

SOUTHERN BLOTTING

- I Principe
- II Méthodes Utilisées
- III Résultats
- IV Interprétation des Résultats

I) PRINCIPE

Après avoir extrait de la bourse de Fabricius de poussin par la technique du phénol chloroforme, les fragments d'ADN sont séparés sur un gel d'agarose puis transférés par capillarité et enfin fixés sur une membrane de nylon. Ces fragments proviennent de la digestion d'ADN eucaryote et de phage lambda, par des enzymes des restrictions (BAM HI , HIND III , ECO RI). Les fragments sont hybridés par une sonde, après avoir été rendu monocaténaire par une solution dénaturante A.

La révélation des bandes d'hybridation se fait soit dans une cassette photographique, la membrane étant recouverte d'un film autoradiographique dans le cas du marquage par une sonde radioactive, soit par un développement calorimétrique , observable à l'œil nu reflétant la liaison sonde-fragment d'ADN détecté par une réaction immunologique avec comme sonde la dioxygénine .

L'intérêt de cette technique est de pouvoir détecter des mutations sur les fragments d'ADN d'une façon relativement simple.

II) METHODES UTILISEES

1)Extraction d'ADN

- Création du tampon de lyse

Il nous faut de 4000µl de tampon de lyse. D'après les différents composants qui constitues ce tampon on doit faire la dilution suivante :

Tris 10mM, on en prélève 40µl

EDTA 1mM, on en prélève 8µl

SDS à 0.5%, on en prélève 100µl

Protéinase K à 100µg/l, on en prélève 40µl et à tout cela on ajoute 3812µl d'eau distillée.

Après obtention d'un broyat d'organe, on le centrifuge pendant 30s et on ajoute 500µl de phénoł-chloroforme. Puis on met dans un tube contenant du phase lock, on centrifuge pendant 20mn.On obtiendra alors une phase aqueuse ou on aura notre ADN, une phase lock ou interphase où l'on retrouvera les protéines et une phase phénolique où il y aura les débris.On tansfert alors notre surnageant (400 ml recueuillit) dans un microtube stérile et on ajoute 40 ml d'acétate de sodium et de l'éthanol froid. On mélange doucement et on obtient un précipité blanc dans lequel notre ADN est visible que l'on recueillera avec une pipette pasteur et on laisse sécher à température ambiante. On reprend l'ADN dans 300µl de TE stérile. Une dilution au 1 /100 de l'ADN sera faite afin de lire la DO à 260 puis à 280.

DO à 260= 0.0654

DO à 280= 0.0291

$DO_{260}/DO_{280}=2.24$

Conclusion notre ADN est contaminé par de l'ARN

Calcul de la concentration de l'ADN obtenu : $0.0654 \times 50 \times 100 = 327$ microgramme/ml

- Préparation du gel d'agarose

L'agarose est à 1%. Donc si on veut de 60ml pour faire un gel on aura :

$$X = (1 * 60) / 100 = 0.6$$

Il faudra prélever 0.6g d'agarose pour préparer une solution à 60ml.

Ajout de Bromure d'éthidium (Beth) dans le gel :

Le Beth est un agent qui s'intercale entre les bases de l'ADN. L'ADN est un anion donc est chargé négativement et le Beth doit être chargé positivement pour s'intercaler. L'ADN migre de la cathode vers l'anode étant chargé négativement, et le Beth migre dans le sens opposé donc est bien chargé positivement. On peut observer que le Beth migre deux fois plus vite que l'ADN (cela dépend de la MM des différents fragments). Le Beth est une petite molécule.

Pour suivre et faire migrer l'ADN on ajoutera du bleu de migration en prélevant 5µl d'ADN et en rajoutant 2µl de tampon de migration et on ajuste à 10µl. Des marqueurs de masse moléculaire migreront dans les mêmes conditions que notre ADN. La migration se fera à 120 volts pendant 1h.

2) Coupure de l'ADN par des Enzymes de restriction.

Le tableau ci-dessous indiquera les réactions enzymatiques effectuées avec notre ADN préalablement extraits de la bourse de Fabricus.

