

Outils et Méthodes en Biologie Moléculaire

1.0

Janvier 2024



Dr Abid Farah

Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale :
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/1.0/fr/>

Table des matières

Objectifs	3
Introduction	4
I - Généralités	5
II - Extraction de l'ADN plasmidique	6
1. Objectifs	6
2. Exercice	6
3. Matériels et réactifs.....	6
3.1. Méthodes.....	7
4. Exercice	7
5. Exercice	7
6. Exercice	8
7. Exercice	8
Conclusion	9



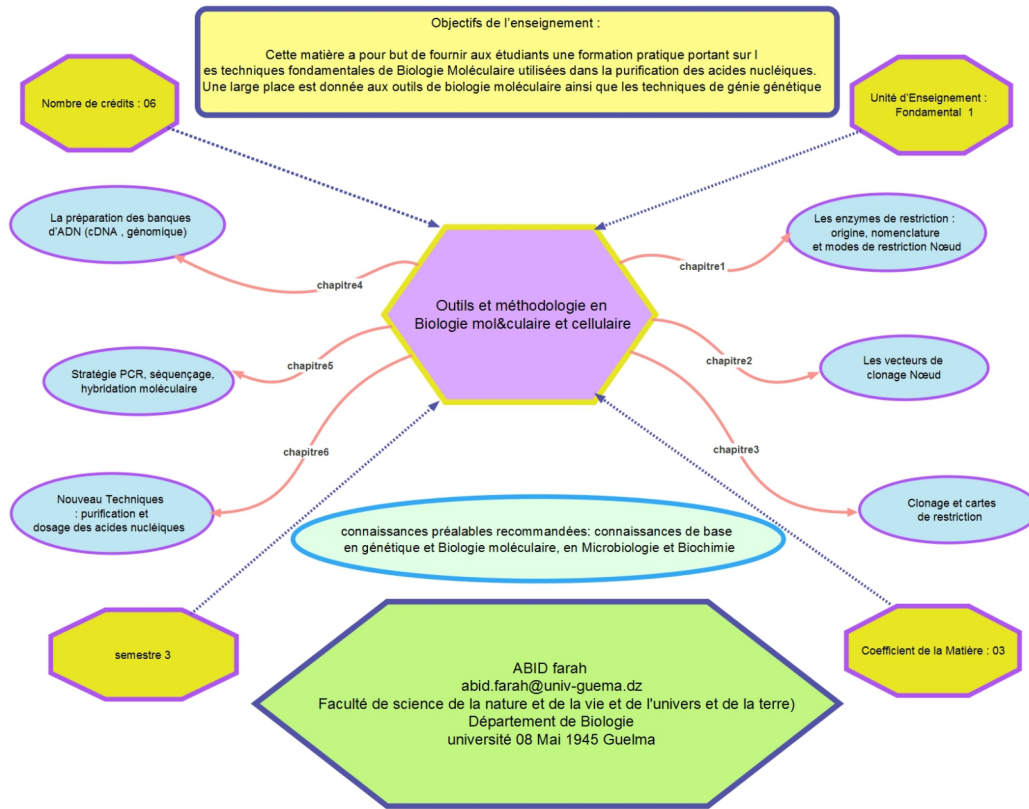
Objectifs

L'objectif de l'extraction est donc d'isoler la molécule d'ADN, c'est-à-dire la séparer de tout les autres constituants d'un tissu, y compris les molécules fortement liées à l'ADN, et d'en obtenir un échantillon suffisamment pur et en quantité suffisante pour permettre toutes les manipulations de biologie moléculaire

Ces travaux pratiques dirigent l'apprentissage des différentes techniques de manipulations des acides nucléiques en biologie moléculaire telles que la préparation des solutions nécessaires à l'extraction de l'ADN plasmidique et détermination du rôle de chacune dans les étapes de l'extraction ainsi que la maîtrise de son protocole in vitro.

