



Mini laboratoire
Digestion Enzymes de
restriction
Guide de l'élève

Cat# M6050TAE

Version 100223-FR



Table des matières

Sécurité en laboratoire	2
Introduction	3
Questions pré-laboratoires	5
Partie I : Electrophorèse	7
Partie II : Résultats	10
Activité d'analyse - Prédire la taille des fragments de restriction	11
Annexe A - Électrophorèse sur gel	15
Annexe B - Lectures recommandées	16

Sécurité au laboratoire

1. Porter des blouses, des gants et des lunettes de protection conformément au protocole du district.
2. Soyez prudent avec tous les équipements électriques tels que les machines PCR et les unités d'électrophorèse.
3. Chauffer et verser de l'agarose fondu présente un risque d'éclaboussures. Soyez prudent lorsque vous manipulez des liquides chauds. Porter des lunettes de protection et des gants pour éviter les brûlures.
4. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir manipulé du matériel biologique et des produits chimiques.

Introduction

Si vous aviez besoin d'un petit bout de ficelle mais que vous n'en aviez qu'un long, que feriez-vous ? Vous prendriez probablement une paire de ciseaux et la couperiez à la longueur voulue. De la même manière, les cellules disposent de mécanismes pour couper les longs brins d'acide nucléique en brins plus courts, une sorte de ciseaux moléculaires. Les cellules ont besoin de couper leur ADN ou leur ARN pour plusieurs raisons. Vous vous souvenez peut-être que lorsque l'ARNm est transcrit à l'origine, il comporte des régions appelées introns qui sont supprimées. Au cours de la méiose, lorsque les chromosomes homologues s'apparient, le processus de croisement ou de recombinaison nécessite de couper et d'échanger des morceaux d'ADN. Les cellules bactériennes peuvent reconnaître et détruire l'ADN étranger en le coupant en morceaux. C'est ce dernier exemple que vous découvrirez dans ce laboratoire.

Lorsque les bactériophages (virus) infectent les bactéries, ils insèrent un brin d'acide nucléique dans la bactérie. Lorsqu'il s'agit d'ADN, les bactéries possèdent des enzymes spéciales appelées enzymes de restriction qui peuvent protéger la cellule en coupant l'ADN viral et en le rendant inutile. Ces enzymes peuvent également être appelées endonucléases parce qu'elles coupent à l'intérieur d'un brin d'ADN ("endo"), qu'elles agissent sur l'acide nucléique ("nucle") et qu'elles sont des enzymes ("ases").

Chaque enzyme de restriction reconnaît un site spécifique ou une séquence de paires de bases, appelé site de restriction. C'est à cet endroit que l'enzyme va cliver l'ADN. Les sites de restriction ont généralement une longueur d'environ six paires de bases. Par exemple, l'enzyme de restriction EcoRI ne se lie qu'à GAATTC, tandis que l'enzyme de restriction EcoRV ne se lie qu'à GATATC. Une autre caractéristique des sites de restriction est que l'ADN double brin est palindromique. Vous savez probablement ce qu'est un palindrome - un mot qui se lit de la même façon en avant et en arrière, comme "La mariée ira mal". Rappelons que l'ADN est antiparallèle, c'est-à-dire qu'un brin va de 5' à 3' et l'autre de 3' à 5'. Pour qu'une séquence soit palindromique, les deux brins d'ADN doivent présenter la même séquence lorsqu'ils sont lus dans le sens 5' vers 3'. Par exemple, le site de restriction pour EcoRI est 5'-GAATTC-3', ce qui rend le brin complémentaire 3'-CTTAAG-5'. Lorsqu'il est inversé pour être lu de 5' à 3', le brin complémentaire se lit 5'-GAATTC-3', identique au site de restriction de l'EcoRI (figure 1).

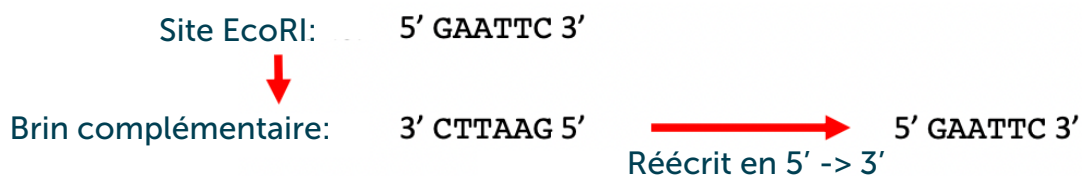


Figure 1. Site de restriction palindromique pour EcoRI.

Considérez ceci : Pourquoi pensez-vous que les sites de restriction sont palindromiques ? En quoi cela peut-il être bénéfique pour la cellule ?

Pour couper le squelette de l'ADN, une enzyme de restriction doit catalyser deux réactions : elle doit rompre une liaison phosphodiester sur un brin et rompre une liaison phosphodiester sur l'autre brin. Comme la séquence d'un site de restriction est palindromique, l'endroit où la liaison phosphodiester est coupée est le même pour les deux brins. Par conséquent, les enzymes de restriction peuvent produire l'une des trois extrémités de fragment - elles peuvent produire un surplomb de 3', un surplomb de 5' ou une extrémité émoussée (Figure 2). Les surplombs générés par les enzymes de restriction sont appelés "extrémités collantes" parce que les bases sont exposées et libres d'être appariées à des bases complémentaires (figure 2). Lorsqu'il n'y a pas de surplomb, on parle d'extrémité émoussée.

