

TP GÉNÉTIQUE : QUELQUES OUTILS POUR L'ÉTUDE DES GÉNOMES.



. Adult *Drosophila* expressing Green Fluorescent Protein (GFP) under control of the engrailed promoter.
genetik.fu-berlin.de

BCPST 1, Lycée Hoche

Principes

ORGANISME DONNEUR

Extraction et coupure de l'ADN en fragment contenant de un à plusieurs fragments d'intérêt.

VECTEUR

Ou transporteur d'ADN. C'est un fragment d'ADN capable de réplication autonome.

insertion individuelle de chaque **fragment d'ADN** dans une molécule de **vecteur**.

Obtention de **l'ADN recombinant**

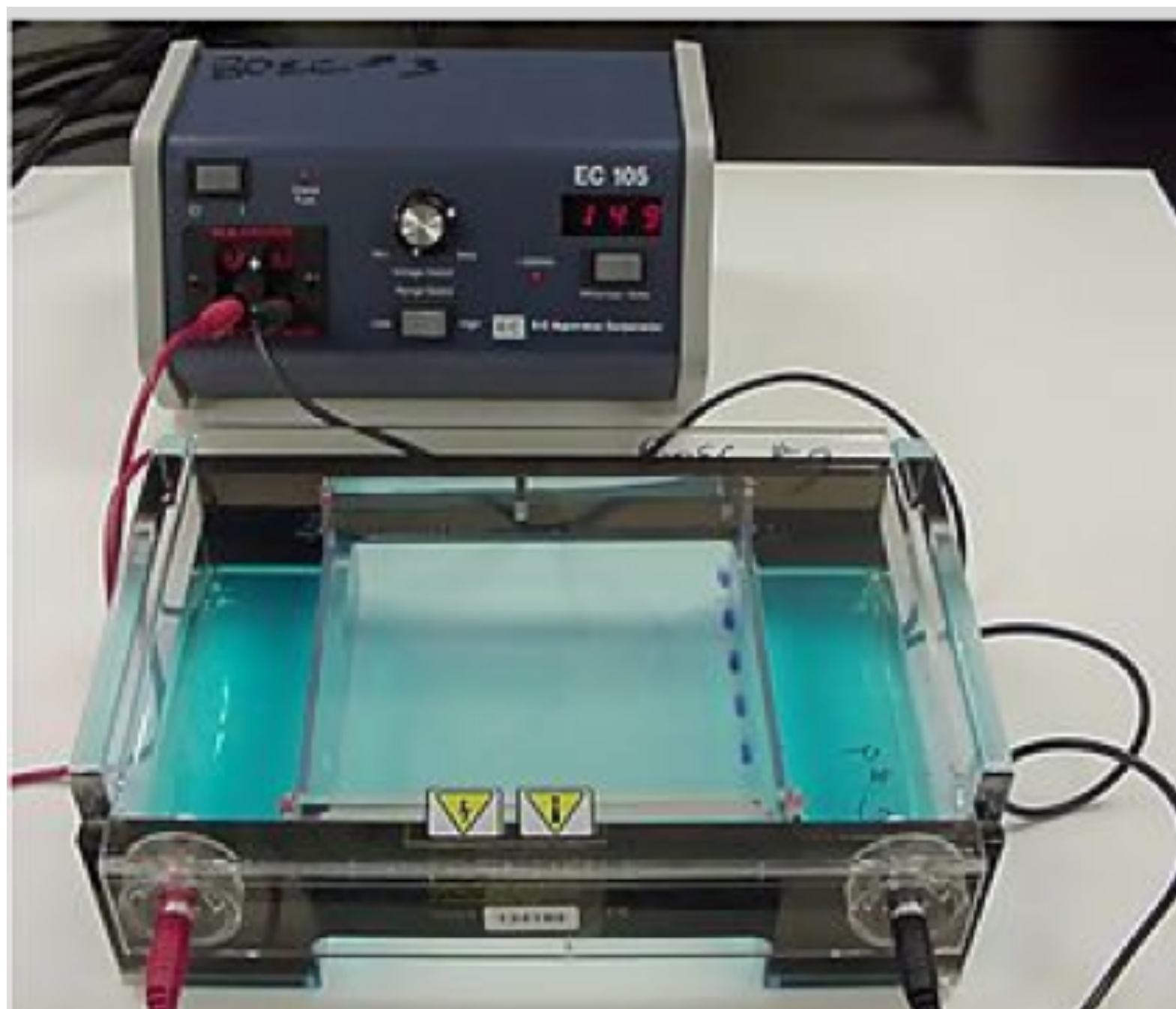
Nouvelle combinaison de **l'ADN d'un génome donneur** (qui peut être de n'importe quel organisme) avec **l'ADN d'un vecteur** qui peut être d'origine complètement différente.

I. Etude de la structure des génomes grâce aux enzymes de restriction.

A) Digestion enzymatique du génome du phage lambda.

1. Protocole

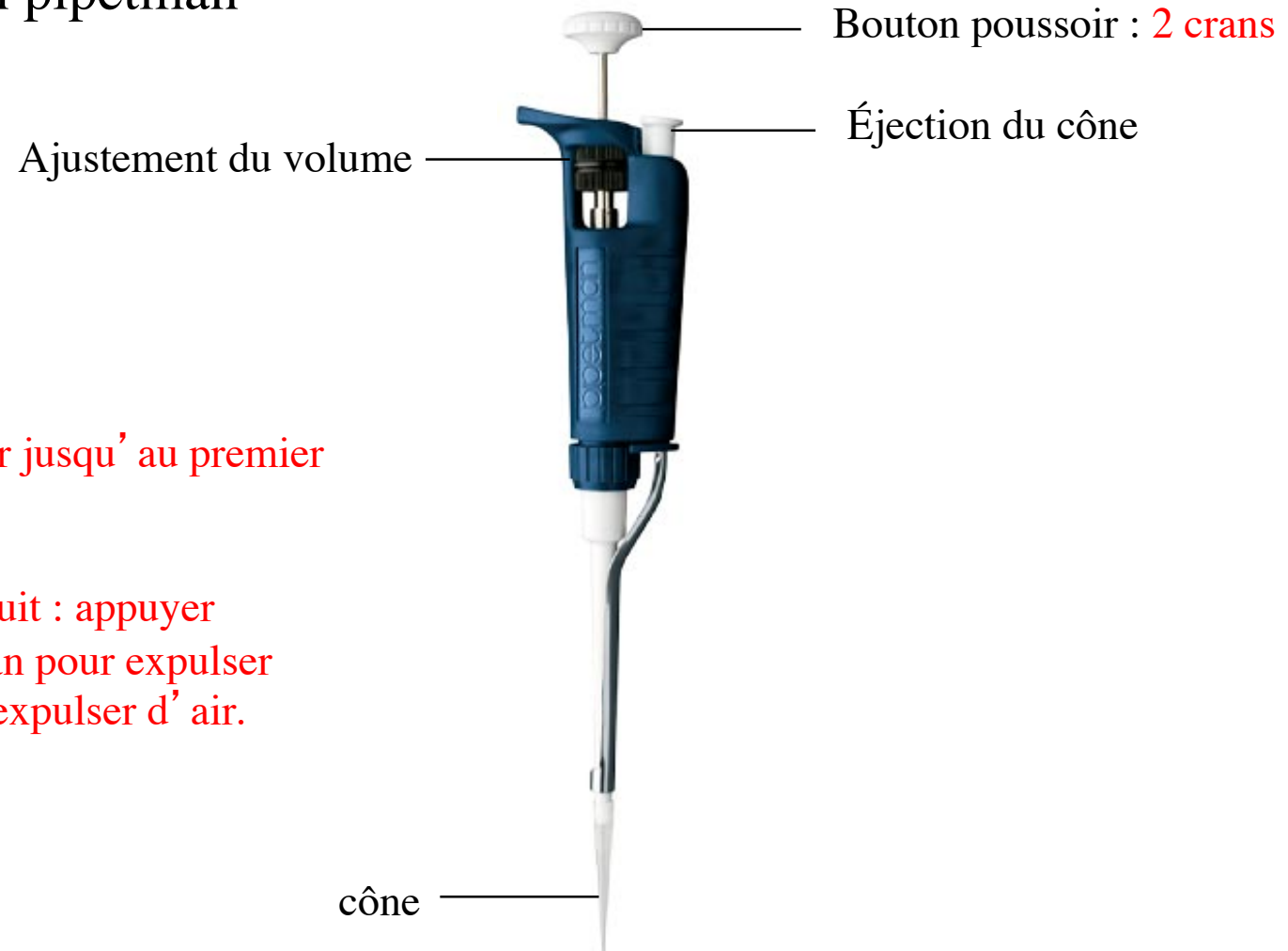
Tube S (témoin sans digestion enzymatique de l'ADN)	Tube E (digestion de l'ADN par l'enzyme EcoRI)	Tube H (digestion de l'ADN par l'enzyme HindIII)
Prélever 8 μ L du tube A (contenant l'ADN du phage) et le déposer dans le tube S / E / H		
Ajouter 26 μ L d'eau stérile	Ajouter 24 μ L d'eau stérile	Ajouter 24 μ L d'eau stérile
Ajouter 4 μ L de tampon dans chaque tube S / E / H		
Mélanger au vortex		
Disposer les tubes S / E / H pendant 1h à 37°C pour réaliser la digestion enzymatique		
Ajouter 5 μ L de tampon de charge dans chaque tube S / E / H <i>Le tampon de charge alourdit la solution et lui permet de "couler" au fond des puits. Il permet également de suivre visuellement l'avancée de la migration, avec un colorant qui migre aussi vite que les plus petits fragments d'ADN et un autre colorant qui migre aussi lentement que les plus gros fragments d'ADN.</i>		
Installer le gel d'électrophorèse dans la cuve, le recouvrir de tampon de migration TAE <i>Veiller à ce que les puits soient situés du côté de la cathode (pôle -)</i>		
Déposer 10 μ L de chaque tube S / E / H dans les puits du gel		
Lancer rapidement la migration électrophorétique à 75 V (30-45 min) <i>Ne pas attendre après avoir fait les dépôts pour lancer la migration sinon l'ADN diffuse dans le gel et les bandes obtenues ne seront pas nettes.</i>		
Plonger le gel dans la solution de coloration de l'ADN (azure A) pendant 15 minutes. Transférer ensuite le gel dans l'eau ; laisser tremper le gel quelques minutes, en changeant l'eau régulièrement. ⇒ <i>Les bandes d'ADN apparaissent progressivement en bleu foncé sur fond bleu clair</i>		



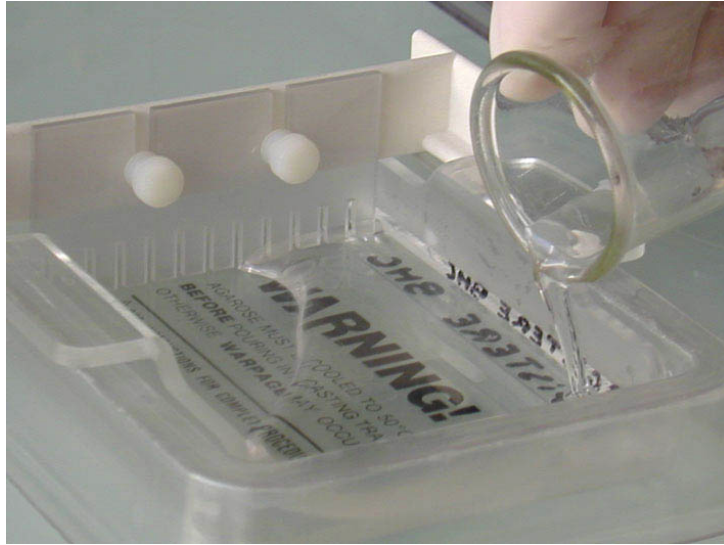
Réalisation d' une électrophorèse d' ADN

