



Laboratoire de Microbiologie
et Biologie Moléculaire



Faculté des Sciences
Rabat

Filière SVI - S4
Module de Biochimie et Biologie Moléculaire
Elément 2: Biologie Moléculaire

TD N 1: TECHNIQUES DE SEPARATION ET D'ANALYSE DES ACIDES NUCLÉIQUES: ADN, ARN & PLASMIDES

Année universitaire 2010-2011

Dr. Leila MEDRAOUI

OBJECTIFS

Connaître les principes des techniques de base de la biologie moléculaire.

Savoir décrire les procédés employés et leur utilité.

Connaître les outils utilisés dans ces techniques.

Savoir analyser les résultats de ces techniques.

PLAN

1. Purification des acides nucléiques

1.1. Extraction des ADN

1.2. Extraction des ARN

1.3. Extraction des plasmides

1.3.1. Rappel sur les plasmides

1.3.2. Purification par Lyse alcaline

1.3.3. Purification par Gradient de chlorure de césium

2. Séparation des acides nucléiques

2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

2.2. Electrophorèse sur gel de polyarylamide

3. Elaboration de Cartes de restrictions des plasmides

1. Purification des acides nucléiques

1.1. Extraction de l'ADN

= technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus.

L'ADN extrait → digestion, hybridation (Southern blot), séquençage, PCR, clonage...

Différents protocoles pour extraire l'ADN avec même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN...)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

Différentes variantes employées:

l'**ADN génomique** (issu du ou des chromosomes des cellules analysées)

Ou

l'**ADN plasmidique** (provenant de plasmides portés le plus souvent par des cellules bactériennes comme *Escherichia coli*).

Kits commerciaux → extractions rapides à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

Préparation d'ADN génomique

lyse des cellules ou des tissus

=broyage ou pas + extraction/détergents

- disperser les bicouches lipidiques des membranes
- dénaturer les protéines srtt celles associées à l'ADN dans la chromatine

Solution très visqueuse

l'ADN : très longs filaments s'opposant aux écoulements hydrodynamiques.

déprotéinisation de la solution

=extraction / solvants organiques, en général du phénol +/-chloroforme

protéines dénaturées → précipité à l'interface phénol-eau = « gâteau »
l'ADN en solution dans la phase aqueuse

précipitation de l'ADN

=addition d'éthanol ou d'isopropanol dans la phase aqueuse

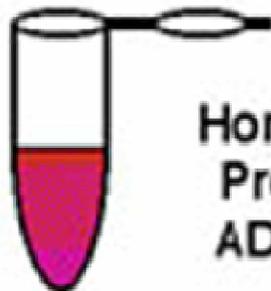
L'ADN collecté/centrifugation
→ dissous dans Tampon ou Eau pure.

Pour éliminer les ARNs → Traitement par l'ARNase.

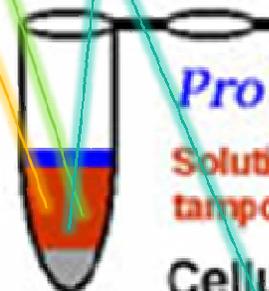
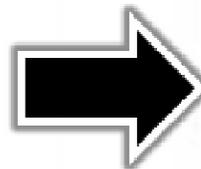
tampon sans pression osmotique, faisant éclater les membranes fermées

EDTA inhibe les nucléases en chélatant les ions Mg^{++} & Ca^{++}

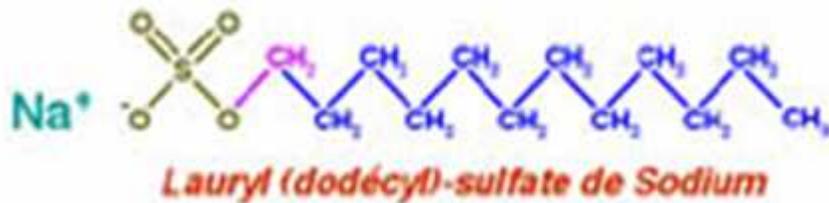
Homogénéisation, déprotéinisation



Homogénat
Protéines
ADN, ARN



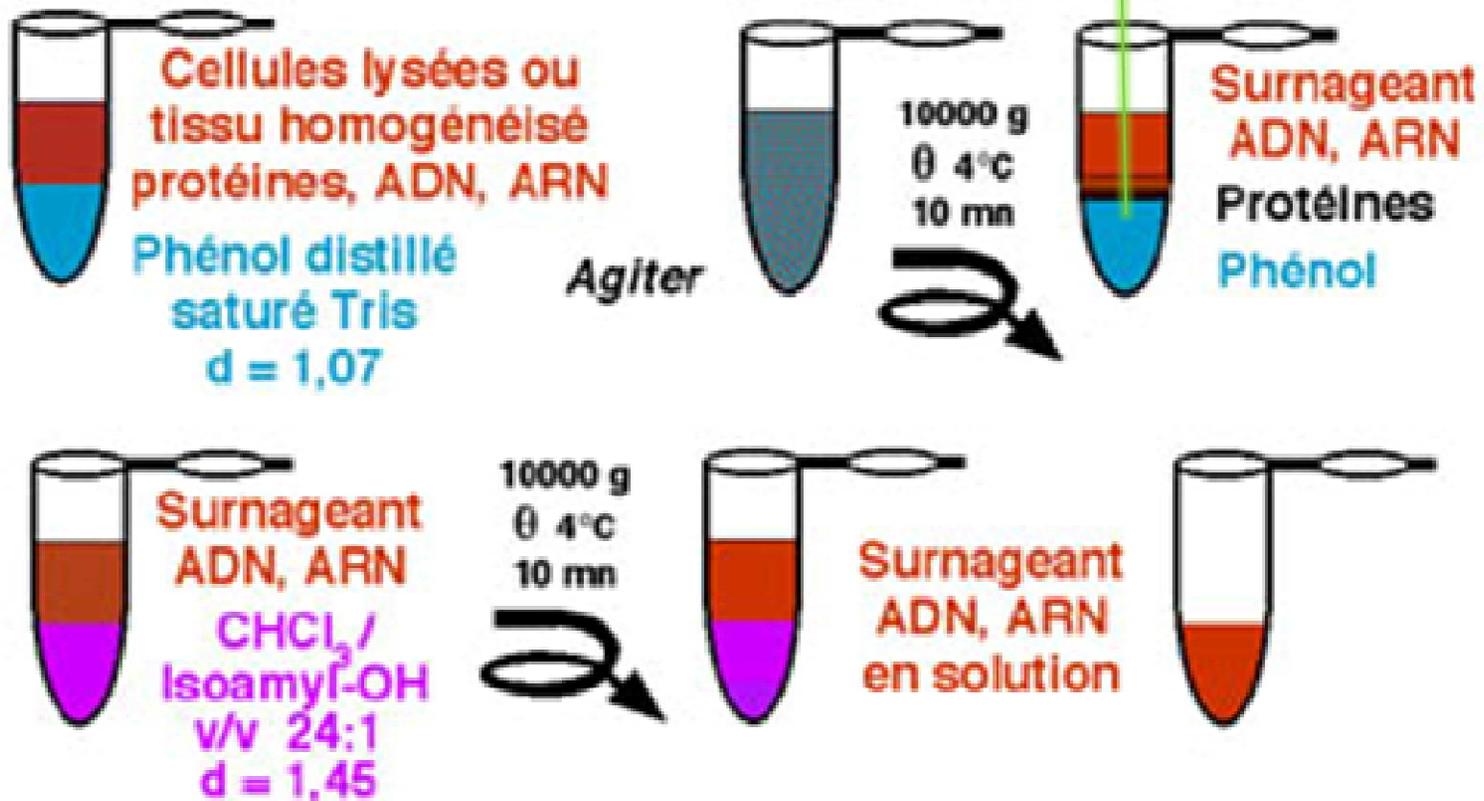
Protéinase K
Solution de lyse :
tampon; EDTA; SDS
Cellules



SDS dénature les lipoprotéines membranaires et les enzymes lysosomiales et libère ainsi l'ADN tout en préservant sa structure.

