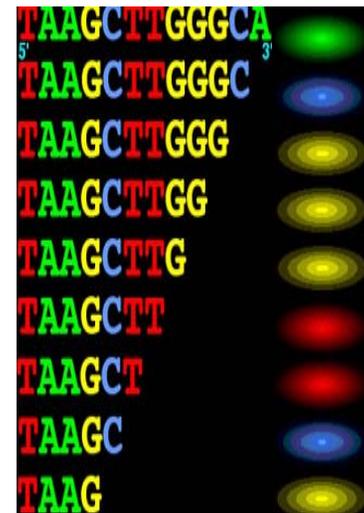
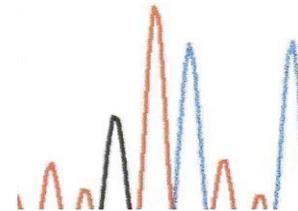
- . Southern blot
- . PCR
- . Séquençage

- Semestre 3 -

2005-2006

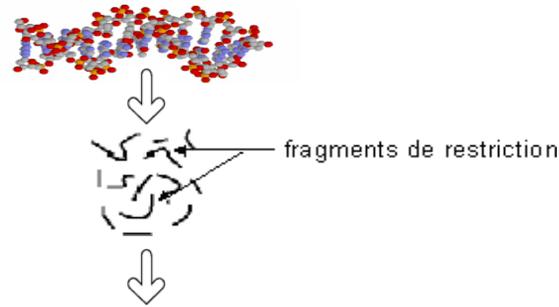
Pr. Saaïd AMZAZI

TTG TCTTC
80

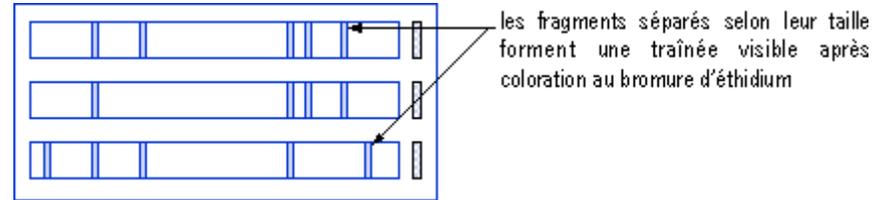


Southern blot

1- Clivage enzymatique de restriction

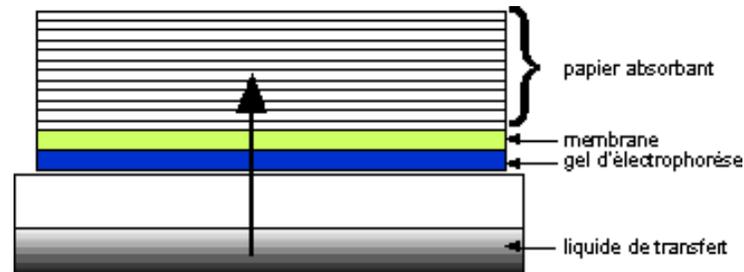


2- Électrophorèse sur gel d'agarose

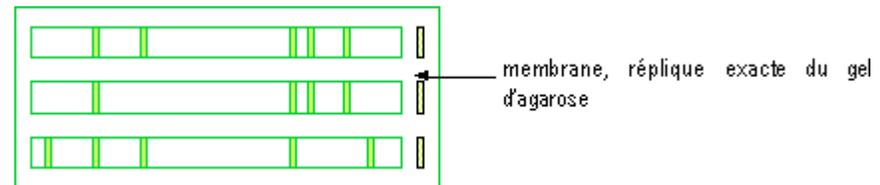


3- Dénaturation dans le gel des fragments de restriction

4- Transfert sur support solide (membrane de nylon ou nitrocellulose) par capillarité (buvardage)