Epreuve de TP au concours

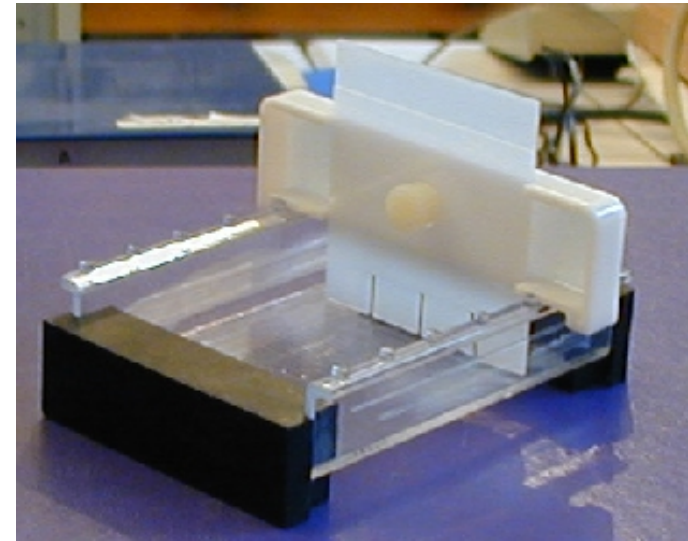
1. Utilisation d' un pipetman



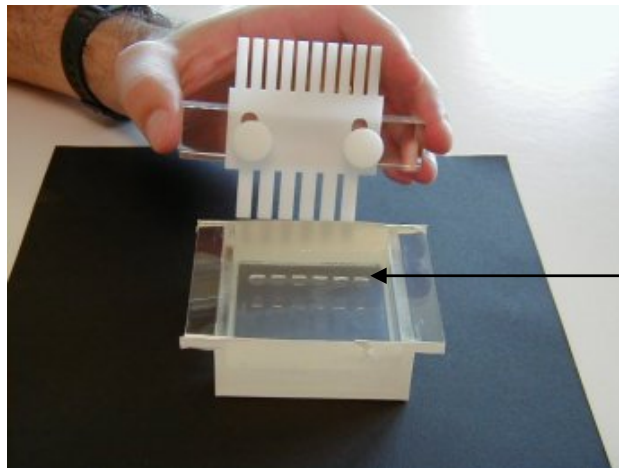
2. Le gel d'électrophorèse



Univ-rouen



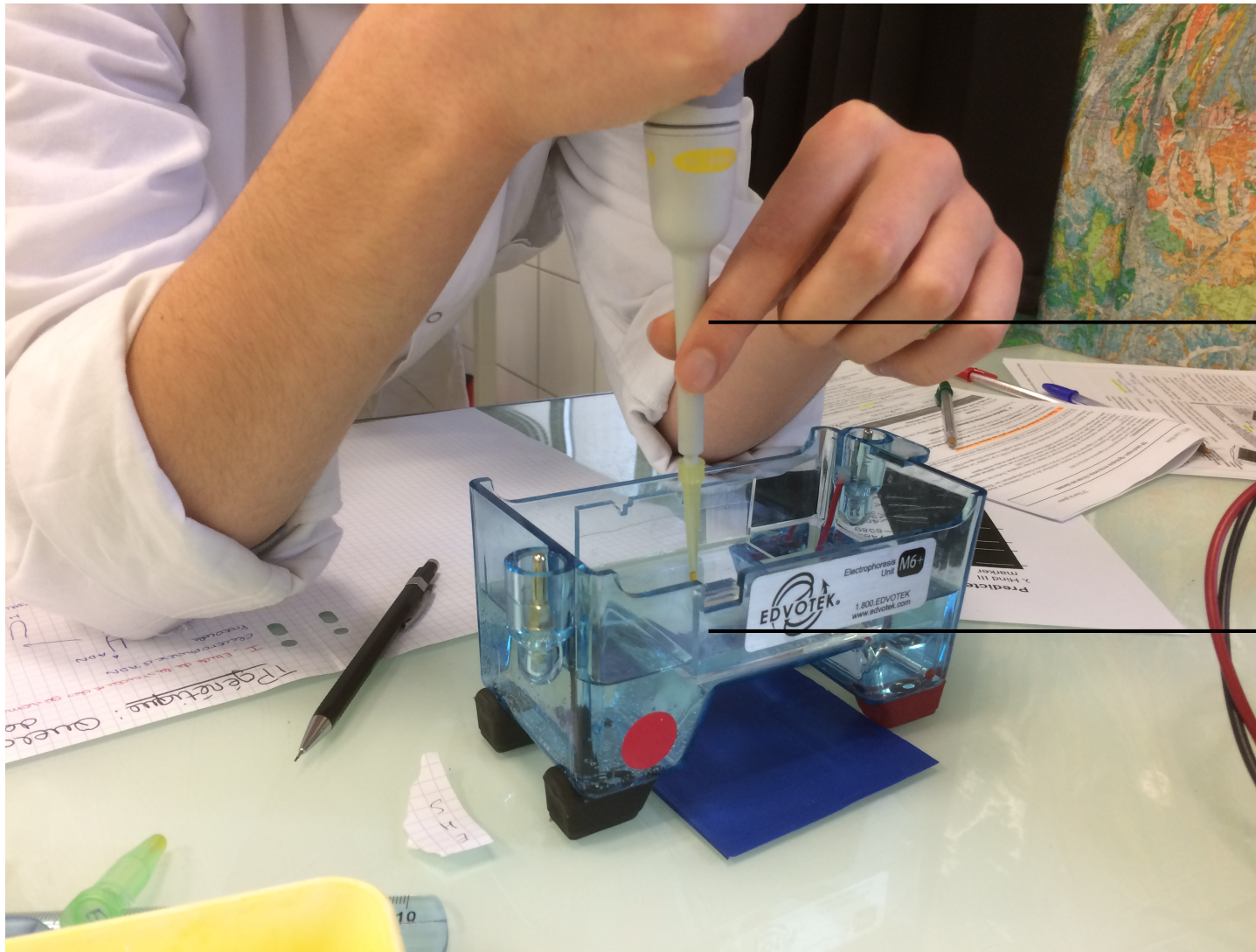
(Sny jussieu)



puits

Ac-nancy

3. Le dépôt

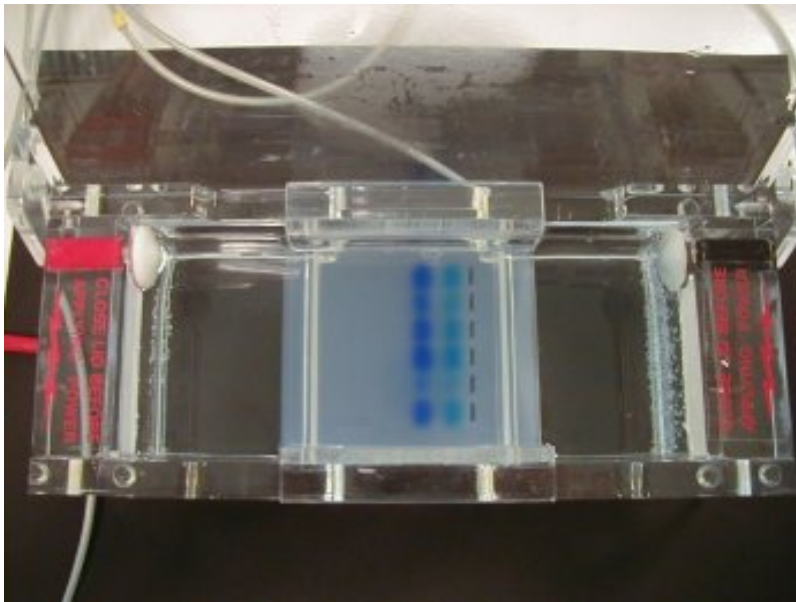
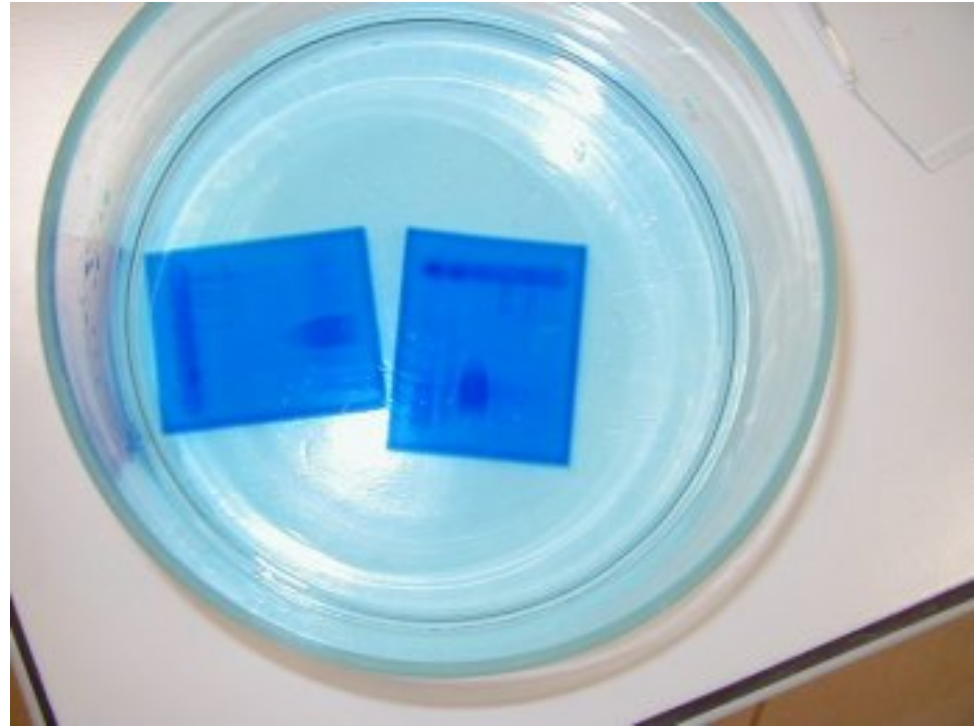
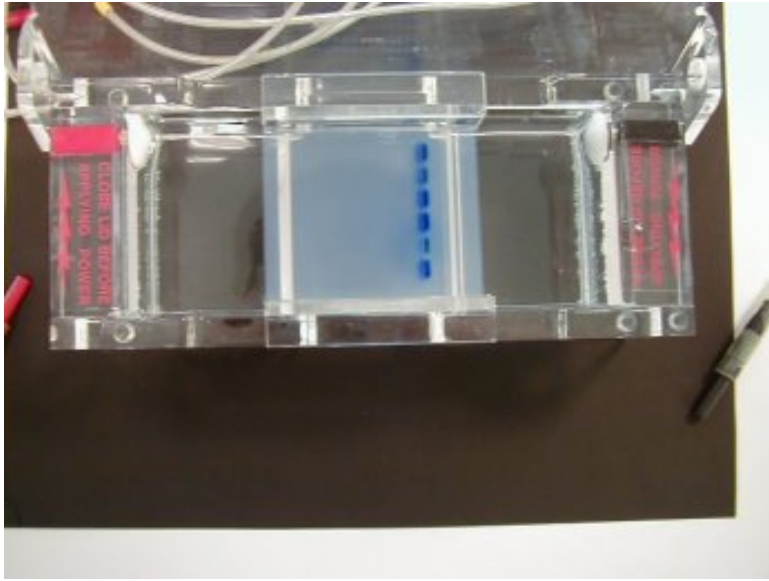


