

Introduction aux techniques de base en biologie moléculaire

Introduction: les techniques de biologie moléculaire sont assez délicates en particulier du fait de l'utilisation presque systématique de très faibles volumes. La séance suivante permet à chacun de voir à directement sa capacité à faire des prélèvements corrects à l'aide de pipettes puis de mettre en application cet exercice en réalisant une technique de coupures des molécules d'ADN et de séparation de ces molécules après électrophorèse sur gel d'agarose.

1. Exercice de pipetage :

1.1. Rappel sur l'utilisation correcte d'une pipette

- saisir le récipient de prélèvement ou de destination et travailler toujours à hauteur d'œil de façon à voir ce que l'on fait
- au moment du prélèvement, ne tremper que l'extrémité de l'embout dans le liquide, relâcher lentement le piston et vérifier qu'il n'y a pas de liquide à l'extérieur de l'embout. Dans le cas contraire, l'essuyer. Pour des petits volumes, une minuscule goutte à l'extérieur de l'embout représente une erreur importante
- incliner le tube de réception et poser l'extrémité de l'embout contre la paroi le plus profondément possible. Pousser alors le piston lentement jusqu'à la première butée puis la deuxième, en vérifiant que la totalité du liquide a été expulsée.

1.2. Contrôle du manipulateur lors d'un pipetage

On ne cherche pas à contrôler la pipette elle même ce qui ne peut être fait que par pesée mais à contrôler le manipulateur dans sa capacité à prélever des volumes correctement et à procéder à des mélanges précis.

Vous disposez de quatre solutions colorées nommées sol 1, sol 2, sol 3 et sol 4 et de pipettes de 10, 100 et 1000 μL .

Préparer 7 microtubes marqués A, B, C, D, E, F et G et les remplir selon le tableau suivant, les volumes étant donnés en μL (on utilisera un embout neuf pour chaque solution et la même pipette pour l'ensemble des prélèvements d'un tube donné) :

pipette	tube	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4
10 μL	A	4	5	1	
	B	4	5		1
	C	4	4	1	1
100 μL	D	30	50	20	
	E	45	10	20	25
1000 μL	F	100	200	150	550
	G	150	250	350	250

Après les pipetages, centrifuger quelques secondes chaque tube de façon à rassembler les prélèvements au fond puis régler la même pipette déjà utilisée au volume final du tube (10, 100 et 1000 μL) et prélever soigneusement le mélange. Trois cas peuvent se présenter :

- l'embout est juste rempli, le pipetage est précis
- il reste du liquide dans le tube, il y a une erreur par excès : dans ce cas, pour évaluer l'erreur, on prend une pipette appropriée au volume en excès estimé, on règle la pipette à un volume un peu supérieur à ce volume et on prélève soigneusement. On chasse alors l'air en tournant le piston doucement jusqu'à ce que le liquide affleure l'extrémité de l'embout et on lit alors le volume prélevé.
- il y a de l'air entre l'extrémité de l'embout et le début du liquide, il y a une erreur par défaut : on tourne doucement le piston jusqu'à ce que le liquide affleure l'extrémité de l'embout et on lit alors le volume prélevé.

2. Analyse de l'ADN du phage λ , après digestion simple

Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées négativement à des pH voisins de la neutralité. Il est donc possible de les faire migrer dans un champ électrique. Ils migrent vers le pôle positif; la charge relative est constante. La vitesse de migration de "ADN ou d'un fragment d'ADN (après digestion enzymatique) dépend de sa masse moléculaire, de sa composition et de la concentration du gel utilisé qui est soit de l'acrylamide, soit de l'agarose.

La méthode utilisée ici propose d'établir le profil de digestion d'un ADN du bactériophage λ par 3 endonucléases de restriction : Bam HI, Eco RI et Hae III.

L'ADN est incubé en présence de chacune des 3 enzymes et les fragments obtenus dans chaque mélange réactionnel sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose immergé (technique des minigels). La révélation des bandes génomiques se fait grâce au bromure d'éthydiu incorporé préalablement au gel d'agarose ; le gel s'observera en transillumination U.V. puis photographié à l'aide d'un dispositif spécial (système photographique Polaroid).