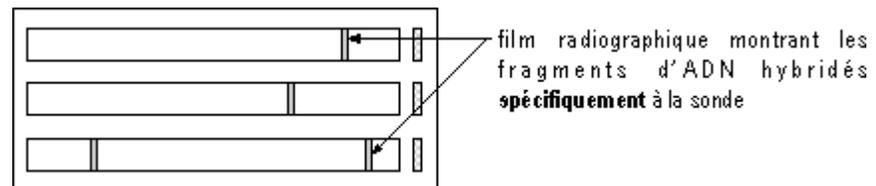
5- Fixation de l'ADN sur la membrane par cuisson (mb. nitrocellulose) ou exposition U.V (mb. nylon)

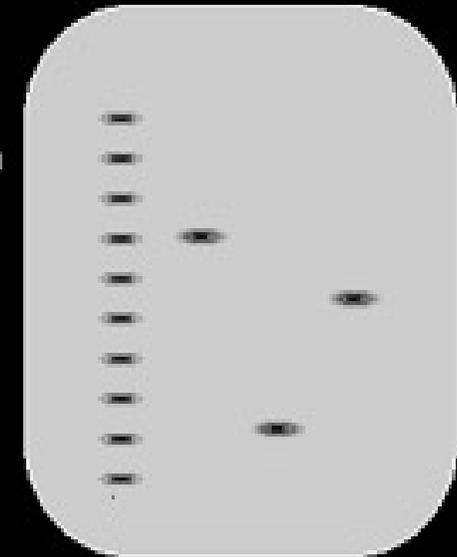
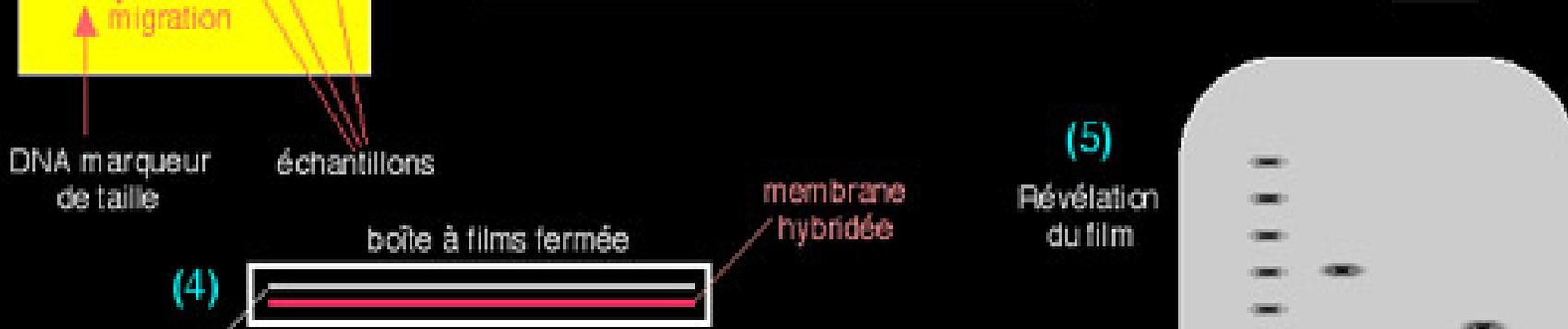
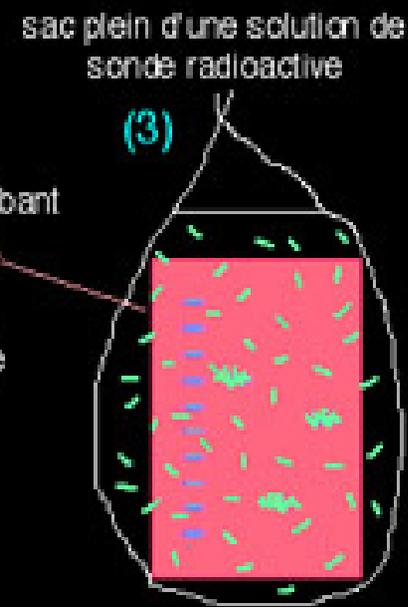
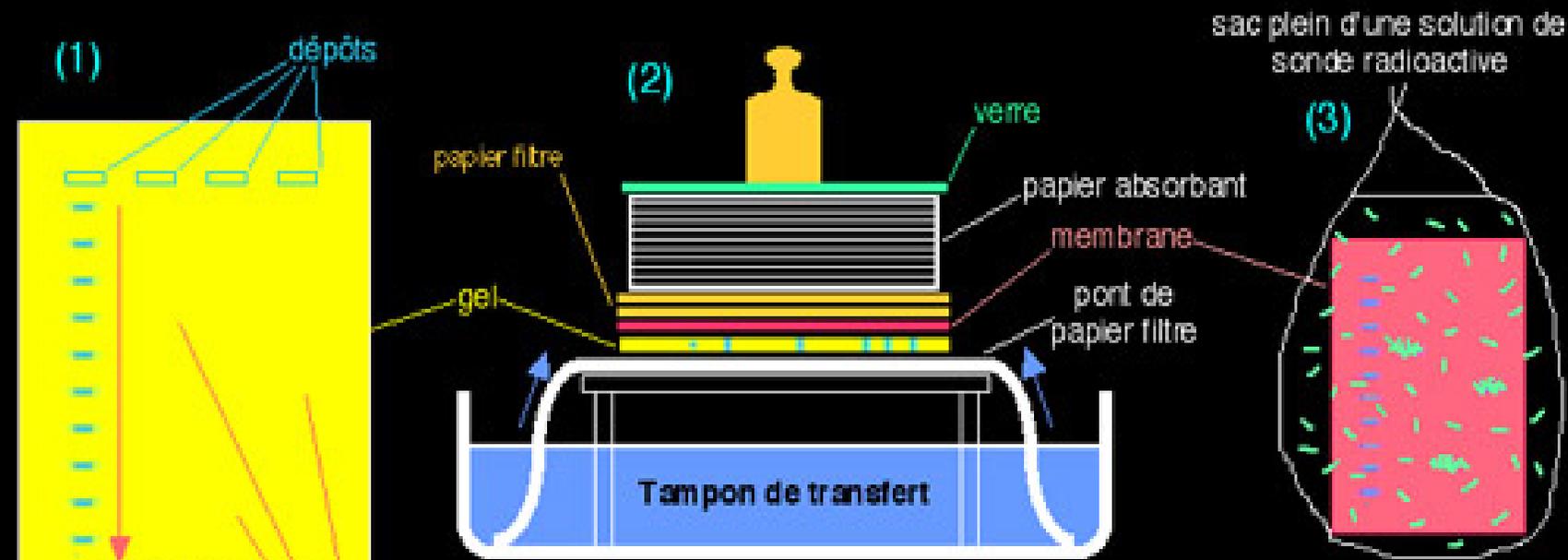