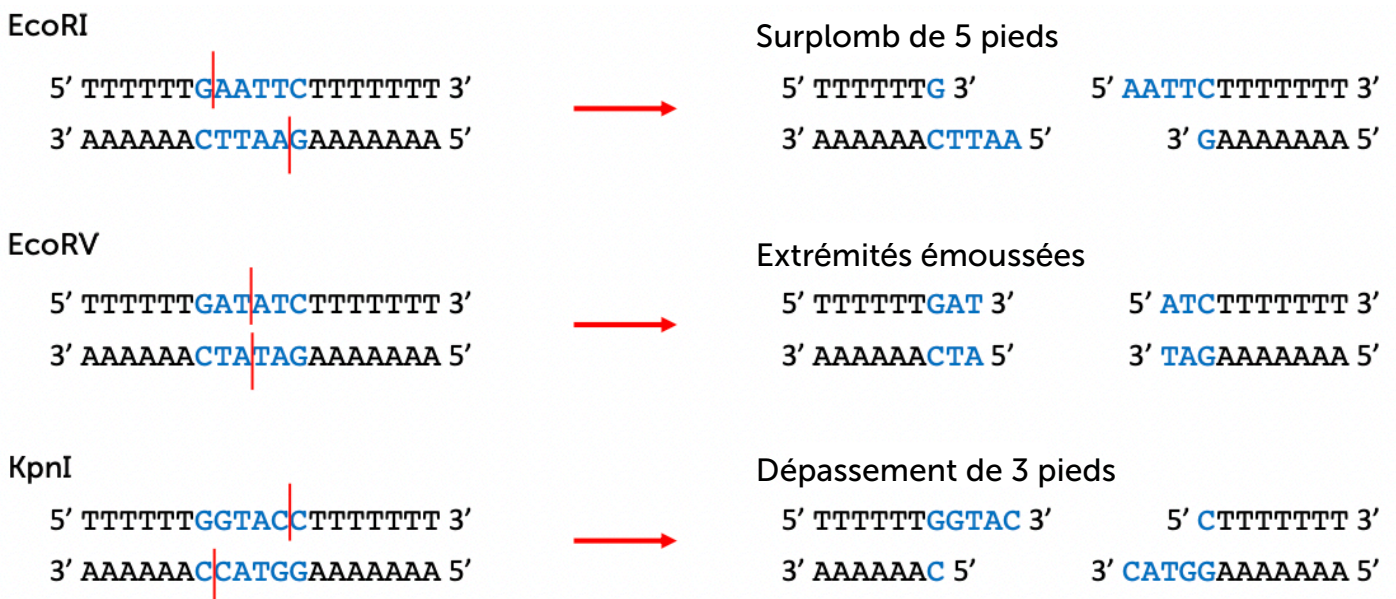


Figure 2. Le site de restriction d'EcoRI est GAATTC et il coupe juste après le G sur les deux brins (en rouge). Le fragment résultant a un surplomb de 4 bases en 5' qui sont libres de se combiner avec des bases complémentaires. Le site de restriction pour EcoRV est GATATC et il clive entre les TA des deux brins, ce qui entraîne une coupure transversale produisant des extrémités émoussées. Le site de restriction de KpnI est GGTAAC et il se clive entre les CC des deux brins, ce qui produit des extrémités 3' collantes.

La réaction de clivage de l'ADN à l'aide d'une enzyme de restriction est appelée "digestion de restriction", car l'enzyme de restriction divise l'ADN en parties plus petites. Étant donné que les enzymes de restriction ne reconnaissent et ne coupent que sur un site de restriction spécifique, une digestion de restriction produit des fragments d'ADN de longueur définie.

Considérez ceci : Comment les scientifiques peuvent-ils utiliser les enzymes de restriction comme outils de recherche génétique ?

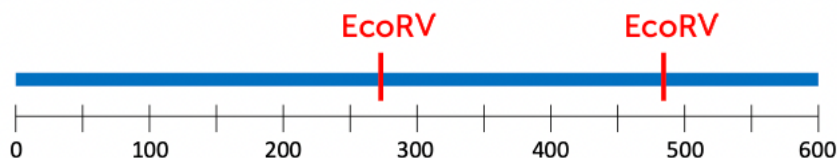
La découverte des enzymes de restriction a révolutionné la biologie moléculaire et la génétique. Comme les enzymes de restriction reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN et clivent le squelette de l'ADN, les scientifiques peuvent digérer l'ADN en fragments plus petits et discrets à

étudier. En outre, grâce à l'utilisation de l'ADN ligase, les scientifiques peuvent recombinaison l'ADN coupé pour continuer à étudier la fonction des sections de l'ADN. Cette capacité à digérer l'ADN en fragments distincts et à recombinaison éventuellement ces fragments dans des combinaisons uniques a ouvert la voie à de nouvelles expériences passionnantes qui permettent aux scientifiques d'en savoir plus sur un gène spécifique, de créer des profils ADN d'individus, de séquencer le génome humain et bien d'autres choses encore.