2 coudes posés

1 main en bas pour plus de précision

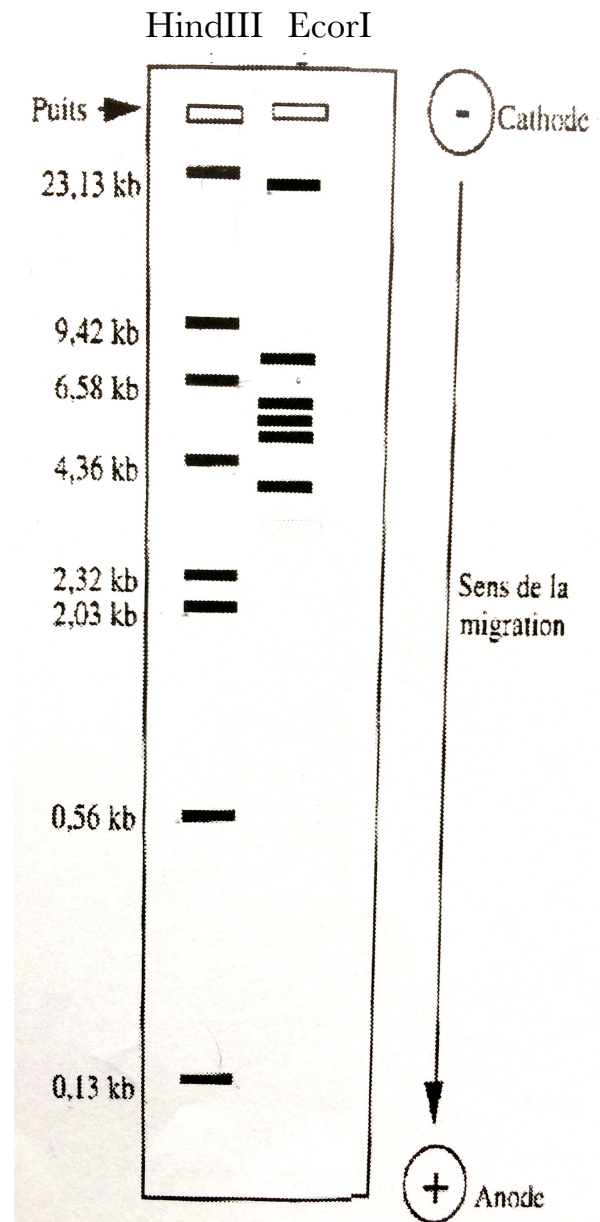
Ne pas percer le puits!

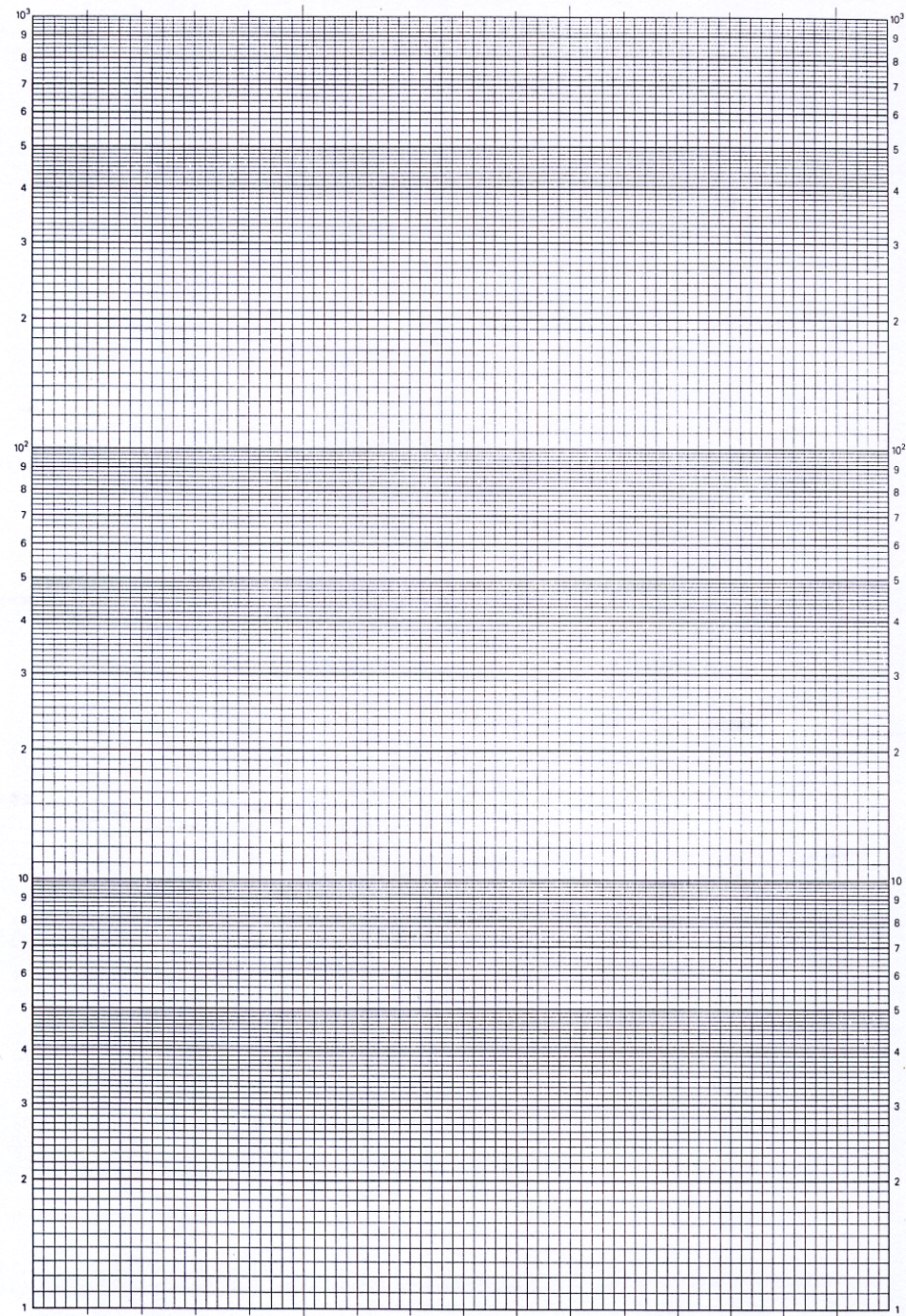
4. La migration et la révélation



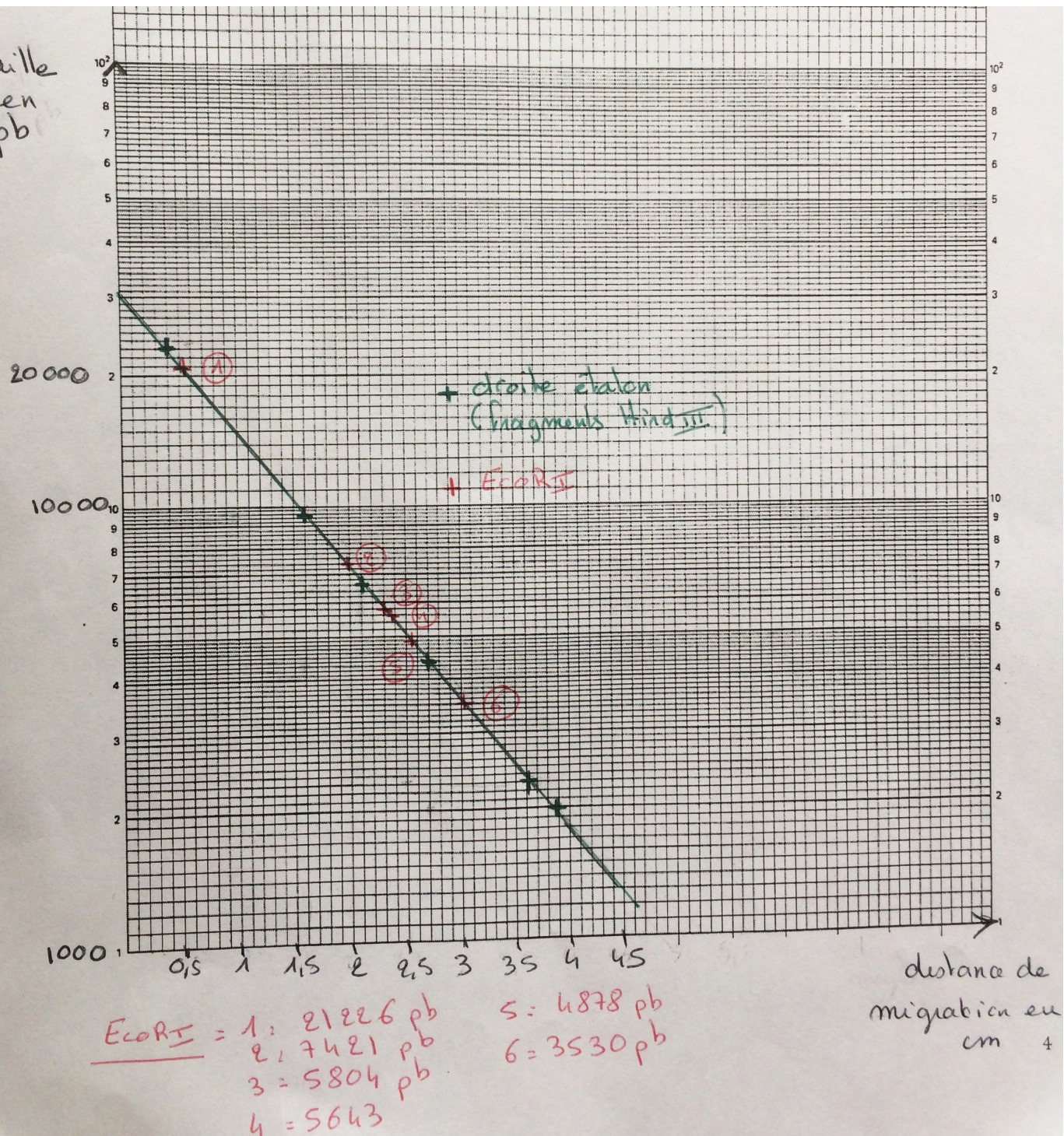


2. Analyse des résultats : déterminer la taille des fragments de restriction.





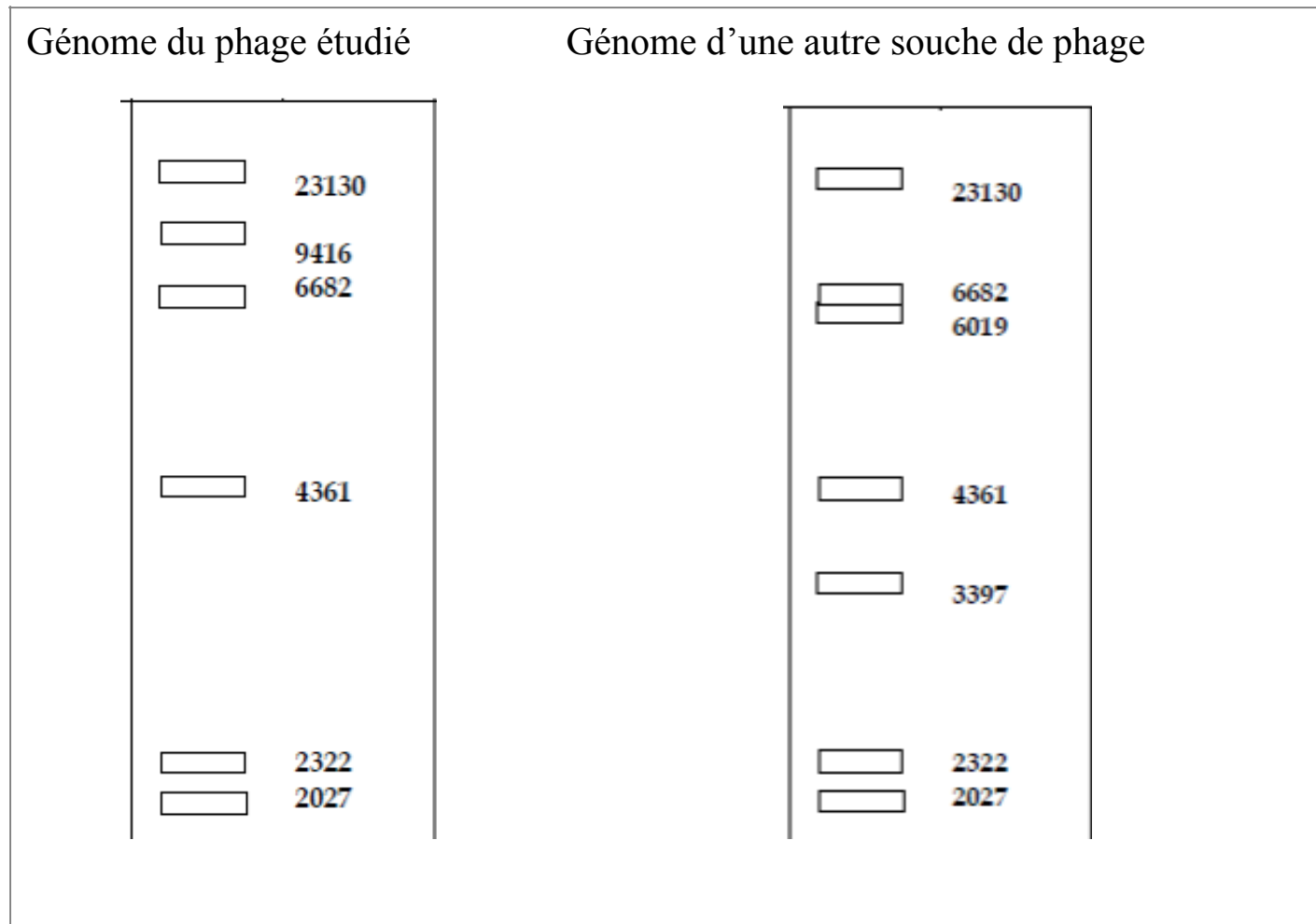
Taille
en
pb



3- Exploitation des résultats : utilisation des enzymes de restriction pour étudier la structure d'un génome