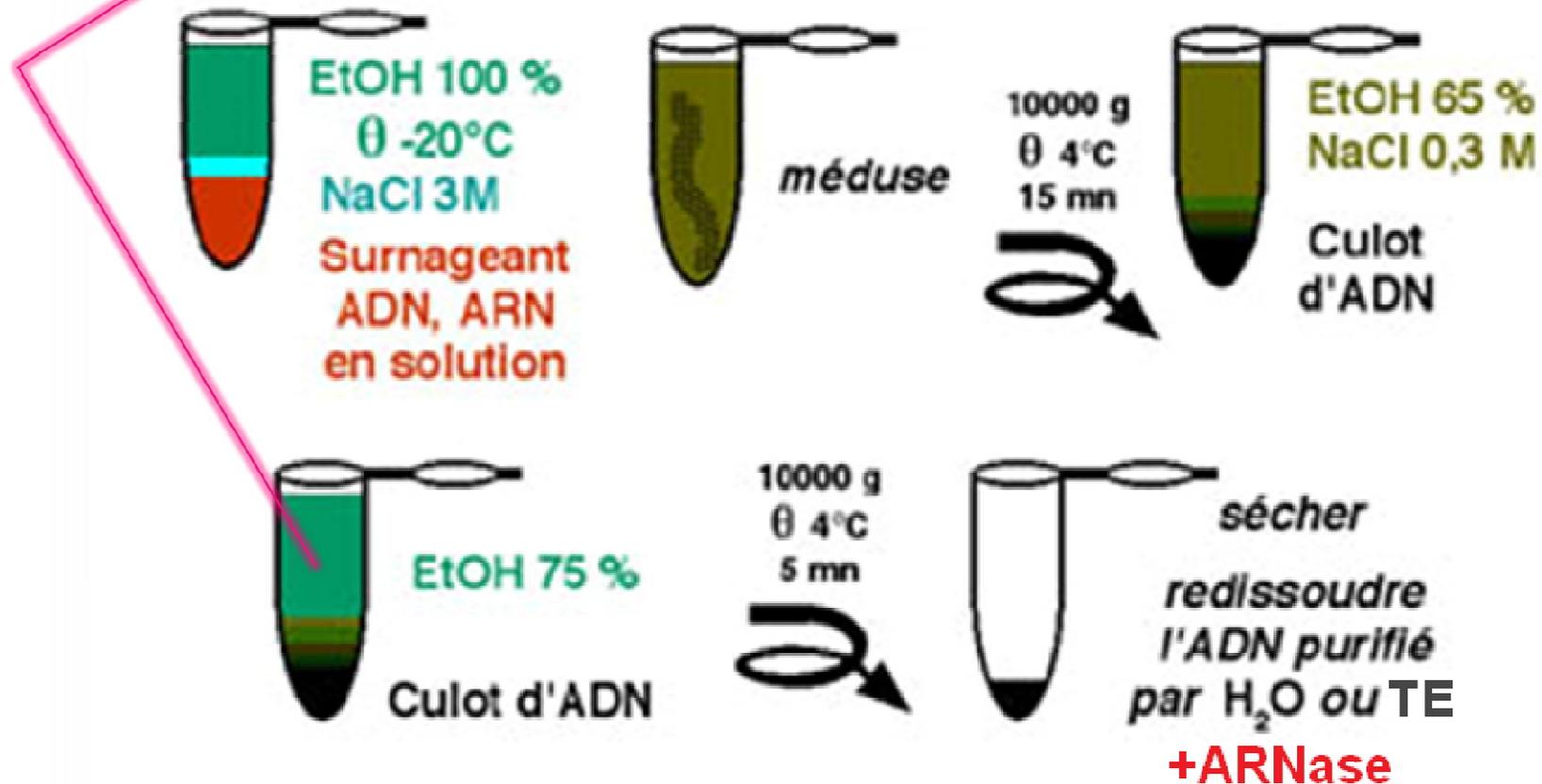
Phénol = agent déprotéinisant

Extraction de l'ADN



Ethanol mobilise l'eau du milieu & diminue la solubilité de l'ADN

Purification de l'ADN



Pour éliminer les traces de phénol et d'autres contaminants (prot., enz...) → dialyse ou purification par chromatographie en colonne de gel dénaturant ou d'adsorption.

SPECTROPHOTOMETRIE à UV

QUANTITE DE L'ADN:

DO_{260nm} =1 correspond à 50 ng/μL d'ADN Total

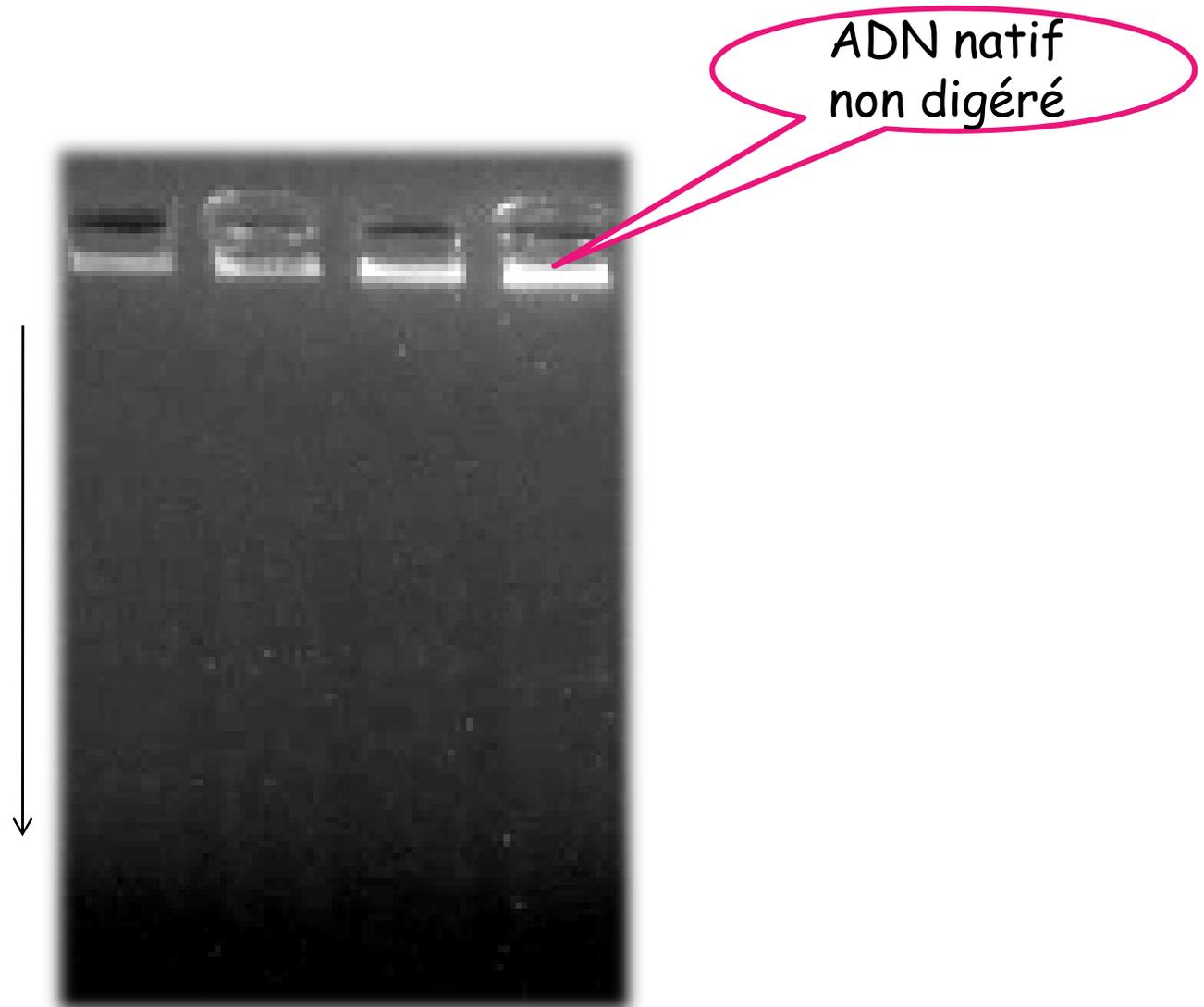
QUALITE DE L'ADN:

Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ nm

QUANTITE & QUALITE DE L'ADN:

Electrophorèse sur gel d'agarose

ASPECT DE L'ADN GENOMIQUE SUR GEL D'AGAROSE



TD1. TECHNIQUES DE SEPARATION
ET D'ANALYSE DES ACIDES
NUCLÉIQUES

1.1.Extraction de l'ARN

=technique permettant d'isoler l'ARN de cellules ou de tissus.

L'ARN extrait → hybridation (Northern blot), banques ADNc, RT-PCR...

Différents protocoles pour extraire l'ARN avec même schéma de principe :

@ Lyse cellulaire mécanique (congélation, billes de céramique ou détergents) ou enzymatique (lysozyme ou la lyticase)+Protection des ARN de l'action des ARNases.

@ 2 grands principes:

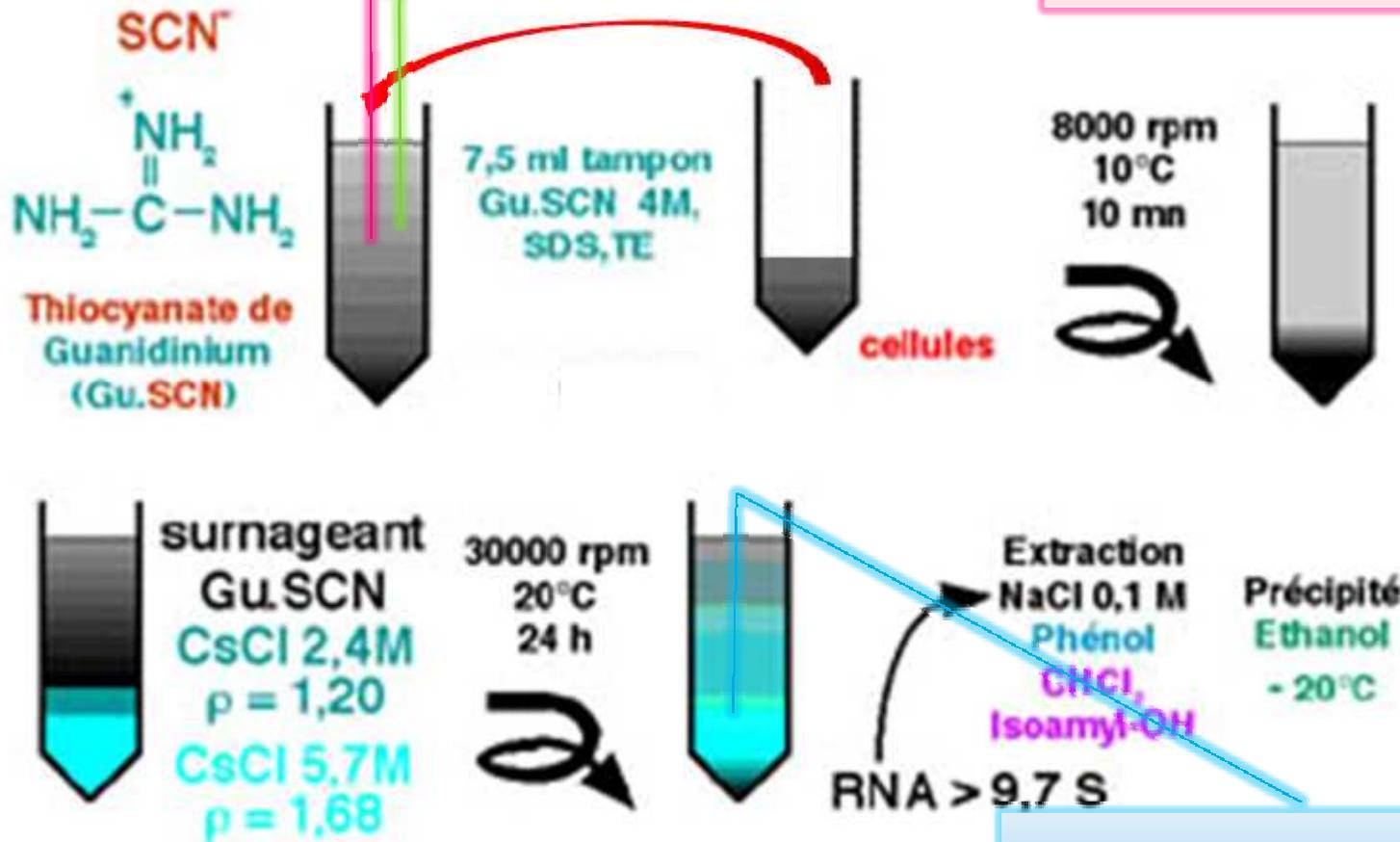
1) les différences de propriétés physico-chimiques ARN/protéines ;

2) l'adsorption sélective des ARN sur support solide.

