

Techniques de base de la biologie moléculaire

Présenté par :

Addoun Hadjer
Ait Saadi Taous



Plan:

- **Introduction**
- **Purification des acides nucléiques**
 - **1-extraction à partir de matériels biologiques**
 - **2-estimation des quantités d'ADN**
- **Migration électrophorétique des fragments d'ADN**
- **Transfert selon Southern**
 - **1-principe**
 - **2-réalisation pratique**
 - **3-utilisation de la technique de Southern**

INTRODUCTION :

Pour pouvoir étudier le polymorphisme de l'ADN, il faut dans un premier temps accéder à la molécules d'ADN. Pour ce faire l'ADN doit impérativement être purifié à partir du matériel biologique dans des conditions optimales de qualité et de quantité.

La première technique à mettre en œuvre est donc l'extraction-purification d'ADN. Cette technique comporte deux étapes.

La première étape consiste à libérer l'ADN de la cellule, c'est l'étape d'extraction

L'étape suivante consistera donc à séparer l'ADN de ces autres constituants cellulaires, c'est l'étape de purification.

1 Extraction

Extraction d'ADN à partir du sang

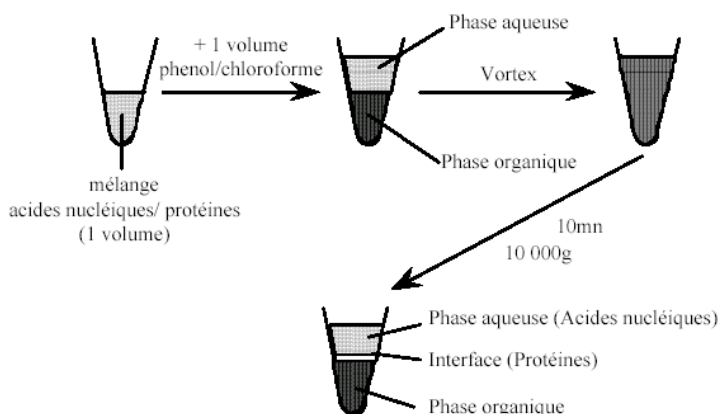
Faire éclater les globules rouges du sang par choc osmotique en le mélangeant à une solution hypotonique. Récupérer des globules blancs par centrifugation. Ajouter un mélange de détergent (SDS ou Sarcosyl) et de protéinase K ; le détergent détruira les membranes et la protéinase digérera les protéines associées à l'ADN. Extraire l'ADN des protéines par un mélange phénol-chloroforme. Ajouter des sels pour augmenter la force ionique puis

précipitation de l'ADN par l'alcool éthylique absolu froid (-20°C).

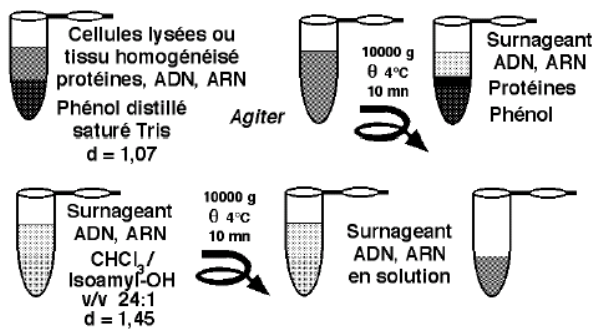
L'ADN précipite sous forme de filaments, visibles à l'œil nu, qui sont récupérés par enroulement sur une baguette de verre. Redissoudre l'ADN dans une solution tamponnée. L'ADN peut être ainsi conservée à 4°C plus d'un an.

Remarque : la taille des fragments engendrés par les cassures mécaniques au cours de cette extraction est supérieure à 20kB. Le rendement de cette méthode est de quelques centaines de microgrammes d'ADN pour 10 à 20 ml de sang. Attention : éviter de congeler l'ADN génomique, la congélation provoquant de nombreuses cassures de la molécule.

