

Techniques d'Analyse Moléculaire

Dr AMIROUCHE A.
Licence Biochimie (2020/2021)



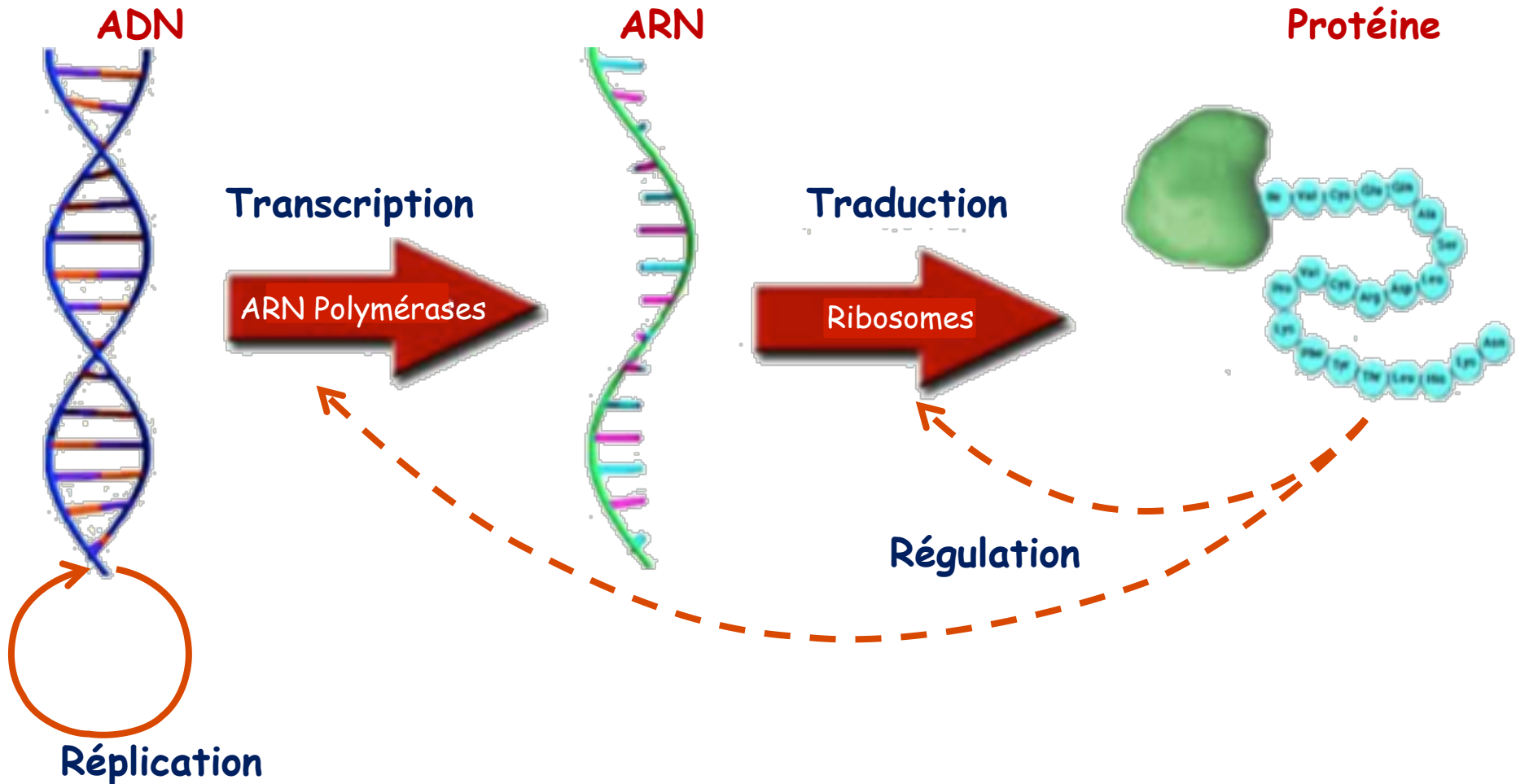
I- méthodes d'analyse des acides nucléiques:

- 1) Méthodes d'extraction d'acides nucléiques (ADN, ARN, plasmide)
- 2) Méthodes de dosage et analyse qualité des acides nucléiques (spectrophotométrie, électrophorèse)
- 3) Poly Chain Reaction (PCR)
- 4) Techniques d'analyse du transcriptome Northern blot, RT-PCR, Q-RT-PCR
- 5) Le séquençage de l'ADN (Principe, Techniques de marquage, Applications)

II- Etudes interaction protéine-protéine

- Caractérisations des protéines (SDS-PAGE), Western-blot
- Co-immunoprécipitation :
- Précipitation d'affinité GST
- Double hybride

