

LES ENZYMES DE RESTRICTION, DES OUTILS POUR MANIPULER LE GÉNOME.

Exemple : action des enzymes de restriction sur le génome du bactériophage lambda

Travail demandé aux élèves

NB : Ceci n'est pas une « fiche élève » !

On veut étudier l'action des enzymes de restriction EcoR I et Hind III sur le génome du bactériophage λ

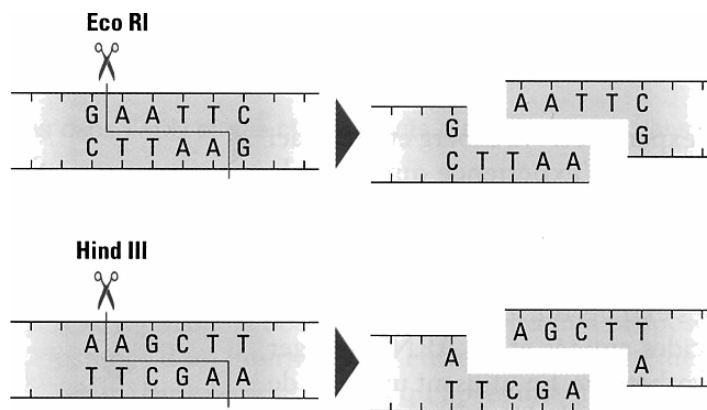
Le bactériophage lambda (λ) est un virus. Le génome du phage est un ADN de petite taille contenant 48 502 paires de bases (pb).

Les enzymes de restriction agissent sur l'ADN du phage λ en le découpant. Les fragments obtenus sont séparés suivant leur taille par électrophorèse.

I DETERMINATION DE LA TAILLE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION APRES L'ACTION DE HIND III

Ce travail est réalisé à partir du logiciel Anagène

Document : sites de coupures des enzymes de restriction Eco RI et HIND III



- 1) Faire déterminer à partir du logiciel Anagène et de la fiche fournie :
 - les sites de coupure de Hind III
 - la taille des fragments de restriction
 - les sites de coupure de Eco RI
 - la taille des fragments de restriction
- 2) Faire reporter les résultats dans le un tableau. Situer les sites de restriction sur le schéma fourni.

Données pour l'utilisation d'Anagène :


Fichier à ouvrir : Fichier *lambda.edi*


Ce fichier correspond à l'un des brins de l'ADN du génome complet du bactériophage λ .

Enzyme de restriction à utiliser : *HIND III*, il s'agit d'une enzyme reconnaissant un site à 6 bases.

ACTION DES ENZYMES DE RESTRICTION SUR LE GENOME DU BACTERIOPHAGE LAMBDA:

Résultats donnés par le logiciel ANAGENE

	Longueur des fragments obtenus (pb)
ADN non digéré	48 502 pb
ADN digéré par Hind III	
Localisation des sites de restriction	1  48 502

	Longueur des fragments obtenus (pb)
ADN non digéré	48 502 pb
ADN digéré par Eco RI	
Localisation des sites de restriction	1  48 502

II ELECTROPHORESE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION DE HIND III ET DE ECO R I

L'ADN de phage λ digéré par Hind III sera utilisé comme ADN de référence (ou ADN étalon) pour déterminer la taille des fragments de restriction obtenus après action d'une autre enzyme, Eco RI.

- 1) Faire réaliser la séparation des fragments de restriction de l'ADN digéré par Hind III et de l'ADN digéré par Eco R I selon un protocole fourni.

On peut scanner les résultats de l'électrophorèse, ce qui rend son exploitation plus facile.

- 2) A la fin de l'électrophorèse, faire représenter sur un dessin l'aspect du gel après migration des fragments. On peut demander d'indiquer :
 - le sens de migration
 - le contenu des puits
 - les fragments étalons
 - le fragment le plus court et le fragment le plus long pour les 2 ADN digérés.
- 3) Faire déterminer le nombre de sites de restriction pour les enzymes EcoR I et Hind III sur le génome du phage λ .
- 4) Faire mesurer les distances de migration des fragments de restriction de Hind III et reporter les résultats dans le tableau fourni. Utilisation de Mesurim possible.

ACTION DES ENZYMES HIND III ET ECO R1 SUR L'ADN DU PHAGE LAMBDA.

Résultats expérimentaux.

Digestion de l'ADN par HIND III (ADN étalon)			Digestion de l'ADN par ECO R1		
Taille des fragments en pb	Distance de migration des fragments	Log 10 taille	Taille des fragments en pb	Distance de migration des fragments	Log 10 taille

On considère que dans les conditions habituelles et dans certaines limites, le log décimal de la taille (en pb) du fragment de restriction est inversement proportionnel à la distance de migration.


- 5) Faire tracer la courbe étalon $\log(\text{taille du fragment en pb}) = f(\text{distance de migration en mm})$ pour les fragments obtenus après digestion de l'ADN par Hind III.
- 6) On peut alors déterminer la taille des fragments obtenus après digestion de l'ADN par EcoRI en utilisant la courbe étalon. Reporter les résultats dans le tableau.

CORRIGE :

Restriction par HIND III :

Sites de restriction: 23131, 25157, 27479, 36896, 37460, 44142.