Extraction phénolique



Extraction de l'ADN



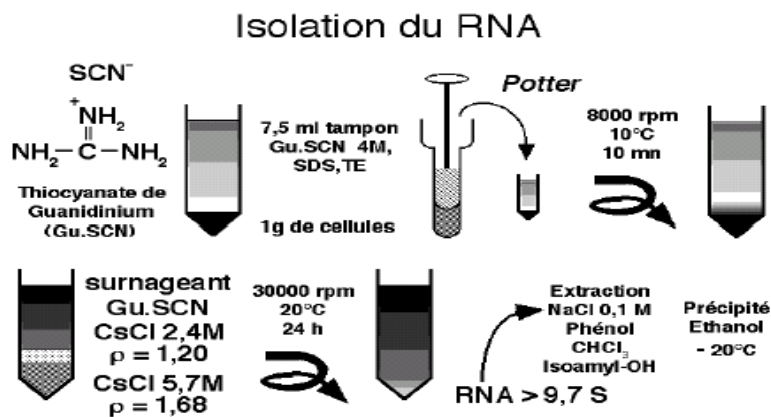
Extraire des ARN

Extraction des ARN totaux

La méthode la plus sûre est la méthode de Chirgwin (extraction d'ARN à partir de pancréas, tissu très riche en RNAses). Broyer le tissu dans un homogénéisateur de Potter avec une solution adéquate (détergent SDS ou Sarcosyl + un agent dissociant + une solution tampon + un agent réducteur). Centrifuger l'homogénat pour éliminer les débris cellulaires.

L'extraction des ARN se fait : soit par précipitation différentielle de l'ARN et de l'ADN / soit par ultracentrifugation sur coussin de chlorure de césium (seul l'ARN peut, vue sa densité, traverser ce coussin et être récupéré dans le culot

Laver l'ARN dans l'acétate de sodium et précipiter à l'alcool. L'ARN peut être conservé plus d'un an soit sous forme précipitée dans l'éthanol, soit sous forme congelée à -80°C .



Extraire de l'ARN à partir de tissus ou cellules en culture

Les sources cellulaires : des biopsies (ex : de villosités choriales lors d'un diagnostic prénatal) ou cultures de cellules. Les cellules doivent préalablement être dissociées et homogénéisées lors du passage du tissu dans un homogénéisateur de Potter en présence de détergent. Le protocole est ensuite identique à celui mentionné ci-dessus.

2Purification

- purification phénol/chloroforme. Cette technique est basé sur le principe de la solubilité différentielle des molécules entre deux phases non miscibles : l'ADN est soluble dans la phase aqueuse et les contaminants (protéines, lipides) dans la

phase organique. Le phénol est un déprotéinisant puissant qui va dénaturer et solubiliser les protéines, et dans lequel l'ADN n'est pas soluble. Le chloroforme va quant à lui permettre d'éliminer les traces de phénol qui auraient pu être emportées avec la phase aqueuse. L'ADN est ensuite récupéré sous forme solide à partir de la phase aqueuse par précipitation à l'alcool (éthanol ou isopropanol). Cette opération permet d'éliminer les molécules qui n'ont pas précipité en même temps que l'ADN (notamment les sels). Le culot ainsi obtenu par précipitation est resuspendu à la concentration voulue dans un tampon Tris/EDTA ou de l'eau.

- purification par utilisation de kits commerciaux. Les kits présentés ici sont le kit Puregene de la société Gentra et DNA easy Tissus kit de la société Qiagen. Le principe du kit Puregene est basé sur la précipitation des protéines (qui permet leur élimination), puis la précipitation de l'ADN (élimination des sels et des sucres) et sa resuspension dans un tampon Tris/EDTA ou de l'eau. Le kit Qiagen quant à lui est basé sur le principe des interactions ioniques : l'ADN est adsorbé sur une membrane de silice en présence de sels chaotropiques (qui déshydrate les molécules d'acides

nucléiques). Les protéines, les lipides et les polysaccharides ne sont pas retenus par la membrane. Après lavage de la membrane, les acides nucléiques sont ensuite élués avec de l'eau ou avec le tampon d'éluion fourni dans le kit (solution aqueuse contenant très peu de sel). On obtient un rendement d'éluion 15 à 20% supérieur en chauffant le tampon d'éluion à 70°C).

