



NOTICE TECHNIQUE

Kit lambda ADN non hydrolysés (20 postes)



Réf. : DT-16

Conception, réalisation, production :
École de l'ADN - 30015 Nîmes, www.ecole-adn.fr

Édition :
APBG - 69356 Lyon, www.apbg.org

Produit français, fabriqué à Nîmes (Gard) conforme à la réglementation européenne.

Rédaction oct 2013, version 1309-RL

1- PRESENTATION

1-1 Principe

L'analyse d'un profil d'hydrolyse de l'ADN fait partie de la routine dans les expériences de laboratoire. Néanmoins, l'énorme progrès scientifique dans le domaine de la biologie moléculaire et de la génétique des trente dernières années est essentiellement dû à la découverte des enzymes de restriction. C'est grâce à ces "ciseaux" moléculaires que les scientifiques sont capables de manipuler et réorganiser les molécules d'ADN à leur gré. Cette technique permet de révéler des marqueurs génétiques, courtes séquences d'ADN qui diffèrent selon les individus, les espèces ou les genres. À la différence des cartes de liaison génétique qui ont longtemps reposé sur des mutations identifiées grâce à leurs effets sur le phénotype, le polymorphisme de restriction s'adresse indifféremment à des séquences d'ADN codant ou non codant.

Le polymorphisme de restriction est basé sur la spécificité des enzymes de restriction en matière de reconnaissance d'une courte séquence d'ADN et de l'hydrolyse qu'elles y opèrent. De nombreux marqueurs génétiques dépendent ainsi de la manière dont de petites différences dans une séquence d'ADN peuvent modifier le profil de coupure par des enzymes de restriction.

Les applications sont multiples, cette technique peut être à la fois appliquée dans le cadre de l'identification d'un individu ou de la recherche d'une anomalie génétique à l'origine d'une pathologie.

Dans l'expérience proposée ici, vous allez utiliser le génome du bactériophage lambda comme source de matériel génétique. Il sera soumis à l'hydrolyse par deux endonucléases différentes EcoRI et HindIII. Chaque enzyme reconnaît une séquence nucléotidique spécifique et clive l'ADN du phage à des sites différents:

EcoRI (5'-G'AATTC-3') et HindIII (5'-A'AGCTT-3') respectivement. Un échantillon est le contrôle négatif, non hydrolysé, et un dernier échantillon sera votre contrôle positif, où l'ADN du phage a été hydrolysé au préalable par la combinaison de deux enzymes pour fournir une échelle de poids moléculaires. Après l'hydrolyse, les différents fragments d'ADN générés seront séparés en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose.

Ce kit, dans sa conception, propose l'ADN du bactériophage lambda et les enzymes de restriction, pour illustrer l'action des endonucléases sur l'ADN.

1-2 Méthodologie

Il s'agit de travaux pratiques comportant une phase expérimentale importante menée directement par l'élève avec des exigences de rigueur, d'habileté et de respect des principes d'hygiène et de sécurité.

Une telle phase pratique se replace dans l'ensemble d'un raisonnement scientifique expérimental. Cette méthodologie, alliée à une technique, correspond très bien à l'optique du programme et des objectifs de spécialité SVT de terminale S.

De plus, ce contact avec des aspects correspondant réellement à des processus de biotechnologie concourt à une orientation positive vers des études scientifiques, en particulier dans le domaine des sciences de la vie.

2- PRESENTATION DU KIT

Ce kit présente des réactifs qui sont prêts à être utilisés pour réaliser un profil de restriction sur l'ADN du phage lambda. Les résultats seront analysés sur un gel d'agarose de 1%. Les réactifs sont fournis de sorte à réaliser 20 dépôts de 20 µl pour chaque échantillon soit au total 80 dépôts.

2-1 Constitution du kit

L'ADN du bactériophage lambda (taille 48502 pb) doit être hydrolysé par EcoRI, Hind III, EcoR I et Hind III.

- ADN du bactériophage lambda	350 µl
- 1 tube d'Enzyme Eco RI	90 µl
- 1 tube d'Enzyme Hind III	90 µl -
- 1 tube de tampon prêt à l'emploi	180 µl
- 1 tube de tampon de charge	430 µl

2-2 Caractéristiques et conseils d'utilisation des réactifs

Tous les réactifs sont directement prêts à l'emploi ; Les réactifs doivent être maintenus à 2 – 8°C, conservés à cette température ils ont une stabilité d'au moins 12 mois à 2 – 8 °C ou 48 heures s'ils sont maintenus à température ambiante.

- Il est recommandé de ne pas maintenir les réactifs de façon prolongée à température ambiante.
- Ne pas congeler.
- Dans tous les cas se référer aux spécifications de stockage mentionnées sur l'étiquette.