La taille des fragments est donc de : (par ordre de calcul à partir du dernier site)
6682, 564, 9417, 2321, 2027, 23130

	Longueur des fragments obtenus (pb)
ADN non digéré	48 502 pb
ADN digéré par Hind III	23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2322, 2 027, 564
Localisation des sites de restriction	

BILAN: il y a 6 sites de restriction lorsque HIND III agit sur l'ADN du phage. On obtient donc 7 fragments. Le schéma réalisé est la carte de restriction du phage lambda pour HIND III.

Restriction par Eco RI :

Sites de restriction : 26104, 31747, 39168, 44972.

La taille des fragments est donc de (par ordre de calcul à partir du dernier site) :
3530, 5804, 7421, 5643.

Exemple obtenu d'après document: Bordas p 140.

Digestion de l'ADN par HIND III			Digestion de l'ADN par ECO R1		
Taille des fragments en pb	Distance de migration des fragments (mm)	Log 10 taille	Taille des fragments en pb	Distance de migration des fragments (mm)	Log 10 taille
23134	43.5	4.364	21230	42	4.45
9416	53	3.973	7421	56	3.916
6557	60	3.817	5804	62	3.783
4361	69	3.639	5643	63.5	3.75
2322	81	3.336	4878	73.5	3.55
2027	90	3.307	3526	Non visible	
564	Non visible	2.751			

Exemple de protocole

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN. On peut utiliser des mélanges de fragments du commerce produits à partir de la molécule d'ADN d'un virus, le phage lambda.

Du fait de la présence de groupements (HPO_4^{3-}) dans les nucléotides, l'ADN en solution dans un milieu basique est chargée négativement. Les fragments d'ADN soumis à un champ électrique migrent donc de la cathode vers l'anode à travers le « réseau de mailles » formé par le gel d'agarose. La migration est d'autant plus rapide que la taille des fragments est petite.

Pour suivre la progression des dépôts au cours de l'électrophorèse, on a ajouté un colorant (BBP) à la solution contenant les fragments d'ADN : il sert seulement d'indicateur de migration.

PROTOCOLE DE L'ELECTROPHORESE

- 1) Couler le gel d'agarose dans le plateau puis attendre sa solidification
- 2) Enlever le peigne ayant servi à creuser les puits
- 3) Placer le gel dans la cuve à électrophorèse, les puits du côté de la cathode juste au dessus de repère coloré
- 4) Remplir la cuve de tampon TBE pH 8,2 . La solution doit affleurer au niveau du gel mais ne doit pas la recouvrir, sinon la cuve Jeulin disjoncte.
- 5) Déposer 10 μl de solution d'ADN densifié au fond de chaque puits à l'aide d'une micropipette, coude en appui : VEILLER A NE PAS PERFORER LE FOND DES PUIITS. L'échantillon prend la place du tampon qui est moins dense.
(L'ADN à déposer à été dilué de manière à obtenir une concentration de 0,07 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.)
- 6) Fermer la cuve. Appliquer une tension de 100V. Suivre la migration grâce au BBP. Arrêter la migration quand le BBP a parcouru 4 à 5 cm (45 mn à 1h environ)
- 7) Retirer avec précaution l'ensemble support + gel. Placer le tout dans un bac. Recouvrir de la solution de colorant. Agiter doucement pendant 10 mn puis retirer le colorant.
- 8) Décolorer le gel par plusieurs bains successifs dans de l'eau distillée.

FICHE TECHNIQUE :