Dans ce laboratoire, vous analyserez des échantillons d'ADN qui ont été prédécoupés avec des enzymes de restriction. À partir de la séquence d'ADN et des séquences des sites de restriction, vous serez en mesure de prédire les résultats de ces trois réactions. Vous analyserez ensuite vos digestions de restriction sur un gel d'agarose afin de déterminer si votre prédiction était correcte.

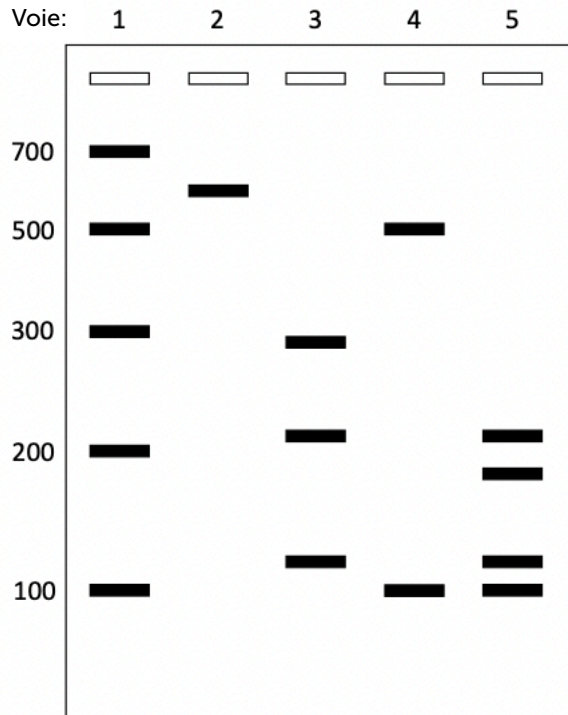
Questions pré-laboratoires

1. Quelles sont les deux fonctions des enzymes de restriction ?
2. Quelles sont les deux caractéristiques des sites de restriction ?
3. La carte ci-dessous est une carte d'un fragment d'ADN mettant en évidence l'emplacement de deux EcoRV des sites de restriction.

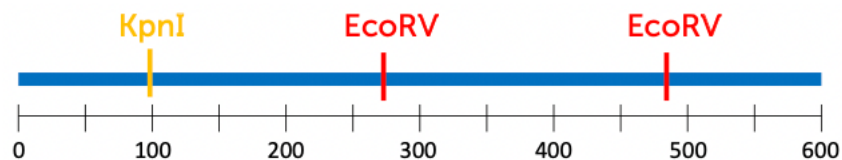


- a. Si ce fragment d'ADN est digéré avec EcoRV et que les produits de la digestion sont analysés par électrophorèse sur gel, quelle taille de bandes observez-vous ?

b. Vous mettez ensuite en place deux expériences : Dans l'expérience 1, le fragment d'ADN est digéré avec KpnI, et dans l'expérience 2, le fragment d'ADN est digéré avec EcoRV et KpnI. Vous passez les produits de la digestion sur un gel et observez le schéma de bandes suivant. À l'aide des informations contenues dans le gel, déterminez l'emplacement du (des) site(s) de restriction KpnI sur le fragment d'ADN original.



Voie	Echantillon
1	Échelle
2	Non digéré
3	Digestion EcoRV
4	Expérience 1
5	Expérience 2



c. Dans les données ci-dessus, pourquoi l'expérience 1 ne suffit-elle pas à identifier le(s) site(s) de restriction pour KpnI ?