GuSCN: agent puissant de dénaturation des protéines: Lyse

beta2-mercaptoéthanol : rupture des ponts disulfures protéiques

Isolation du RNA



Pour extraire l'ARN d'un tissu ou d'une suspension de cellules, il faut impérativement **inhiber toute trace d'ARNase.**

Parmi les acides ribonucléiques extraits des cellules → les **ARN messagers = ARNm = classe la plus étudiée**

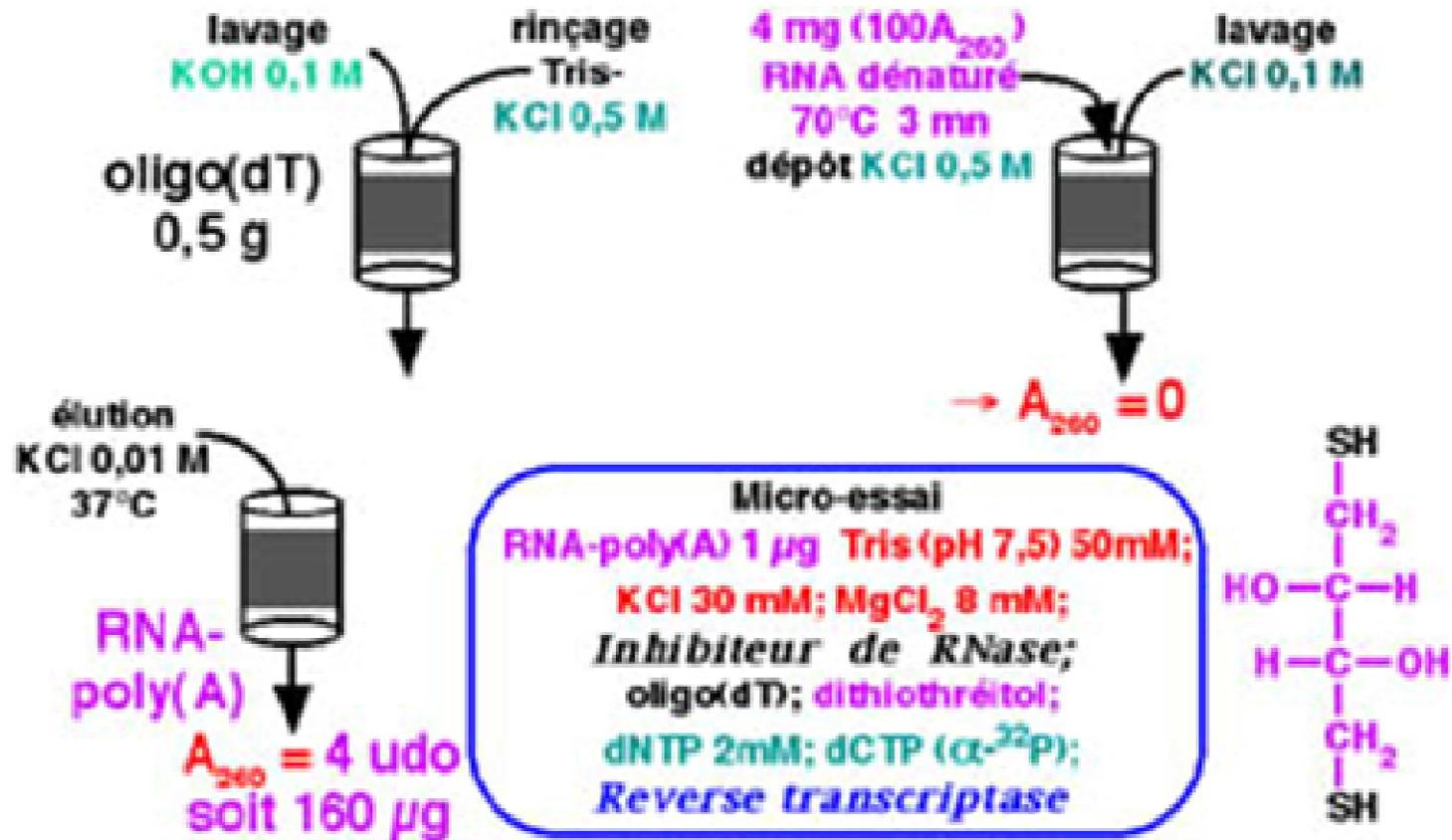


se caractérisent par la présence du côté 3'-terminal d'une **longue queue poly(A)** synthétisée à la phase post-transcriptionnelle.



chromatographie d'affinité entre cette queue poly(A) et une colonne dont la phase fixe est pourvue de fragments d'oligo(dT) de quelques dizaines de nucléotides qui peuvent s'hybrider avec les RNA poly(A).

Purification du RNA-poly(A)



SPECTROPHOTOMETRIE à UV

QUANTITE DE L'ARN:

DO_{260nm} =1 correspond à 40 ng/μL d'ARN Total

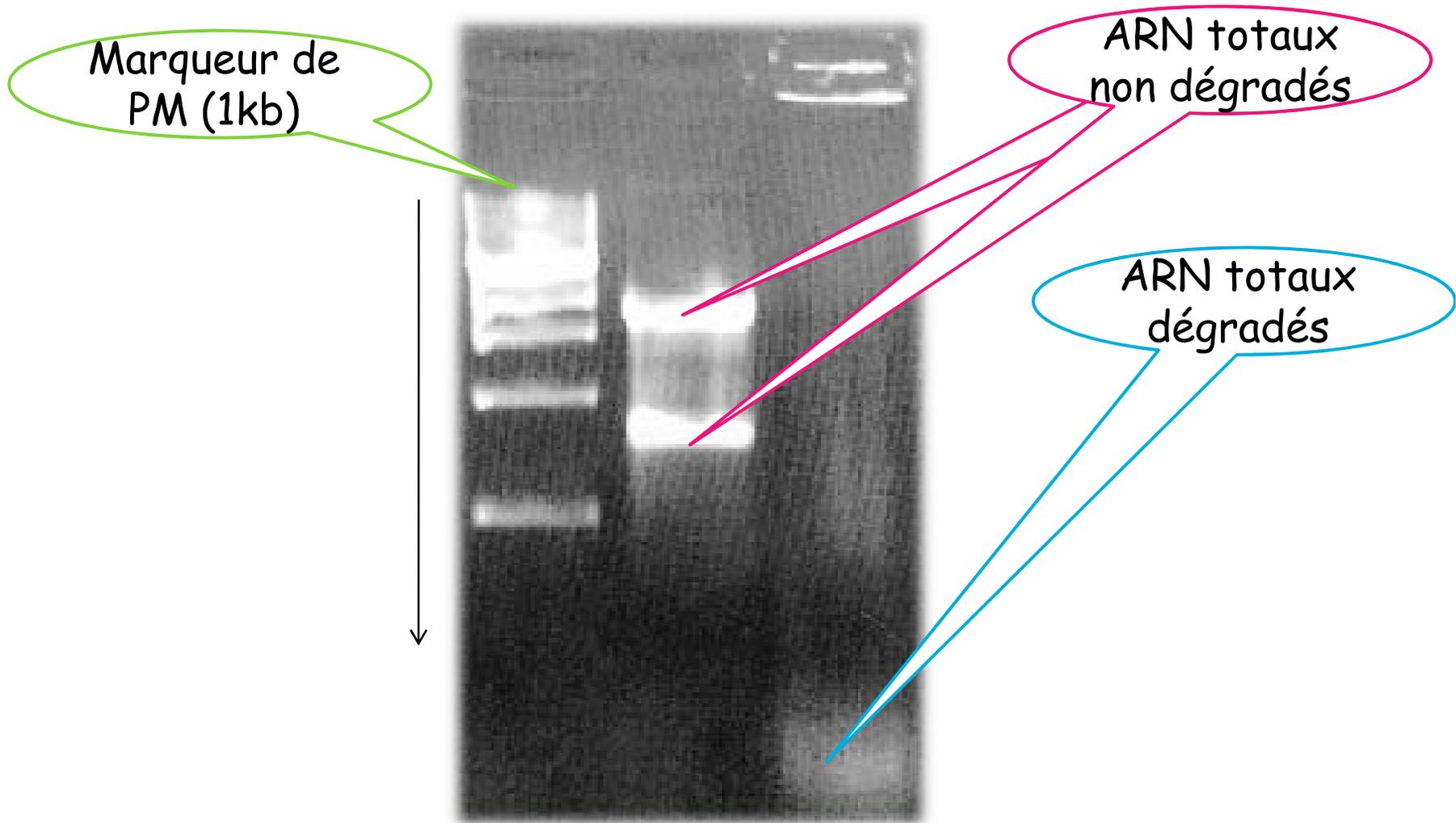
QUALITE DE L'ARN:

Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ nm

QUANTITE & QUALITE DE L'ARN:

Electrophorèse sur gel d'agarose

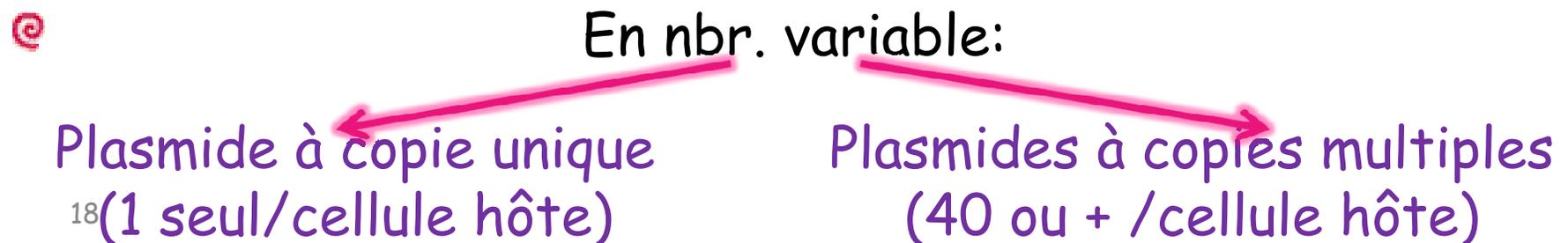
ASPECT DES ARN SUR GEL D'AGAROSE



1.3.Extraction des plasmides

1.3.1. Les plasmides: Rappel

- Ⓢ Petites molécules d'ADN habituellement circulaire
- Ⓢ Existant indépendamment des chromosomes de l'hôte
- Ⓢ Présents chez nombreuses bactéries (qqes levures et mycètes)
- Ⓢ A réplication autonome (=réplicons) indépendamment des chromosomes
- Ⓢ Portent un nombre de gènes très réduit (≤ 30)
- Ⓢ A information génétique non-essentielle pour l'hôte



Les plasmides peuvent être éliminés des cellules hôtes=**CURAGE** (curing)

➤ Spontané/Induit

➤ Principe: traitements inhibant la réplication des plasmides sans affecter la reproduction des cellules hôtes → Plasmides inhibés progressivement & dilués au cours de la multiplication bactérienne