6- Hybridation avec une sonde marquée dénaturée

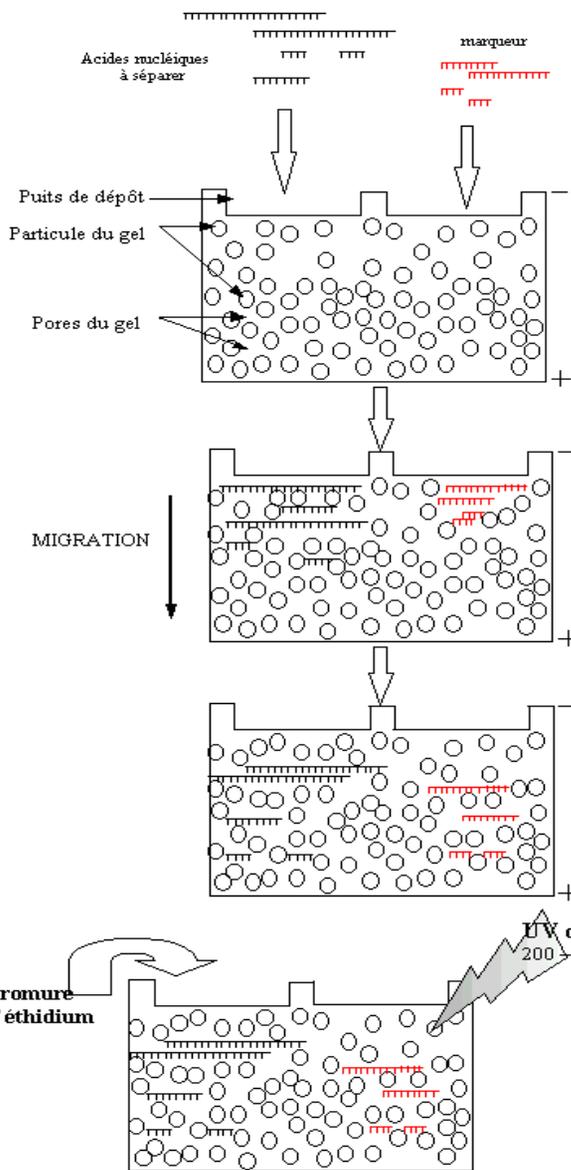
7- lavages

8- Autoradiographie





Southern blot



1 - Mélange d'acides nucléiques à séparer, chargés négativement

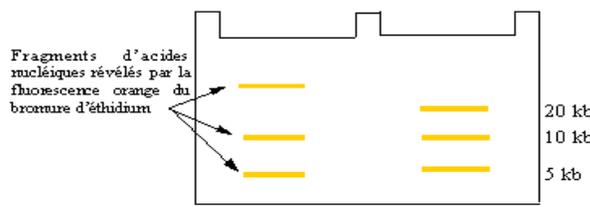
2 - Placer le mélange sur gel d'agarose ou polyacrylamide au niveau d'un puits de dépôt.

3 - Placer dans un deuxième puits une molécule marqueur dont la taille des fragments est connue.

4 - Appliquer un champ électrique

5 - **Migration** : les molécules chargées négativement cheminent vers l'anode par les pores du gel à une vitesse inversement proportionnelle à la longueur de leur chaîne.

6 - **Visualisation** des acides nucléiques : on ajoute du bromure d'éthidium qui va s'intercaler entre les bases des acides nucléiques



Les tailles des fragments donc de l'acide nucléique de départ peuvent être estimées par comparaison avec les bandes de la molécule marqueur.

CATHODE

paires de bases
(pb)