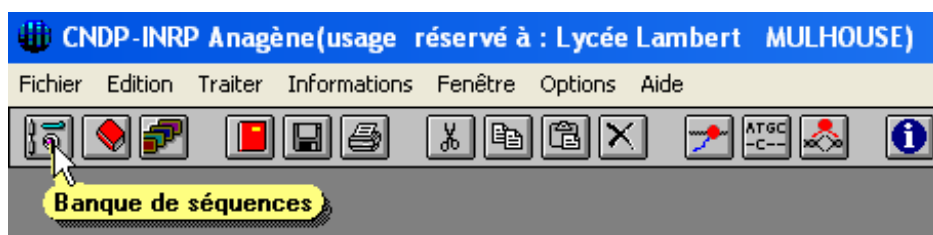
DÉTERMINATION DES FRAGMENTS DE RESTRICTION À PARTIR DU LOGICIEL ANAGÈNE

1. Lancer le logiciel Anagène à partir d'un raccourci disponible :



2. Charger les séquences à étudier selon l'un des 3 modes de chargement indiqués sur la fiche de TP :

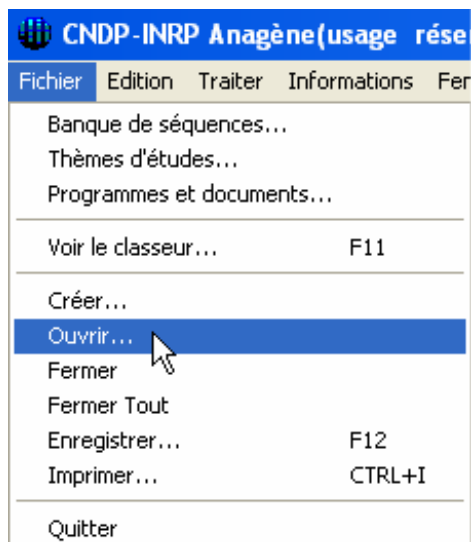
- *Fichier\Banques de séquences*



- ou *Fichier\Thèmes d'études*



- ou *Fichier\Ouvrir*



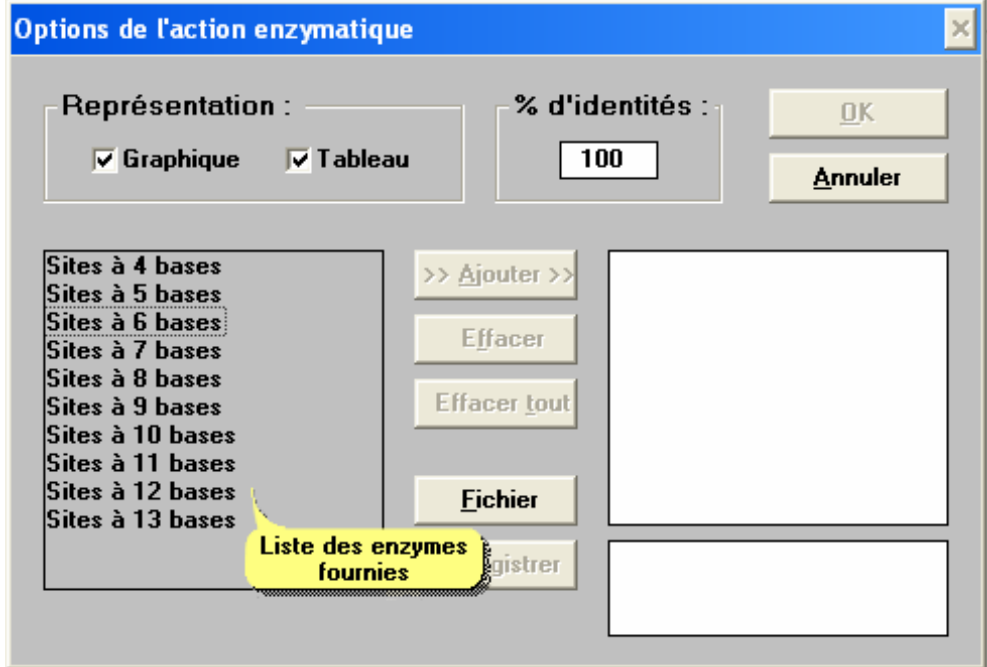
3. Réaliser la restriction enzymatique sur les séquences étudiées :

Suite au verso

Lancer l'action enzymatique



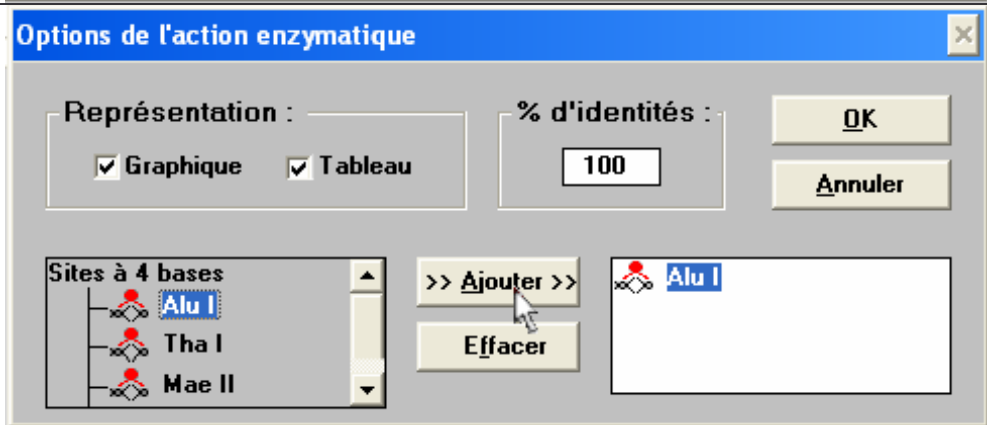
Rechercher les enzymes de restriction à utiliser dans la liste selon les indications fournies sur la fiche de TP :



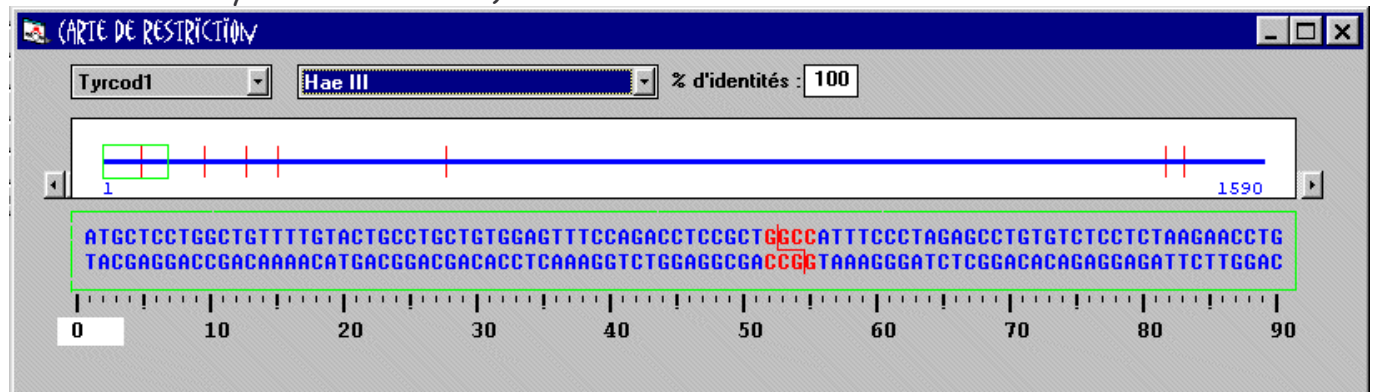
Ajouter les enzymes à utiliser à la liste des enzymes

et

cocher les cases « Représentation graphique » et « Tableau » des options de l'action enzymatique.