≠ Méthodes de curage:

- Mutagènes dérivés de l'acridine
- Radiations UV ou ionisantes
- Privation de thymine
- Températures supra-optimales

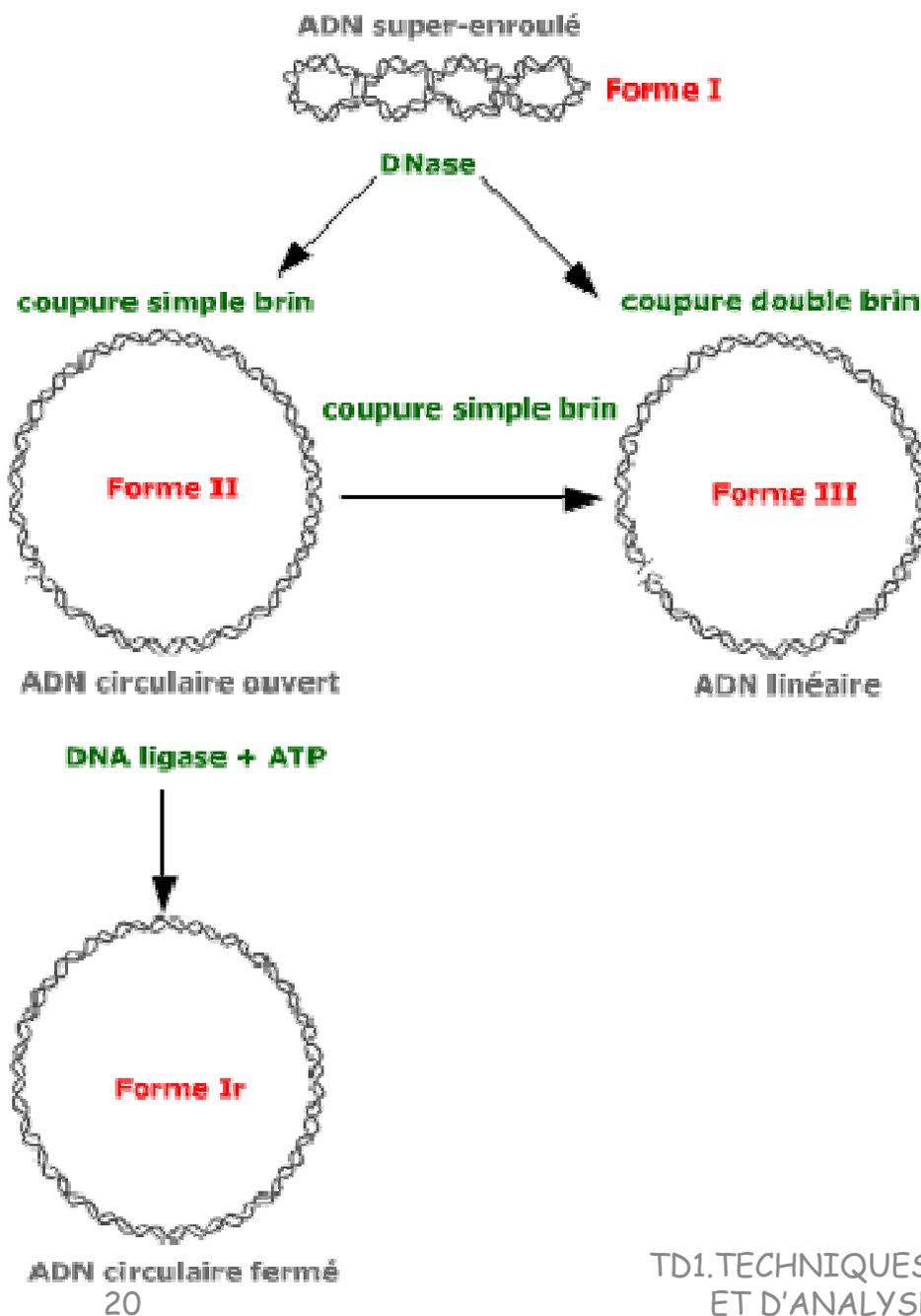
Différentes formes d'un plasmide

L'axe de la double hélice d'ADN peut lui-même s'enrouler en une super hélice droite ou gauche. Cette forme **superenroulée** de l'ADN joue un rôle biologique très important (**compaction, stabilité de l'ADN**).

Une coupure sur un seul des deux brins d'ADN superenroulé (forme I) déverrouille la superhélicité et permet le relâchement spontané de la molécule sous forme **circulaire ouverte** (forme II).

La réparation de cette coupure par une ligase produit une forme **circulaire fermée** (forme Ir).

Une coupure sur les deux brins d'une molécule superenroulée ou d'une molécule circulaire fermée produit une **molécule linéaire** (forme III).



1.3.2. Purification par Lyse alcaline

⊙ Parmi les techniques les plus courantes de la biologie moléculaire = noms abrégés: **miniprep**, **midiprep** et **maxiprep** (volume de la culture bactérienne).

BUT : Extraire de façon rapide l'ADN plasmidique afin de l'analyser avec des enzymes de restriction et électrophorèse en gel d'agarose. Obtenir plusieurs mg d'ADN partiellement purifié et Réaliser plusieurs digestions enzymatiques pour vérifier un clone, ou établir une carte de restriction.

⊙ Préparation sélective de l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.

⊙ Différentes variantes ou améliorations de cette méthode existent

⊙ kits commerciaux (grd nbr) avec petites colonnes de résine chromatographique échangeuse d'ion → améliorer la pureté de l'ADN.

Préparation d'ADN plasmidique

Lyse des cellules /détergent (SDS) en présence de soude (pH 13)

Dénaturation de l'ADN total

Neutralisation rapide /acétate de potassium (pH 5,5)

Renaturation de l'ADN plasmidique / Précipitation de l'ADN Chromosomique

Concentration de l'ADN plasmidique par précipitation à l'alcool

Récupération de l'ADN par centrifugation

Suspension de l'ADN plasmidique dans TE ou Eau pure

Élimination des ARN/ribonucléases (hydrolyse sélective des ARN/ ADN intact)

1.3.3. Purification par Gradient de chlorure de césium

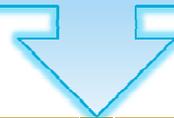
= technique basée sur la centrifugation en gradient de densité.

PRINCIPES DE BASE

Ⓜ La centrifugation = méthode couramment utilisée en biochimie pour séparer ou analyser des fractions ou des structures cellulaires, des macromolécules, etc

Ⓜ On peut accentuer ou raffiner les méthodes de séparation en faisant cette centrifugation dans un gradient de concentration:

la différence entre la **densité** de la particule et celle du solvant influence la **vitesse de sédimentation**.



On peut donc moduler cette vitesse en faisant varier de façon continue ou par étape (discontinue) cette différence de densité en créant un **gradient de concentration**

Comment?

Densité de la
particule > celle du
milieu

La particule
sédimente

Densité de la
particule = celle du
milieu

La particule ne
sédimente pas

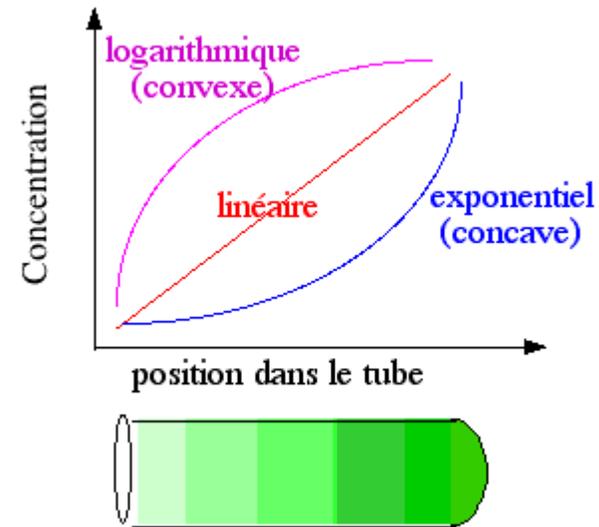
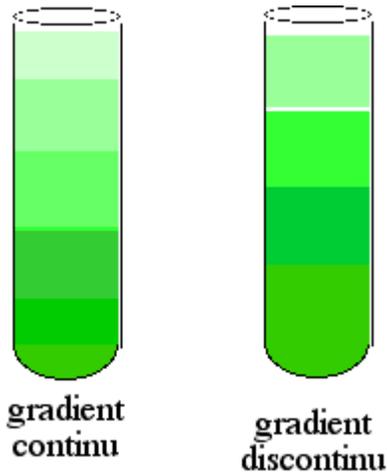
Densité de la
particule < celle du
milieu

La particule
s'élève →
flotte

Fabrication des gradients

- ⊙ Les variations de densités sont obtenues en faisant varier la concentration d'un produit chimique dans la solution.
- ⊙ Divers produits peuvent être utilisés pour faire ces gradients: Ils doivent être:
 - très solubles en solution aqueuse → des densités suffisantes.
 - inertes, peu coûteux, faciles à manipuler, non toxiques, etc.

- ▶ Le produit couramment utilisé, particulièrement dans la séparation des acides nucléiques: le **chlorure de césium (CsCl)**.
- ▶ Ce sel peut atteindre une densité très élevée, de l'ordre de 1.9 g/mL à 7.5 mol/L.
- ▶ Cette possibilité d'atteindre des densités si élevées en solution aqueuse est son principal avantage.