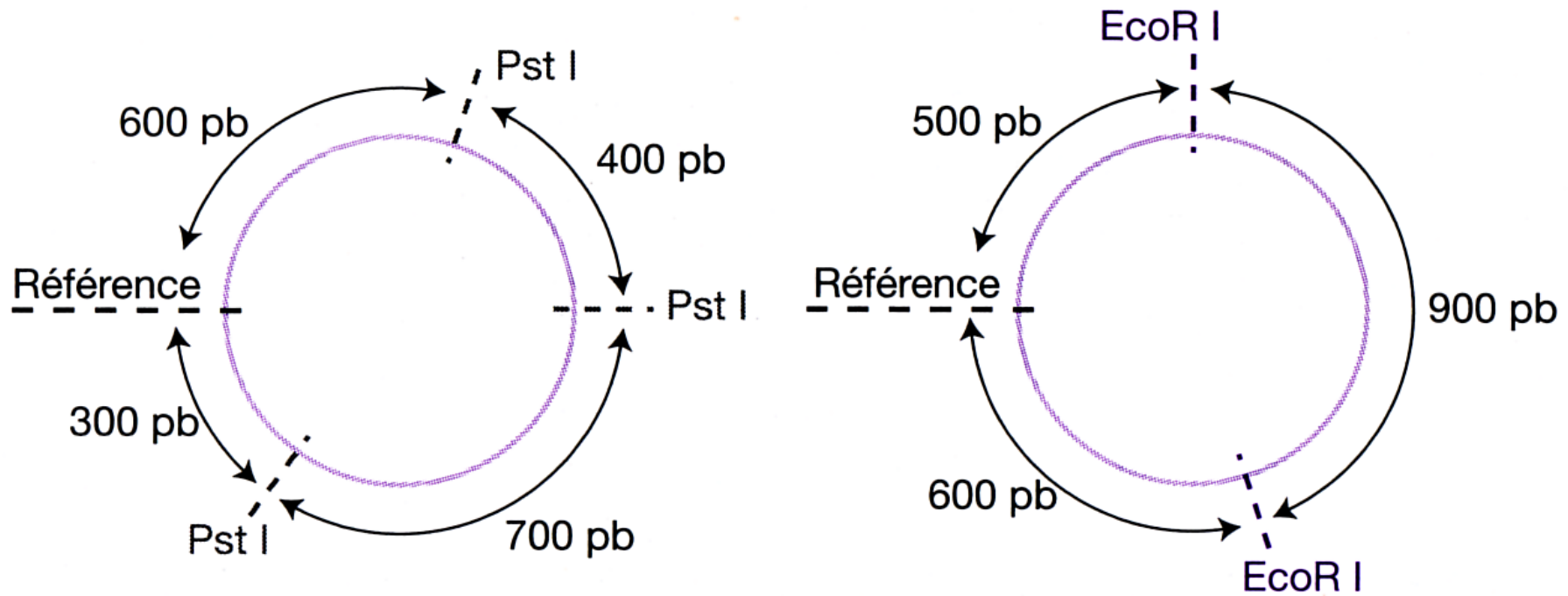
On veut comparer les génomes de la souche de phage étudiée et d'une autre souche du même phage.

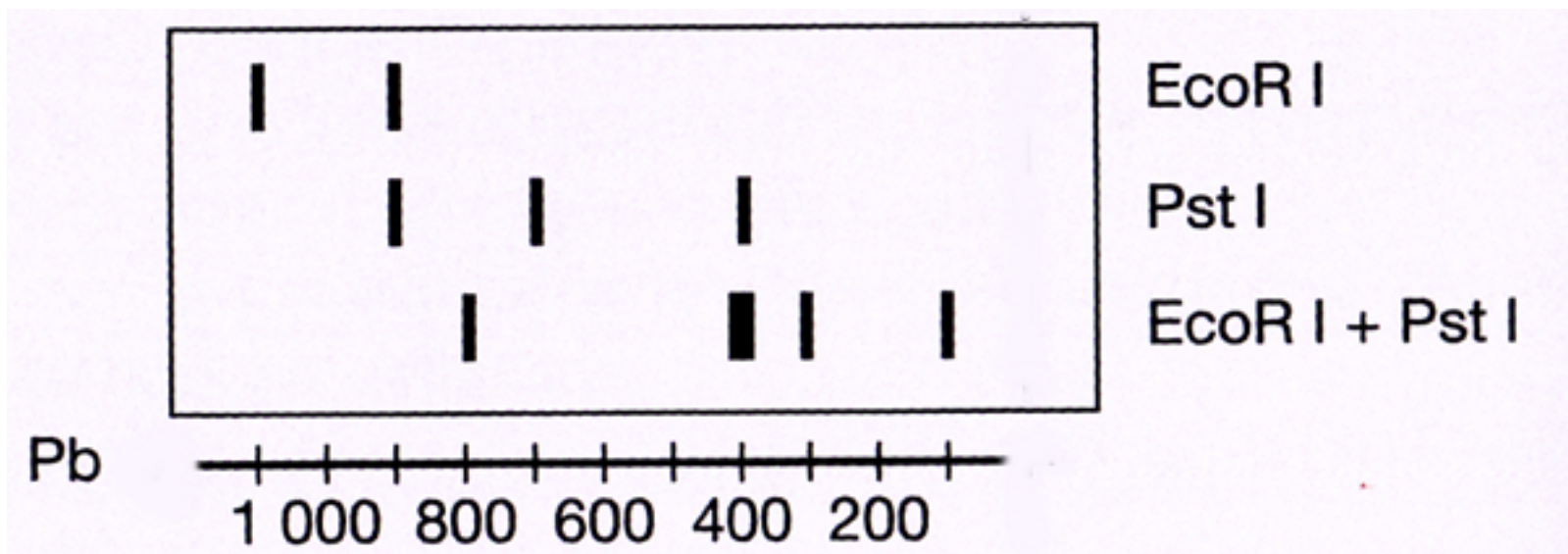
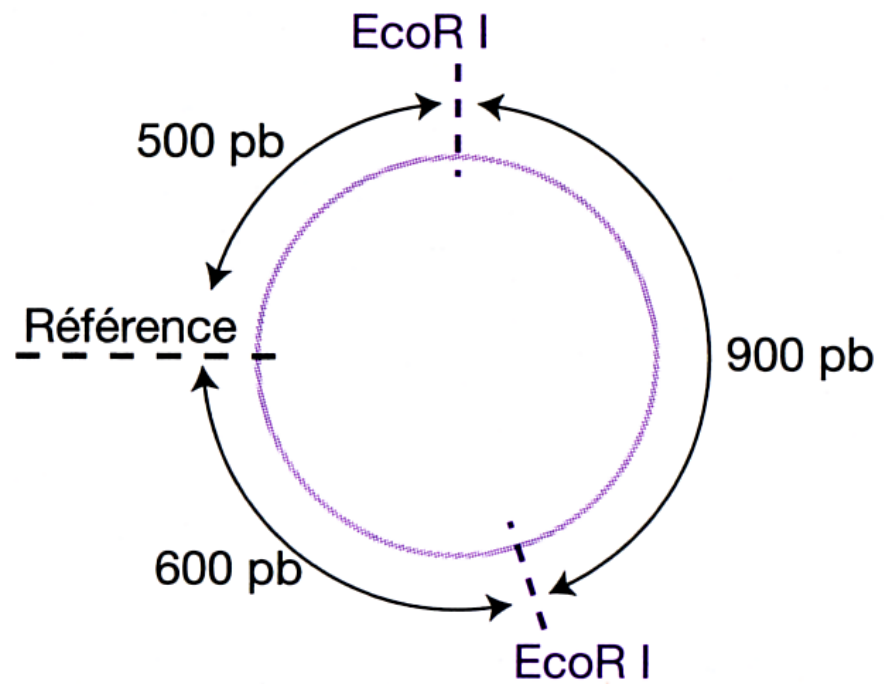
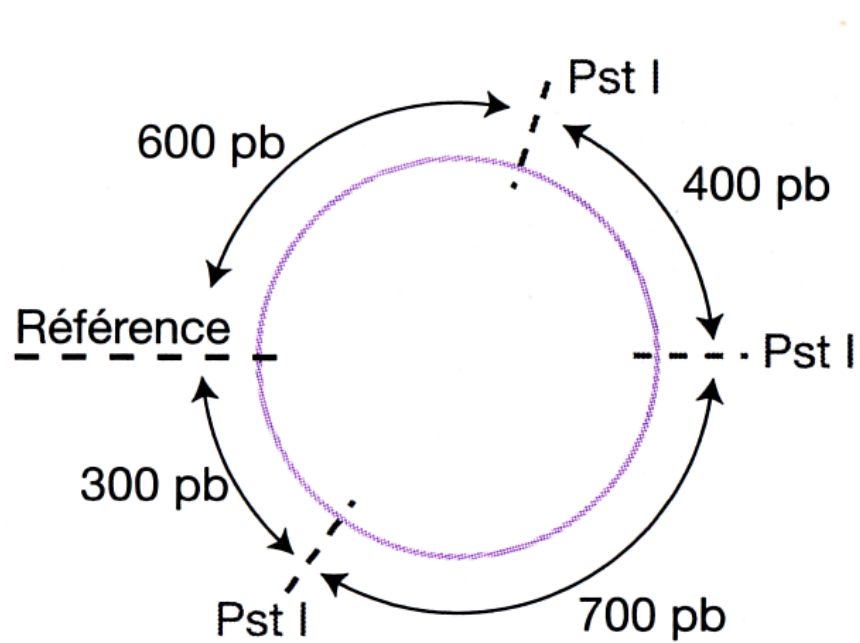
Les résultats de la digestion par HindIII de chacun des génomes sont présentés ci-dessous :



B) Etude de la structure d'un génome : construction et exploitation de carte de restriction.