Cliquer OK, les résultats s'affichent. (Ci dessous un exemple de représentation graphique pour un allèle et une enzyme de restriction.)



Utilisez ces résultats pour répondre aux questions posées.

Fiche Technique : ACQUISITION D'UN ELECTROPHOREGRAMME

L'acquisition de l'image d'un résultat d'électrophorèse peut se faire à partir d'un appareil photo numérique ou d'un scanner.

A - Appareil photo numérique

1. Acquisition des images à partir d'un appareil photo numérique :

Prendre l'image comme pour n'importe quelle autre photographie, en veillant à utiliser une résolution suffisante pour pouvoir visualiser l'ensemble de la zone de migration de l'électrophorèse.

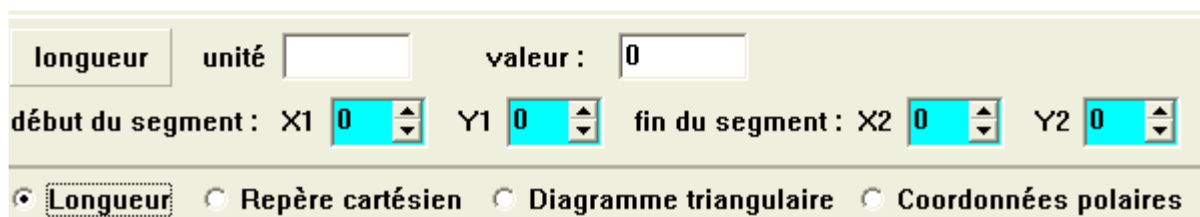
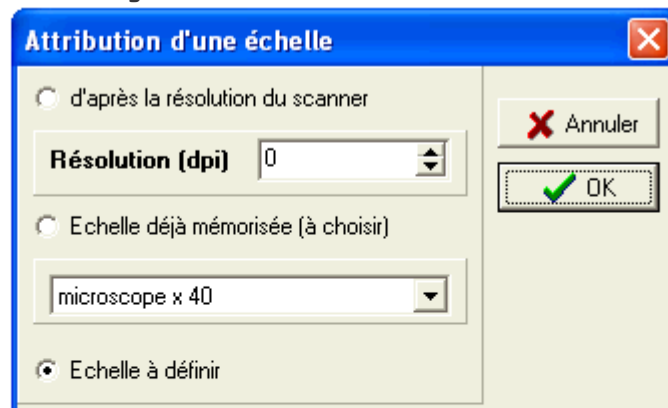
2. Enregistrer l'image capturée dans le répertoire de la classe

3. Lancer le logiciel *Mesurim* puis accéder à l'image par la commande *Fichier/Ouvrir*

4. Créer une échelle pour cette image à partir de la commande à partir de la commande



Choisir *Echelle à définir*, puis utiliser l'outil pour créer une échelle en tirant un trait de longueur connu sur l'image puis en indiquant la longueur de la ligne tracée.



Enfin *transférer* et *enregistrer* l'échelle pour pouvoir l'utiliser dans Mesurim.

Création du fichier échelle associé à un fichier image

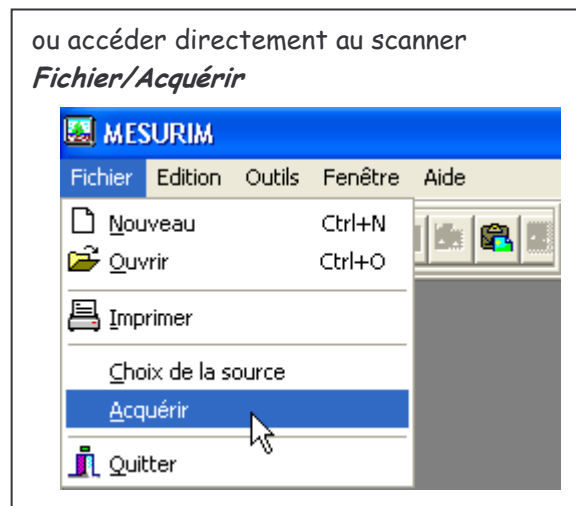
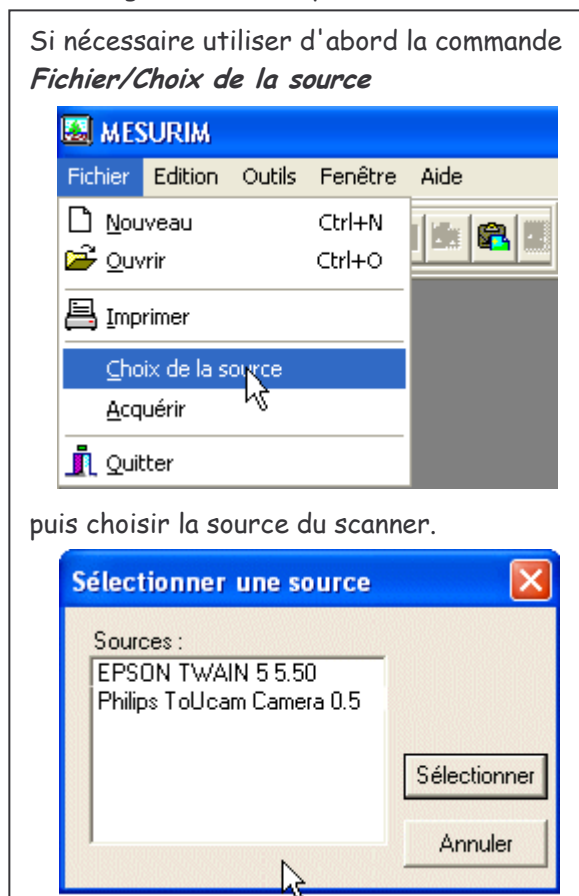
Transférer l'échelle Abandonner



B - Acquisition au scanner

Pour effectuer la capture des images d'électrophorèse à l'aide du scanner.