Annotations : E : Eco RI

H : Hind III

Tubes	ADN phagique	ADN eucaryote	10X tampon	E	H	H2O stérile
1 E	0.8µl	-	1µl	1µl	-	7.2 µl
2 H	0.8µl	-	1µl	-	1µl	7.2 µl
3 E + H	0.8µl	-	1µl	1µl	1µl	6.2 µl
4	0.8µl	-	1µl	-	-	8.2 µl
5	-	6.1 µl	1µl	-	1µl	1.9 µl
6	-	1.53µl	1µl	-	-	7.47µl
7	Marqueur de PM (1µl)			(donné)		9 µl

Après avoir laissé 1h à 37°C on centrifuge brièvement à 13000g et on ajoute 2µl de tampon de migration dans chaque tube. On recentrifuge brièvement et on met le contenu de chaque tube dans un puits de gel d'agarose. Ce gel sera préparé de la même façon que précédemment (1) et les conditions de migrations seront les mêmes.

Après l'électrophorèse, on passe le gel dans une solution A pendant 20mn puis on le transfère dans une solution B pendant 20mn.

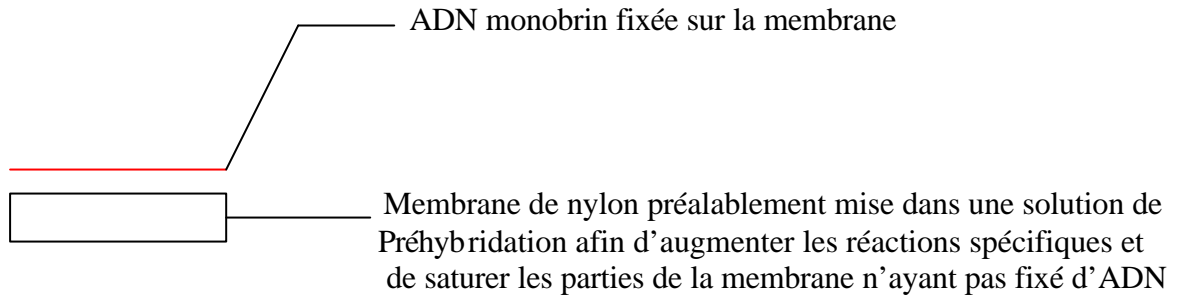
La solution A contenant du NaOH permet de séparer l'ADN double brin en ADN monobrin, car c'est un agent dénaturant qui casse les liaisons hydrogène entre les brins (car son pH est alcalin). L'ADN simple brin pourra alors être marqué par une sonde.

Après utilisation de la solution A, le milieu est fortement alcalin donc l'utilisation de la solution B sert à neutraliser l'effet de la solution A en rétablissant un pH normal.

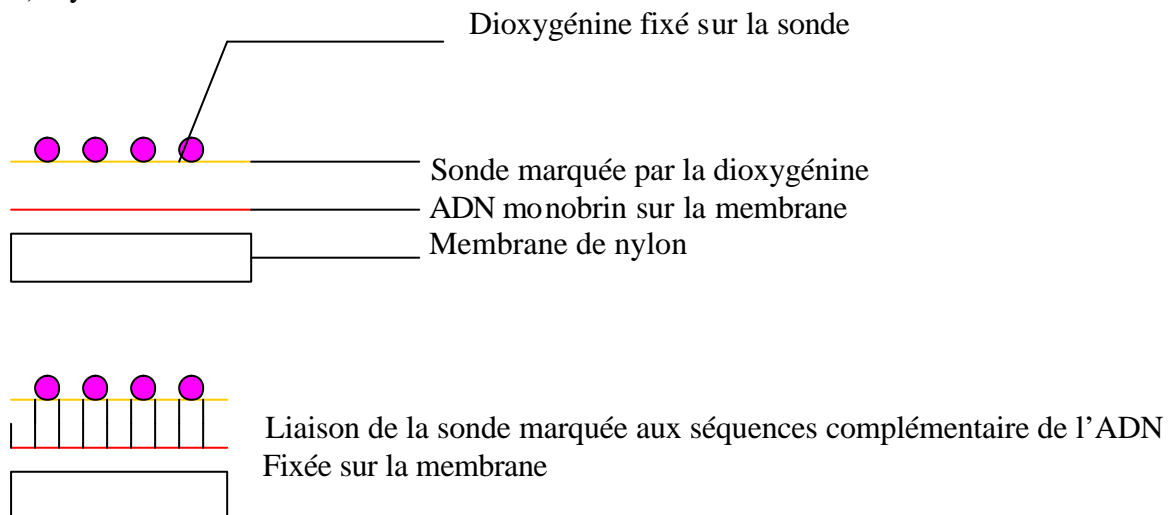
Quand on obtient le gel après migration, on fait un transfert des fragments d'ADN sur une membrane de nylon.