Partie I: Electrophorèse

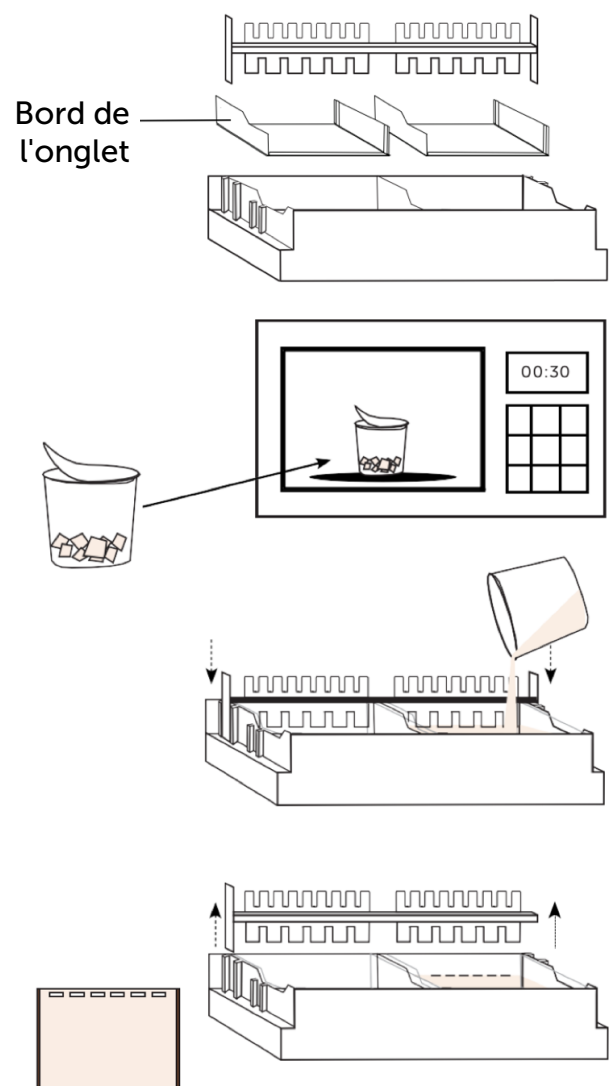
Materials

- 1 Système de coulage MiniOne
- 1 Système d'électrophorèse MiniOne
- 1 Coupelle agarose GreenGel™ (1.5%)
- 5 aliquotes d'échantillons d'ADN
- Le tampon de migration TAE (135 mL)
- 1 micropipette (2-20µL)
- 5 Embouts de micropipettes


Bien	Nom de l'échantillon	Volume de chargement
1	Marqueur d'ADN universel MiniOne®	10 µL
2	ADN non digéré	10 µL
3	ADN digéré avec EcoRV	10 µL
4	ADN digéré avec NcoI	10 µL
5	ADN digéré avec EcoRV et NcoI	10 µL
6	Vide	10 µL

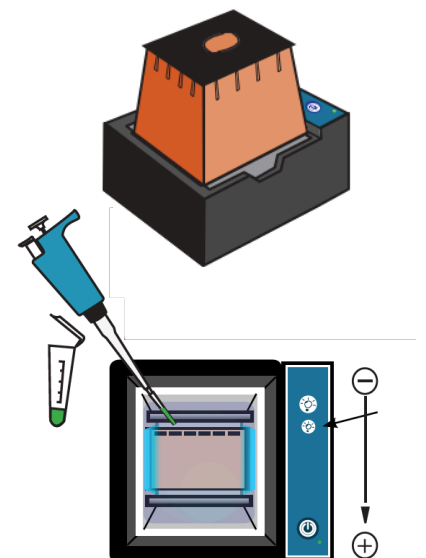
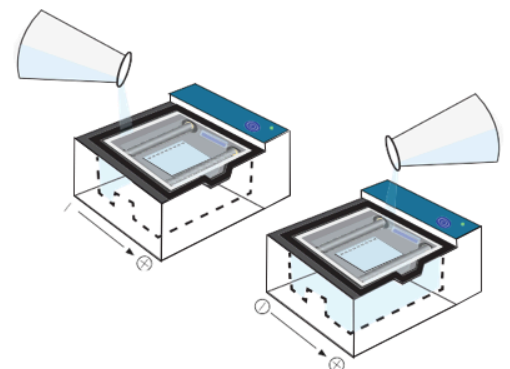
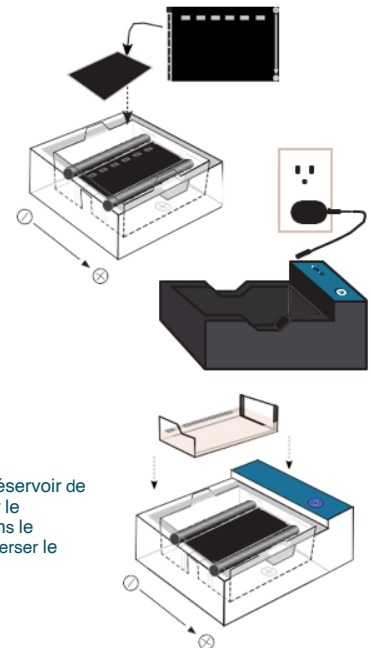
Coulage du gel

1. Placez le support de coulage de gel MiniOne® sur une surface plane et placez des plateaux de gel dans les deux cavités. Pour une orientation correcte du plateau, placez le bord de la languette du plateau sur le côté gauche. Insérez le peigne dans les fentes en haut du support de coulage avec le côté 6 puits vers le bas.
2. Décollez partiellement le film d'une coupelle avec le GelGreen™ et le mettre au micro-ondes pendant 20 secondes. Laissez refroidir pendant 15 secondes. **NE PAS mettre plus de 2 coupelles de gel au micro-ondes à la fois.**
3. **Exigence de sécurité** : La surveillance d'un adulte est requise si les élèves manipulent seuls des coupelles de gel!
4. **Une coupelle de gel sert à fabriquer un gel d'agarose** Versez lentement la solution d'agarose chaude dans un moule. Assurez-vous qu'il n'y a pas de bulles d'air dans la solution d'agarose. Laissez le gel d'agarose se solidifier pendant 10 minutes ou jusqu'à ce qu'il soit opaque. **NE PAS remuer le gel ou faire vibrer le support avant que le temps soit écoulé.**
5. Retirez soigneusement le peigne lorsque le gel est prêt. Retirez le plateau de gel avec le gel solidifié du support de coulage et essuyez tout excès d'agarose du fond du plateau.