3- PROTOCOLE

3-1 Matériels complémentaires nécessaires au laboratoire (non fournis):

- Micro-pipettes ;
- Micro-centrifugeuse de paillasse ;
- Chronomètre ;
- Bain marie ou bain à sec ;
- Cuve à électrophorèse ;
- Plaque de moulage pour gel ;
- Appareil photo Polaroid® Gelcam pour biologie moléculaire (option) ;
- Portoirs pour tubes Eppendorfs® ;

3-2 Consommables

- Embouts pour micro-pipettes 200 µl ;
- tubes de type Eppendorfs® ;

3-3 Réactifs complémentaires nécessaires

Tous les réactifs nécessaires pour réaliser une électrophorèse en gel d'agarose à 1%.

Voir Kit : Préparation d'un gel d'agarose réf. : DT-06

- Eau milliQ ;

- Tampon TBE : Tris-Borate 0,045 M ; EDTA 1 mM, pH 8,3 (ex. : 5 X TBE Eppendorf®) ; S'utilise à la concentration de 1 X.
- Agarose LE Ultra pure (USB Co.) ;
- Bleu de méthylène ou Azure A ;

3-4 Opérations préalables aux travaux pratiques

• **Stérilisation du matériel et des réactifs**

Aucune stérilisation ni préparation de matériel spécifique.

• **Préparation des gels d'agarose:**

Il est conseillé de préparer le gel d'agarose pour l'électrophorèse avant la séance de travaux pratiques. Se référer à votre procédure et protocole interne au laboratoire.

• **Préparation des solutions :**

Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.

4- PREPARATION DE L'EXPERIMENTATION

4-1 Préparation préalable de la séance

Pour chaque poste, préparer préalablement la veille ou le jour même les microtubes avec les ADN, les enzymes, et le tampon, en fonction de la manipulation :

protocole d'hydrolyse

- 1 x « ADN 1 » 17 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Eco RI de 4 µl ;
- 1 tube d'Enzyme Hind III de 4 µl ;
- 1 tube de 9 µl de tampon

4-2 Déroulement de la séance

• **Manipulation par les élèves**

La préparation des échantillons d'hydrolyse se déroule conformément aux tableaux décrits, dans des tubes de 200 ou 500 µl.

Les tubes sont distribués de sorte à réaliser une manipulation complète.

Note :

- Chaque tube doit être identifié ;
- Pour la préparation des échantillons un embout unique doit être utilisé lors de chaque pipetage.

Voir Tableau: protocole d'hydrolyse

• **Après la préparation des échantillons d'hydrolyse :**

- Centrifugation rapide en micro centrifugeuse (quelques secondes à 4000 – 5000 tours/min) ;
- Incubation à 37°C pendant 45 minutes ;
- Ajout par échantillon de 5 µl de tampon de charge (solution orange) ;
- Dépôt sur gel d'agarose à 1% (voir préparation d'un gel d'agarose) ;

• **Méthode de dépôt sur gel et électrophorèse**

- Préparer la cuve à électrophorèse ;
- Ajouter du TBE 1 X ;
- Déposer le gel, veiller à ce que le gel soit immergé dans le tampon, et les puits entièrement inondés ;
- Déposer dans les puits : 25 µl maximum dans les grands puits, ou 15 µl maximum dans les petits puits ;

- 5 µl de marqueur de taille choisi en fonction de la nature des bandes attendues ;
- Brancher le transformateur en vérifiant la polarité (- fil noir, + fil rouge) ;
- Migration à 100 volts pendant 30 minutes ou 135 volts pendant 20 minutes (penser à vérifier le sens de migration, le pôle négatif est côté dépôt).

- Après la migration

Coloration à l'Azure A (plus sensible et plus rapide)

Sortir le gel et le traiter comme indiqué :

- Plonger le gel pendant 5 à 6 min dans une solution aqueuse à 0,4 % Azure A.

- Après cette incubation, rincer abondamment à l'eau du robinet, laisser dans l'eau une vingtaine de minutes pour visualiser les résultats.

- Pour une meilleure définition, il est possible de laisser les gels au réfrigérateur une nuit emballés dans un film plastique.

Note :

Ces échantillons sont également adaptés pour le système qui utilise les « FlashGel® Cassettes » ; il suffit avec ce système de déposer uniquement 5 microlitres d'échantillon. Se référer à la notice technique du produit : Réf. DT-FG2 ou DT-FG4.

Dans tous les cas d'utilisation de gels d'agaroses spécifiques se reporter aux spécificités d'utilisation décrites par le fabricant

Résultats attendus Photo de gel bactériophage lambda.