3) Etapes principales qui permettent de révéler sur la membrane de nylon la réaction d'hybridation.

a) Préhybridation

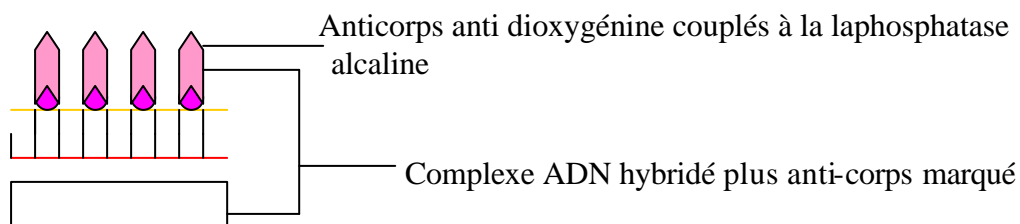


b) Hybridation



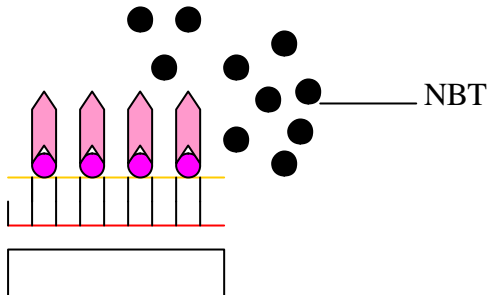
c) Lavage

Ce lavage est effectué pour enlever l'excès de sonde et on fera une mise en présence d'anti-corps anti dioxygénine couplés à la phosphatase alcaline.



d) Révélation

On transfère après dans une boîte de pétri, la face portant l'ADN au dessus de sorte que la solution de développement émulsionne la cible. En présence de NBT on aura la formation d'un précipité bleu violet.



On fait par la suite une incubation dans le noir à température ambiante, jusqu'à ce que les bandes colorées soient visibles. L'incubation est faite pendant 30mn dans 20ml de TE sous agitation. Pour terminer on séchera la membrane entre 2 morceaux de papier filtre.

III) RESULTATS

Photo 1

Photo sous UV de l'électrophorèse de groupe.
Le résultat de l'électrophorèse est visible sur cette photo, notre préparation a été placée dans le 3eme puits en partant de la règle. Le 1^{er} et 2eme puits ont reçu les marqueurs de Masse Moléculaire d'ADN.

Photo 2

Photo sous UV de l'électrophorèse
Puits 1 à l'opposé de la règle. Puits 7 proche de la règle

- 1) ADN ? +EcoRI
- 2) ADN ? + Hind III
- 3) ADN ? + EcoRI + HindIII
- 4) ADN ?
- 5) ADN Eucaryote + HindIII
- 6) ADN Eucaryote
- 7) Marqueur de poids moleculaire

Courbe semi-logarithmique (voir page suivante)

Courbe semi logarithmique montrant la relation entre la distance de migration et le nombre de paires de bases.

Les 7 valeurs ont été lues directement sur la photo 2 au niveau des marqueurs de poids moléculaire (puits 7)

Noter que seulement 6 des 7 valeurs ont servi à tracer la droite. La bande à 1.3 cm (21226 paires de bases) n'a pas été prise en compte pour tracer la droite d'étalonnage.

Membrane, Photocopie de Membrane (page suivante)

Membrane originale et photocopie montrant les bandes colorées par la dioxygénine
Le numéro de la bande est compté en partant du puits.