Le Dogme Central de la Biologie Moléculaire



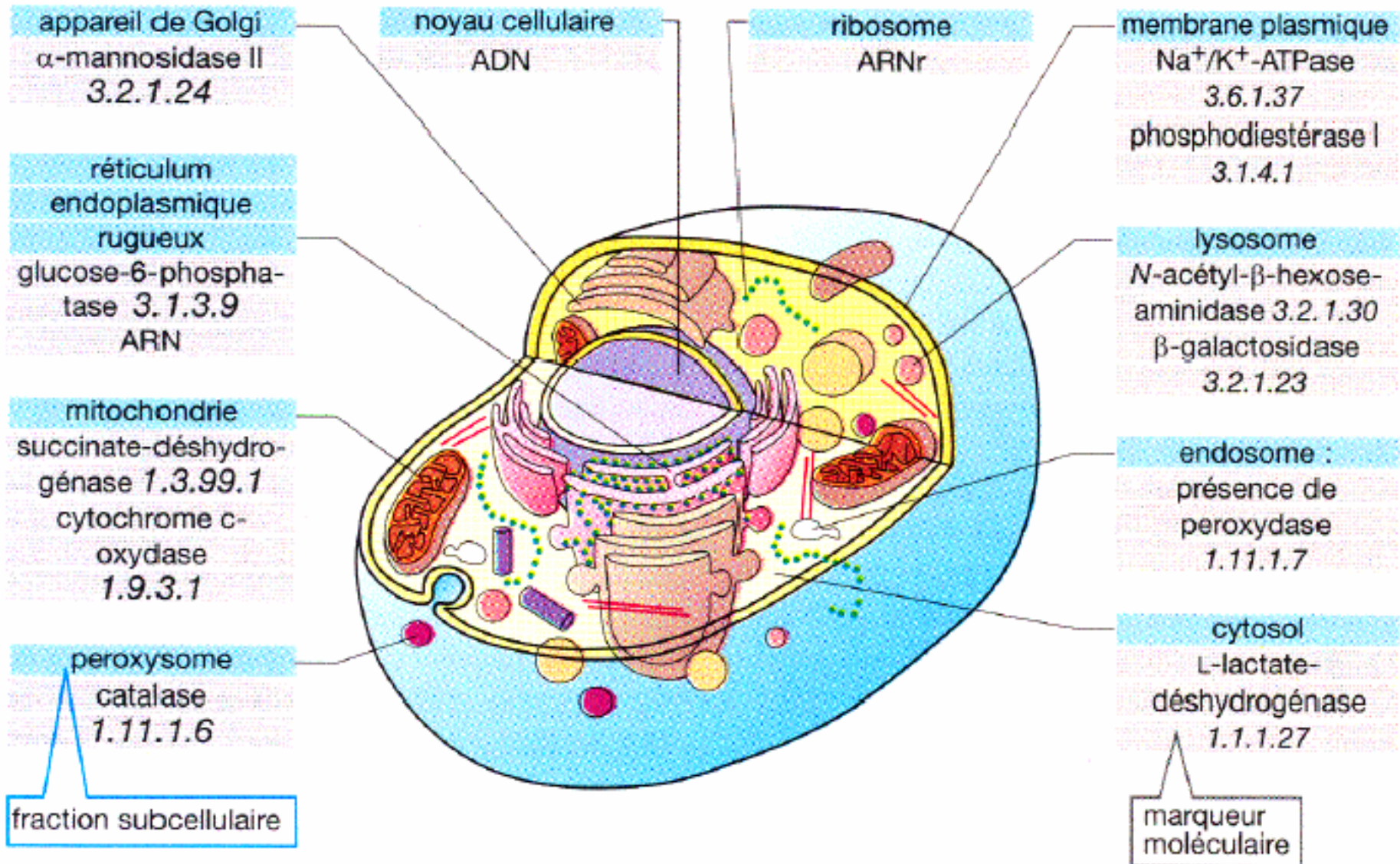
Chapitre I

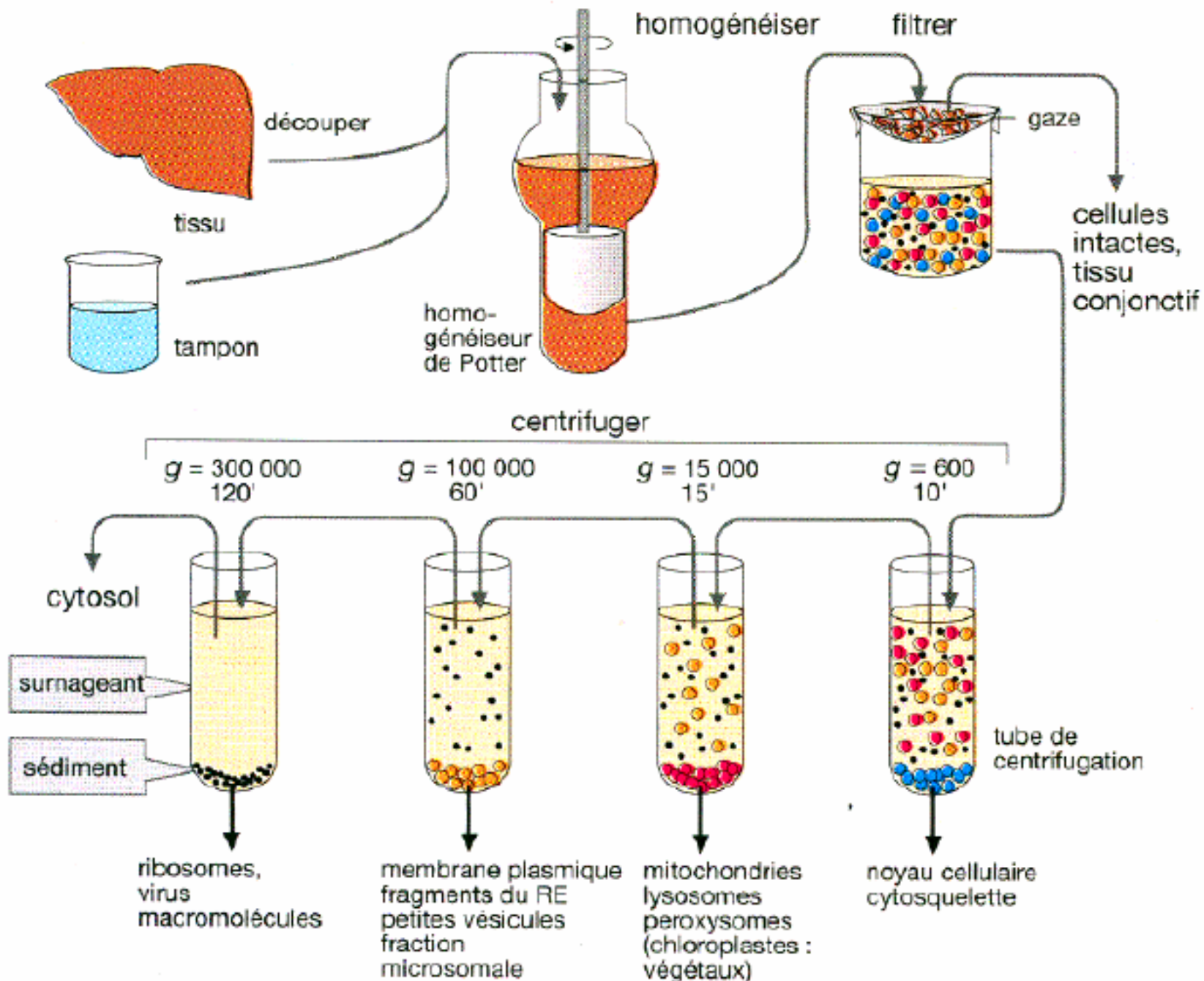
I- Extraction ADN

Obtenir en quantité suffisante D'ADN tout en préservant ses propriétés physiologiques (structure et activité).