Comment charger un gel

1. Assurez-vous que la plate-forme d'observation noire se trouve dans le réservoir de gel. Assurez-vous que les puits sont alignés avec les marques de la plate-forme sur l'extrémité négative.
2. Branchez l'alimentation électrique au secteur et insérez soigneusement l'autre extrémité à l'arrière du générateur MiniOne®.
3. Placez la cuve d'électrophorèse dans le générateur de manière à ce que les électrodes de carbone touchent les rivets dorés et que la cuve soit au niveau du chariot.
4. Placez le plateau avec le gel dans la cuve de gel.
5. Le réservoir de gel ne doit pas contenir de tampon lorsque vous placez le plateau de gel avec le gel dans celui-ci.
6. Allumez la LED bleue de faible intensité en appuyant sur le  bouton du générateur.
7. Mesurez 135 ml de tampon migration TAE et le verser dans un côté de la cuve. Regardez l'air sortir entre le plateau de gel et la plate-forme d'observation. Une fois que l'air a été retiré du dessous du plateau de gel, versez le tampon restant dans l'autre côté de la cuve.
8. Placez le filtre orange sur le générateur.
9. Appuyez sur le bouton marche qui devrait maintenant être un feu vert fixe. Si le voyant vert est allumé, éteignez l'appareil et passez au chargement des gels. Si le voyant vert **clignote**, consultez le guide de dépannage.
10. Assurez-vous que la lumière bleue de faible intensité est allumée. Déposez dans chaque puits les échantillons de volume appropriés à votre activité. Les MiniLabs sont conçus pour utiliser 10 μL par puits. N'oubliez pas de changer les embouts de pipette pour chaque échantillon. **Notez le nom de chaque échantillon correspondant aux puits adéquat pour faciliter l'analyse ultérieure**

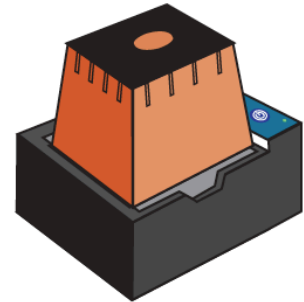


Migration et résultats


1. Une fois que le gel est chargé, ne le déplacez pas. Assurez-vous que l'alimentation électrique est branchée et placez le filtre orange sur le générateur. Allumez l'appareil en appuyant sur le  bouton.

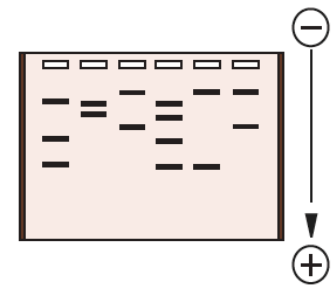
Le voyant vert à côté du bouton s'allume.

- Le voyant vert ne s'allume pas si :
- La cuve n'est pas correctement placée à l'intérieur du générateur.
- Il n'y a pas de tampon dans la cuve.
- Le tampon est trop dilué.
- Le filtre orange n'est pas sur le générateur. Il y a trop peu de tampon de migration.
- L'alimentation électrique n'est pas branchée. Vérifiez en allumant les LED bleues.



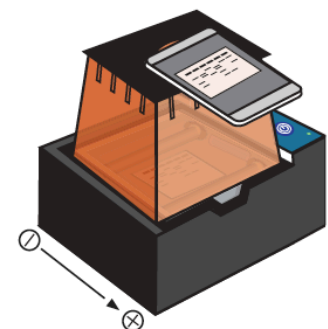
2. Demandez aux élèves de vérifier périodiquement la migration des bandes (toutes les cinq minutes).

3. Laissez le gel migrer pendant **25-30 minutes** ou jusqu'à ce que la séparation de l'ADN soit suffisante. N'oubliez pas que les petits échantillons d'ADN migrent plus vite, il est donc important de vérifier périodiquement où se trouvent vos bandes. Une fois votre analyse terminée, coupez l'alimentation en appuyant sur le  bouton. Utilisez la basse intensité pour le visionnage pendant la migration. La lumière affaiblit le signal fluorescent de l'ADN.



4. **Archivez vos résultats.**

Si nécessaire, **essuyez la condensation à l'intérieur du filtre orange avec un chiffon doux**, puis remettez la filtre orange sur le générateur. Allumez la lumière à haute intensité. Placez votre téléphone portable ou votre appareil photo directement sur le filtre orange pour prendre une photo de la migration de l'ADN. Ne pas zoomer, ni de flash car les photos seraient alors floues. (Le filtre orange photo est déjà à la distance focale optimale pour un smart phone.)



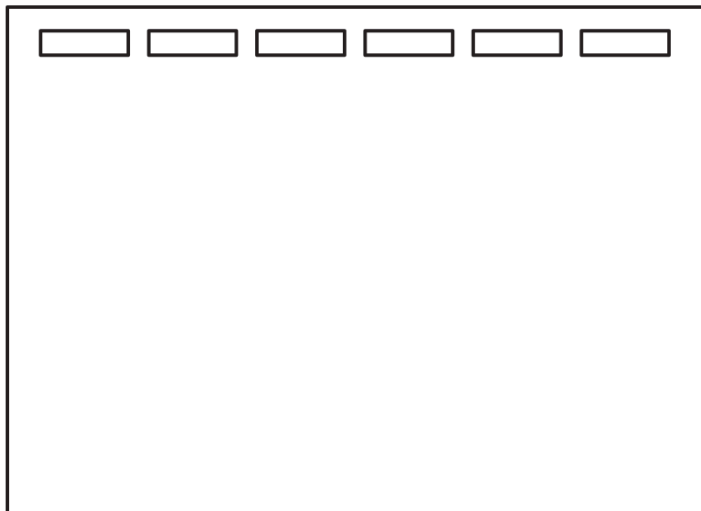
Nettoyage

Note d'instruction : Tous les réactifs de ce laboratoire peuvent être éliminés comme des déchets non dangereux.