1000

800

700

600

500

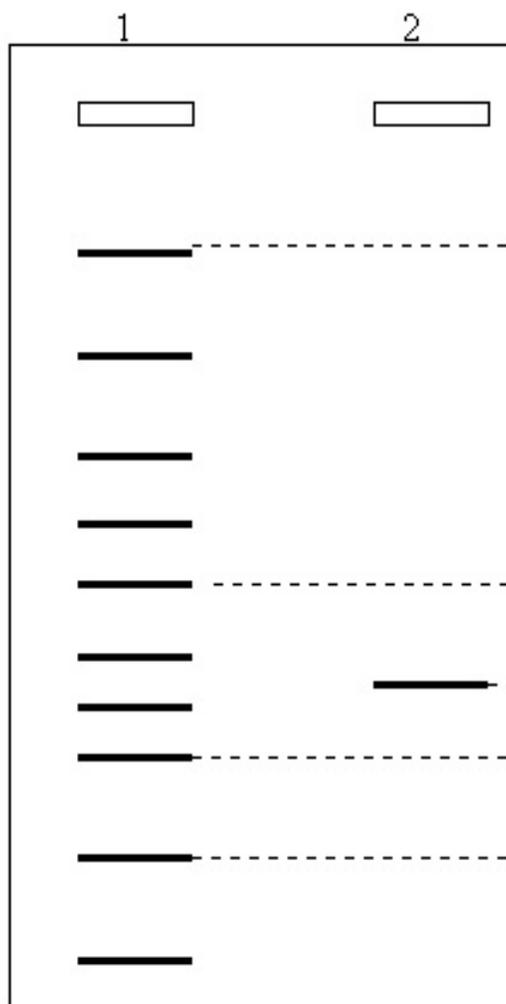
400

300

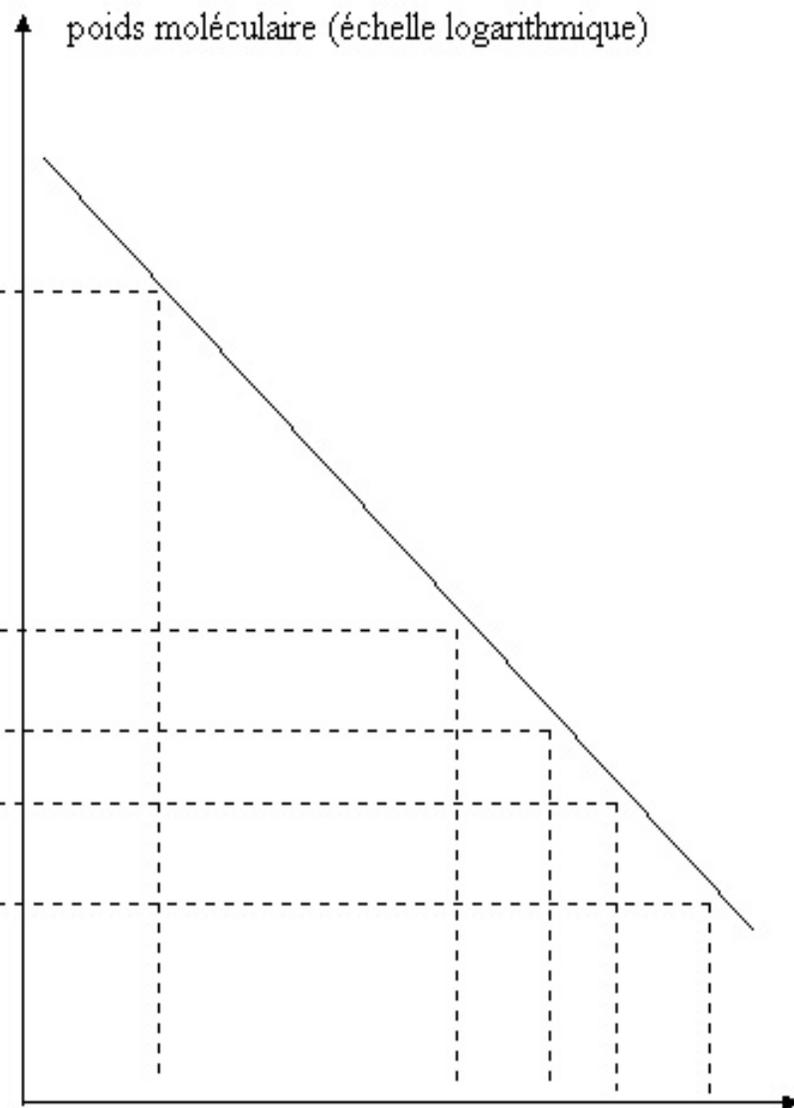
200

100

ANODE



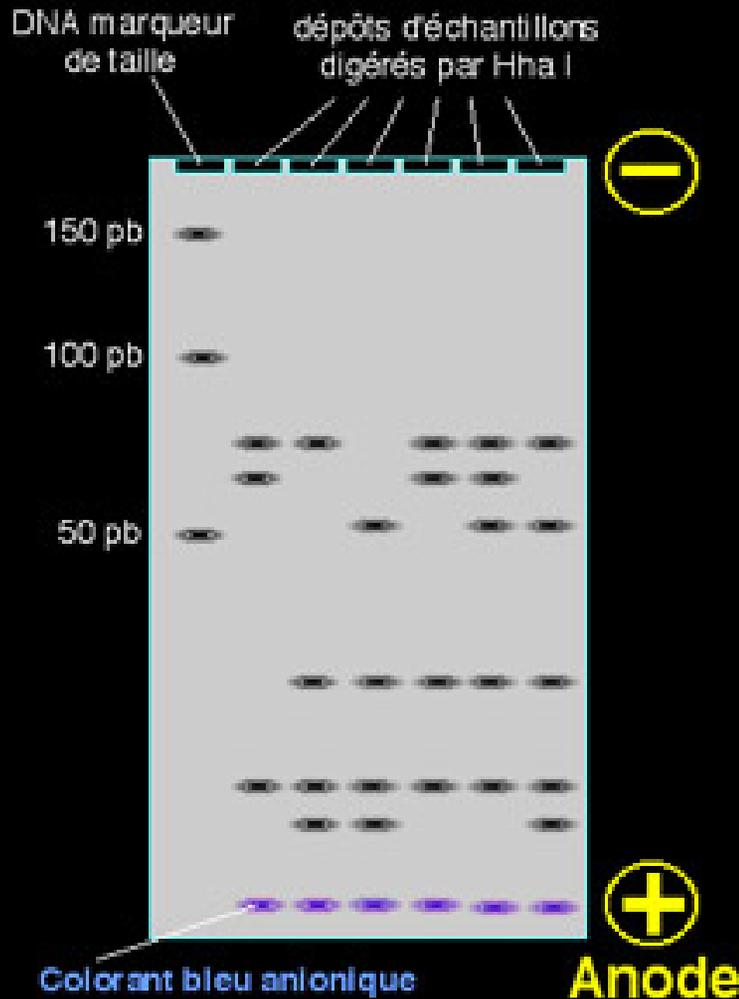