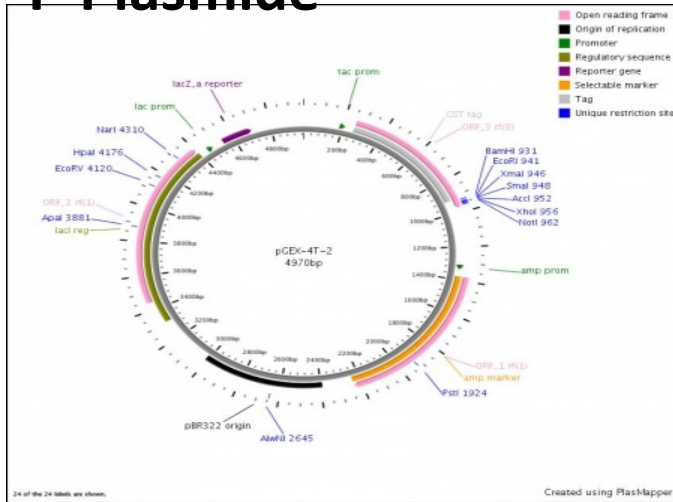
Source  Extraction  Purification

- Dosage de la quantité produite
- Contrôle de la pureté
- Contrôle de l'activité
- Stockage





I- Plasmide



- Décongeler 200 μ L de bactéries compétentes.

Souches bactériennes

- **E. coli BL21 (DE3)**,
- Rosetta 2 (DE3)
- Rosetta-gami 2 (DE3) sont utilisées pour sur-exprimer la protéine

- Ajouter 10 ng de plasmide.

2. Laisser incuber dans la glace pendant 1 h.

3. Incuber à 42°C pendant 2 min.

4. Ajouter 1 mL de milieu de culture stérile, mélanger par aller-retour. Incuber 1 h à 37°C.

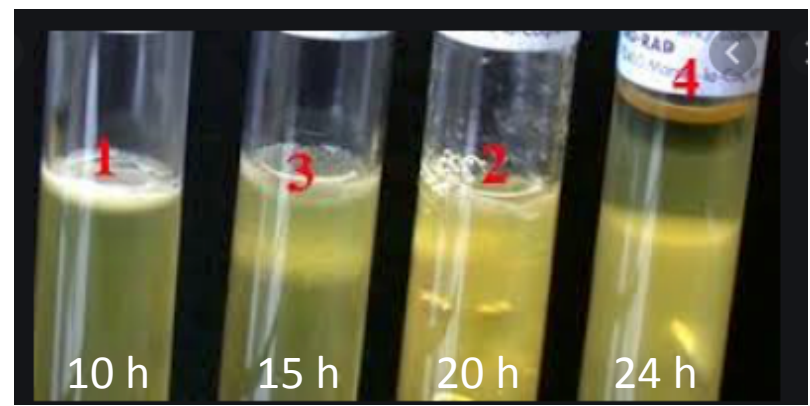
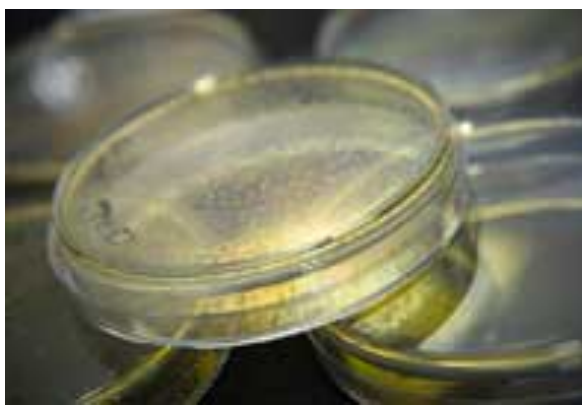
5. Centrifuger à 3 000 g pendant 3 min à température ambiante.

6. Eliminer 1 mL de surnageant. Reprendre délicatement le culot avec les 200 μ L restants.

7. Inoculer 2 boites de cultures avec 100 μ L de bactéries chacune. Les boites de cultures doivent contenir du milieu de culture et l'antibiotique de sélection.