Introduction

La biologie moléculaire est une discipline scientifique de la vie au croisement de la génétique, de la biochimie métabolique et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire. [20][20]



Carte conceptuelle du module

I Généralités

La biologie moléculaire (parfois abrégée bio. mol.) est une ¹discipline scientifique² de la vie au croisement de la génétique³, de la biochimie⁴ métabolique et de la physique⁵, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule⁷ au niveau moléculaire [1]^[1]Le terme « biologie moléculaire », utilisé la première fois en 1938 par Warren Weaver⁸, désigne également l'ensemble des techniques de manipulation d'acides nucléiques (ADN⁹, ARN¹⁰), appelées aussi techniques de génie génétique^[2][2].¹¹

Depuis la fin des années 1950¹² et le début des années 1960¹³, les biologistes moléculaires ont appris à caractériser, isoler et manipuler les composants moléculaires des cellules et des organismes.[3]Ces composants incluent l'ADN¹⁴, support de l'information génétique, l'ARN¹⁵, proche de l'ADN dont les fonctions vont de la copie provisoire d'ADN jusqu'aux réelles fonctions structurelles et enzymatiques et qui est une partie fonctionnelle et structurelle de l'appareil traductionnel, et les protéines¹⁶, molécules¹⁷ structurelles et enzymatiques les plus importantes des cellule.[4]^[4]¹⁸

1. [https://fr.wikipedia.org/wiki/Discipline_\(sp%C3%A9cialit%C3%A9\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Discipline_(sp%C3%A9cialit%C3%A9))

2. [https://fr.wikipedia.org/wiki/Discipline_\(sp%C3%A9cialit%C3%A9\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Discipline_(sp%C3%A9cialit%C3%A9))

3. <https://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A9n%C3%A9tique>

4. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Biochimie>

5. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Physique>

6. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Physique>

7. [https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_\(biologie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_(biologie))

8. https://fr.wikipedia.org/wiki/Warren_Weaver

9. https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_d%C3%A9soxyribonucl%C3%A9ique

10. https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ribonucl%C3%A9ique

11. https://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A9n%C3%A9ticien_g%C3%A9n%C3%A9ticien

12. <https://fr.wikipedia.org/wiki/1950>

13. <https://fr.wikipedia.org/wiki/1960>

14. https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_d%C3%A9soxyribonucl%C3%A9ique

15. https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ribonucl%C3%A9ique

16. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Prot%C3%A9ine>

17. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Mol%C3%A9cule>

18. [https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_\(biologie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_(biologie))

II Extraction de l'ADN plasmidique

1. Introduction

Les plasmides bactériens sont des petits fragments d'ADN circulaire, autonomes et mobiles qui se trouvent dans la cellule bactérienne indépendamment du génome [14]^[14]. L'extraction du plasmide repose sur une méthode de séparation différentielle dite lyse alcaline qui permet de récupérer sélectivement l'ADN plasmidique tout en éliminant l'ADN chromosomique en se basant sur la différence de leurs tailles [15]^[15].

2. Objectifs

Ce travail pratique permet l'apprentissage des méthodes de l'extraction de l'ADN plasmidique au laboratoire de biologie moléculaire, depuis la suspension bactérienne jusqu'au plasmide extrait.

3. Exercice

Un biologiste a isolé, purifié l'ADN (extraction d'ADN) et mélangé dans une éprouvette diverses molécules nécessaires à la réplication de l'ADN. Lorsqu'il a ajouté un peu d'ADN au mélange, une réplication s'est produite, mais chaque molécule d'ADN qui s'est formée se compose d'un brin d'ADN normal apparié à un grand nombre de segments d'ADN d'une longueur de quelques centaines de nucléotides. Quel élément a-t-il probablement oublié d'incorporer dans le mélange ?

- a) L'ADN polymérase.
- b) L'ADN ligase.
- c) Les nucléotides.
- d) Les fragments d'Okazaki.
- e) La primase.