Purification des ARNm à partir de ARN totaux

La majorité des ARNm eucaryotes possèdent une queue polyadénylée (polyA) à son extrémité 3', utilisée pour purifier les ARNm par affinité.

Passer la solution d'ARN sur une colonne d'affinité dont les sites de fixation sont des oligonucléotides polydT ou polyU. Les ARN polyA sont retenus alors que les ARNt et ARNr non. Eluer les ARNm et les récupérer par précipitation par l'alcool éthylique absolu froid. On obtient ~50% d'ARN non polyA. Pour enrichir en ARN polyA, repasser sur la colonne.

Remarque : la technique phénol/chloroforme en elle-même a un

faible coût, mais celui augmente considérablement si on intègre les coûts d'achat et de maintenance des équipements de sécurité et la gestion des déchets (le phénol et chloroforme sont très toxiques pour le manipulateur et l'environnement).

Estimation des quantités d'ADN

Cette estimation est indispensable après extraction d'ADN à partir d'un matériel biologique.

Méthode basée sur la fluorescence.

Le principe est un fluorochrome qui se fixe sur le DNA et dont le taux de fixation est directement lié à la quantité de DNA émettra une quantité de fluorescence qui sera proportionnelle à la quantité de DNA présente.

Les différents fluorochromes :

- Se fixant spécifiquement sur des paires de bases :

Bases A-T: Hoechst 332 et DAPI

Bases G-C: mithramycine

- Intercalants :

Iodure de propidium, Bromure d'ethidium et Acridine orange

Ils ont l'avantage d'être moins chers.

Méthode basée sur la spectrophotométrie.

Le dosage s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm. Une unité de densité optique à 260 nm correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 µg/ml ou à l'absorption d'une solution d'ADN simple brin à la concentration de 33 µg/ml ou encore à de l'ARN à 40µg/ml.

Migration électrophorétique et visualisation des fragments d'ADN

L'électrophorèse consiste à séparer des fragments d'ADN, qui migre dans un gel soumis à un champ électrique, en fonction de leur taille (plus la taille est élevée et moins le fragment migrera loin dans le gel et inversement, les plus petits fragments auront la distance de migration la plus importante). Ceci est possible car la molécule d'ADN est chargée négativement, elle se déplacera donc vers le pôle positif (anode) de la cuve de migration. La détection de l'ADN est ensuite réalisée par

coloration au bromure d'éthydium (BET, agent chimique qui s'intercale entre les brins de l'ADN), puis par exposition aux UV. Les UV excitent le colorant qui émet alors une fluorescence rose/orange.

La migration et la séparation des fragments d'ADN vont être réalisés dans un gel d'agarose ou d'acrylamide selon la résolution souhaitée (tableau) :

- gel d'agarose : en fonction du pourcentage d'agarose dans le gel, des fragments d'ADN de quelques dizaines à quelques milliers de paires de bases peuvent être discriminés. Il est utilisé pour la visualisation de produits PCR;

- gel d'acrylamide : il est plus résolutifs que le gel d'agarose et permet de séparer, en fonction du pourcentage d'acrylamide dans le gel, des fragments des quelques dizaines à quelques centaines de paires de bases, à la base près. Il est utilisé pour la séparation fine de fragments d'ADN de taille voisines : séquençage, analyses de polymorphismes de longueur (microsatellites, AFLP).

Tableau : résolution des gels d'agarose et d'acrylamide en fonction du % respectivement d'agarose et d'acrylamide :