1. **Déposer** les résultats de l'électrophorèse face vers le bas sur le scanner (en prenant soin de protéger la vitre à l'aide d'un feuille de transparent) et les **repérer** à l'aide d'un feutre.
2. Lancer le logiciel **Mesurim** puis accéder au scanner par l'une des commandes ci-dessous :

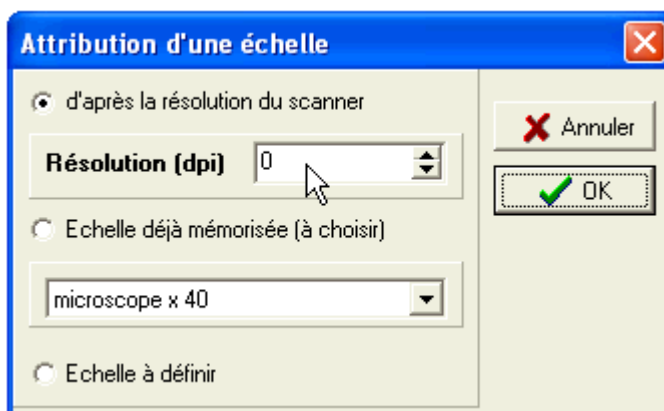


3. **Utiliser le pilote du scanner pour acquérir l'image**

Remarques : Chaque pilote est spécifique (favoriser les modes manuels aux modes automatiques)

4. **Création d'une échelle**

Lorsque le pilote de scanner est lancé depuis Mesurim, indiquer alors la résolution utilisée pour l'acquisition de l'image dans le cadre **Résolution**.



Lorsque le pilote de scanner n'est pas lancé depuis Mesurim, mais à partir d'un autre logiciel, enregistrer l'image puis se reporter à l'utilisation de l'outil **Image/ Créer**, modifier une échelle décrite dans le paragraphe A (Appareil photo numérique).

5. **Enregistrer l'image capturée** dans le répertoire de la classe.

FICHE TECHNIQUE : OUVERTURE D'UNE IMAGE ET APPLICATION D'UNE ECHELLE

L'électrophorèse des Protéines a été réalisée selon les consignes de la fiche technique.

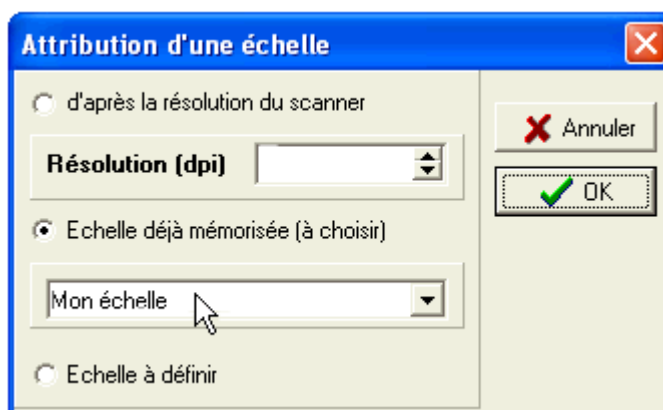
Ouvrir l'image de l'électrophorégramme

1. **Ouvrir le fichier** correspondant à l'électrophorèse par la commande *Fichier/ouvrir*. Choisir l'image qui correspond à l'électrophorèse à étudier.

2. **Appliquer une échelle à l'image**. Utiliser la commande *Image Créer/modifier l'Echelle* :

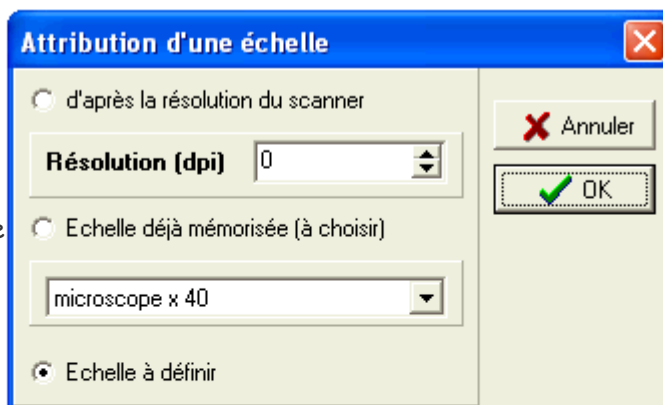


- pour appeler une échelle déjà mémorisée dans un fichier pour cette image



- ou pour Définir une échelle si ce n'est pas encore fait. (voir fiche Acquisition)

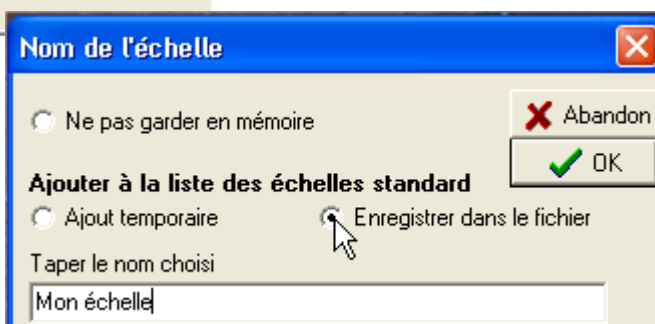
Choisir *Echelle à définir*, puis utiliser l'outil pour créer une échelle en tirant un trait de longueur connu sur l'image puis en indiquant la longueur de la ligne tracée.