1. Après avoir recueilli les données et documenté les résultats, retirez la hotte photo et débranchez l'alimentation électrique de la prise et de l'arrière du chariot MiniOne®. Retirez le réservoir transparent du chariot et retirez le gel et le plateau du réservoir.
2. Versez le tampon utilisé dans l'évier ou dans un bûcher à déchets. Jetez le gel. Rincez le réservoir en plastique transparent, le plateau à gel, le peigne et le système de coulage avec de l'eau déminéralisée ou distillée. Laissez les cuves sécher à l'air libre avant de les ranger.
3. Utilisez une serviette en papier ou un kimwipe pour essuyer délicatement les rivets dorés du chariot (où les électrodes sont connectées) afin de vous assurer que toute l'humidité a été éliminée. Essuyez tout tampon qui aurait pu se répandre dans le chariot noir. Suivez toutes les instructions supplémentaires données par l'instructeur pour le nettoyage et le stockage.

Partie II: Résultats

A quoi ressemble votre gel ? Enregistrez des images du gel.



Voie 1: _____

Voie 2: _____

Voie 3: _____

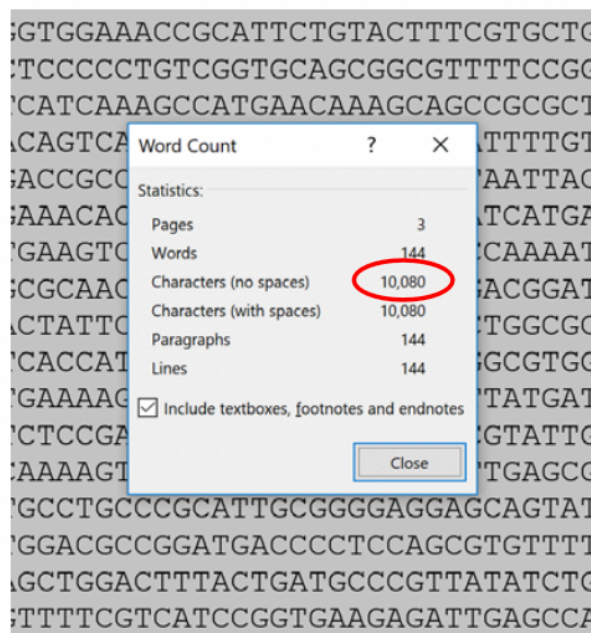
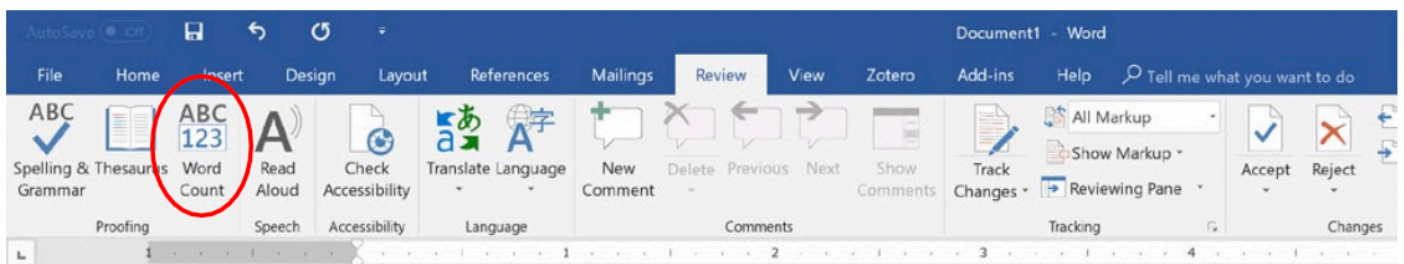
Voie 4: _____

Voie 5: _____

Voie 6: _____

Activité d'analyse - Prédire la taille des fragments de restriction

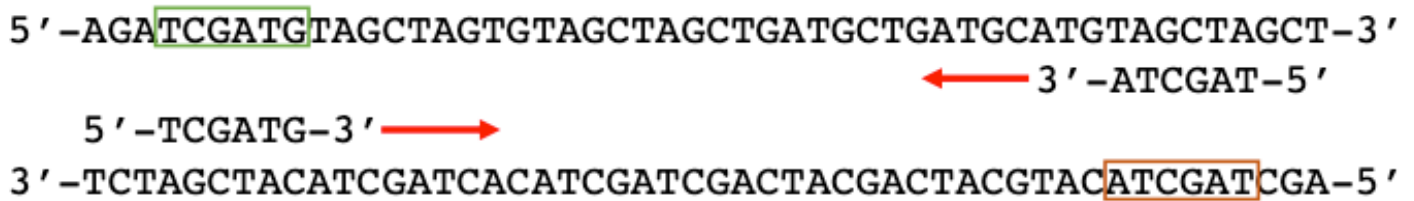
1. Ouvrez le document d'accompagnement "Séquence d'ADN plasmidique". Il s'agit de la séquence complète d'un brin d'un plasmide contenant la séquence d'ADN d'intérêt dans le sens 5'->3'. Copiez et collez cette séquence dans un document Word. Google Docs et d'autres logiciels de traitement de texte fonctionnent tout aussi bien, mais les captures d'écran ci-dessous supposent que vous utilisez MS Word.
2. Sous l'onglet **Révision**, cliquez sur le bouton "**Nombre de mots**" pour connaître le nombre de caractères du document. Il s'agit du nombre de paires de bases dans le plasmide.