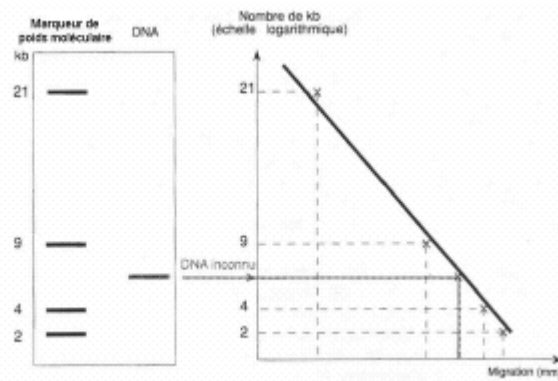
Agarose (%)	Size of fragments separated (kb) *	Acrylamide* (%)	Size of fragments separated (bp)
0.5	1-30	3.5	100-1000
0.7	0.8-12	5.0	80-500
1.0	0.5-10	8.0	60-400
1.2	0.4-7	12.0	40-200
1.5	0.2-3	15.0	25-150
2.0	0.05-2	20.0	6-100

Après coloration, cette technique permet de vérifier quantité, qualité et la taille de l'ADN. C'est une technique de contrôle qui peut être mise en œuvre à diverses étapes des différents protocoles de biologie moléculaire. Ainsi, elle va permettre de visualiser l'ADN :

- après extraction purification : évaluation de la quantité et de la qualité;*
- après amplification par PCR : évaluation de la taille, de la quantité et de la spécificité de l'amplification;*
- obtenus après digestion par des enzymes de restriction : nombre de fragments, évaluation de leur taille.*

La détermination de la taille se fait à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire qui est composé de plusieurs fragments d'ADN de taille connue. Il déposé dans le gel et migre en même temps que les échantillons (figure 16)

Figure 16 :



L'évaluation de la quantité d'un ADN est réalisée par comparaison entre l'intensité du fragment à doser et les intensités d'une gamme de concentration connues d'un fragment témoin.

L'évaluation de la qualité d'un d'ADN est réalisée en observant le profil de migration. Un extrait d'ADN génomique non dégradé (coupé) doit présenté, sur gel, une seule bande de haut poids moléculaire. Si l'ADN est dégradé, on observera des bandes supplémentaires de plus petit poids moléculaire.

Technique de SOUTHERN BLOT

I) PRINCIPE

Après avoir extrait de la bourse de Fabric ius de poussin par la technique du phénol chloroforme, les fragments d'ADN sont séparés sur un gel d'agarose puis transférés par capillarité et enfin fixés sur une

membrane de nylon. Ces fragments proviennent de la digestion d'ADN eucaryote et de phage lambda, par des enzymes des restrictions (Bam HI, HIND III, Eco RI). Les fragments sont hybridés par une sonde, après avoir été rendu monocaténaire par une solution dénaturante A.

La révélation des bandes d'hybridation se fait soit dans une cassette photographique, la membrane étant recouverte d'un film autoradiographique dans le cas du marquage par une sonde radioactive, soit par un développement calorimétrique, observable à l'œil nu reflétant la liaison sonde-fragment d'ADN détecté par une réaction immunologique avec comme sonde la dioxygénine .

L'intérêt de cette technique est de pouvoir détecter des mutations sur les fragments d'ADN d'une façon relativement simple.

II) Méthodes utilisés :

1. Après avoir digéré le DNA par une enzyme de restriction, on obtient un mélange de très

nombreux fragments de restriction. On soumet ces fragments à un électrophorèse pour

les faire migrer dans un gel de haut en bas en fonction inverse de leur taille.

2. On fait un montage pour faire passer les fragments grâce à une montée de tampon imprégnant

le gel puis une membrane de nylon où le DNA va se fixer par des liaisons stables.

3. La membrane de nylon avec le DNA fixé est alors mise à incuber dans un sac contenant

une solution d'une sonde radioactive complémentaire du fragment de DNA qu'on recherche,

à une température assez basse pour que l'hybride se forme mais assez élevée

pour que cet hybride soit parfaitement complémentaire.

4. On lave la membrane des molécules de la sonde qui ne sont pas fixées à leur DNA complémentaire,

puis on la met en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA

complémentaires impressionne le film.

5. On révèle le film où des taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments d'ADN complémentaires de la sonde. On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui servent de marqueurs de taille.

3 Utilisations du Southern Blot :

- Identification des mutation, délétions, et réarrangements des gènes.
- Prévision de certains cancers.
- Diagnostic de HIV-1 et des maladies infectieuses
- Tests paternité et en médecine légale.