Laisser incuber 15 min à 37°C,

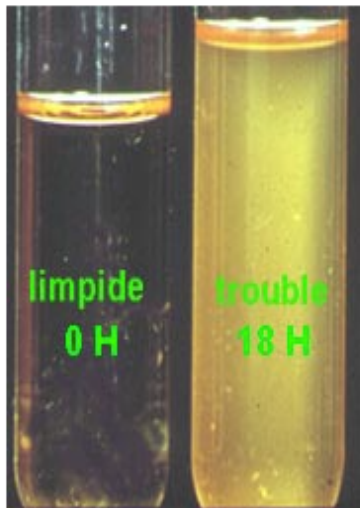
ENZYME	RECOGNITION SITE	ENZYME	RECOGNITION SITE	ENZYME	RECOGNITION SITE
<i>Aat II</i>	GAOGI▼C	<i>BsrBRI</i>	GATNN▼NNATC	<i>Fok I</i>	GGATG(9/13)
<i>AccI</i>	GT▼(A/T)(T/G)AC	<i>BsrS I</i>	ACTGGN▼	<i>Hae II</i>	(A/G)GCGC▼ (T/C)
<i>AccIII</i>	T▼OCGGA	<i>BssH II</i>	G▼OGCGC	<i>Hae III</i>	GG▼OC
<i>Acc65 I</i>	G▼GTAOC	<i>Bst71 I</i>	GCAGC(8/12)	<i>Hha I</i>	GOG▼C
<i>AccB7 I</i>	OCANNNN▼NTGG	<i>Bst98 I</i>	C▼TTAAG	<i>Hinc II</i>	GT(T/C)▼(A/G)AC
<i>AcyI</i>	G(A/G)▼OG(T/C)C	<i>BstE II</i>	G▼GTNACC	<i>Hind III</i>	A▼AGCTT
<i>Age I</i>	A▼OCGGT	<i>BstO I</i>	CC▼(A/T)GG	<i>Hinf I</i>	G▼ANTC
<i>Alu I</i>	AG▼CT	<i>BstX I</i>	OCANNNNN▼ NTGG	<i>Hpa I</i>	GTT▼AAC
<i>A/w26 I</i>	G▼TCTQ(1/5)	<i>BstZ I</i>	C▼GGOCG	<i>Hpa II</i>	C▼OGG
<i>A/w44 I</i>	G▼TGCAC	<i>Bsu36 I</i>	CC▼TNAGG	<i>Hsp92 I</i>	G(A/G)▼ OG(T/C)C
<i>Apa I</i>	GGGOC▼C	<i>Cfo I</i>	GOG▼C	<i>Hsp92 II</i>	CATG▼
<i>Ava I</i>	C▼(T/C)CG(A/G)G	<i>Cla I</i>	AT▼OGAT	<i>I-Ppo I</i>	CTCTCTTAA▼ GGTAGC
<i>Ava II</i>	G▼G(A/T)OC	<i>Csp I</i>	OG▼G(A/T)CCG	<i>Kpn I</i>	GGTAC▼C
<i>BaI I</i>	TGG▼OCA	<i>Csp 45 I</i>	TT▼OGAA	<i>Mbo I</i>	▼GATC
<i>BamH I</i>	G▼GATCC	<i>Dde I</i>	C▼TNAG	<i>Mbo II</i>	GAAGA(8/7)
<i>Ban I</i>	G▼G(T/C)(A/G)OC	<i>Dpn I</i>	G▼A▼TC	<i>Mlu I</i>	A▼OGCGT
<i>Ban II</i>	G(A/G)GC(T/C)▼C	<i>Dra I</i>	TTT▼AAA	<i>Msp I</i>	C▼OGG
<i>Bbu I</i>	GCA TG▼C	<i>EdHK I</i>	GACNNN▼NNGTC	<i>MspA I</i>	C(A/C)G▼ C(G/T)G
<i>Bcl I</i>	T▼GATCA	<i>Eco47 III</i>	AOG▼GCT	<i>Nae I</i>	GOC▼GGC
<i>Bgl I</i>	GOCNNN▼NNGC	<i>Eco52 I</i>	C▼GGOCG	<i>Nar</i>	GG▼OGCC
<i>Bgl II</i>	A▼GATCT	<i>Eco72 I</i>	CAC▼GTG	<i>Nd I</i>	CC▼(G/C)GG
<i>BsaM I</i>	GATTGCN▼	<i>EcoI CR I</i>	GAG▼CJC	<i>Nco I</i>	C▼CATGG
<i>BsaO I</i>	OG(A/G)(T/C)▼OG	<i>EcoR I</i>	G▼AATTC	<i>Nde I</i>	CA▼TATG
<i>Bsp1286 I</i>	G(G/A/T)GC(C/A/T)▼ C	<i>EcoR V</i>	GAT▼ATC	<i>NgoM I</i>	G▼OCGGC



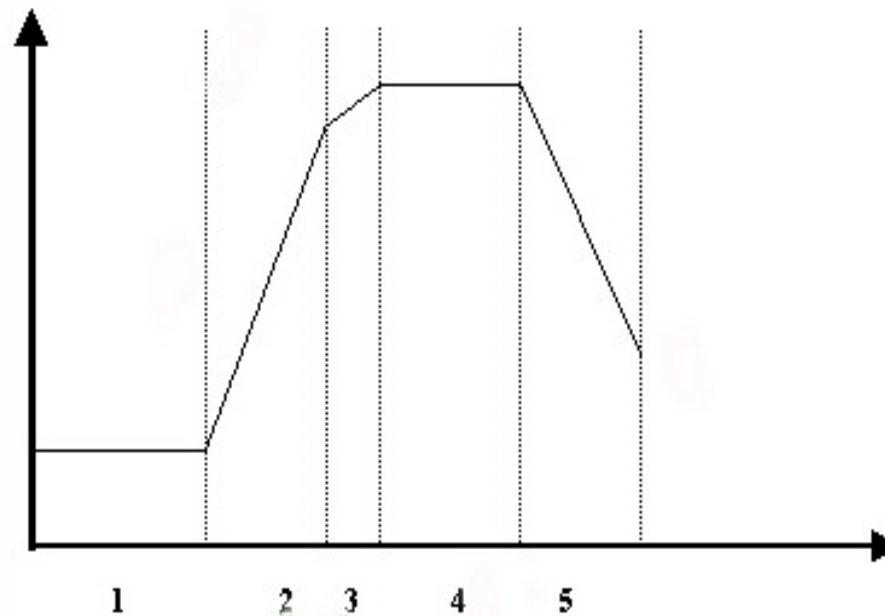
Les bactéries ayant intégré le plasmide recombinant sont inoculées dans 10 ml de milieu LB (Luria Broth, 1% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure et 0,5% de chlorure de sodium) contenant de l'ampicilline à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les cultures sont incubées sous agitation (200 rpm) toute la nuit à 37°C. Ces précultures servent à ensemençer 1 l de milieu de culture supplémenté de l'antibiotique.



Courbe de croissance



Exemple d'une courbe de croissance



- 1 : phase de latence,
- 2 : phase de croissance exponentielle,
- 3 : phase de ralentissement,
- 4 : phase stationnaire,
- 5 : phase de déclin.