3. Ensuite, vous trouverez la longueur du fragment d'ADN fourni avec ce laboratoire, qui a été coupé avec les enzymes de restriction EcoRV et NcoI, ainsi que son emplacement dans le plasmide. Ce fragment d'ADN a été amplifié par PCR à partir du plasmide ci-dessus en utilisant les amorces avant et arrière suivantes.

Amorce avant	Amorce inverse
5'- GCATTGTTTGGTAGGTGAGAG-3'	5'- CAGCTATGACCATGATTACGC-3'

4. Nous ne vous avons donné que la séquence d'un brin d'ADN du plasmide. Rappelons que les amorces se lient aux séquences complémentaires des deux brins et s'orientent dans des directions opposées :



5. La séquence de l'amorce directe se trouve dans le brin que nous vous avons donné. Utilisez la fonction **Rechercher** de word pour localiser le site de liaison de l'amorce directe en tapant **Ctrl+F** sur votre clavier. Saisissez la séquence de l'amorce (uniquement les nucléotides) dans la boîte de dialogue et cliquez sur "Rechercher". La correspondance avec la séquence de l'amorce dans le document doit être mise en évidence. Marquez cet emplacement en soulignant la séquence en surbrillance.
6. Nous allons maintenant trouver le site de liaison pour l'amorce inverse. C'est un peu plus délicat. La séquence de l'amorce inverse se trouve dans le brin complémentaire du génome que nous ne vous avons pas donné. Par conséquent, vous devrez rechercher le complément inverse de la séquence de l'amorce inverse. Utilisez l'espace situé sous la séquence d'amorce inverse ci-dessus pour écrire son complément inverse.
7. Utilisez la fonction **"Find"** dans Word pour trouver cette séquence dans le génome. Marquez cet emplacement en soulignant la séquence en surbrillance.
8. La région située entre les sites de liaison des amorces (y compris les amorces elles-mêmes) est la région qui est amplifiée par PCR pour créer le fragment que nous coupons avec les enzymes de restriction. Mettez cette séquence entière en surbrillance et utilisez la fonction **Word Count** comme ci-dessus pour trouver le nombre de caractères dans cette séquence. Notez la longueur du fragment PCR ci-dessous.
9. Copiez et collez cette séquence dans un nouveau document, car nous ne chercherons que des sites de restriction dans cette région.
10. Les séquences de reconnaissance (sites de restriction) des enzymes de restriction que nous avons utilisées pour couper le fragment sont énumérées ci-dessous.

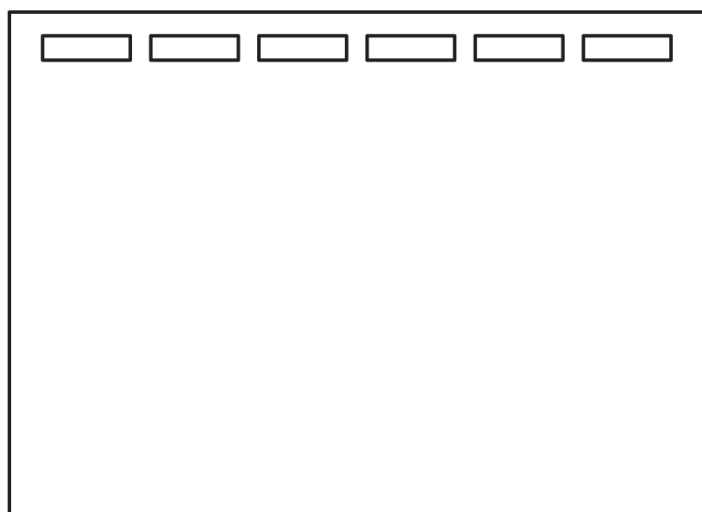
EcoRV	NcoI
GAT ATC	C CATG G
CTA TAG	G GTAC C

11. Utilisez à nouveau la fonction "Find" pour trouver l'emplacement de toutes les séquences de reconnaissance EcoRV dans la région. Marquez la séquence de reconnaissance en surlignant ou en changeant la couleur du texte.
12. Utilisez le tableau 2 ci-dessous pour noter le nombre de fragments et leurs tailles attendues produits par la coupe avec EcoRV.
13. Répétez les étapes 11 et 12 pour NcoI et utilisez une couleur distincte pour marquer le texte.
14. Maintenant que les sites de restriction des deux enzymes sont marqués sur votre séquence, déterminez la taille des fragments auxquels vous vous attendez pour la double digestion et inscrivez-les dans le tableau 2.