pois moléculaire (échelle logarithmique)



migration en mm

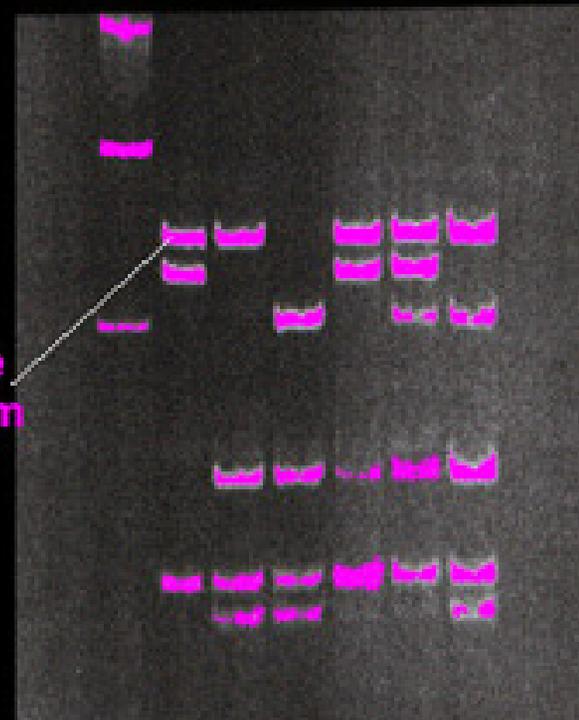
(par rapport au puits d'inclusion)