- 1) La bande colorée est la 4eme bande
- 2) La bande colorée est la 1ere bande
- 3) La bande colorée est la 5eme bande
- 4) La bande colorée est la 1ere et seule bande
- 5) Enormément de molécules colorées a différentes distances de migrations
- 6) La bande colorée est la 1ere et seule bande
- 7) Pas de coloration

IV) INTERPRETATION DES RESULTATS

Photo 1

On observe une bande bien nette à la hauteur de 2.3 cm. Cette bande est l'ADN. En deçà on remarque d'autres molécules ayant migré moins vite que l'ADN, c'est probablement une contamination par de grosses protéines. On note également la présence de 2 bandes vers 4 et 4.5 cm. En l'absence de la connaissance des valeurs des bandes du marqueur de Masse Moléculaire d'ADN il ne nous est pas possible de déterminer la masse moléculaire de ces molécules. Cependant on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'ARNr vu que ces bandes sont présentes pour chacun des binômes. Ils travaillaient tous avec des cellules eucaryotes. En théorie, elles possèdent toutes le même ARNr. Le ribosome est composé entre autre d'une sous unité monocaténaire ARNr 28S et une 18S qui ont respectivement 4718 et 1874 bases. Il est possible que ces bandes soient cet ARNr car bien que la purification de l'ADN soit faite correctement il restera toujours un peu d'ARN.

Photo 2

Cette électrophorèse permet de séparer les fragments d'ADN qui proviennent de la digestion de la molécule d'ADN par différentes enzymes de restrictions. Les rangées des puits 1 à 3 montrent des bandes qui représentent les fragments découpés d'ADN de phage en accord avec le document « Restriction Maps of the Linear Lambda Genome » qui nous renseigne sur le nombre de paires de bases. Les bandes sont dans l'ordre décroissant du nombre de paire de bases.

Puits 1 Bande #	Longueur du fragment en paires de bases
1	21226
2	7421
3	5804 et 5643
4	4878

Puits 2 Bande #	Longueur du fragment en paires de bases
1	23130
2	9416
3	6557
4	4361
5	2322
6	2027

Puits 3 Bande #	Longueur du fragment en paires de bases
1	21226
2	5148 et 4973
3	4268
4	3530
5	1904 et 2027

Puits 4 Bande #	Longueur du fragment en paires de bases
1	48502

Puits 5 Bande #	Longueur du fragment en paires de bases
Nombre de bandes trop grand pour qu'elles soient distinguables	Nombreuses tailles intermédiaires

Puits 6 Bande #	Longueur du fragment en paires de bases
1	Longueur max de l'ordre de 10^8 à 10^9

Pour les puits 1 et 2 une lecture directe du document « Restriction Maps of the Linear Lambda Genome » nous permet d'identifier les segments.

Par contre pour le puit 3, deux enzymes agissent ensemble EcorI et HindIII. Leurs sites de coupures s'additionnent et on a donc plus de fragments de plus petite taille.

Pour le puit 4 il faut noter que malgré une molécule d'ADN supposée intacte de 48502 paires de bases, la bande qui apparaît n'est pas très nette. On le constate également pour le puit 6 avec l'ADN d'Eucaryote non digéré. La molécule d'ADN chez les Eucaryote est longue de 100 000 000 à 1000 000 000 de paires de bases. Dans le puits 6 elle est en théorie intacte et ne semble pas migrer nettement moins qu'une molécule de 48502 paires de bases ou même de 23130. Il semble donc qu'il y ait une limite à la relation entre la distance de migration et le nombre de paires de bases pour les bandes aux environs de 1 cm. C'est pourquoi lors du tracé de la courbe semi logarithmique nous avons ignoré la bande à 1.2 cm et n'avons utilisé uniquement les 6 autres bandes se trouvant au delà de 2 cm.