I-1 Lyse Cellulaire

Resuspendre le culot bactérien avec de tampon (50 mM Tris-Cl, pH 8 ; 10 mM EDTA, 100 µg/µL RNase A). 5 min



Ajouter 200 mM NaOH ; 1 % SDS
Incuber à t ambiante - 5 min

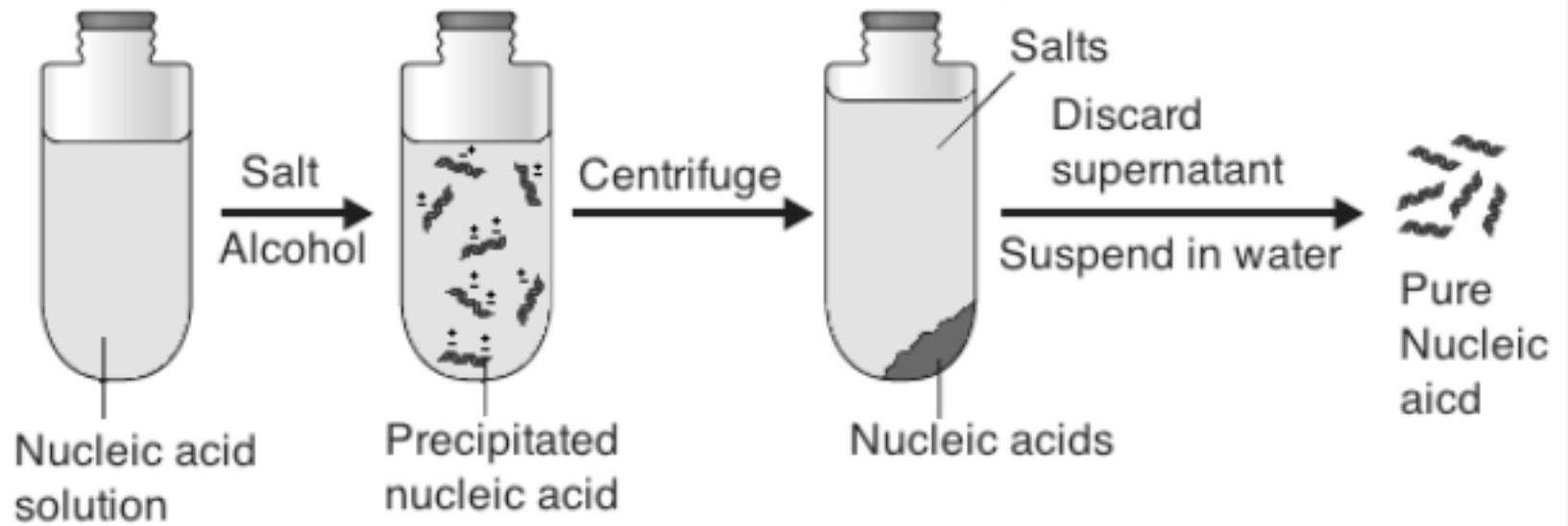


3 M potassium acétate, pH 5,5.- Incuber 4C

I-2 Précipitation



Précipiter l'ADN avec 560 µL d'isopropanol



Précipiter l'ADN avec 560 μ L d'isopropanol



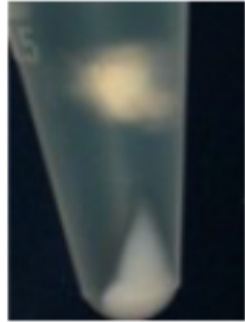
Centrifuger à 18 000 g pendant 30 min.



Laver le culot d'ADN avec 1 mL d'éthanol 70 %.



Reprendre le culot d'ADN dans 20 μ L de tampon d'extraction (10 mM Tris-Cl, pH 8 ; 1 mM EDTA)



I-3 Elution

Ethanol ou Isopropanol ? Utilisez l'éthanol si :

1. Vous avez l'espace nécessaire pour mettre deux volumes d'éthanol à l'échantillon dans votre tube.
2. L'échantillon doit être stocké pendant une longue période de temps.
3. Vous avez besoin de précipiter de très petits fragments d'ADN.

Utilisez l'isopropanol si :

1. Le volume de votre échantillon est important et vous ne pouvez mettre qu'un volume de solvant dans votre tube.
2. Vous avez besoin d'espèces de grand poids moléculaire.
3. La concentration d'ADN dans votre échantillon est faible.
4. Vous êtes pressé et voulez accélérer la précipitation des acides nucléiques à la température ambiante.

Précipitation à l'éthanol :

- Ajouter 60% volumes d'éthanol à l'échantillon et congeler à -20°C pendant au moins 1 heure ou toute la nuit pour de meilleurs résultats.
- Centrifuger l'échantillon à pleine vitesse (20 000 g) pendant 20 minutes pour recueillir tout le matériel.
- Laver avec de l'éthanol à 70 %, puis centrifuger pendant 10 à 15 minutes pour éliminer l'ADN.
- Laissez-le sécher à l'air libre ou utilisez un évaporateur centrifuge (5 minutes suffisent), puis remettez-le en suspension dans le tampon.

Précipitation d'isopropanol :

- Éviter les températures froides en raison de la précipitation excessive de sel qui peut se produire.
- Pour augmenter les rendements précipités, incuber le mélange d'échantillons à température ambiante pendant 15 minutes.
- Le culot est parfois plus difficile à voir que le culot d'éthanol.
- Après le lavage à l'éthanol, le culot devient visible et blanc.
- Assurez-vous qu'il ne glisse pas sur le côté de la paroi du tube avant de décanter le surnageant.
- Laissez-le sécher à l'air libre ou utilisez un évaporateur centrifuge (5 minutes suffisent), puis remettez-le en suspension dans le tampon.

Reprendre le culot d'ADN dans 20 μ L de tampon d'extraction (10 mM Tris-Cl, pH 8 ; 1 mM EDTA)



