**TP N° :01**

**Matériel dans un laboratoire de biologie moléculaire**

**1- Identification des zones de manipulation**

L'organisation physique du laboratoire doit être pensée en fonction des activités et des risques. On distingue deux grands types d'activités :

* les activités pré-PCR où l'on manipule de l'ADN non amplifié (extraction- purification, préparation des mix PCR, clonage d'ADN génomique).

* les activités post-PCR où l'on manipule de l'ADN amplifié (purification de produits PCR, réaction de séquence, clonage de produits PCR). Cette séparation a pour but de réduire les risques de contaminations (l'ADN amplifié étant très contaminant pour l'ADN non amplifié).

Tout échange de matériel entre ces deux zones est strictement proscrit (tout particulièrement les micropipettes qui sont une source importante de contamination du fait des aérosols).

**1- Les micropipettes automatiques**

De nombreuses expérimentations dépendent de la justesse du pipetage. Un soin tout particulier doit donc leur être apporté. Quelques conseils d'utilisation :

* Evitez de poser les pipettes automatiques à plat.
* Evitez les chocs (cause de dérèglement).
* Rangez les pipettes sur leur portoir entre chaque utilisation.

**2-La balance**

Comme les pipettes automatiques, elle ne doit pas être utilisée en dehors des limites spécifiées par le fabricant (problème de dérèglement donc de justesse de la pesée). Nettoyez la balance et la paillasse autour après utilisation.

**3- Le thermocycleur**

Lors de la programmation, entrez une température de 10°C et non de 4°C en fin de programme, cela permet d'augmenter la durée de vie de la machine.

**4- La centrifugeuse**

La partie la plus fragile d'une centrifugeuse est l'axe du rotor. Pour ne pas le fausser, il faut impérativement équilibrer le rotor, c'est-à-dire répartir les tubes de façon homogène de part et d'autre de l'axe central (en partant du principe que tous les tubes ont le même poids, sinon les peser et les associer deux à deux de même poids de part et d'autre de l'axe de rotation).

**5- Le bain-marie**

Pensez à ajustez le niveau d'eau avant utilisation. Pensez à couvrir la cuve pour éviter l'évaporation (surtout pour les incubations sur la nuit) car certains bains-marie n'ont pas de système de sécurité et continuent à chauffer même sans eau. Ceci a été la cause de plusieurs incendies dans différents laboratoires. Changez l'eau de la cuve quand le besoin s'en fait sentir (eau trouble, dépôts sur le fond).

**6- Les réfrigérateurs et congélateurs**

Vérifiez que les réfrigérateurs et congélateurs sont bien refermés. Ne stockez pas inutilement et pensez à jeter ce qui n'est plus utile. Etiquetez de façon lisible ce que vous mettez dans les réfrigérateurs et congélateurs (nom, nom du projet ou de l'encadrant, date, contenu, etc.).

**7- La table UV**

Eteignez les tables UV après visualisation d'un gel d'agarose coloré au BET. Nettoyez la surface de la table UV avec de l'eau, surtout pas avec de l'alcool !

**8- La cuve d'électrophorèse**

Ne laissez pas les sels s'accumuler sur les électrodes de la cuve d'électrophorèse. Cela provoque un mauvais ajustement du couvercle qui empêche le contact de se faire, donc le courant électrique de passer et par conséquent la migration dans le gel ne se fait pas.

Un petit nettoyage de temps en temps ne leur fait pas de mal et permet de changer le tampon de migration (TBE). Dans le cas des cuves Mupid® letampon de migration doit être utilisé à une concentration de 0,5x (une concentration supérieure en sels entraîne des dégagements de chaleur qui endommage ce type de cuve). Ne remplissez pas les cuves Mupid® au-delà de la marque interne, sinon des fuites se produisent par capillarité. Ne coulez pas les gels avec de l'agarose trop chaud , cela déforme les moules. Un bon repère est que vous pouvez couler les gels quand vous pouvez tenir la bouteille d'agarose chaud sans le gant de cuisine et sans vous brûler.

**9- Le pHmètre**

Le pH mètre doit être étalonné avant d'effectuer vos mesures. Pour ce faire, rincez préalablement l'électrode à l'aide d'une pissette d 'eau osmosée puis utilisez les solutions commerciales d'étalonnage. Attention, il faut rincer l'électrode à l'eau osmosée entre chaque solution d'étalonnage, ainsi qu'avant et après vos mesures de pH. Une fois les mesures terminées, immergez l'électrode dans la solution de KCl 3M.