Enfin *transférer* et *enregistrer* l'échelle pour pouvoir l'utiliser dans Mesurim.

Création du fichier échelle associé à un fichier image


Transférer l'échelle Abandonner



FICHE TECHNIQUE : SPECTRE D'ABSORPTION D'UN ELECTROPHOREGRAMME

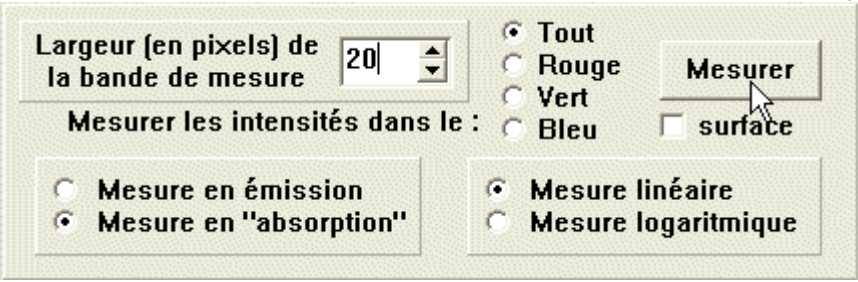
A - Mesure du spectre d'absorption

1. Sélectionner l'outil de Mesure



puis **Tracer** avec la souris **une ligne** sur la zone de migration de l'image d'électrophorèse

2. Lancer l'outil de mesure de lumière sur une bande :
Paramétrer l'outil comme indiqué :



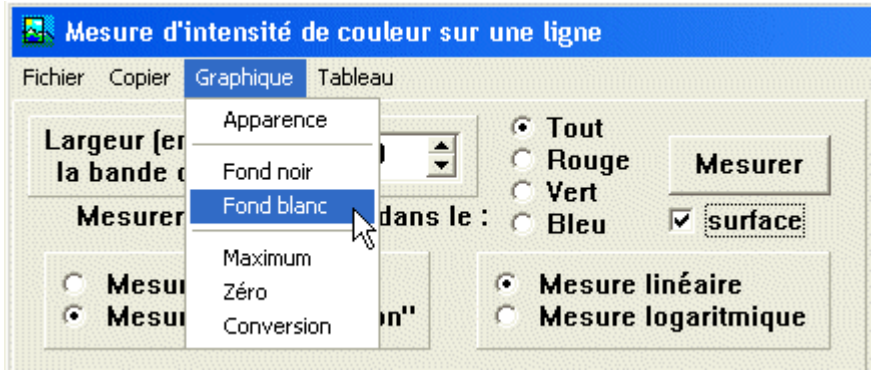
Cliquer sur *Mesurer*

2. **lumière sur une Bande**

- Courante
- Surface
- Lumière sur un rectangle
- ✓ lumière sur une Bande
- Angle
- Délimitation d'objets
- Lumière sous ce qui est coloré

B - Affiner la présentation et la lecture du spectre d'absorption obtenu :

Dans le menu *Graphique*, régler le *Fond Blanc*, le *Maximum* et le *Zéro*:



Puis *cochez* l'outil *surface*

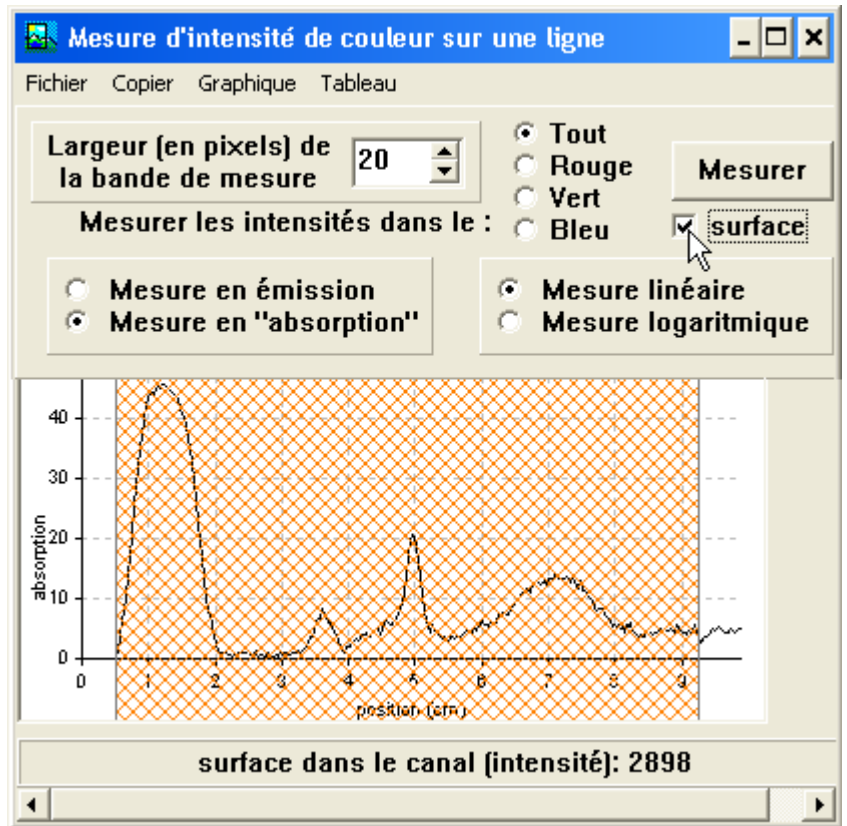
FICHE TECHNIQUE : MESURE DES PICS D'UN SPECTRE D'ABSORPTION

1 - Mesurer la surface totale des pics d'absorption (Absorption totale de la bande)