/56-FAM/CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT
CCC CCT TTT CCC

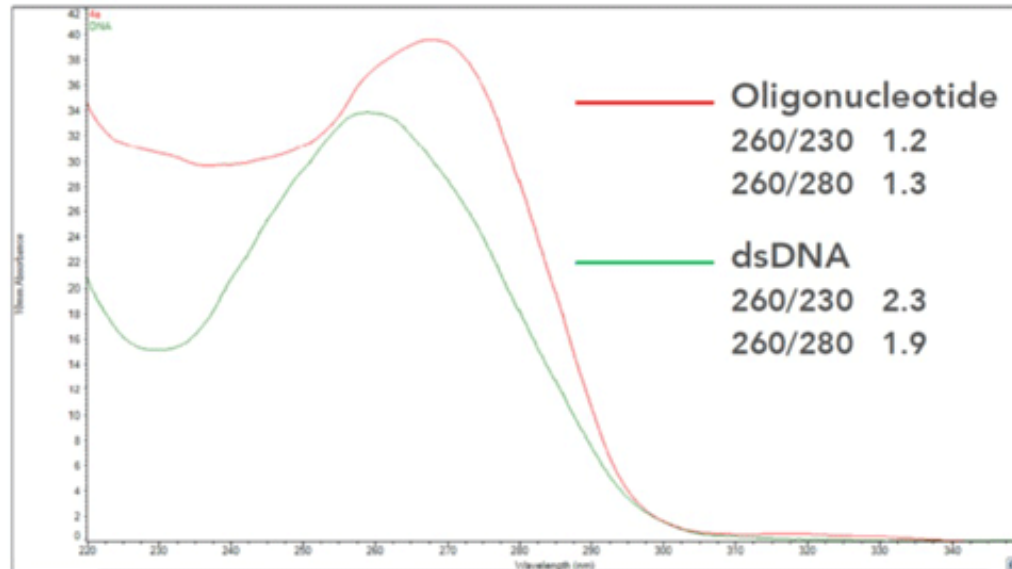


Figure 3. Le spectre d'UV d'un oligonucléotide pur.

Dosage spectrophotométrique d'un ADN purifié

Longueur d'onde (nm)	Absorbance	A260/A280
325	0	-
280	0,28	-
260	0,56	2
230	0,30	-

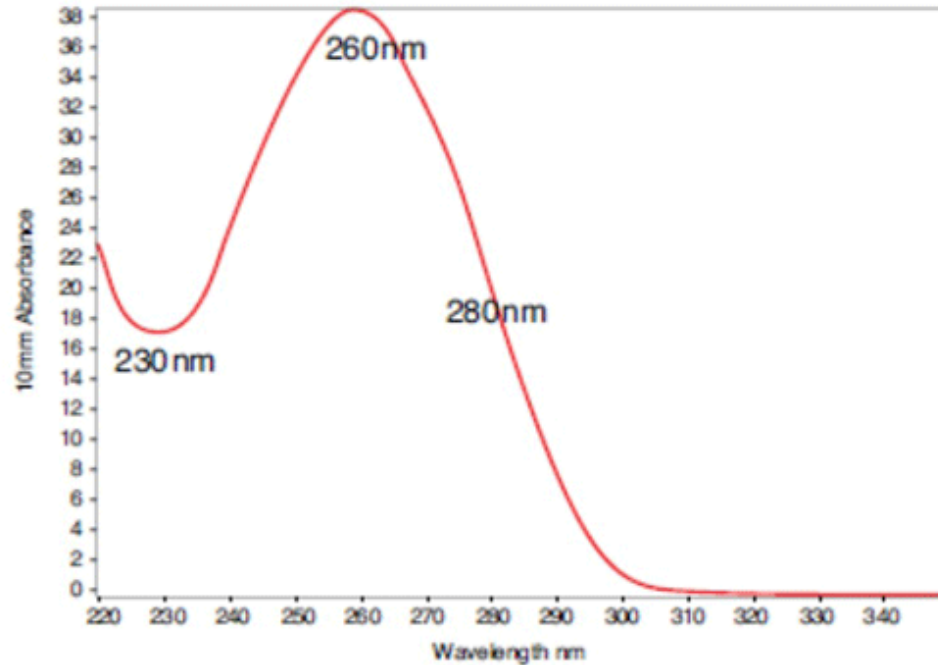


Figure 1. le spectre d'absorption caractéristique d'AND pur

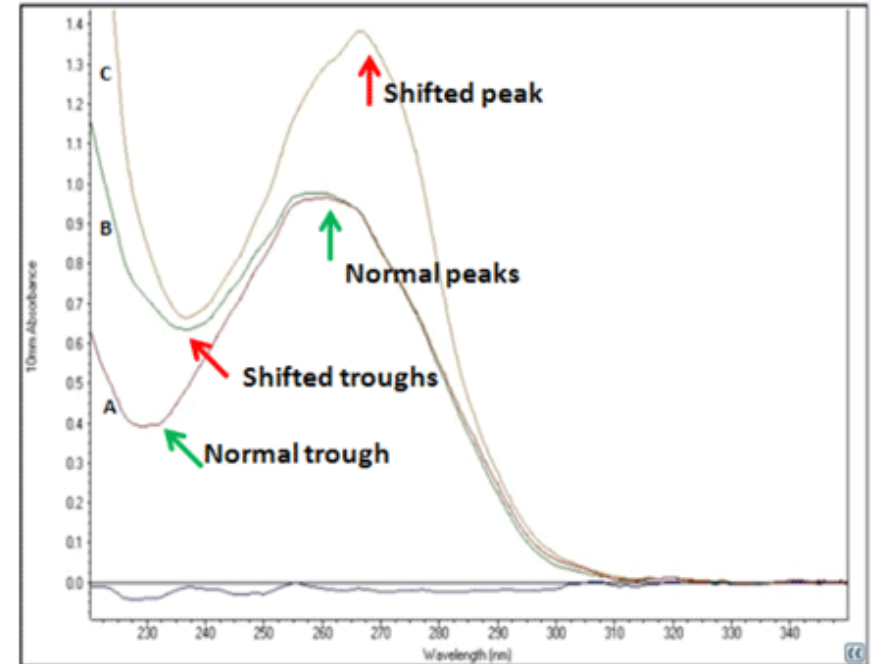


Figure 2. Spectre d'absorption d'ADN purifié.
 A : sans contamination. B: le même ADN avec de la guanidine. C: le même AND avec du phénol.