Electrophorèse de DNA



UV 254 nm

Bromure d'Ethidium



PCR

1- **digestion enzymatique** par endonucléase de restriction

Quantité infime d'ADN d'un échantillon de sang

2- **dénaturation** de l'ADN à 94°C

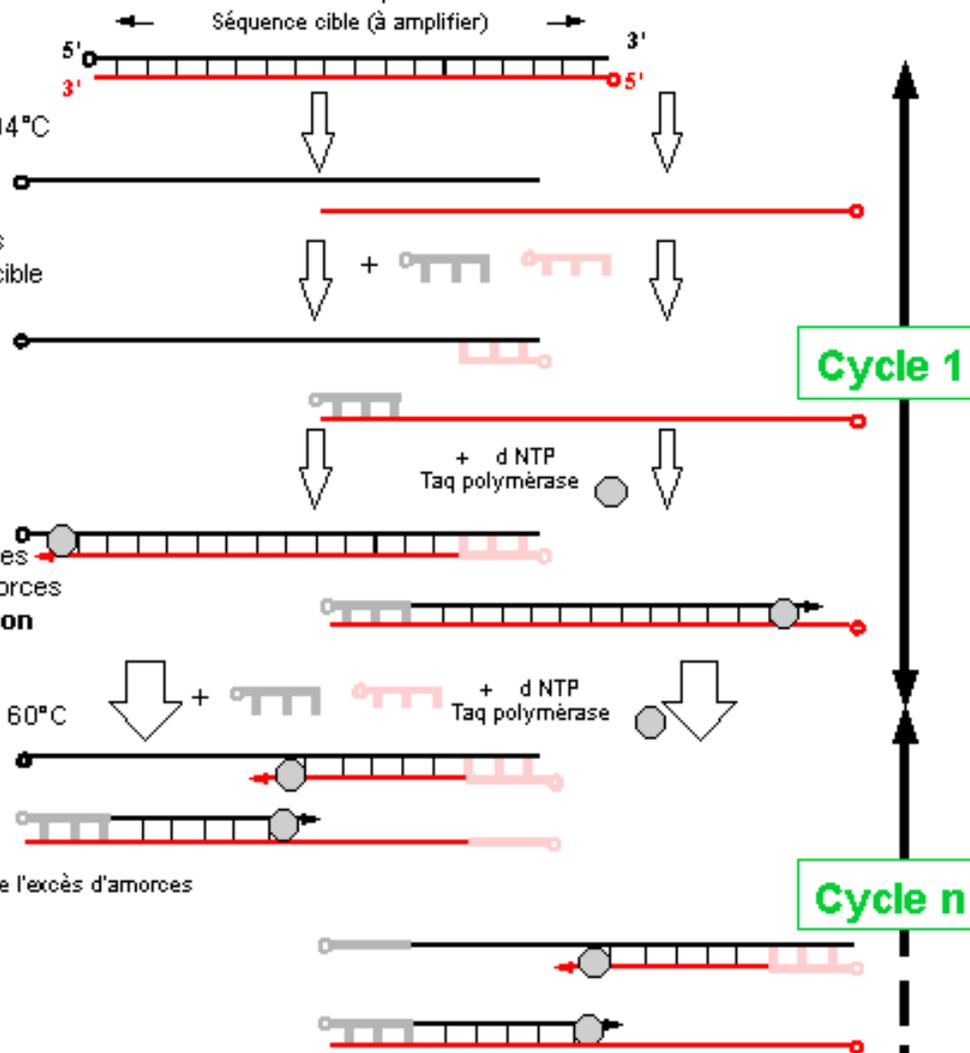
3- préparation de deux **sondes** nucléotidiques complémentaires des extrémités de la séquence cible

4- ajout des sondes en excès à 50-60°C : **hybridation**

5- synthèse des brins à partir des sondes hybridées servant d'amorces (=primers) à 60-70°C : **extension**