Exercice 1

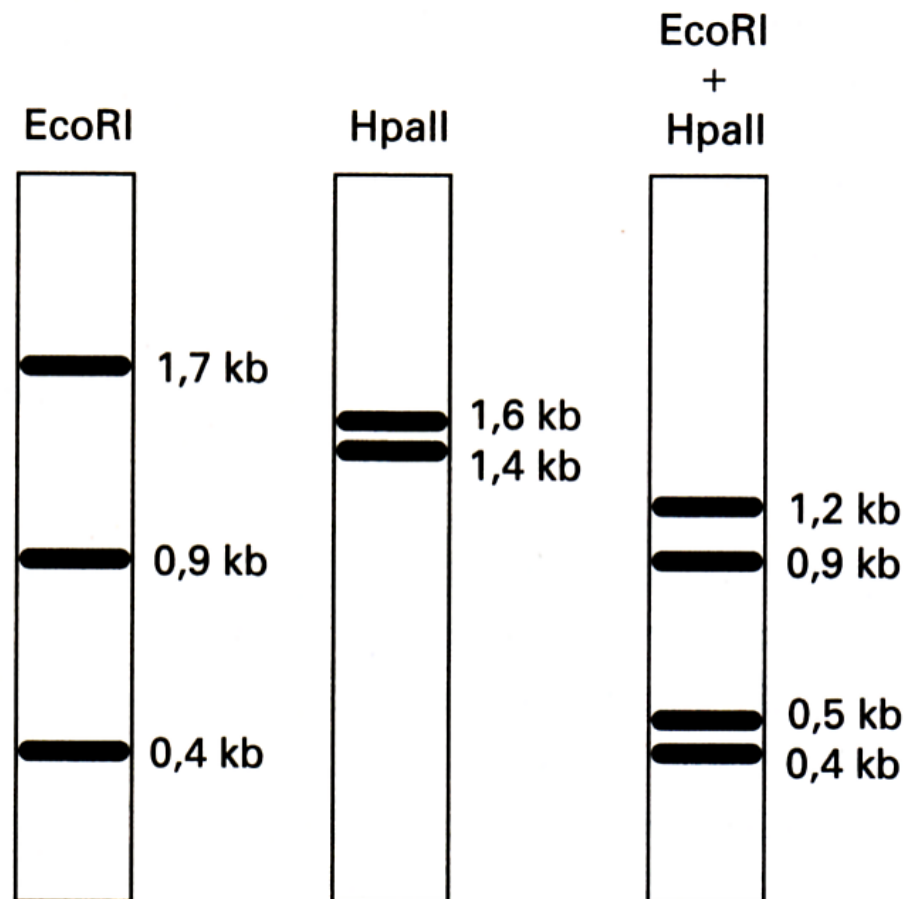




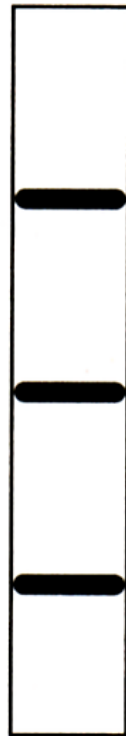
Exercice 2

Méthode :

- Représenter l'ADN par un trait linéaire ou circulaire (selon si l'ADN est linéaire ou circulaire).
- Pour chaque enzyme de restriction, identifier le nombre de sites de restriction d'après le nombre de fragments (attention, la relation entre nombres de sites et de fragments dépend du type d'ADN linéaire ou circulaire). Positionner les sites sur l'ADN schématisé lorsque c'est possible.
- Retrouver les fragments des simples digestions sur le profil de double digestion afin de situer les sites de restriction les uns par rapport aux autres.



EcoRI

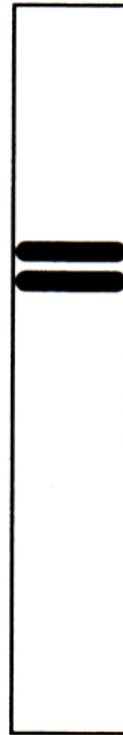


1,7 kb

0,9 kb

0,4 kb

HpaII



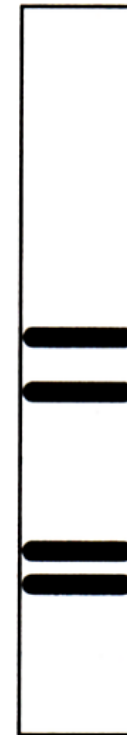
1,6 kb

1,4 kb

EcoRI

+

HpaII

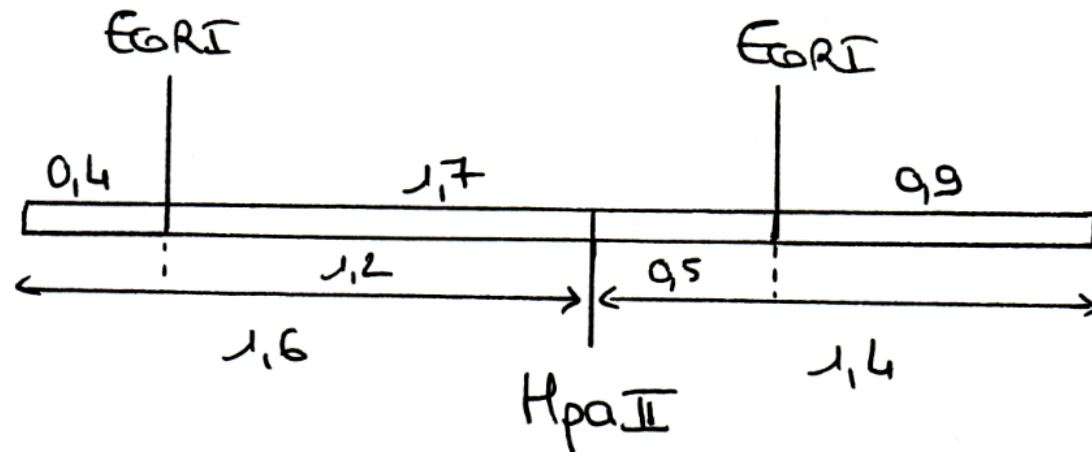


1,2 kb

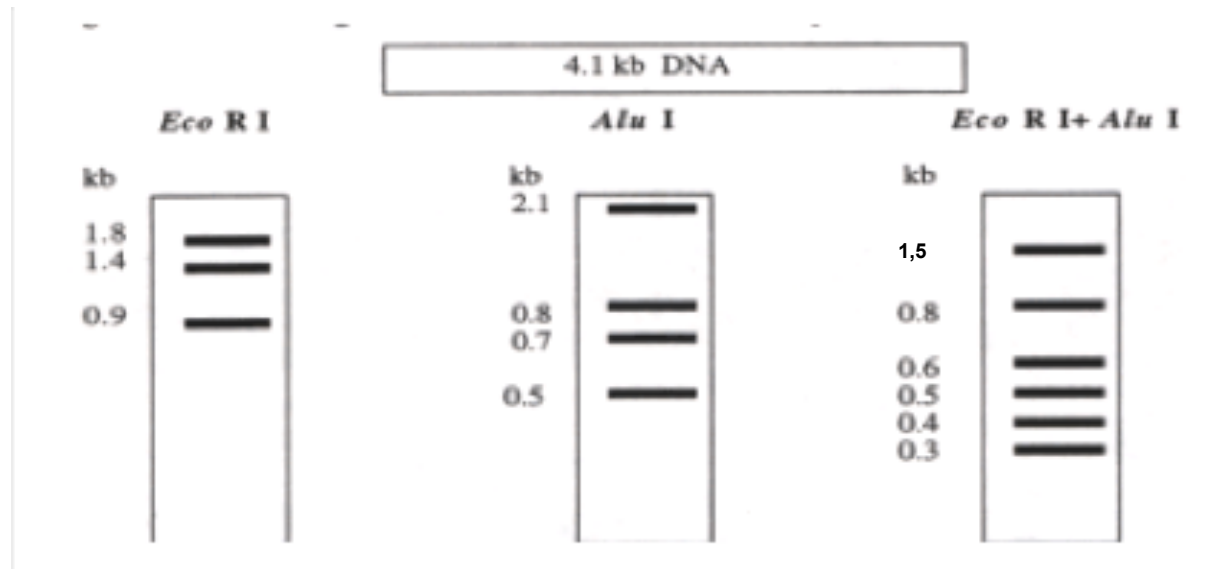
0,9 kb

0,5 kb

0,4 kb



Exercise 3



On vérifie d'abord que tous les fragments sont présents dans les profils observés.

$$\begin{aligned}
 \text{EcoRI} &= 1,8 + 1,4 + 0,9 = 4,1 \text{ kbp} \\
 \text{AluI} &= 2,1 + 0,8 + 0,7 + 0,5 = 4,1 \text{ kbp} \\
 \text{EcoRI+AluI} &= 1,5 + 0,8 + 0,6 + 0,5 + 0,4 + 0,3 = 4,1 \text{ kbp}
 \end{aligned}$$

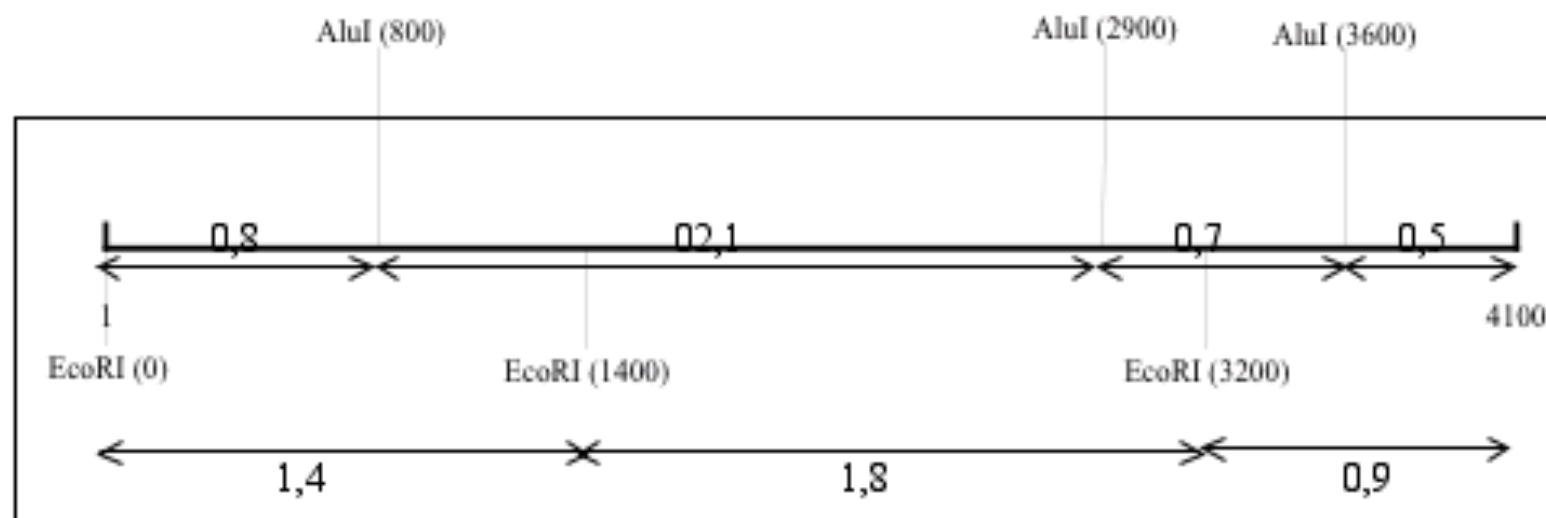
On recherche quels fragments de la double digestion doivent être voisins :