Point méthodologique : le dosage d'acides nucléiques

En matière de dosage des acides nucléiques, il apparaît fondamental (si vous utilisez un spectrophotomètre) de connaître la fameuse **loi de Beer** où **$A = \epsilon \cdot l \cdot C$**

- A étant l'absorbance (sans unité) et ϵ est le coefficient d'absorption moléculaire (unité : $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- l : la longueur du trajet optique (valeur fixe, donnée par l'épaisseur d'une cuve ou d'un ménisque sur un Nanodrop) (unité : cm)
- C, souvent ce que l'on souhaite déterminer: la concentration d'acides nucléiques (unité : $mol \cdot L^{-1}$)

Cette formule permet d'estimer assez aisément une concentration en acides nucléiques, elle est vérifiée lorsque la solution est de concentration inférieure à : $c < 0,1 mol \cdot L^{-1}$

acides nucléiques	A _{260 nm}	
	$\epsilon (M^{-1} \cdot cm^{-1})$	pour 1 unité absorbance ($\mu g \cdot mL^{-1}$)
ADN db	6200	50
ADN ss	8350	37
ARN	7700	40

standard : température ambiante, l=1cm, A₂₆₀/A₂₈₀ =1,80

Coefficient d'extinction des bases

Nucléotide	λ_{max} (nm) à pH 7,0	$\epsilon_{260\text{nm}}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
5' dAMP	259	15 200
5' dCMP	271	7 050
5' dGMP	252	12 010
5' dTMP	267	8 400
5' dUMP	262	10 000

En pratique, pour chaque séquence d'ADN/ARN, il n'est pas nécessaire de calculer le coefficient d'extinction (ϵ) spécifique. Des coefficients d'extinction estimatifs, acceptés par la communauté scientifique, sont généralement utilisés pour calculer les concentrations des acides nucléiques et qui sont suffisamment précises pour les expériences de biologie moléculaire. Ces coefficients d'extinction sont listés ci-dessous :

- . ADN double brin = $\sim 50 \text{ ng.cm}/\mu\text{l}$
- . ADN simple brin = $\sim 33 \text{ ng.cm}/\mu\text{l}$
- . ARN = $\sim 40 \text{ ng.cm}/\mu\text{l}$

Une exception existe pour les oligonucléotides qui sont en simple brin et dont les séquences sont très courtes. La composition de séquence des oligonucléotides influence significativement l'absorbance contrairement aux ADN/ARN simple brin ou double brin plus longs. La formule ci-dessous est recommandée pour calculer les concentrations des oligonucléotides :

$$C \text{ (pmol / } \mu\text{l)} = A_{260} \times 100 \text{ (} 1,5NA + 0,71NC + 1,20NG + 0,84NT \text{)}$$

Il n'est pas rare d'observer des différences de 5 à 10% parmi les résultats de quantification des oligonucléotides faute d'utiliser un coefficient d'extinction correct. Un exemple de ces variations est donné dans le tableau ci-dessous :

Oligo sequence	Oligo-specific conversion factor (µg/A ₂₆₀)	A ₂₆₀	Concentration using general ssDNA conversion factor 33 (ng/µL)	Concentration using oligo-specific coefficient (ng/µL)	Difference (%)
AAA AAA AAA AAA AAA AAA	25.41	20.75	684.75	527.26	26.0
/56-FAM/CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT TTT CCC	38.18	36.96	1219.68	1411.13	14.6
CTC AAT TGT AGG TAC TAC TTC	32.19	19.97	659.01	642.83	2.5

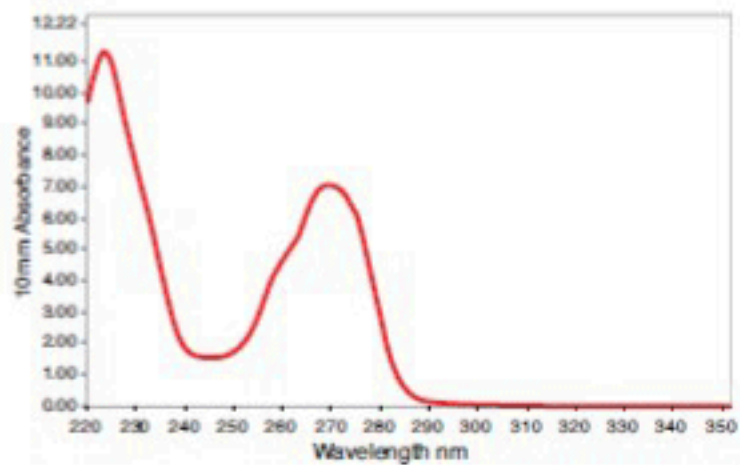
Ratio A260/A280 :

- un ratio de 1,80 (+/- 0,1) permet de qualifier une extraction d'ADN comme pure, ce ratio se situe autour de 2,0 pour une extraction d'ARN (+/- 0,1).
- Si ce ratio est inférieur cela signifie que l'extraction est polluée par des protéines et/ou des composés phénoliques

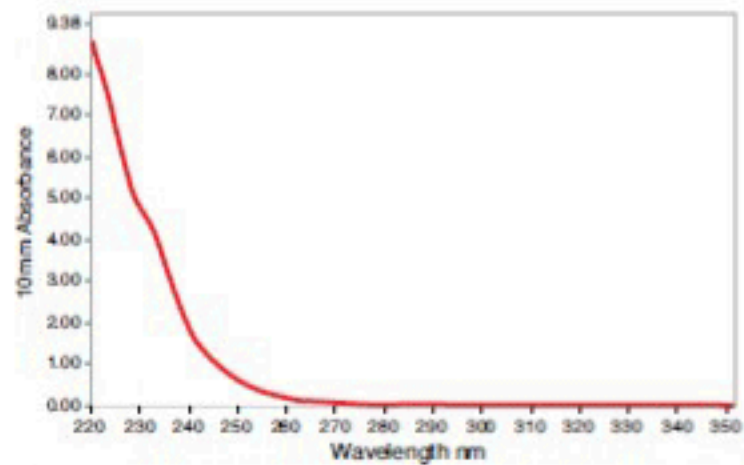
Ratio A260/A230 :

- la valeur attendue de ce ratio se situe entre 2,0 et 2,20.
- Si ce ratio est plus faible cela indique nécessairement qu'un composé absorbe à 230 nm.
- Ces composés peuvent le plus souvent être de l'EDTA, des sucres, et encore une fois le phénol et particulièrement le TRIzol reagent.