Résultats de la migration

Tailles des Fragments après hydrolyse :

- Bactériophage lambda non hydrolysé (taille en pb) : 48502

- Bactériophage lambda / EcoR I (taille en pb) : 21226, 7421, 5804, 5643, 4878 3530

- Bactériophage lambda / EcoR I (taille en pb) : 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125.

- Bactériophage lambda / EcoR I + Hind III (taille en pb) : 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.

5- CONSIGNES DE SECURITE

Les réactifs qui constituent ce kit pédagogique ne présentent aucun caractère dangereux, toxique ou pathogène. La fiche de sécurité MSDS est disponible sur simple demande, auprès de l'École de l'ADN.

Au début de chaque formation, il est néanmoins important de sensibiliser les élèves aux risques encourus lors des manipulations :

Se référer aux mesures de sécurité d'utilisation des appareils électriques et matériels ;

Utiliser les précautions d'usage pour toutes manipulations de produits dangereux ou toxiques.

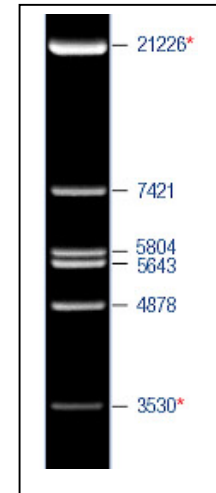
En cas d'ingestion informez le médecin responsable ou contactez le centre antipoison le plus proche.

Précautions spécifiques :

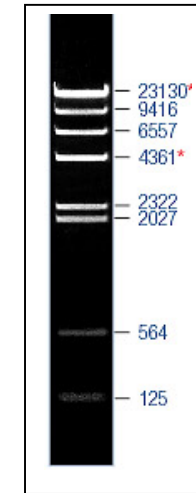
Le port de gants et de la blouse est conseillé.

Mesures d'hygiène : se laver les mains avant et après l'expérimentation ; Dans le cadre d'une révélation des fragments d'ADN au BET, il est important de veiller à respecter rigoureusement ces recommandations :

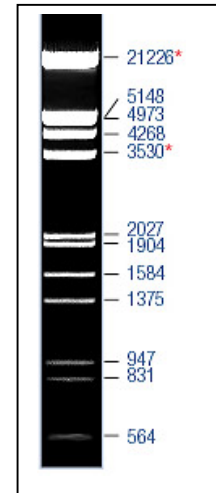
- Interdire formellement aux élèves de manipuler le gel d'agarose chargé en BET, (manipulation effectuée par le professeur préalablement formé) ;
- Porter des lunettes de protection en utilisant la table UV ;
- Pour l'élimination du BET chaque établissement doit se référer à sa procédure interne de « traitement des déchets ».



Lambda/EcoR I



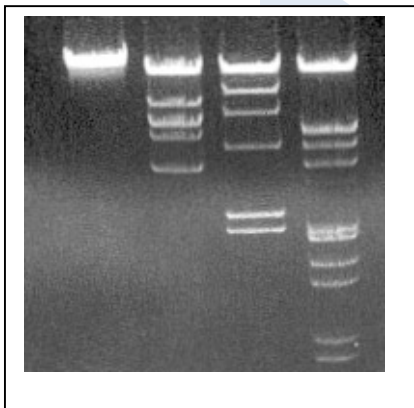
Lambda/Hind III



Lambda/EcoRI+HindIII

Remarque : ces photos ne sont pas à la même échelle.

Révélation sur gel d'agarose par BET :



Contrôle EcoR I Hind III EcoRI + HindII

Protocole :

Échantillons	eau milliQ	Tampon	ADN	Enzymes		volume final
				Eco RI	Hind III	
Lambda	14 µl	2µl	4µl	-	-	20 µl
Lambda Eco	12µl	2µl	4µl	2µl	-	20 µl
Lambda Hind	12µl	2µl	4µl	-	2µl	20 µl
Lambda E/H	10µl	2µl	4µl	2µl	2µl	20 µl

protocole d'hydrolyse

Contact commande

APBG - B.P. 8337
69356 Lyon cedex 08
tel 04 78 74 47 22
fax 04 78 01 22 14
apbg@wanadoo.fr
www.apbg.org

**Informations
Renseignements**

Ecole de l'ADN
19, Grand Rue
BP 81295
F-30015 Nîmes Cedex 1
Tél/fax : +33 (0) 466 67 82 29
E-mail : patrice@ecole-adn.fr
www.ecole-adn.fr

DNATOOLS est une marque
déposée par l'école de l'ADN

Action soutenue par

ThermoFisher
SCIENTIFIC



UNION EUROPÉENNE