$$1,8 (\text{EcoRI}) = 1,5 + 0,3$$

$$2,1 (\text{AluI}) = 1,5 + 0,6$$

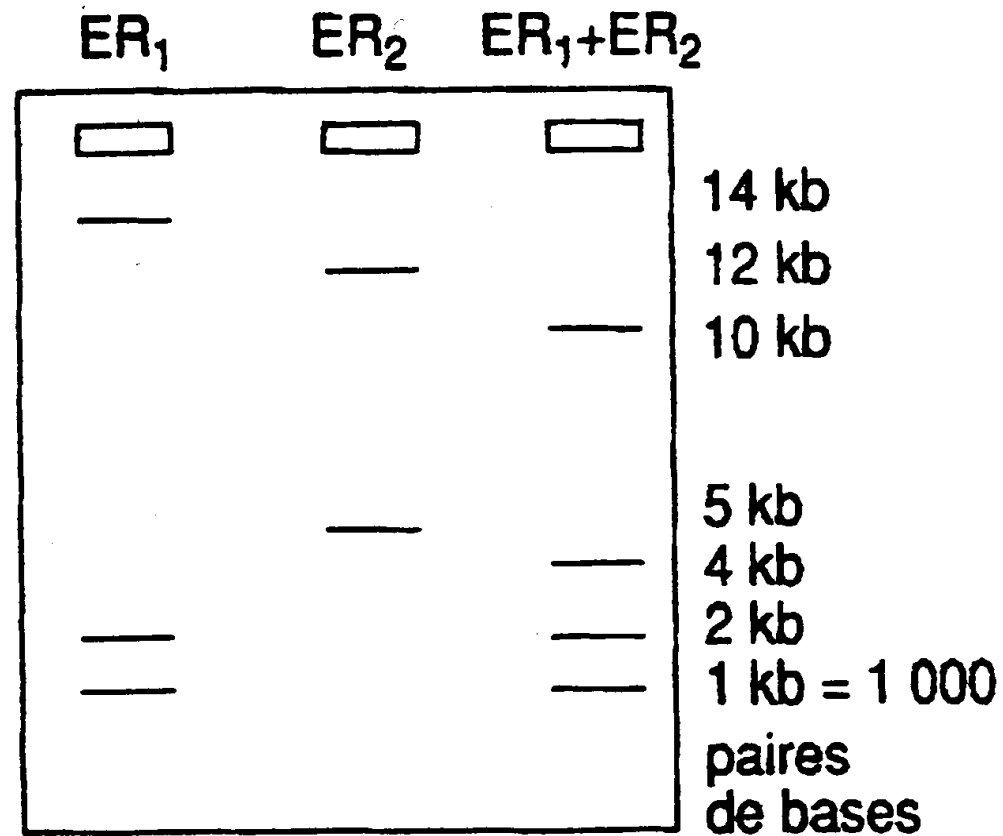
Donc le fragment de 1,5 kbp ayant d'un côté un site AluI et de l'autre un site EcoRI doit avoir du côté du site EcoRI, le fragment de 0,6 et de l'autre le fragment 0,3.

On obtient finalement la carte de restriction du fragment.

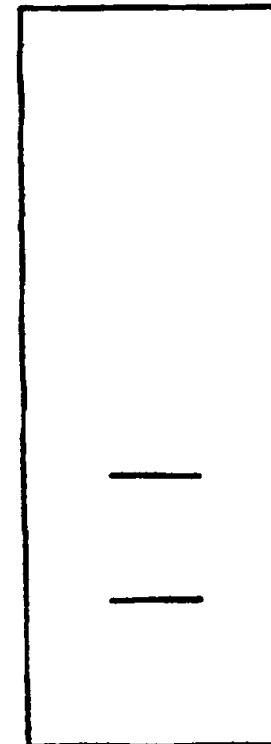


Exercice 4

Doc. 1 : Fragments
obtenus par action de :

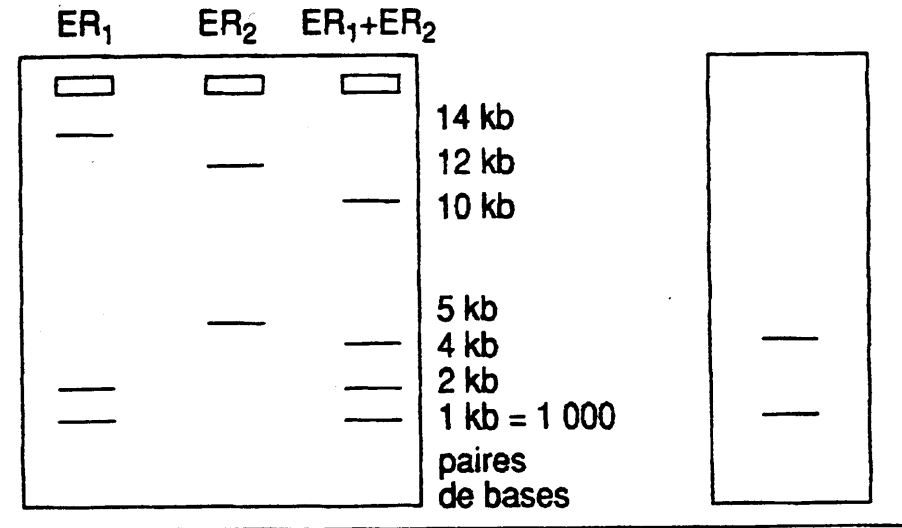


Doc. 2 : Autoradiographie

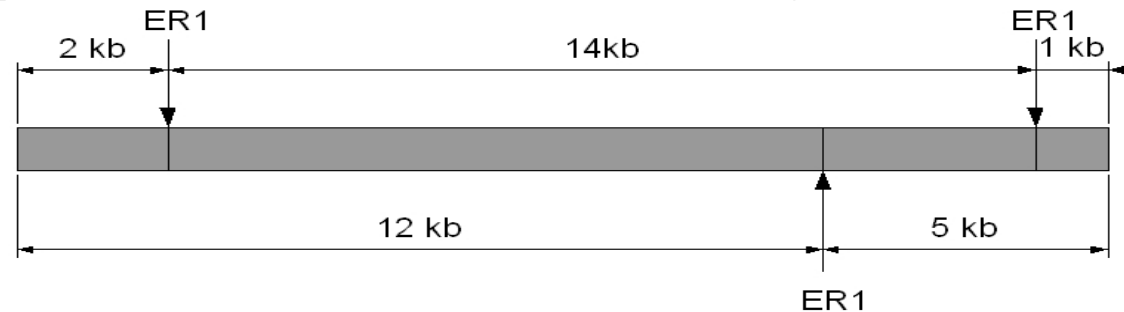


Doc. 1 : Fragments
obtenus par action de :

Doc. 2 : Autoradiographie



L'ADN est linéaire. Une coupure crée 2 fragments. L'action de ER1 crée 3 fragments → 2 sites de restriction. L'action de ER2 crée 2 fragments → 1 site de restriction. La sonde se fixe sur les fragments 4kb et 1kb. On peut donc supposer que la séquence recherchée est à cheval sur ces 2 fragments

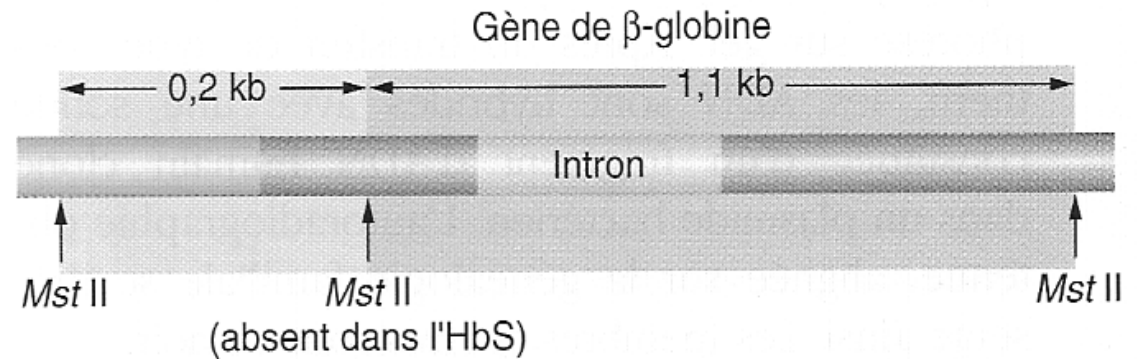


C) Comparaison de génomes par exploitation des RFLP

Exercice : détection de la drépanocytose

La drépanocytose résulte d'une mutation dans le gène de la β -globine qui conduit à la disparition d'un site d'une enzyme restriction (MstII).

Type d'Hb	Séquence d'acides aminés Séquence nucléotidique
A	—Pro—Glu—Glu— —CCT—GAG—GAG— Mst II
S	—Pro—Val—Glu— —CCT—GTG—GAG—



Pour vérifier la présence de la mutation dans des cellules, l'ADN est extrait, digéré par MstII et déposé sur gel d'électrophorèse. Le gel est transféré sur membrane et un Southern est réalisé.