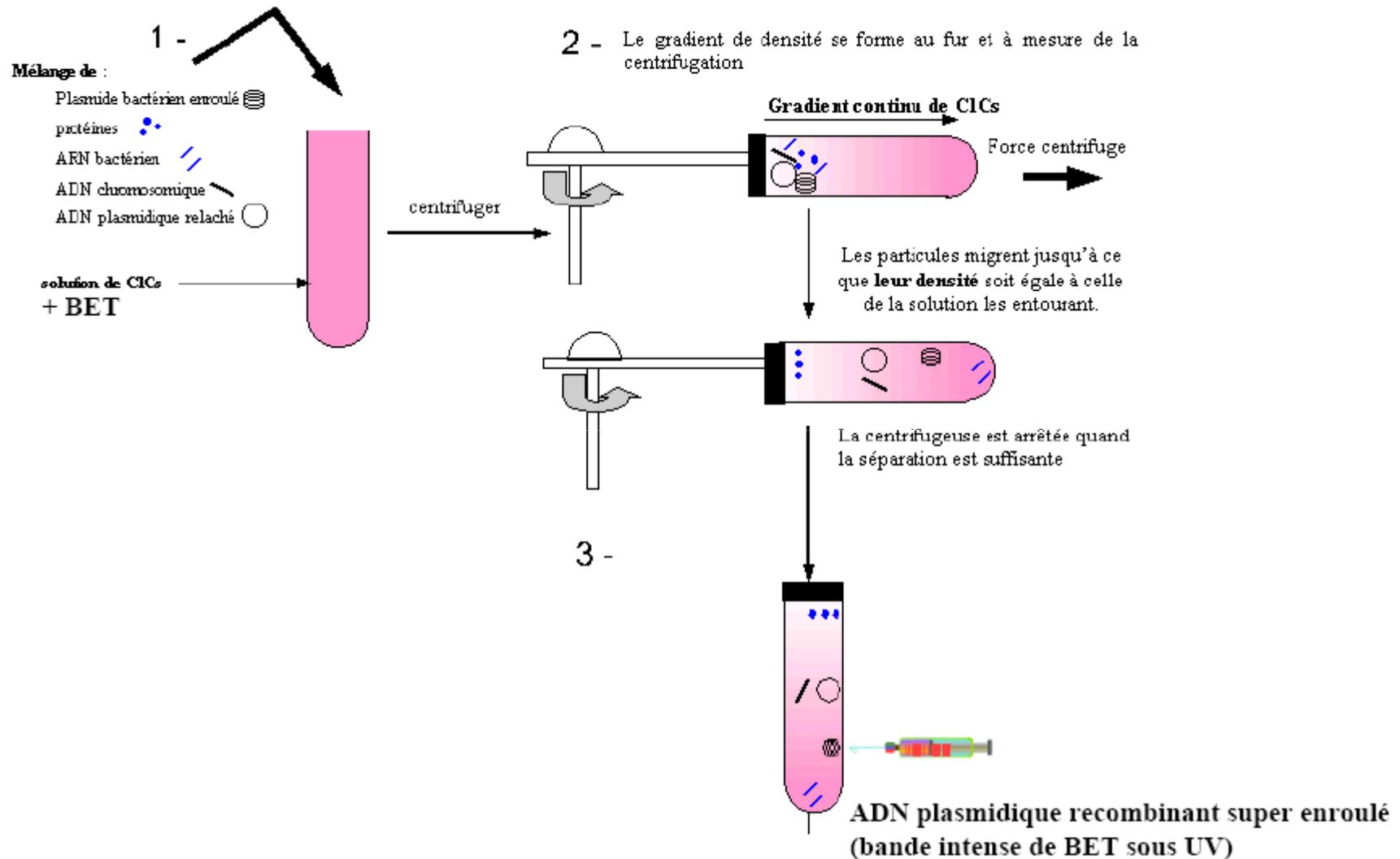
La juxtaposition un par-dessus l'autre des solutions ayant des différences suffisantes de densités

Gradients discontinus

La variation de densité est graduelle le long du tube à centrifuger.

Gradients continus

Purification sur gradient de Chlorure de Césium



2. Séparation des acides nucléiques

La technique la plus utilisée pour la séparation des acides nucléiques: **L'électrophorèse**



Principe général:

Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, en fonction de leur **taille**.

ELECTROPHORESE DE L'ADN

= technique de biologie moléculaire → séparer des fragments d'ADN de différentes tailles en les faisant migrer dans un **gel** en les soumettant à un courant électrique.

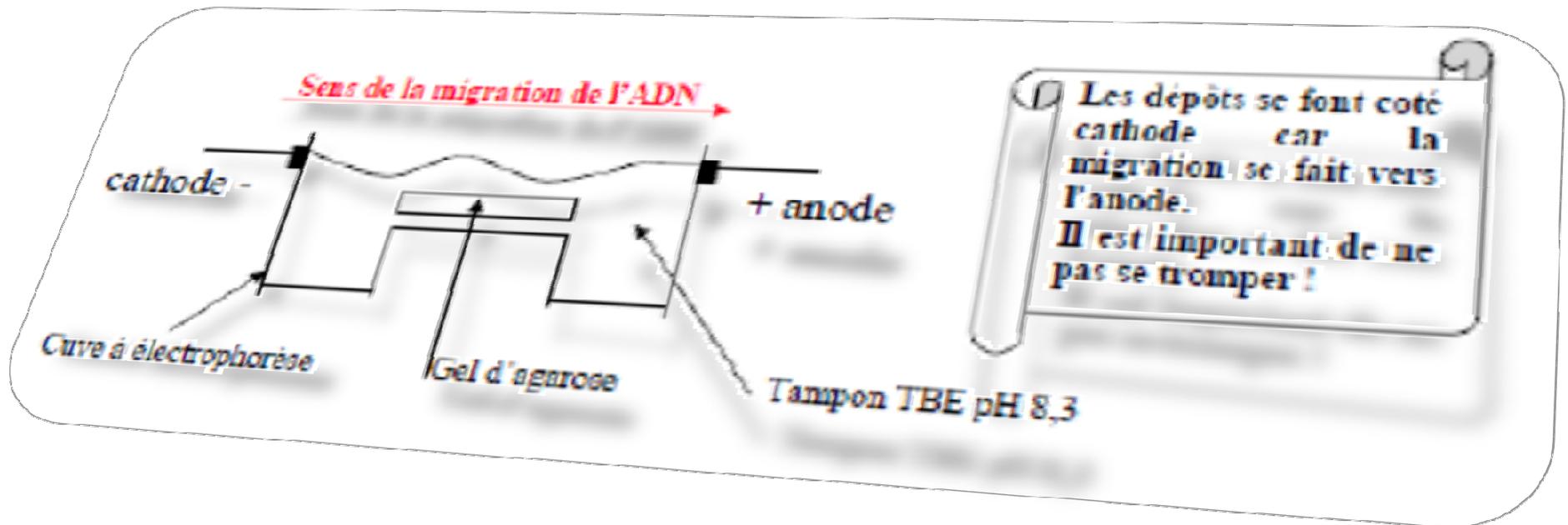
▶ Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur.

▶ Deux principaux polymères sont utilisés : l'**agarose** et le **polyacrylamide**.

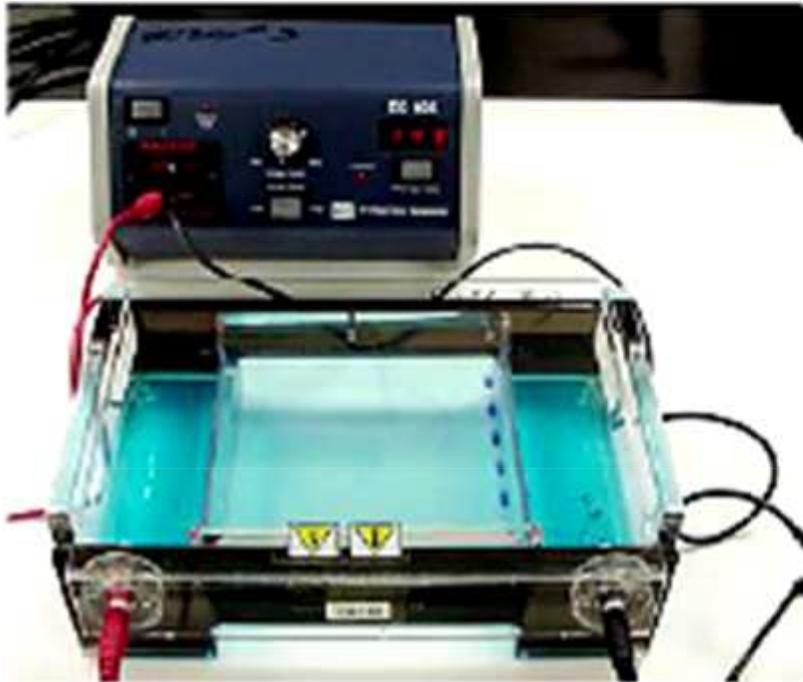
Cette technique est assez simple à mettre en œuvre si on dispose des bons outils et de quelques astuces.

Principe:

basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH 7~8, vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules.



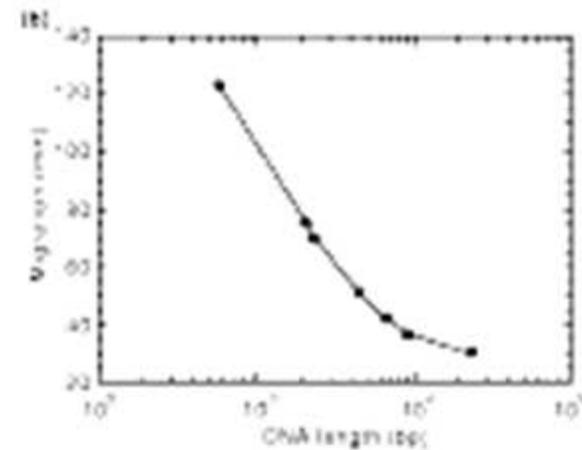
Electrophorèse d'ADN



L'ADN chargé (-) migre toujours vers le pôle + (anode)

L'ADN migre généralement en fonction de sa taille

Les pores du gel sont d'autant plus petit que le % en agarose ou en acrylamide est grand



Les applications de l'électrophorèse de l'ADN

- ▶ Estimation du poids moléculaire de fragments d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction
- ▶ Analyse d'ADN ou d'ARN après une amplification par PCR
- ▶ Séparation de fragments d'ADN digérés avant Southern blot ou d'ARN dans le cas de Northern Blot.