Tableau 2 : Enregistrer les échantillons chargés dans chaque puits.

Enzyme de restriction	# Nombre de fragments	Taille des fragments
EcoRV		
NcoI		
EcoRV + NcoI		

15. Utilisez le modèle ci-dessous pour esquisser les résultats attendus pour les digestions simples et les digestions doubles. Incluez également des voies sur votre gel pour le fragment non digéré et le marqueur universel d'ADN MiniOne® (200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 6000 et 10000 pb).



Voie 1: _____
Voie 2: _____
Voie 3: _____
Voie 4: _____
Voie 5: _____
Voie 6: _____

16. Comparez la taille des fragments que vous avez calculée aux résultats expérimentaux de votre digestion de restriction. Votre prédiction était-elle correcte ? Si vous n'avez pas encore analysé votre gel, conservez les informations ci-dessus pour les comparer aux résultats de votre analyse de gel.
17. Enregistrez le document Word avec le fragment que vous avez marqué sous un nouveau nom sur votre ordinateur.
18. **Question défi** : Si vous aviez découvert une nouvelle enzyme de restriction, décrivez les étapes que vous suivriez pour déterminer la séquence de son site de restriction.

Annexe A - Qu'est-ce que l'électrophorèse sur gel ?

L'électrophorèse sur gel est une technique utilisée dans de nombreux domaines scientifiques pour analyser les composants de mélanges chimiques complexes. Les mélanges d'ADN, d'ARN, de protéines ou de colorants peuvent être séparés en leurs composants individuels sur la base de la taille moléculaire et de la charge électrique en utilisant une matrice de séparation dans un champ électrique.

Le gel utilisé dans l'électrophorèse sur gel est un enchevêtrement de polymères formant une matrice tridimensionnelle avec des pores remplis d'eau à travers lesquels les molécules migrent. Une densité plus élevée de polymères crée des pores plus petits. Comme les trous d'un tamis ou d'une passoire, la taille des pores doit être adaptée à la taille des molécules à séparer. Les gels peuvent être fabriqués à partir de différentes substances selon l'application. L'un des matériaux les plus couramment utilisés et les plus efficaces est l'agarose, un polymère extrait d'algues marines. Les gels d'agarose sont formés (ou coulés) en versant de l'agarose fondu dans un plateau où il se solidifie en refroidissant pour prendre la forme souhaitée. Un peigne est placé pendant que l'agarose est fondu, puis retiré après sa solidification pour créer des puits où les échantillons sont chargés.

Après solidification du gel, celui-ci est placé dans un tampon électriquement conducteur entre des électrodes parallèles positives ((+) anode) et négatives ((-) cathode) Une tension est appliquée entre les électrodes, ce qui crée un champ électrique uniforme dans le gel. Les molécules dans les puits commencent à se déplacer sous l'influence du champ électrique : les molécules chargées positivement migrent vers la cathode (-) et les molécules chargées négativement migrent vers l'anode (+).

La vitesse de déplacement d'une molécule dans un champ électrique est déterminée par la force de sa charge électrique par rapport à son poids moléculaire. Cette force est quantifiée comme le rapport entre la charge et la masse. La vitesse de mouvement à l'intérieur d'un gel est également influencée par la taille de la molécule par rapport aux pores du gel. Les polymères dans le gel sont comme une course d'obstacles : les petites molécules se déplacent facilement à travers les pores, voyageant plus vite et plus loin que les grosses molécules volumineuses. Cependant, une grosse molécule peut se déplacer plus rapidement dans un gel qu'une petite molécule lorsque la force de sa charge par rapport à sa masse est nettement plus élevée. La forme peut également affecter la façon dont une molécule se déplace à travers le gel. Les longues molécules de type spaghetti se déplacent plus lentement que les molécules compactes, qui se glissent facilement à travers les pores. Les molécules de même taille, de même forme et de même charge se déplacent ensemble et forment une bande distincte. Si plusieurs types ou tailles de molécules sont présents dans l'échantillon, ils se sépareront les uns des autres et chacun d'eux formera une bande distincte.

Annexe B - Lectures recommandées

Scitable by Nature Education : Lecture de fond sur les enzymes de restriction : <https://www.nature.com/scitable/topicpage/restriction-enzymes-545>

Explication des séquences de restriction palindromiques, extrait de Science Primer : <http://scienceprimer.com/palindromic-sequences>

Animation 3D d'une enzyme de restriction liant et coupant l'ADN du DNA Learning Center :
<https://www.dnalc.org/view/15488-Restriction-digest-3D-animation-with-no-audio.html>

Chargement d'échantillons pour l'électrophorèse de l'ADN : Vidéo du Kirkwood Community College montrant la bonne technique et quelques erreurs courantes : <https://www.youtube.com/watch?v=tTj8p05jAFM>



 theminione.eu

 +32 475 36 68 34

 info@theminione.eu

FastTaq, GreenGel et PrepOne sont des marques commerciales d'Embi Tec. GelGreen est une marque de commerce de Biotium. MiniOne est une marque déposée de C.C. IMEX.

Brevets délivrés : US 10 641 731 B2, US 20110253541 A1.