

# NOTICE TECHNIQUE



## ADN hydrolysés du bactériophage lambda

Réf. APBG : K08LD1

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

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

Rédaction mai 2008, version 0508-1

## 1- PRÉSENTATION

### 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 donc l'ADN du phage sur des sites différents:

EcoRI (5'-G<sup>A</sup>AATTC-3') et HindIII (5'-A<sup>G</sup>CTT-3') respectivement. Vous disposez d'un contrôle négatif, non hydrolysé, et d'un 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 des ADN hydrolysés pour illustrer l'action des endonucléases sur l'ADN du bactériophage lambda.

### 1-2 Méthodologie

Il s'agit de travaux pratiques comportant une phase expérimentale simplifiée, 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.

## 2- PRÉSENTATION DU KIT

Ce kit présente des réactifs qui sont prêts à être déposés sur un gel d'agarose de 0,8 % à 1 % maximum. 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 48 502 pb) est hydrolysé par EcoR I, Hind III, EcoR I et Hind III.

- ADN du bactériophage lambda 430 µl;
- ADN du bactériophage lambda / EcoR I 430 µl;
- ADN du bactériophage lambda / Hind III 430 µl;
- ADN du bactériophage lambda / EcoR I+Hind III 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. Leur stabilité est d'au moins 12 mois à 2 - 8 °C, de 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 ;
- Cuve à électrophorèse ;
- 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 0,8 à 1%.

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

## 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 d'aliqoter chaque échantillon avant la séance.

## 4- PRÉPARATION DE L'EXPÉRIMENTATION

### 4-1 Préparation préalable de la séance

Pour chaque poste, préparer des échantillons d'au moins 21 microlitres de chaque ADN

- 1 x 21 µl ADN du bactériophage lambda
- 1 x 21 µl ADN du bactériophage lambda / EcoR I
- 1 x 21 µl bactériophage lambda / Hind III
- 1 x 21 µl bactériophage lambda / EcoR I+Hind III

### 4-2 Déroulement de la séance

- **Manipulation par les élèves**

Les élèves déposent directement 20 µl de chaque ADN dans un puits de gel d'agarose traditionnel à 0,8 à 1%.

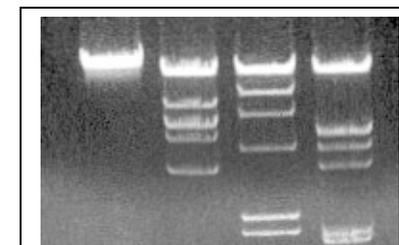
La révélation des fragments d'ADN se fait après une migration à 100 volts pendant 30 minutes ou 135 volts pendant 20 minutes.

Pour la coloration de l'ADN se référer à votre procédure et protocole interne au laboratoire.

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

Résultats attendus Photo de gel coloré à l'azure A

Résultats de la migration 30 minutes à 100 volts (Photo de gel coloré au BET)



## Contrôle EcoR I Hind III EcoRI + HindII

Carte de restriction des ADN :

Tailles des Fragments après hydrolyse :

- Bactériophage lambda non hydrolysé (taille en pb) : 48 502

- Bactériophage lambda / EcoR I (taille en pb) : 21 226, 7 421, 5 804, 5 643, 4 878, 3 530.

- Bactériophage lambda / Hind III (taille en pb) : 23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027, 564, 125.

Bactériophage lambda / EcoR I + Hind III (taille en pb) : 21 226, 5 148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904, 1 584, 1 375, 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.

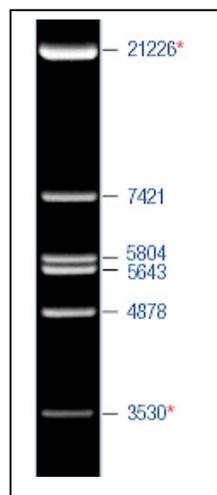
Mesures d'hygiène : se laver les mains avant et après l'expérimentation ;

Dans le cadre d'une révélation des fragments d'ADN au BET, il est important de veiller à respecter rigoureusement ces recommandations :

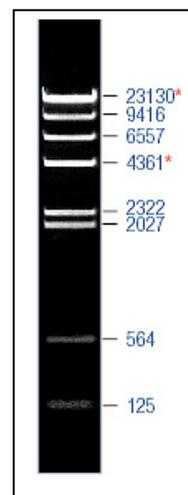
- Interdire formellement aux élèves de manipuler le gel d'agarose chargé en BET, (manipulation effectuée par le professeur préalablement formé) ;

- Porter des lunettes de protection en utilisant la table UV ;

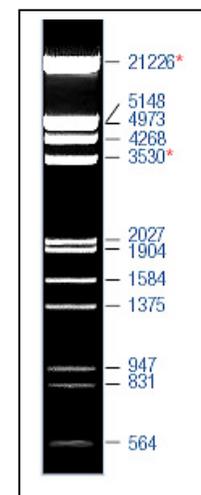
- Pour l'élimination du BET chaque établissement doit se référer à sa procédure interne de « traitement des déchets ».



Lambda/EcoR I



Lambda/Hind III



Lambda/EcoRI+HindIII

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

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 :

École de l'ADN  
19, Grand Rue  
BP 81295  
F-30015 Nîmes Cedex 1  
Tel/fax : +33 (0) 4 66 67 82 29  
E-mail : info@ecole-adn.fr  
www.ecole-adn.fr