Il existe de nombreux types d'électrophorèses, dont :

- ▶ électrophorèse sur gel de polyacrylamide (ou PAGE pour Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) ;
- ▶ électrophorèse en gel d'agarose ;
- ▶ focalisation isoélectrique (électrophorèse dans un gradient de pH) ;
- ▶ électrophorèse bi-dimensionnelle ;
- ▶ électrophorèse en champ pulsé ;
- ▶ Immunoélectrophorèse (pour détecter une interaction antigène/anticorps) ;

2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

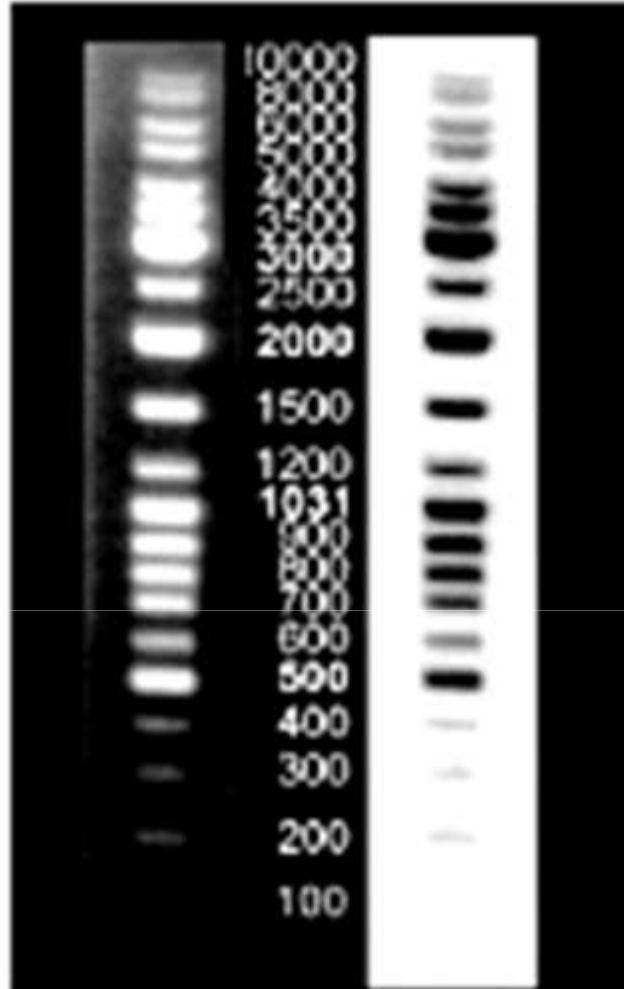
- ⊗ L'agarose = polymère à base d'agar purifié. Différentes puretés d'agarose sont disponibles. En général, de l'agarose de grande pureté à solidification lente est utilisé lorsque l'ADN doit être extrait du gel après migration.
- ⊗ L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (poids/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement de l'ADN ou de l'ARN ;

Pouvoir de séparation d'ADN linéaire, double brin, selon la concentration d'agarose du gel

Concentration d'agarose (% en M/V)	Gamme de tailles idéales (en kb)
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	0.1 – 2



Le pouvoir de résolution d'un gel d'agarose dépend du % d'agarose. Il peut varier de 0,5 à 2%



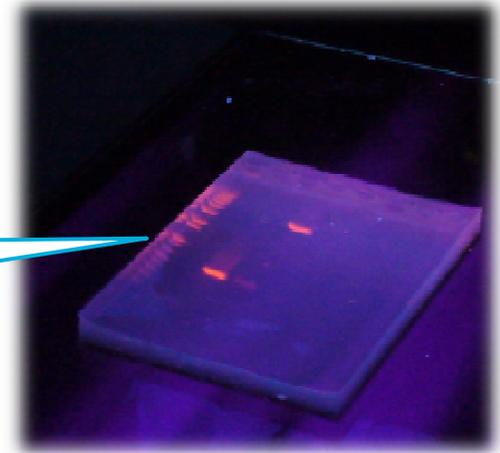
Le gel d'agarose n'est pas résolutif pour de petits fragments d'ADN (Inférieurs à 100 pb)

TD1. TECHNIQUES DE SEPARATION
ET D'ANALYSE DES ACIDES
NUCLÉIQUES



Un gel d'agarose avant éclairage sous ultraviolets

Le gel est exposé à des rayonnements ultraviolets, le BET colore l'ADN en une couleur rouge-orangée



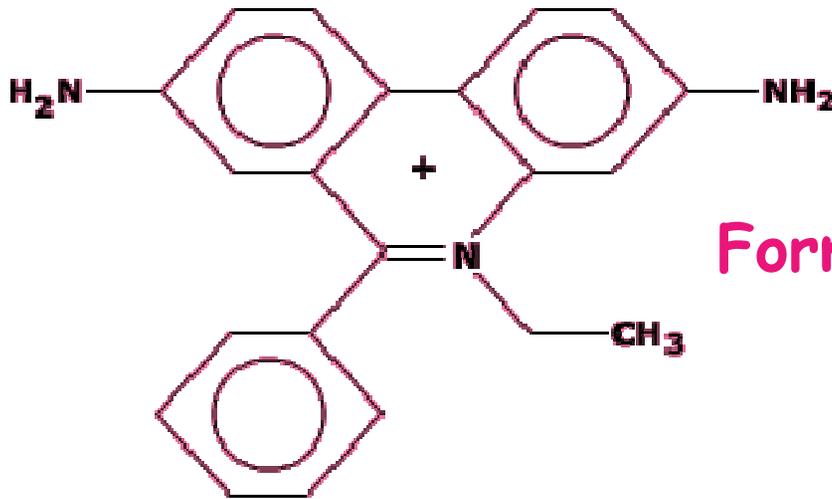
Photographie du gel



Puits :

1. Echelle de marqueur de poids moléculaire (1kbplus) 2. vide, 3. Un produit de PCR d'une taille légèrement supérieure à 500 paires de bases 4. Fragment d'environ 4.5kb d'un Plasmide digéré par une

enzyme de restriction



Formule du bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium (EtBr) = à la fois un agent intercalant et un fluorochrome.

Structure aromatique plane → s'intercaler entre les paires de bases → détorsion de la double hélice et émission de lumière (fluorescence) dans le rouge-orange lorsque le complexe ADN-EtBr est excité en lumière ultraviolette.

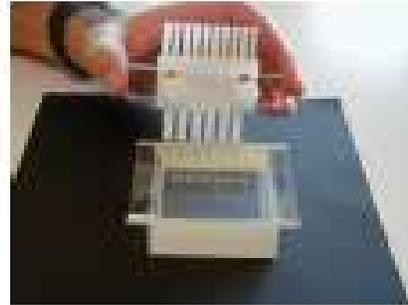
C'est l'une des principales méthodes de détection de l'ADN dans les gels d'électrophorèse.

Les avantages de l'électrophorèse en gel d'agarose sont:

- ▶ préparation aisée, rapide, et peu coûteuse des gels d'agarose
- ▶ pas de dénaturation des échantillons
- ▶ l'agarose plus ferme et moins toxique que le gel de polyacrylamide
- ▶ les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires



Matériel nécessaire :
 Tampon d'échantillon
 Cuve
 Support + scotch
 Peigne
 Erlen (chauffage de l'agarose)



Dissolution de l'agarose à chaud
 Laisser refroidir
 Ajouter BET
 Pas de bulles !
 Cuve et agarose : mise en place du peigne.
 Faire une masse de l'agarose



Mise sous tension
 Cathode (-) et anode (+)
 Migration des molécules
 chargées positivement (anion)
 et négativement (cation)

ADN polyanion donc du - au +



Migration
 Bleu clair : Xylène Cyanol, ADN grande taille
 Bleu foncé : Bleu de Bromophénol, ADN petite taille, front de migration
 Variable selon % agar