Électrophorèse en gel



1,1 kb

Transfert
de type
Southern



0,2 kb

A

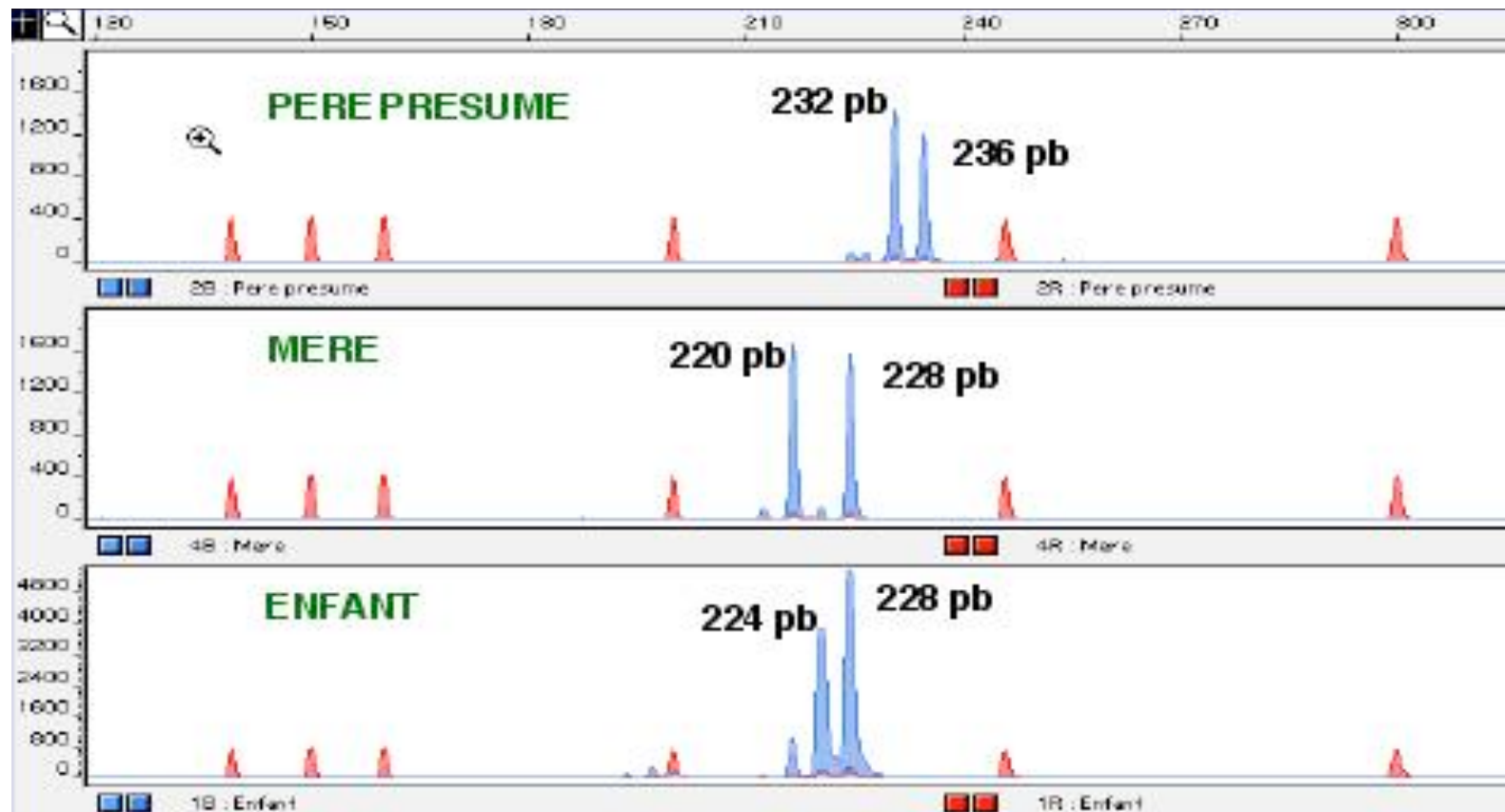
S



1,3 kb

ADNc de β -globine
marqué au ^{32}P

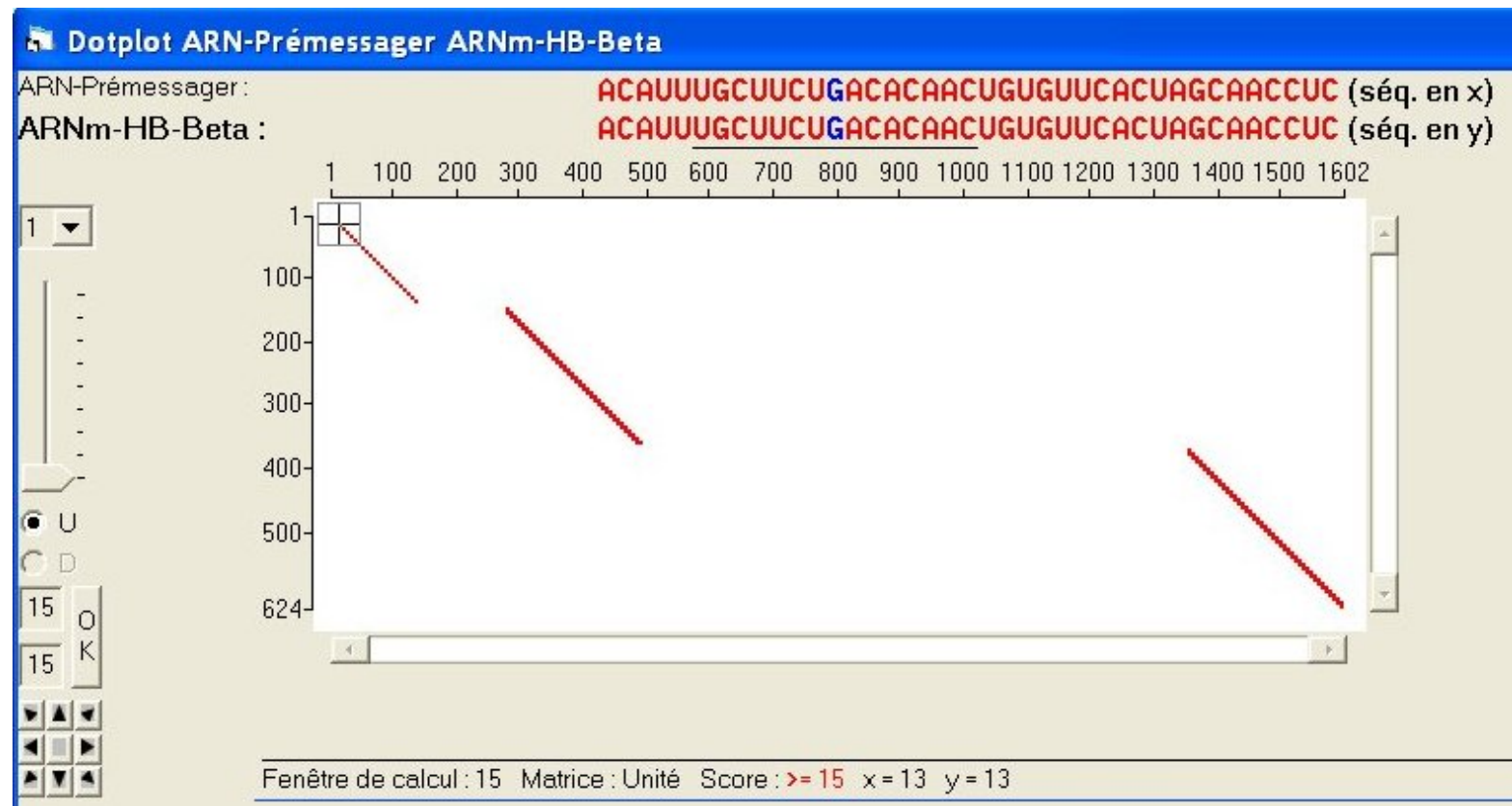
Test de paternité



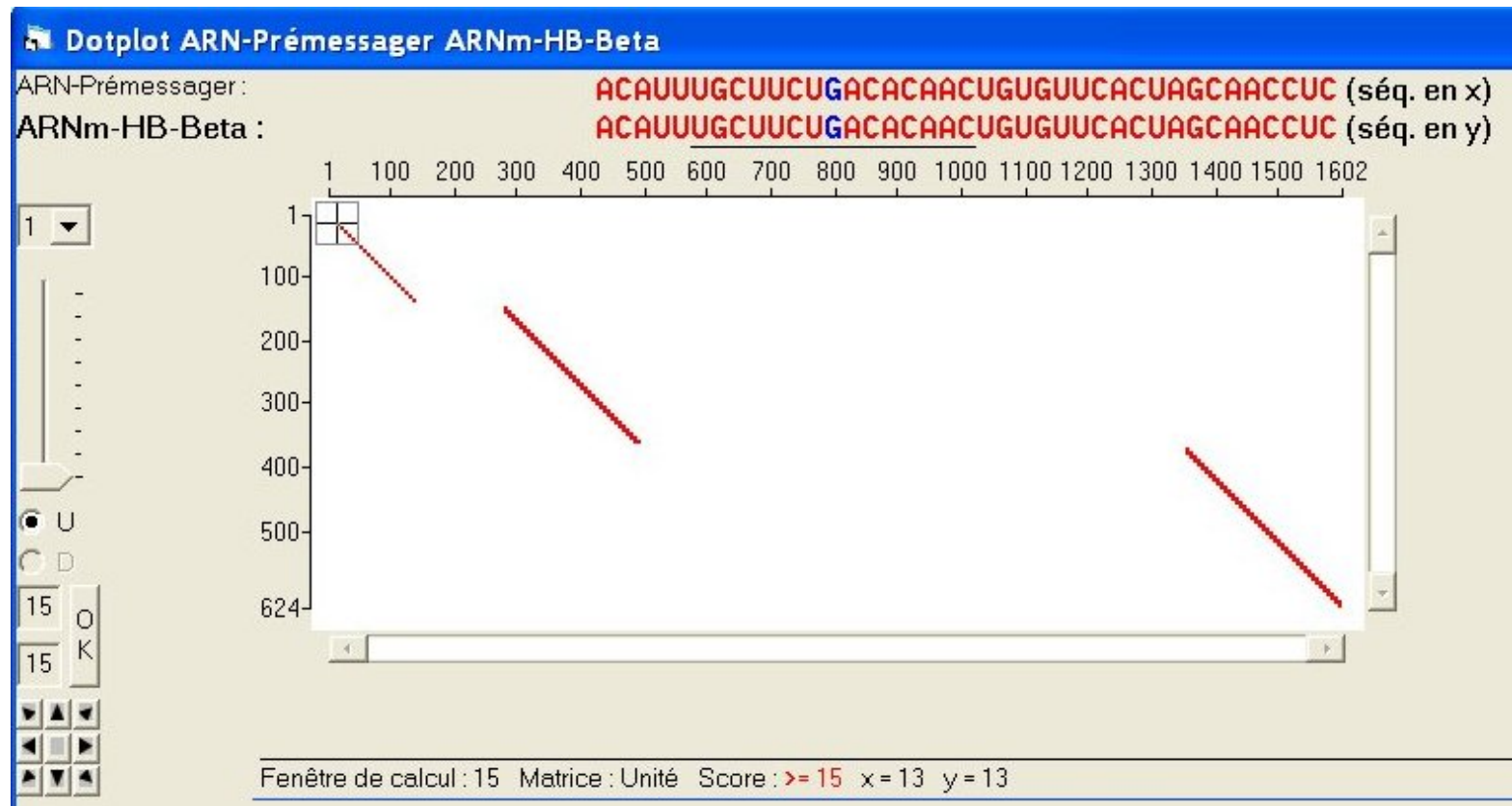
II. Etude de la structure et de la fonction des gènes par diverses techniques de biologie moléculaire.

A) Etude de la maturation des ARNm eucaryotes par Northern Blot.

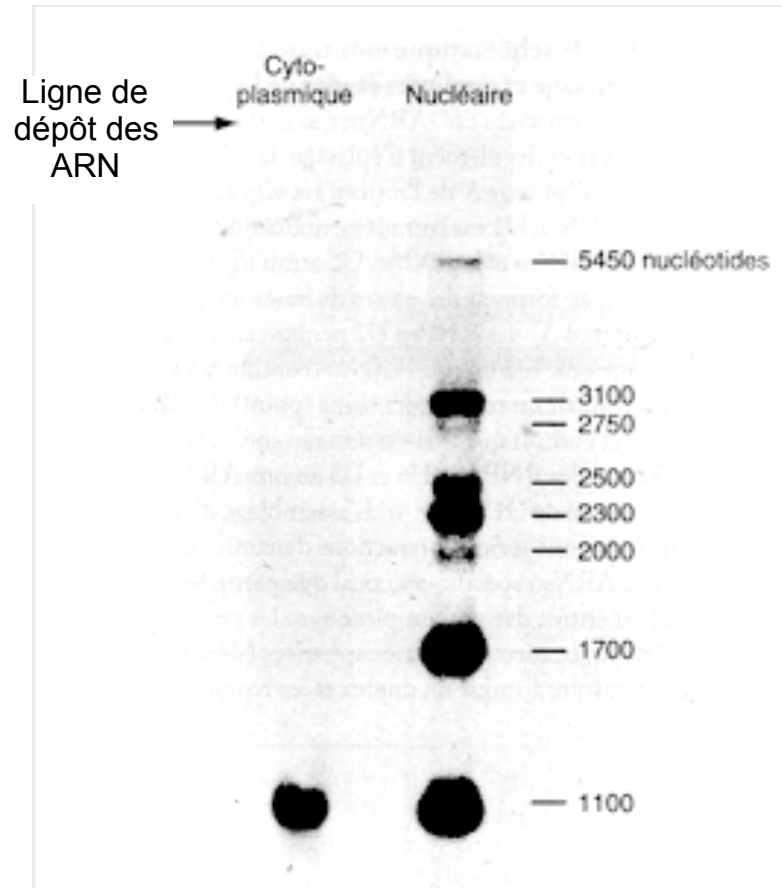
Doc.1 : alignement des séquences d'ARNprém et d'ARNm par Anagène. *Anagène, acces ENS Lyon*



Doc.1 : alignement des séquences d'ARNprém et d'ARNm par Anagène. *Anagène, acces ENS Lyon*



Doc : Northern Blot des ARN nucléaires et cytoplasmiques d'ovomucoïde



3. A quoi correspondent les bandes noires sur le cliché ?

4. Quelle est la taille de l'unité de transcription ?

Quelle est la taille de l'ARNm ?

Quelle longueur d'intron a donc été éliminée lors de l'excision-épissage ?