**TP N° :02**

**Extraction et visualisation de l’ADN végétale ( banane)**

Cette manipulation est un exemple de technique d’extractionde molécules intracellulaires. Elle permet d’extraire les molécules d’ADN contenues dans les cellules : il est possible alors d’observer la structure filamenteuse de cette molécule.

La technique d’extraction comporte plusieurs étapes :

1-destruction mécanique des cellules (éclatement du tissu végétal et des cellules).

2-destruction chimique des membranes biologiques.

3-précipitation de l’ADN extrait (apparition sous une forme non soluble).

**1-Matériel et réactifs**

- Banane

- solution de chlorure de sodium (NaCl) à 60g/L.

- solution de détergent SDS (1%).

- solution d’éthanol à 90° maintenue dans la glace.

- Solution de vert de méthyle (0.1%)

- mortier + pilon.

- éprouvette de 50 mL.

- spatule longue.

- bécher + 1 Erlenmeyer.

- entonnoir + papier filtre.

**2- Mode opératoire**

Dans un mortier (verre), broyer à peu près 10g de banane avec 10ml de NaCl jusqu’à obtenir d’un mélange pâteux homogène puis 10 ml de SDS (1%).

- Mélanger en tournant lentement. Le mélange devient visqueux.

- Ajouter 10 ml d’eau et remuer. Attendre 5 minutes.

- Filtrer le contenu du bécher sur du papier filtre, et récupérer le filtrat dans l’Erlenmeyer.

- Presser légèrement et très délicatementle filtre pour récupérer un maximum de filtrat.

-Ajouter dans le tube une quantité égale d’alcool froid

**Attention : opération délicate**, **verser l’alcool très lentement** pour ne pas le mélanger avec le liquide filtré. L’alcool doit rester au dessus du liquide filtré.

- Laisser reposer le contenu de l’éprouvette pendant quelques minutes. L’ADN apparaît sous forme d’une pelote blanche (méduse).

-Prélever la « méduse » avec la pointe d’un outil et la déposer dans la coupelle en verre.

- Déposer une goutte de vert de méthyle acétique sur la « méduse ».

**3- Compte rendu :**

* Décrire l’aspect final de l’ADN extrait. L’ADN est-il soluble dans la solution d’éthanol ?
* Ecrire la conclusion de ce travail
* Construire un schéma expérimental de la manipulation.

**TP N° :03**

**Sur le dosage de l’ADN**

**1**- Compléter le tableau suivant :

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Dilutions** | **ADN (v=ml)** | **Eau**  **(v=ml)** | **Volume final (ml)** | **DO260** | **DO280** |
| 1/1.5 | ? | ? | 10 | 0.893 | 0.884 |
| 1/2 | 2.5 | ? | ? | 0.612 | 0.617 |
| ? | 1.66 | ? | 5 | 0.410 | 0.402 |
| 1/4 | ? | 3.75 | ? | 0.424 | 0.377 |
| 1/5 | ? | ? | 2 | 0.305 | 0.282 |

**2.5 pts  
2**- Quel est l’objectif de TP 3pts

**3**- Calculez la concentration d’ADN en µg/ml 2.5pts

**4**- Quelle est la quantité d’ADN contenue dans 2 et 10µl de solution 2pts

**5**- Tracer la courbe DO=f(C) 4pts

**6**- Pourquoi et que dose-t-on à 260 et 280 nm? Quels sont les intérêts des cuves que vous avez utilisées? 2pts

**7**- L'ADN que vous avez préparé est-il relativement pure ? Expliquer 1pts

**8**- Quelle est votre conclusion.3pts

**TP N° :04**

**Sur l’extraction des plasmides**

Au cours de cette séance de Travaux Pratiques, vous effectuerez une mini-extraction d'ADN plasmidique à partir d'une culture de bactéries Escherichia coli, en utilisant la technique de la lyse alcaline. Cette méthode permet de récupérer facilement et rapidement une grande quantité d'ADN plasmidique plus ou moins pur, c'est-à-dire peu contaminé par de l'ADN génomique, des protéines (nucléases et autres...) ou d'autres composants bactériens.