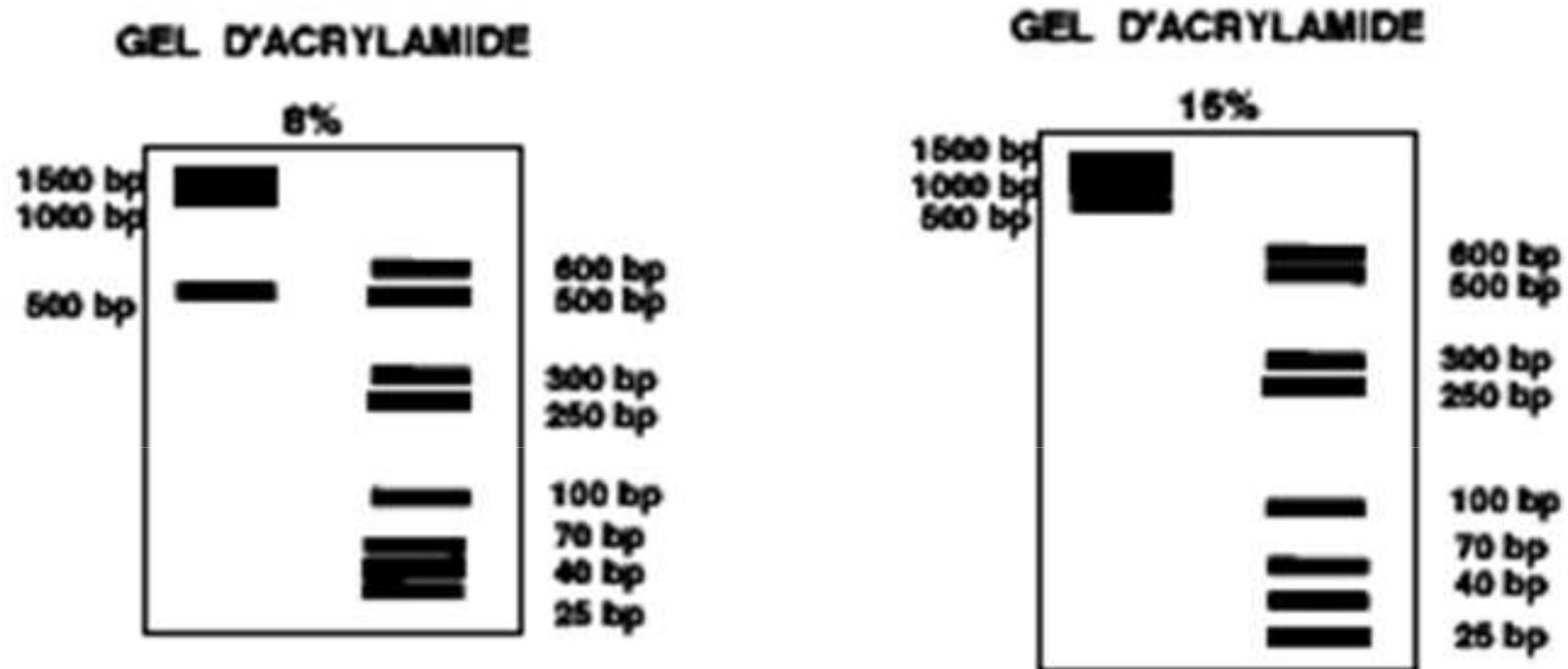
Lecture sous UV : BET

DETAILS A VOIR EN TP

2.2. Electrophorèse sur gel de polyarylamide

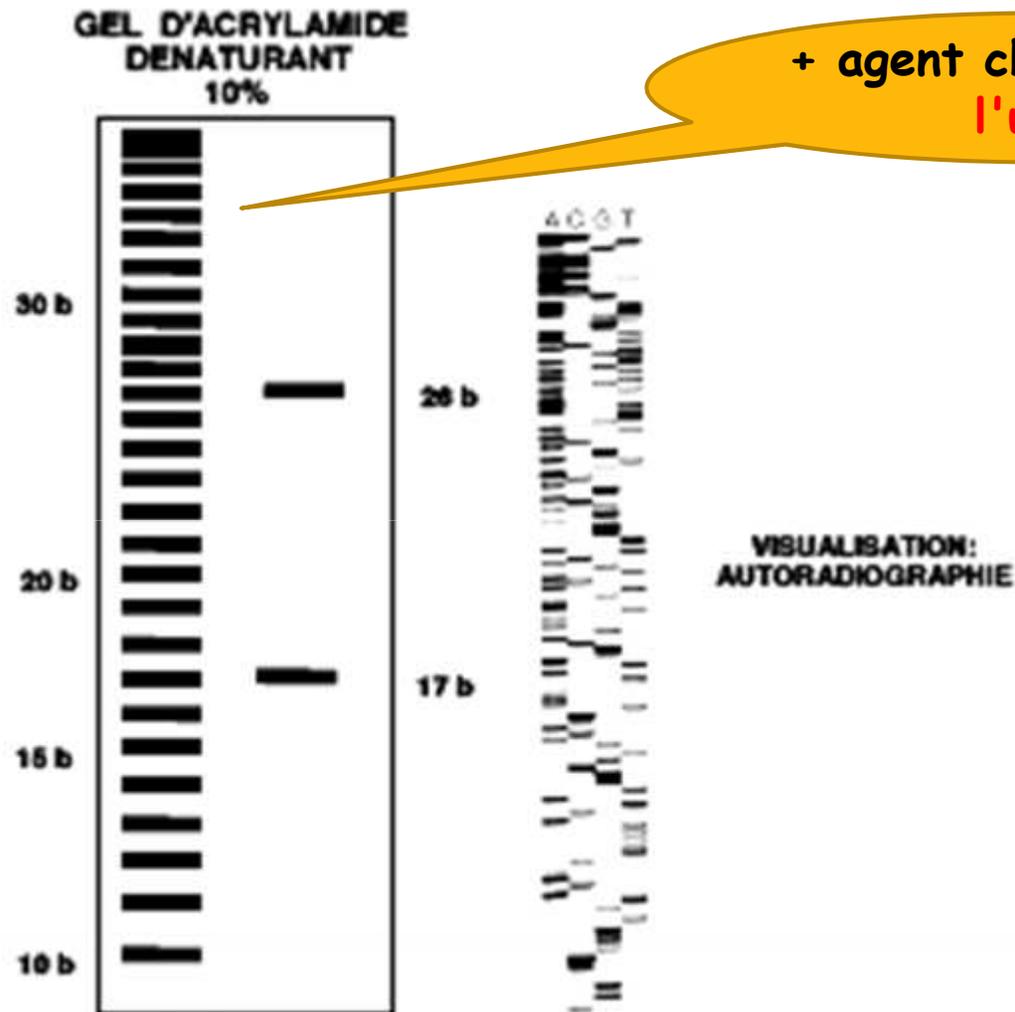
- Ⓢ L'acrylamide est le nom usuel du 2-propénamide (amide acrylique) de formule brute C_3H_5NO .
- Ⓢ En biologie moléculaire, on utilise l'acrylamide polymérisé (**polyacrylamide**) pour réaliser des électrophorèses.
- Ⓢ Le polyacrylamide est utilisé à des concentrations de 4% à 20% (poids/volume) et permet de séparer des molécules plus petites d'acides nucléiques.
- Ⓢ On peut aussi faire varier sa réticulation (taux de ramification) lors de la polymérisation pour moduler les paramètres de séparation ;

GEL D'ACRYLAMIDE NATIF (L'ADN est double brin)



Efficace pour les petits fragments d'ADN entre 20 & 2000 paires de bases. (cartographie)

GEL D'ACRYLAMIDE DENATURANT (L'ADN est double brin)

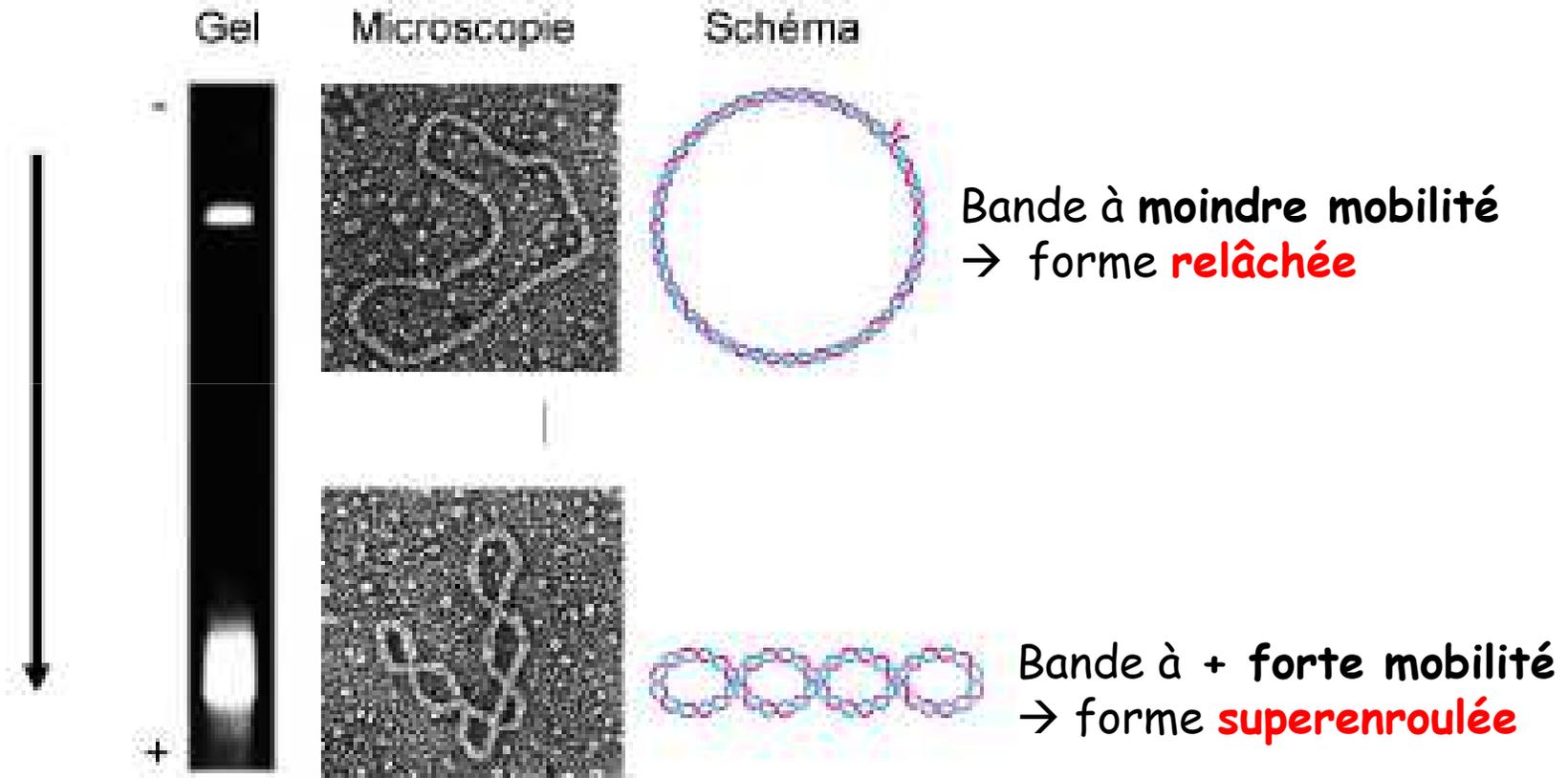


Efficace pour les très petits fragments d'ADN
entre 1 & 400 paires de bases. (séquençage)

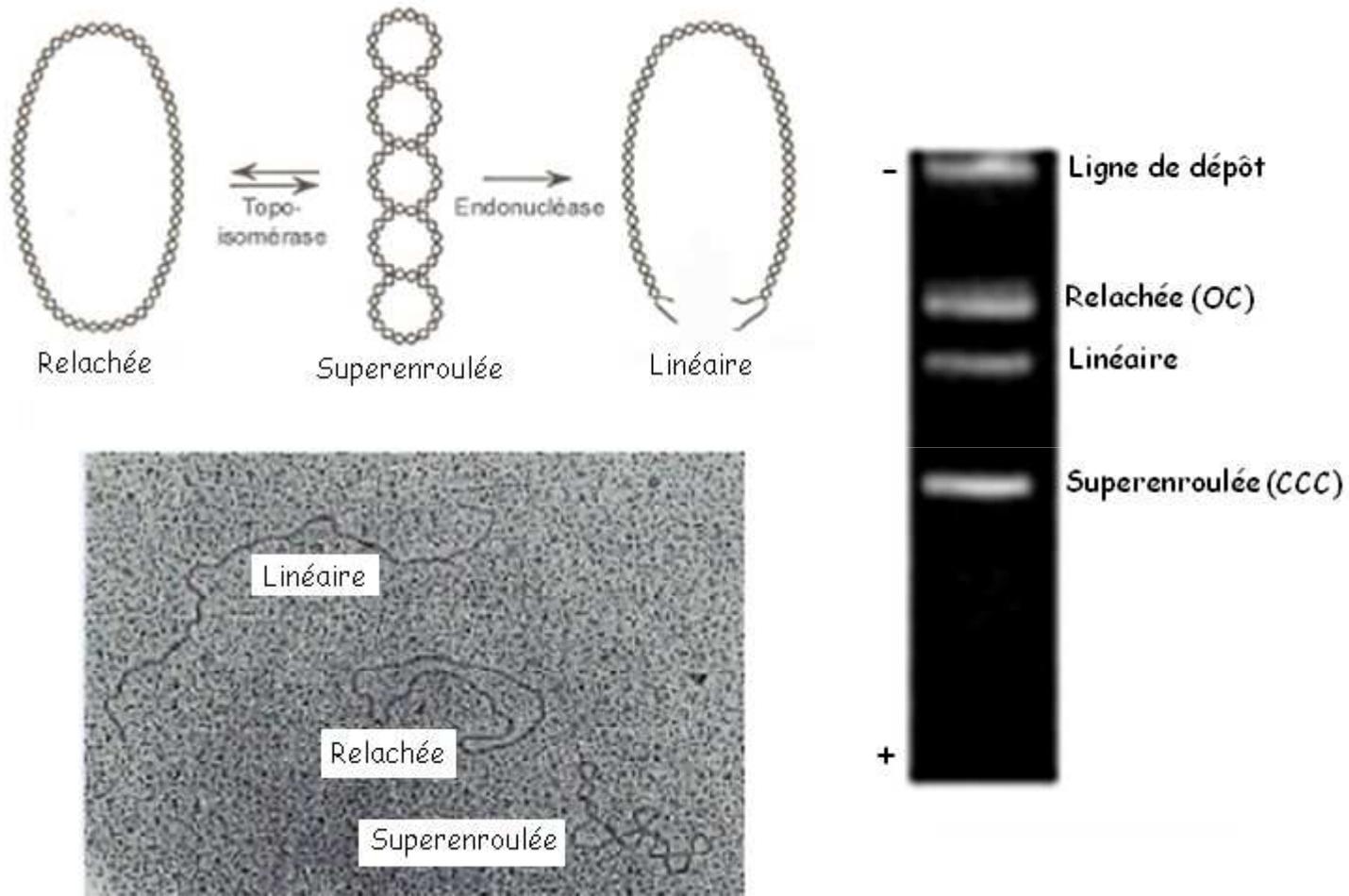
Facteurs affectant la migration

- Ⓜ La longueur de la molécule d'ADN : la séparation se fait en fonction du poids moléculaire et donc de la taille de l'ADN.
- Ⓜ La conformation de l'ADN: l'ADN plasmidique, non digéré par une enzyme de restriction, migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) : ADN circulaire, ADN linéaire et ADN superenroulé.
- Ⓜ La concentration du gel: l'augmentation de la concentration réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille.
- Ⓜ Le voltage: plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité (5V/cm): un fort voltage → augmentation de température (fondre le gel).