5. En déduire le pourcentage de séquence réellement exprimée.

6. Quelle précision sur le mécanisme d'excision-épissage vous apporte ce document ?

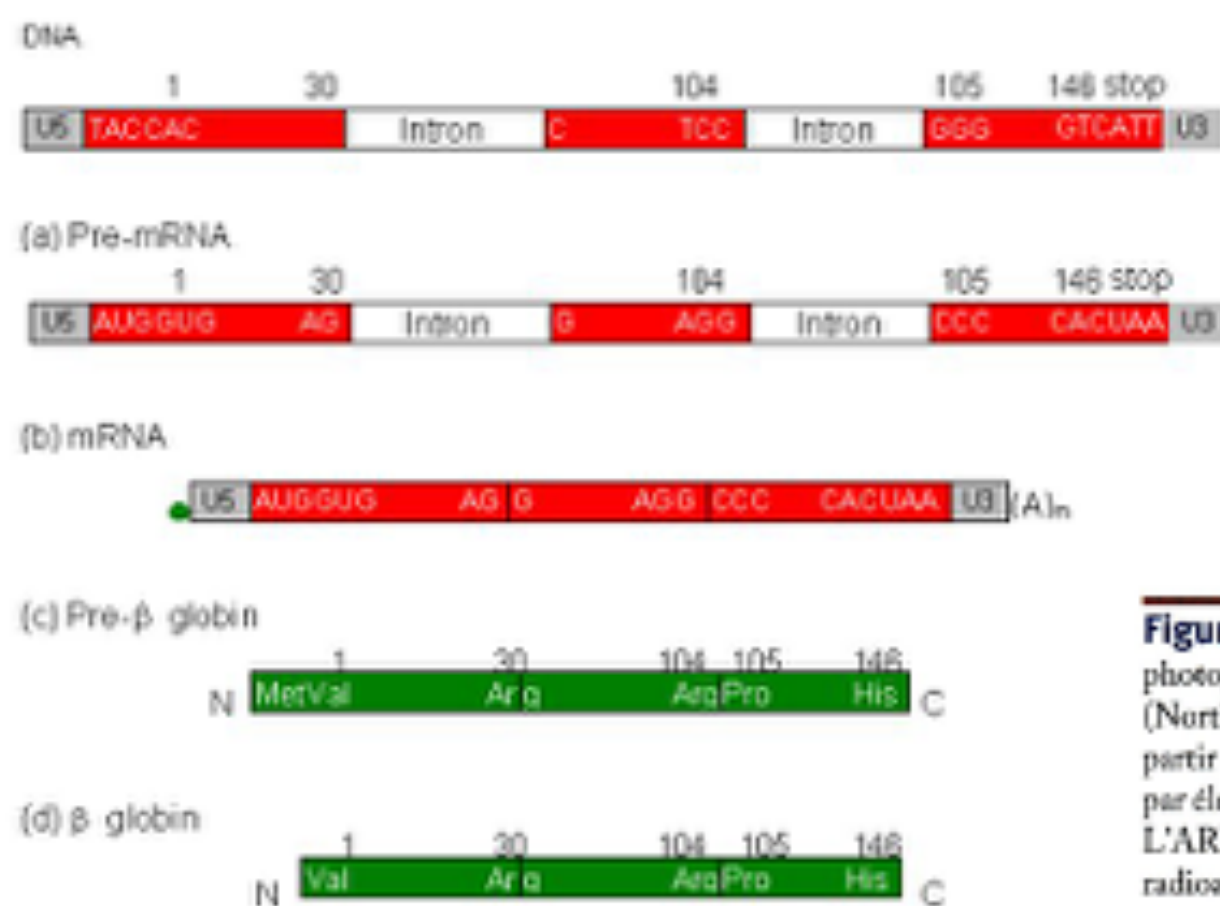
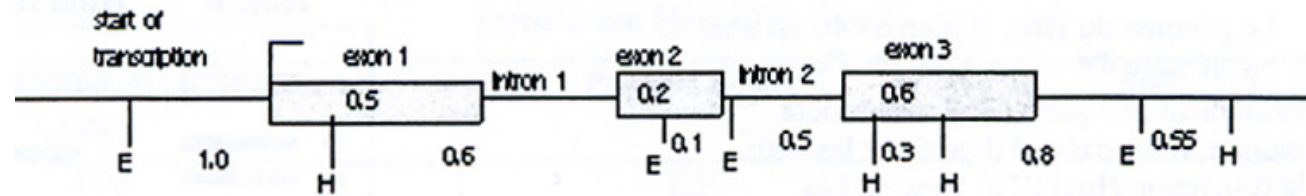


Figure 11.38 Maturation de l'ARNm d'ovomucoïde. La photographie illustre une technique, appelée transfert Northern (Northern blot), par laquelle l'ARN extrait (dans le cas présent à partir de noyaux de cellules de l'oviducte de poule) est fractionné par électrophorèse en gel et repris par capillarité sur un papier filtre. L'ARN immobilisé sur le filtre est ensuite incubé avec un ADNc radioactif (dans ce cas, un ADNc construit à partir de l'ARNm d'ovomucoïde) pour produire des bandes qui permettent d'identifier la position des ARN contenant la séquence complémentaire. L'ARNm mature codant la protéine ovomucoïde compte 1100 nucléotides et se trouve vers le bas. Il est évident que le noyau contient un certain nombre d'ARN plus grands qui renferment aussi la séquence d'ARNm d'ovomucoïde. Les plus grands ARN présents sur le filtre sont longs de 5.450 nucléotides, ce qui correspond à la taille de l'unité de transcription de l'ovomucoïde ; cet ARN serait le transcrit primaire dans lequel l'ARNm est finalement taillé. D'autres bandes importantes contiennent des ARN longs de 3.100 nucléotides (correspondant à un transcrit dépourvu des introns 5 et 6), 2.300 nucléotides (transcrit sans les introns 4, 5, 6 et 7) et 1.700 nucléotides (transcrit qui a perdu tous les introns, sauf le 3). (Dû à l'obligeance de Bert O'Malley.)

Voici la carte de restriction d'un gène autosomal de Drosophile.

ADN génomique



E = site de restriction par Eco RI

H = site de restriction par HindIII

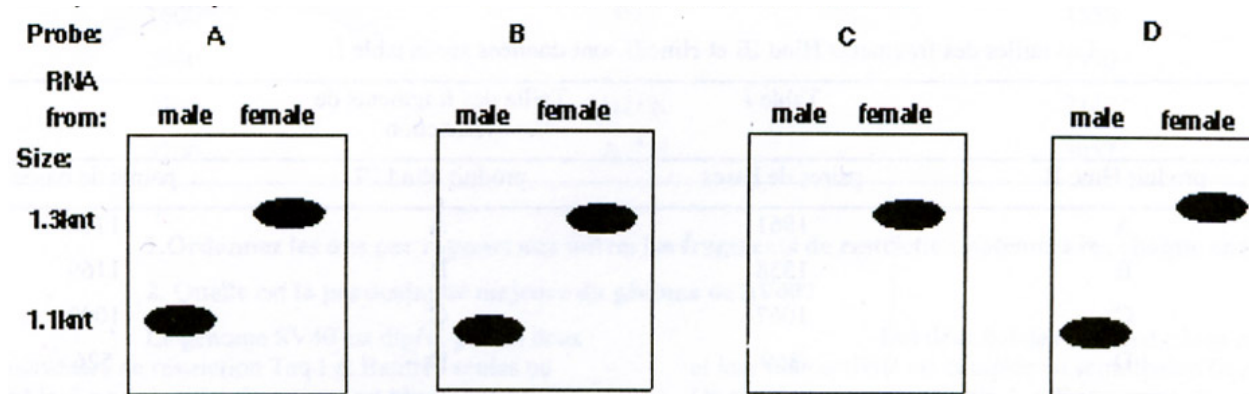
Tailles des fragments en kpb

Vous possédez le fragment complet de 3,85kpb EcoRI-HindIII du gène, à partir duquel vous fabriquez plusieurs sondes ADN complémentaires de l'ARN, par digestion aux enzymes de restriction (cf. tableau).

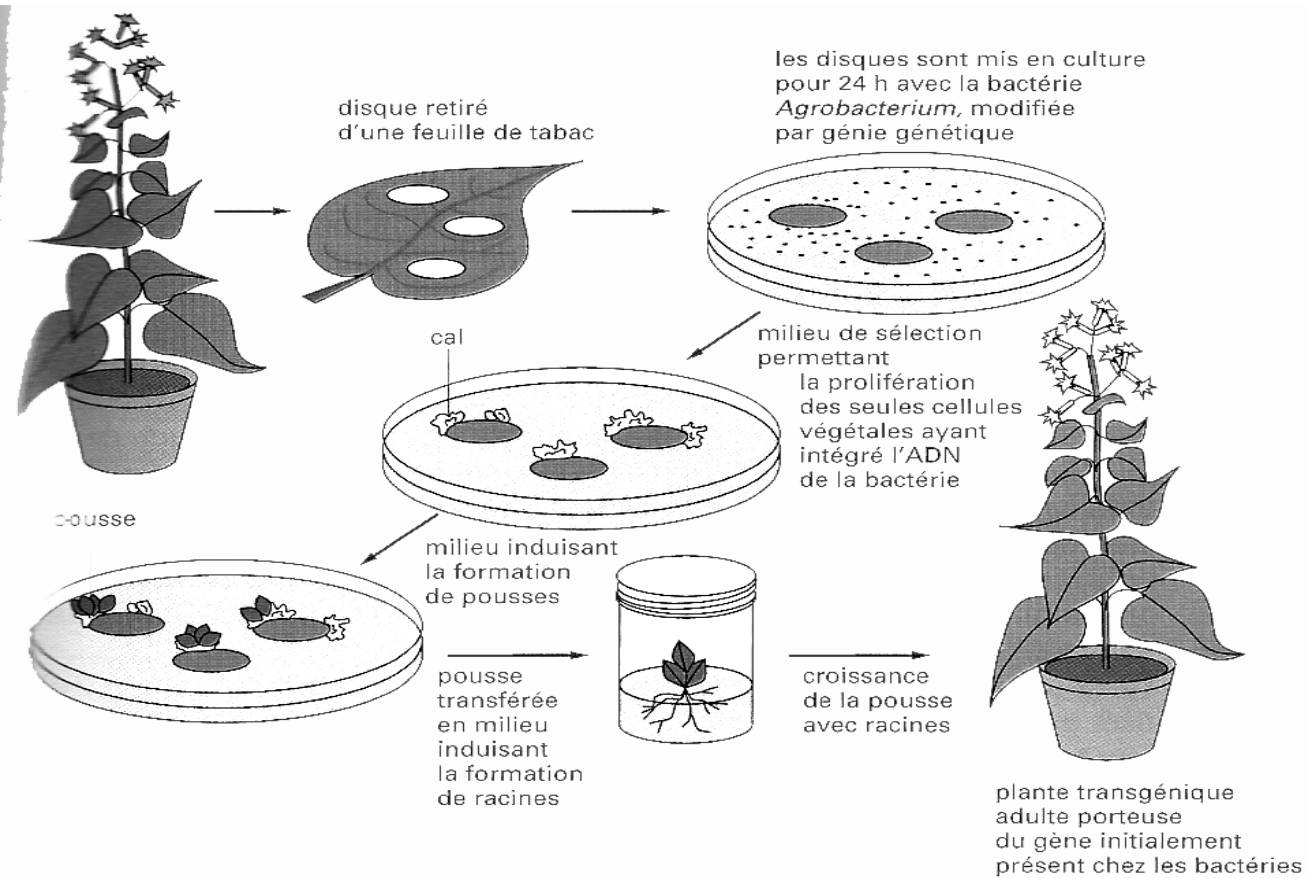
Sonde	Fragment de restriction
A	1,0kb EcoRI – HindIII
B	0,6kb HindIII – EcoRI
C	0,1kb EcoRI – EcoRI
D	0,5kb EcoRI – Hind III

Vous extrayez l'ARN de ce gène chez des mâles et des femelles

et faites quatre Northern blots, en hybridant chaque blot avec une sonde différente (*probe en anglais*). Vous obtenez le résultat suivant :



B) Transgénèse.



On peut produire des plantes transgéniques grâce à la technologie de l'ADN recombinant. On découpe un disque sur une feuille et on l'incube sur une culture d'*Agrobacterium*, dans laquelle les cellules bactériennes portent un plasmide recombinant qui présente à la fois un marqueur de sélection et un gène modifié. Les cellules endommagées, de la périphérie du disque libèrent une substance qui attire les bactéries et qui est responsable du fait qu'elles injectent leur ADN dans ces cellules végétales. Seules les cellules de la plante qui se sont approprié cet ADN et expriment le marqueur sélectif survivent et prolifèrent pour former un cal. En manipulant les facteurs de croissance apportés à ce cal en culture, on induit la formation de pousses puis de racines, pour arriver finalement à une plante transgénique adulte.

animaux transgéniques : exemple des saumons ayant un transgène codant pour une hormone de croissance (les 2 saumons ont le même âge)



Souris KO