A a et b

B b et d

4. Matériels et réactifs

Afin de réaliser ce travail pratique requis les différentes techniques et matériel utilisés au laboratoire sont illustrés dans le tableau suivant :

Matériels et réactifs	
Eau distillée	Suspension bactérienne
Solution TrisHcl 25mM ; EDTA 10mM (PH=8)	Microtubes stériles.
Solution soude 0.2M SDS1	Micropipettes (1000ml) et embouts stériles.
Solution Acétate de sodium 3M, pH 5.2	Centrifugeuses réfrigérées.
Ethanol absolu, 75%	Etuve.

4.1. Méthodes

Ce travail pratique requiert les différents techniques utilisés au laboratoire suivantes



a) Lyse alcaline

(cf. Extraction de l'ADN (lyse alcaline traditionnelle).[WZbAfQ58eCw])

i) Purification de l'ADN plasmidique

 Méthode

- Ajouter 225ml d'acétate de sodium.
 - Mélanger par retournements successifs (à la main) 6 à 10 fois.
 - Placer les tubes dans de la glace pendant 10 minutes.
 - Centrifuger à 12000g pendant 10 minutes à températures ambiante.
 - Récupérer le surnageant (volume V).
- (cf. Extraction du plasmide [nsv8py5ujA0])

5. Exercice

Expliquez ce qui s'est passé à la dernière étape, quand vous avez ajouté de l'éthanol à votre suspension bactérienne.

(Indice : L'ADN est soluble dans l'eau, mais pas dans l'éthanol).

Pourquoi est-il important pour les scientifiques d'être en mesure d'extraire l'ADN d'un organisme? Donnez deux raisons.

6. Exercice

Exercice

Pour faire un travail de recherche en biologie moléculaire, l'étudiant doit réaliser deux premières étapes. L'extraction de l'ADN à partir des cellules biologiques (eucaryotes ou procaryotes).

Cet ADN doit être pur (il ne doit pas être associé à des protéines). Sachant que les protéines absorbent à 280 nm et l'ADN à 260 nm [16]^[16],

une solution d'ADN dont le rapport $D_{280}/D_{260nm} = 0.02$. [16]^[16]

Est- ce que cet acide nucléique est pur ?

7. Exercice

A la fin de votre travail pratique analyser vos résultats :

1. À quoi ressemblait l'ADN? .

2. Personne ne peut voir un filament de coton à 30 mètres, mais si on enroule des milliers de filaments de coton pour former une corde, on peut les voir de beaucoup plus loin. Pouvez-vous utiliser cet exemple pour faire une analogie qui décrit ce qui est arrivé lors de votre extraction d'ADN?

8. Exercice

Expliquez ce qui s'est passé à la dernière étape, quand vous avez ajouté de l'éthanol à votre extrait de banane. (Indice : L'ADN est soluble dans l'eau, mais pas dans l'éthanol).

1. Pourquoi est-il important pour les scientifiques d'être en mesure d'extraire l'ADN d'un organisme? Donnez deux raisons.

2. Pouvez-vous nommer des sources de contamination? Pour quelle raison cette expérience risquerait-elle de ne pas fonctionner correctement?

Conclusion

L'extraction de l'ADN consiste donc d'isoler la molécule d'ADN, c'est-à-dire la séparer de tout les autres constituants d'un tissu, [18]^[18] compris les molécules fortement liées à l'ADN, et d'en obtenir un échantillon suffisamment pur et en quantité suffisante pour permettre toutes les manipulations de biologie moléculaire, les étapes de l'extraction de l'ADN commence par la rupture des structures des tissus et des cellule puis l'élimination des protéines, des lipides et autres contaminants des acides nucléiques et enfin le transfert les acides nucléiques dans l'eau ou dans une solution tampon [19]^[19] qui les préservera sans interférer avec les travaux ultérieurs.

Conclusion

L'analyse d'ADN, qu'elle serve à faire correspondre des échantillons prélevés sur une scène de crime à un suspect, à tester des maladies génétiques ou à identifier une nouvelle espèce animale ou végétale, requiert d'abord l'extraction de l'ADN d'un échantillon. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. ceci à l'aide de techniques appropriées ,in vitro.