Après avoir mesuré le spectre d'absorption, cocher la case **surface** de l'outil de **mesure de lumière sur une bande**

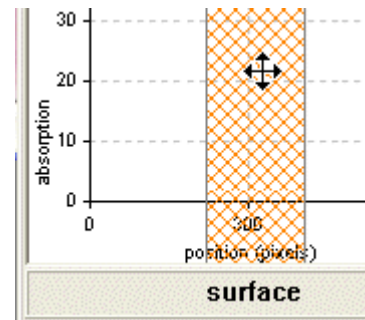
La bande hachurée indique la zone sur laquelle la mesure de surface est effectuée

Déterminer la **surface totale couverte** par l'ensemble des pics. (Positionner avec précision la bande hachurée sur l'ensemble de la surface occupée par les pics d'absorption puis lire la mesure dans le bandeau sous le graphique).



2 - Mesurer la surface de chaque pic d'absorption (pic caractéristiques de chaque protéine)

Déterminer la **surface de chaque pic** (Positionner avec précision la bande hachurée sur un pic et lire la mesure dans le bandeau sous le graphique).



3 - Compléter le tableau de relevé des mesures.

Sérum	Surface totale	Gamma	Bêta	Alpha	Albumine
Non immunisé (Lapin A)	100 %				
Immunisé (Lapin B)	100 %				

4 - Refaire le travail pour la seconde bande d'électrophorèse.

Fiche technique : CONSTRUCTION DE LA COURBE ETALON

La courbe étalon représente le logarithme de la longueur d'un fragment d'ADN en fonction de la distance parcourue. :

$$\log(\text{taille du fragment en pb}) = f(\text{distance de migration en mm})$$

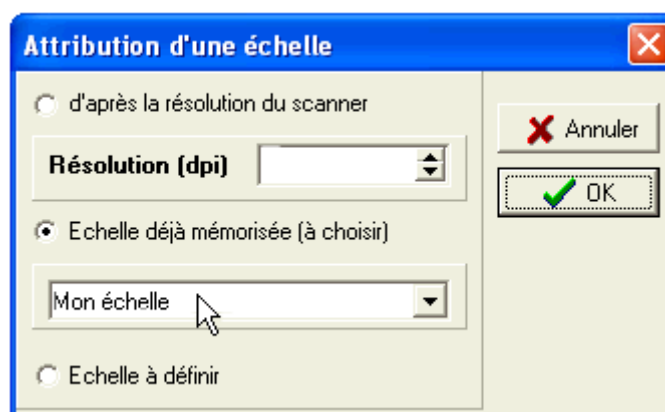
La longueur des fragments est déterminée à l'aide du logiciel Anagène, la distance de migration est déterminée à partir de Mesurim. Cette fiche explique comment mesurer la distance de migration des fragments d'ADN et comment tracer à partir des résultats la courbe étalon.

A - Ouvrir l'image de l'électrophorégramme

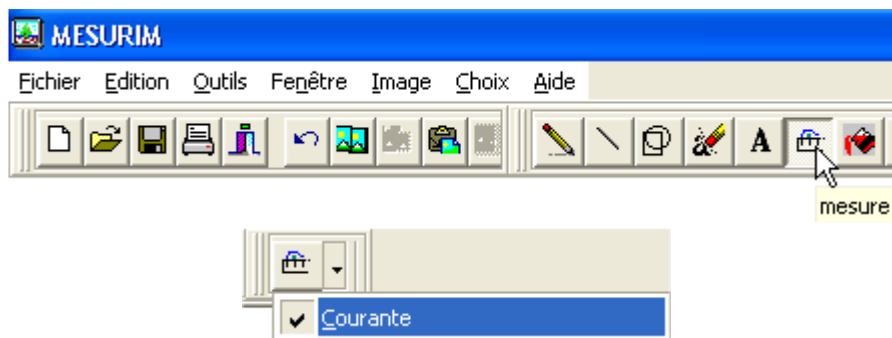
2. **Ouvrir le fichier** correspondant à l'électrophorèse par la commande *Fichier/ouvrir*.

Choisir l'image qui correspond à l'électrophorèse à étudier.

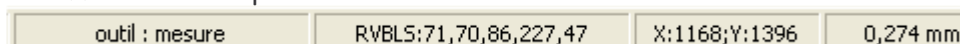
2. **Appliquer une échelle à l'image**. Utiliser la commande *Image Créer/modifier l'Echelle* pour appeler l'échelle mémorisée dans un fichier pour cette image ou créer une nouvelle échelle si ce n'est pas encore fait (voir fiche Acquisition).