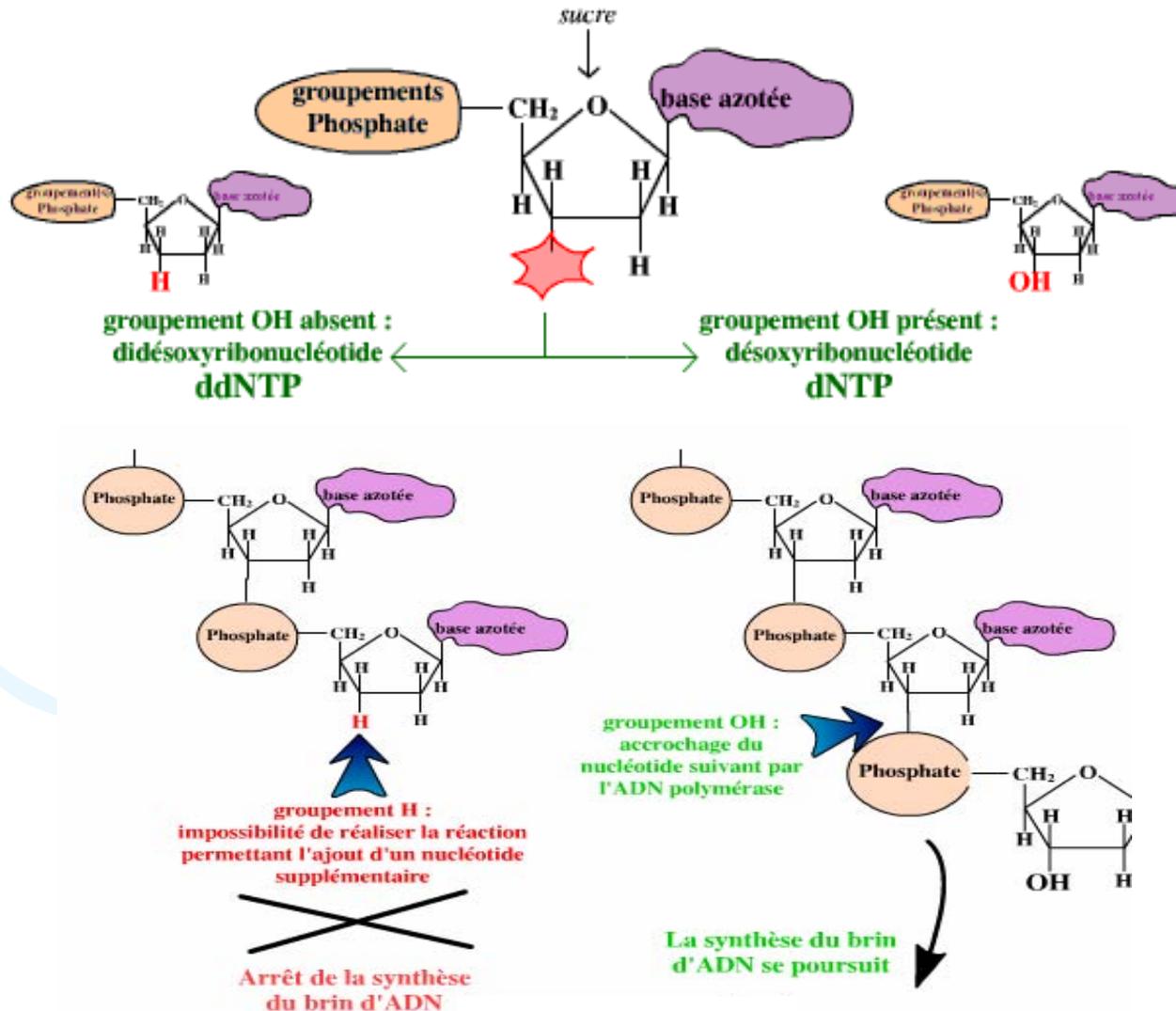
6- **dénaturation** des duplex néoformés à 95°C puis retour à 60°C

Reprise de la polymérisation du fait de l'excès d'amorces



Répétition de cycles de synthèse/dénaturation réalise une augmentation exponentielle de la quantité initiale d'ADN (à chaque cycle, le nombre d'exemplaires de la séquence encodée par les deux amorces double !)

Méthode enzymatique de Séquençage de l'ADN selon Sanger



ADN à séquencer (brin transcrit)

A T G G T A C* G T C* A A C* T A

T A C C A T (G) C A (G) T T G-H
T A C C A T (G) C A G-H
T A C C A T G-H

***** = nucléotides à Cytosine

↑
synthèse du brin
d'ADN
complémentaire

→ arrêt de la synthèse,
par utilisation d'un **ddGTP**

(G) utilisation d'un **dGTP** :
la synthèse continue

dATP dCTP
dGTP ddGTP dTTP
 (un peu)

Révélation par fluorescence ou par radioactivité