Pour interpréter correctement les résultats observés au puits 5 (ADN Eucaryote digéré par HindIII) il est important de revenir au matériel que l'on observe. Nous avons ici une molécule d'ADN de bourse de Fabricius (organe interne d'oiseau). C'est un eucaryote. Les Eucaryotes ont des molécules d'ADN longues de 10^9 paires de bases (1.5×10^8 pour la Drosophile et 4×10^9 pour l'homme). Nous avons vu que pour l'ADN du phage lambda (long de 48502 paires de bases), HindIII, découpe l'ADN en 8 segments long de 125 à 23130 paires de bases. On peut donc supposer que pour une molécule d'ADN d'Eucaryote digérée par HindIII longue de 10^9 paires de bases le nombre de fragments de tailles différentes sera au moins de l'ordre de 10^5 ($10^9 / 10^4$ (longueur du plus long fragment du phage)) et probablement beaucoup plus. Le nombre de paires de bases de ces fragments est variable de quelques centaines à quelques dizaines de milliers. C'est cela qui signifie la traînée et l'impossibilité d'observer des bandes distinctes dans la rangée du puit 5. On peut supposer qu'en augmentant le temps de migration on finirait par voir apparaître des bandes distinctes

Le puit 6 montre que la molécule d'ADN n'a pas été découpée en fragments mais qu'elle a quand même migré jusqu'à environ 1 cm.

Le puit 7 nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage connaissant le nombre de paires de bases des molécules présentes dans chacune des bandes.

Courbe semi-logarithmique

Il convient de noter que la relation que nous mettons en évidence ici est du type exponentiel (c'est pourquoi les 6 points sont alignés sur une grille semi logarithmique). C'est-à-dire pour une distance de migration proche de 0 une faible variation de la distance de migration représente une très grande variation du nombre de paires de bases. Comme nous l'avons vu une molécule de 48502 paires de bases est quasiment à la même position qu'une molécule de 23130 paires de bases. Ainsi, la difficulté d'effectuer une mesure suffisamment précise ne permet pas d'exploiter les résultats proches de 1 cm.

La courbe d'étalonnage a été utile pour confirmer l'identification des fragments visible sur la photo 2.

Membrane, Photocopie de Membrane

Pour l'ADN d'Eucaryote

Toute la traînée est colorée. Il existe un très grand nombre de fragments différents, la sonde a reconnu la séquence sur plusieurs d'entre eux. Cependant les fragments sont trop proche les uns des autres pour pouvoir distinguer des bandes. Au niveau du puit 6, il est normal que l'ADN non digéré soit coloré car si la séquence existe sur les fragments d'ADN, elle existe sur l'ADN entier.

En conclusion on peut simplement dire que la séquence reconnue par la sonde existe de nombreuses fois sur l'ADN de bourse de Fabricius. Lorsque l'ADN est digéré par HindIII, cela donne des fragments d'une longueur allant de quelques paires de bases à quelques dizaines de milliers. Sur de nombreux fragments de toutes tailles la séquence spécifique est reconnue par la sonde. Le principe de Southern Blotting doit nous permettre d'identifier des fragments d'ADN porteur d'une séquence spécifique cependant le protocole utilisé est adapté pour une molécule d'ADN courte (phage lambda par exemple) mais pas pour de l'ADN d'Eucaryote.

Pour l'ADN de Phage Lambda

Nous observons une coloration des bandes suivantes :

Puit 1 – Bande 4 (fragment a 4878 paires de bases) –	Position entre 21226 et 26104
Puit 2 – Bande 1 (fragment a 23130 paires de bases) –	Position entre 0 et 23130
Puit 3 – Bande 5 (fragment a 1904 paires de bases) –	Position entre 21226 et 23130
ou – Bande 5 (fragment a 2027 paires de bases) –	Position entre 23130 et 25157
Puit 4 – Présence de la séquence sur l'ADN non digéré	

Etant donné les positions il est impossible que le segment reconnu par la sonde soit contenu dans le fragment à 2027 paires de bases car il ne peut pas être en dessous de 23130 et en même temps au dessus.

Donc au vu de ces résultats, nous pouvons affirmer que il existe une seule séquence de paires de bases dans l'ADN du phage Lambda qui soit reconnue par la sonde. Cette séquence se trouve entre la position 21226 et 23130. Un fragment de 1904 paires de bases contenant cette