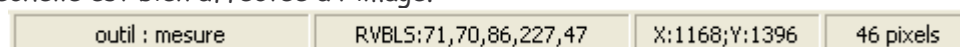
3. **Mesurer sur l'image** la migration des différents fragments en utilisant l'outil de *mesure courante*



Lorsqu'un trait est tiré à la souris, Mesurim affiche dans la barre d'état en bas de l'écran soit la mesure du trait selon l'échelle affectée à l'étape 2 :



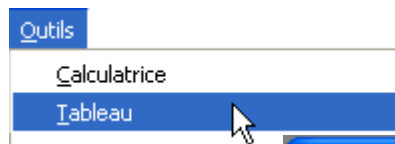
Remarque : Lorsque aucune échelle n'est appliquée, la mesure du trait est exprimée en pixels, cela permet de vérifier qu'une échelle est bien affectée à l'image.



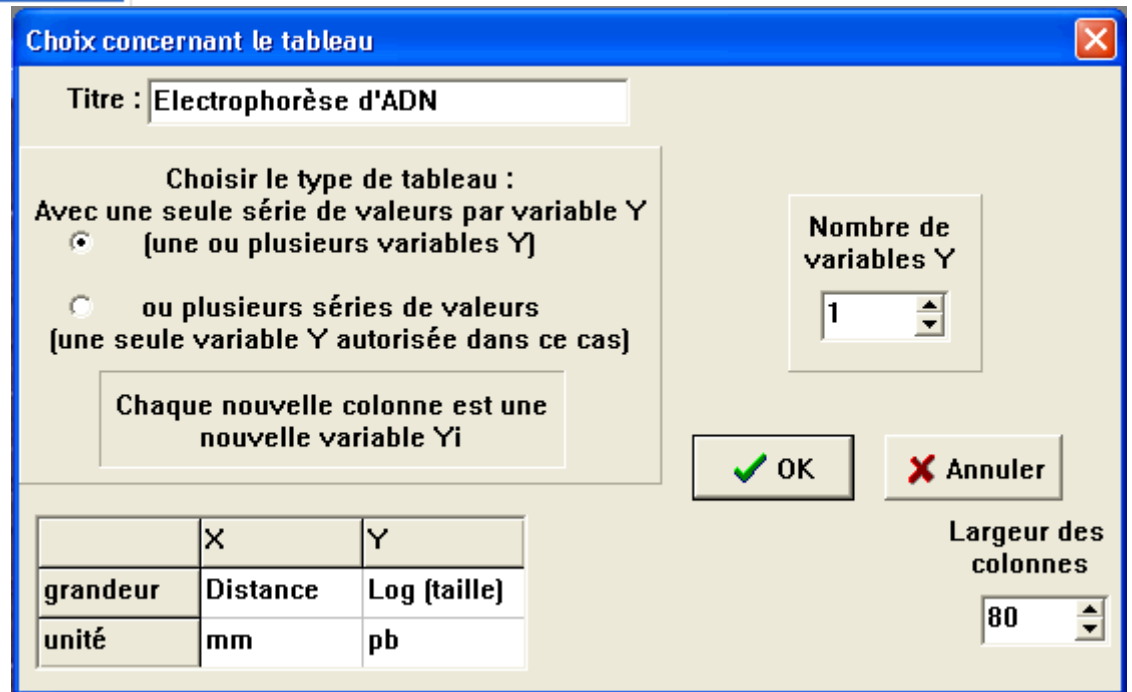
La migration à partir du puits de dépôt peut alors être mesurée pour les différents fragments d'ADN.

B - Tracer la courbe étalon

1. Lancer l'*Outil Tableau* pour tracer la courbe Etalon



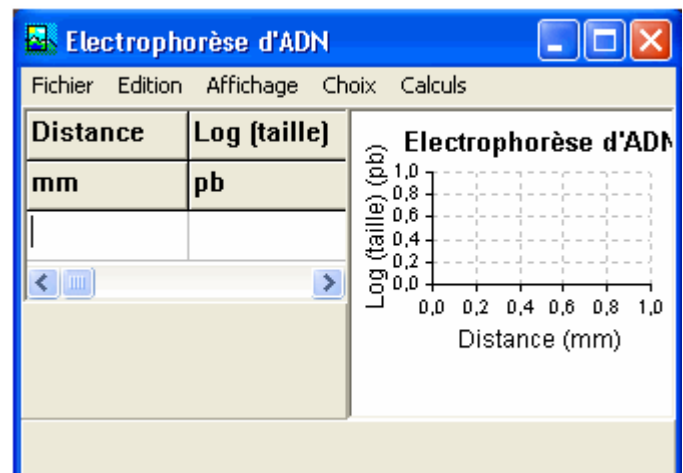
Compléter les paramètres du tableau, puis cliquer OK



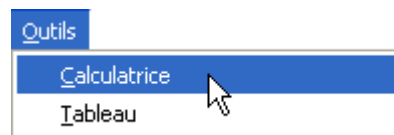
2. Compléter le tableau

Le tableau s'ouvre, il ne reste plus qu'à le compléter et le graphique se complète automatiquement.

Il est possible de modifier le paramétrage du graphique à partir des menus disponibles dans cette fenêtre.



Remarque : le menu *Outil Calculatrice* de Mesurim permet d'appeler la calculatrice de Windows pour calculer le logarithme de la taille des fragments d'ADN déterminés par Anagène.



Cette courbe peut alors servir à déterminer la taille de fragments d'ADN de taille inconnu ayant migré dans les mêmes conditions.