Electrophorèse de l'ADN plasmidique



Formes linéaire, relâchée, super-enroulée



3. Elaboration de Cartes de restrictions des plasmides

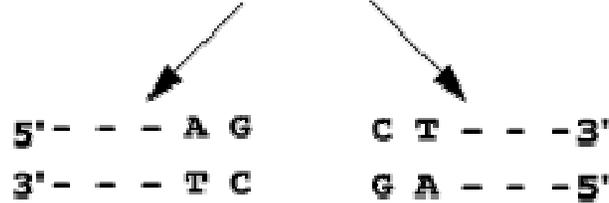
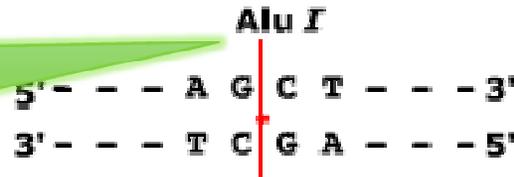
Définitions:

La **carte de restriction** (= **physique**) est une représentation graphique de la localisation des sites reconnus par les principales enzymes de restriction sur une molécule d'ADN.

Grâce à une telle carte, il est facile de prévoir la taille des fragments produits par digestion par une seule ou plusieurs enzymes de restriction.

A ne pas confondre avec « Carte génétique »: Représentation graphique de la position des gènes les uns par rapport aux autres sur un génome.

plein milieu du motif → extrémités franches

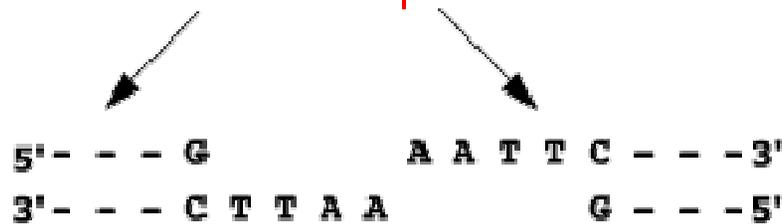


EcoR I

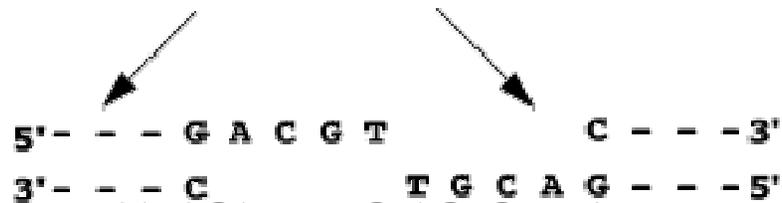
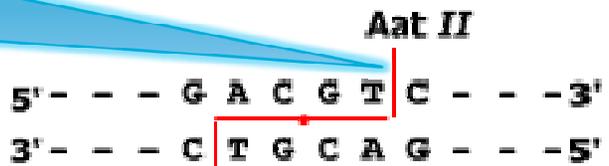
Genre : *Escherichia*
 Espèce : *coli*
 Variété : R

Numéro d'ordre (s'il y a plusieurs enzymes)

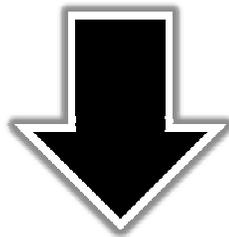
en décalé → extrémités cohésives (3' sortant)



en décalé → extrémités cohésives (5' sortant)



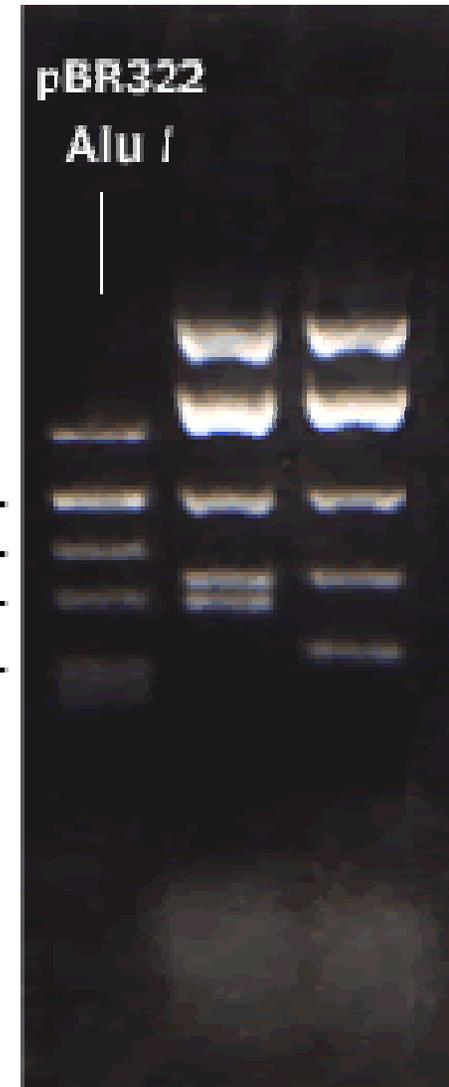
Valeurs de longueurs en pb:
produits de la digestion
totale du plasmide pBR322
par *Alu I*.

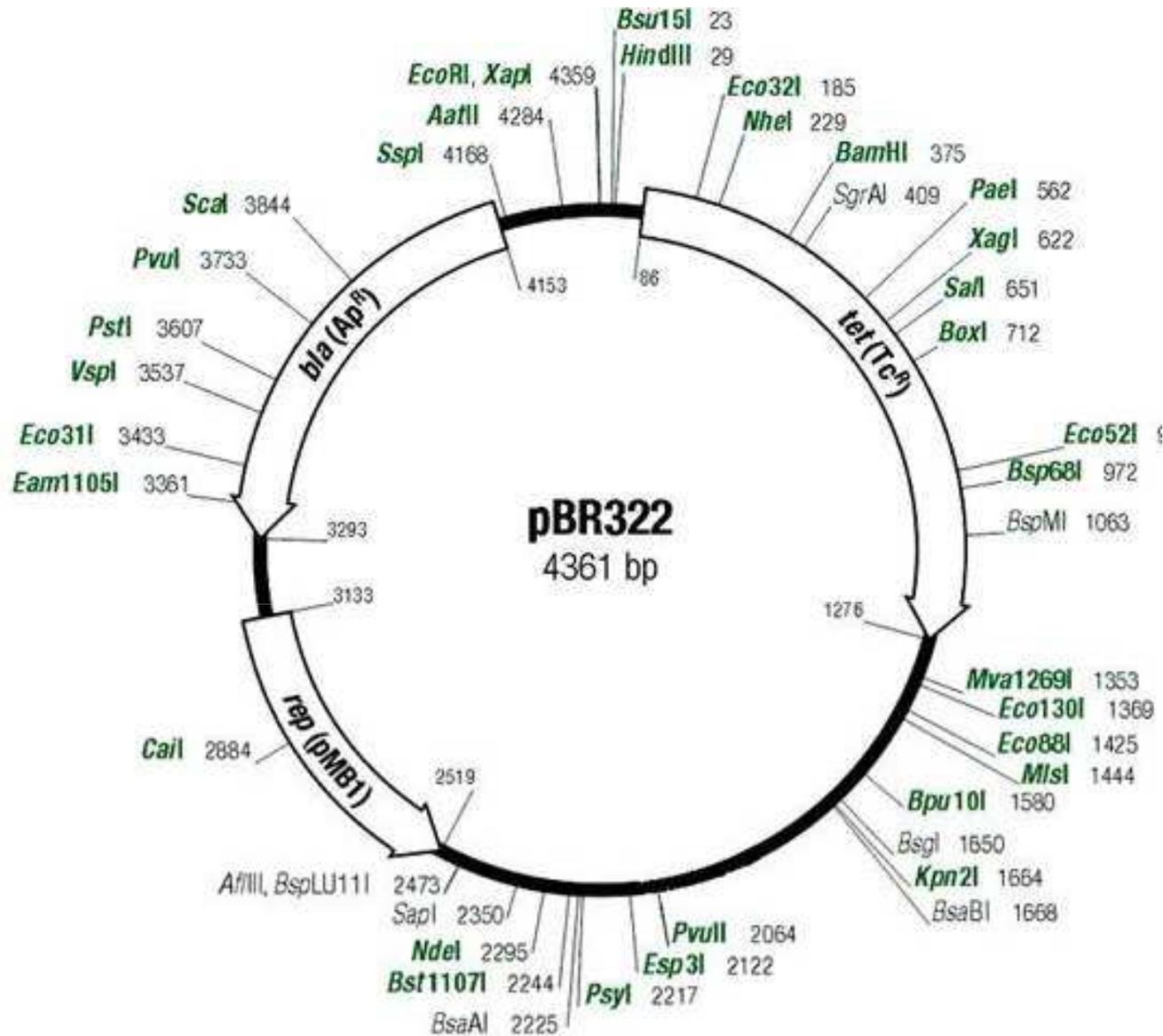


Utilisation comme **marqueur de poids moléculaire**



pb
900
600 —
500 —
400 —
280 —





Carte du plasmide pBR322.

Les sites existant à un seul exemplaire sur ce plasmide sont indiqués en gras.

Notion de Polylinker

Un polylinker = petite séquence d'ADN portant de très nombreux sites pour les enzymes de restriction les plus utilisées en génie génétique.

Doté d'un polylinker, un plasmide ou un ADN de bactériophage devient un vecteur de clonage dans lequel il est possible d'insérer de l'ADN étranger.