- 4 microtubes sont marqués de 1 à 4 et placés dans la glace pilée. Introduire dans ces tubes les divers réactifs dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessous.

Pour éviter toute contamination, changer de cône chaque fois qu'une nouvelle endonucléase est utilisée. Suivre également les précautions d'usage indiquées dans le document annexe.

Tubes n°	Eau distillée (μL)	Tampon (μL)	ADN λ (μL)	Enzyme de restriction (μL)
1	14	2 E	4	0
2	12	2 E	4	2 Bam HI
3	12	2 H	4	2 Eco RI
4	12	2 C	4	2 Hae III

Remarques: - l'ADN du phage λ est au départ à une concentration de $0,25 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
- les enzymes de restriction sont préparés à partir des solutions stocks du commerce à 2-4 unités et dilués dans leurs tampons respectifs 10X.

- Agiter doucement les tubes et centrifuger à 12000 tr/min pendant quelques secondes.
- Incuber à 37°C pendant 60 minutes.
- Ajouter dans chaque tube $4 \mu\text{L}$ de la solution de charge 6X (glycérol 30% avec bleu de bromophénol). Mélanger vigoureusement et incuber les tubes 5 min à 65°C .
- Centrifuger 1 min à 12000 tr/min pour collecter les liquides et éliminer les bulles.
- Déposer $8 \mu\text{L}$ du contenu de chaque tube dans les puits correspondants du minigel d'agarose (4 minigels préparés pour l'ensemble du groupe à des concentrations d'agarose de 2%, 1%, 1,2% et 0,8%).
- Laisser migrer entre 30 min et 1 heure (suivre la migration du bleu de bromophénol) à une tension voisine de 5V/cm de gel (entre 50 et 100V).
- Après migration, rincer dans le tampon de migration (tampon Tris Borate EDTA : TBE).
- Observer en transillumination et faire une photographie du gel.

Remarque: 1) Sécurité: le bromure d'éthydiu (BET) est un colorant fluorescent qui s'intercale entre les paires de base des acides nucléiques ou sa fluorescence est exaltée. Il est révélé placé sous illumination par U.V. courts (vers 300 nm). Le port de lunettes de protection est obligatoire. De plus, le BET est hautement mutagène, tout produit contenant du BET doit être manipulé avec d'extrême précautions et dans tous les cas, manipulé avec des gants.

2) Préparation du gel d'agarose : plusieurs concentration seront testées dans ce TP. Le BET sera déjà introduit dans le gel à une concentration finale de $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ de gel. 15 mL de gel sont maintenus en surfusion, couler le gel de sorte qu'il ne déborde pas de son support (utiliser du film

adhésif pour éviter tout débordement). Placer le peigne de sorte qu'il ne touche pas les bords du support. Laisser solidifier, retirer le peigne.

3) L'électrophorèse se fait ici dans des minicuves « prêtes » à l'emploi. La migration se fait soit en tampon TBE, soit en tampon TAE (voir poly électrophorèse sur gel d'agarose). Le gel est immergé par le tampon et les dépôts se font donc sous le liquide. L'utilisation de la solution de charge permet d'alourdir l'ADN de sorte qu'il reste emprisonné dans le gel.

3. Compte rendu

Partie 1: Pour chaque tube, rassembler sous forme d'un tableau le volume attendu, le volume réellement pipeté, l'erreur absolue et l'erreur relative commise.

Partie 2: - En début de compte rendu, indiquer le protocole expérimental sous forme d'un organigramme schématique.

- Préciser l'ADN utilisé, les enzymes de restriction...

- Faire figurer les résultats expérimentaux : photographie des gels, interprétation schématique qui devra être légendé.

- Compter le nombre de fragments obtenus pour chacune des expériences avec les 4 tests et les 4 gels obtenus.

- En déduire: le nombre de sites de restriction de l'ADN phagique pour chaque enzyme la concentration en agarose la plus adaptée pour la séparation des bandes.

- En utilisant comme standard la taille des fragments d'ADN λ / EcoRI visibles sur le gel (21225, 7421, 5804, 5643,4878, 3530), tracer sur papier semi-logarithmique le graphe $\log(\text{taille pb}) = f(\text{distance de migration en cm ou mm})$. En déduire alors la taille des fragments ADN λ / Bam HI.