L'ensemble de ces manipulations vous permettra de vous familiariser avec les techniques de base de la biologie moléculaire.

**Principe de la lyse alcaline**

Le milieu de culture est d'abord éliminé par centrifugation. Le culot de bactéries est ensuite resuspendu dans la **solution 1**, qui contient du Tris (tamponne le pH) et de l'EDTA. L'EDTA chélate les cations métalliques divalents (majoritairement le calcium et le magnésium), ce qui déstabilise la membrane bactérienne, et inactive les DNases. Les bactéries sont ensuite lysées dans **la solution 2**. Cette solution contient de la soude (NaOH 0.2 M) ainsi que du SDS, qui est un détergent. Les parois bactériennes sont fragilisées à pH basique. De plus, à pH basique, les deux brins de l'ADN se séparent. Le chromosome bactérien, très fragile, se linéarise en grands fragments, mais les deux brins des plasmides, beaucoup plus petits, restent circulaires et donc demeurent associés (contrainte topologique).

**La solution 3**, constituée d'acétate de potassium 3M à pH 5,5, permet aux brins d'ADN de se réapparier de façon complémentaire. L'ADN plasmidique se renature très vite car les brins n'avaient pas pu se séparer l'un de l'autre. La renaturation de l'ADN génomique nécessite plus de temps, et finalement ne peut avoir lieu car ces fragments d'ADN simple brin précipitent sous l'effet de la forte concentration en sels. L'ADN double brin reste en solution. Le SDS est lui aussi éliminé par précipitation. L'ADN plasmidique est finalement précipité par addition d'isopropanol ou d'éthanol. Ces alcools mobilisent l'eau du milieu, ce qui diminue la solubilité de l'ADN. Les charges négatives portées par les phosphates de l'ADN sont neutralisées

par les ions potassium ajoutés lors de l'extraction.

**Compte rendu :**

**1-** Donner l’objectif de TP 2 pts

**2**- Pourquoi ne centrifuge-t-on pas les bactéries à faible vitesse (Etape 1) 2pts

**3**- Quel est le rôle de la soude, acétate de sodium, le SDS et l’éthanol absolu dans le protocole? 2 pts

**4**- Où se trouve le plasmide tout au long du protocole ? 3pts

**5**- D’après vous comment s’assurer de l’intégrité de l’ADN plasmidique (l’ADN n’a pas été digéré durant sa conservation) 2 pts. Donner le protocole expérimental ainsi que les résultats attendus dans le cas d’une bonne et une mauvaise conservation 4 pts

**6-** Comment pourrait-on vérifier la présence et la pureté de l'ADN plasmidique extrait ? 2pts

**7**- Donner une conclusion au TP 3pts

**TP N° :05**

**Sur la préparation de Mix PCR**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Mix** | **Concentration initiale** | **Volume à prélever** | **Mix X7** |
| H2O | - |  |  |
| Tampon de réaction | 10X | 2.5µl |  |
| dNTP | 1.25mM | 4µl |  |
| Amorce sens | 10µM | 1µl |  |
| Amorce anti sens | 10µM | 1µl |  |
| DNA polymérase | 2.5U | 0.5µl |  |
| ADN matrice | 1µg | 2µl | Ajouter à la fin |

**1**-Compléter le tableau 2pts

**2**- A quoi sert le tampon enzymatique et pourquoi l'utilise-t-on à une concentration 10X (10 fois concentré)? 3pts

**3-** A quelle concentration de tampon enzymatique les enzymes (Taq ADN polymerase) fonctionnent-elles donc de façon optimale? 3pts Si on vous disait que la concentration optimale d’action d’une enzyme devait être dans un tampon enzymatique 2X, combien mettriez-vous de tampon 10X dans un volume final réactionnel de 25μl? 3pts

**4**- Que contient le contrôle positif? Qu’est ce que ça signifie quand un contrôle positif

est négatif ? 4pts

**5**- Vous connaissez la séquence d’un gène dans trois espèces de bactéries et vous aimeriez isoler le même gène dans une espèce où le gène n’a pas été séquencé. Comment faites-vous ? 3pts

**6**- Dessinez à la main et sans trop de détails une amplification PCR pour une région

d’ADN au cycle 1 et 2. 2pts