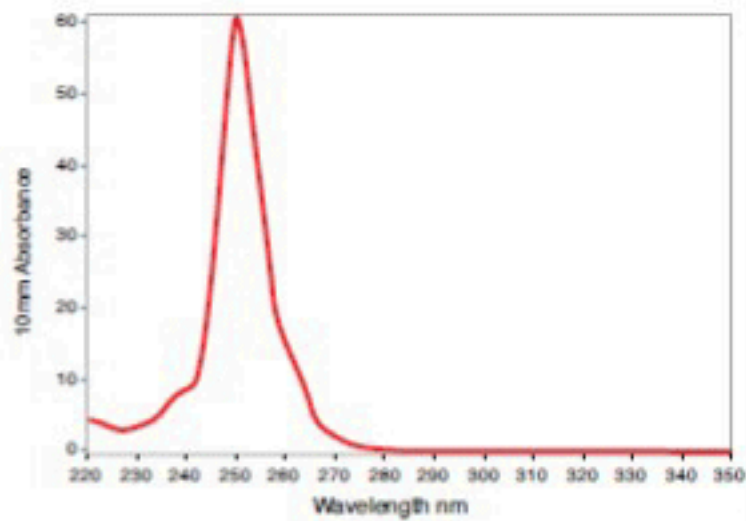
Ces valeurs de ratios peuvent parfois être négligées, cependant elles donnent une indication quant à la présence d'éventuels inhibiteurs qui viendraient perturber le devenir de vos acides nucléiques (PCR et autres réactions enzymatiques). Il est important de réaliser une valeur de blanc sur la solution qui vous aura servi à éluer vos acides nucléiques (car comme il a été précédemment mentionné l'EDTA absorbe à 230 nm... et bien souvent le TE 1X sert à reprendre et conserver des acides nucléiques



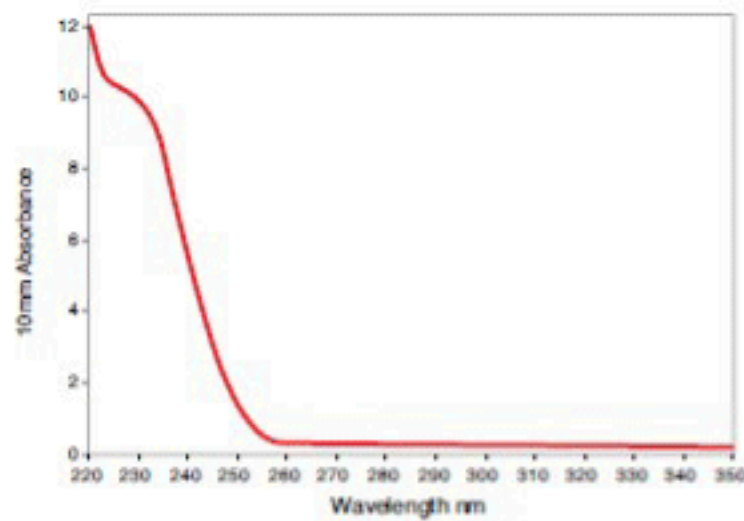
Phenol



EDTA



Guanidine Isothiocyanate



Guanidine HCl

QUANTIFICATION PAR FLUORESCENCE (FLUOROMÉTRIE)

La quantification par fluorescence est une méthode plus sensible que la spectrophotométrie qui permet d'obtenir une sensibilité de l'ordre du $\text{pg}/\mu\text{l}$. De plus, elle est plus spécifique et n'est pas impactée par la présence de contaminants dans la solution d'acides nucléiques. Elle est particulièrement intéressante lorsque la solution contient à la fois de l'ADN et de l'ARN, car elle permet de les quantifier spécifiquement. Mais contrairement à la spectrophotométrie, la fluorimétrie ne permet pas d'analyser la pureté et ni d'identifier des contaminants dans une solution d'acides nucléiques.

Le ratio A260/A280 d'une série de dilution n'est pas toujours constant

Même si la dilution est parfaite, le ratio A260/A280 peut varier à cause du changement de pH suite aux dilutions.

La spectrophotométrie ne permet pas de discriminer les ADN et les ARN dans une même solution

L'absorbance d'une solution est le résultat des absorbances de l'ensemble des acides nucléiques présents. Ainsi, si une solution d'ADN contient de l'ARN ou si des contaminants absorbent à 260 nm, la concentration de l'ADN sera surestimée. Si une solution contient de l'ADN dégradé et non dégradé, la concentration mesurée par la spectrophotométrie correspond aux deux types d'ADN. Il est donc important de traiter les ADN par de la RNase ou les ARN par de la DNase avant la quantification par spectrophotométrie.

Pourquoi la concentration de mon échantillon est-elle négative ?

Ceci peut être dû à l'utilisation d'une solution inappropriée pour effectuer le « blanc » ou bien le « blanc » a été effectué dans une cuvette sale ou sur une surface de piédestal sale. Il est important d'utiliser pour le « blanc » une solution dont la composition et le pH sont les mêmes que ceux utilisés pour les acides nucléiques purifiés.

Mes résultats ne sont pas reproductibles

Votre solution d'acides nucléiques n'est peut-être pas homogène. Les ADN de grandes tailles comme les ADN génomiques peuvent être plus difficiles à dissoudre. Il faut bien mélanger à l'aide d'un vortex la solution contenant ces ADN. Ou bien, les concentrations d'acides nucléiques sont trop faibles ou bien elles sont trop élevées par rapport aux limites de quantification du spectrophotomètre, les mesures ne sont donc pas reproductibles.

Voici les limites de détection des ADN double brins pour les NanoDrop® :

NanoDrop ONE : 2 à 27 500 ng/μl

NanoDrop ONEc : 0,2 à 75 ng/μl en mode cuvette ou 2 à 27 500 ng/μl en mode piédestal

NanoDrop 2000 : 2 à 15 000 ng/μl

NanoDrop 2000c : 0,4 à 75 ng/μl en mode cuvette ou 2 à 15 000 ng/μl en mode piédestal

NanoDrop 8000 : 2,5 à 3750 ng/μl

NanoDrop 1000 : 2 à 3750 ng/μl

La spectrophotométrie permet-elle de quantifier les acides nucléiques marqués par des fluorochromes ?

Oui. Dans ce cas, il est important de prendre en compte l'absorbance à 260 nm des fluorochromes. Le spectrophotomètre NanoDrop® inclut le mode de mesure « Microarray » qui permet de mesurer simultanément les absorbances des acides nucléiques et des fluorochromes et de calculer la concentration de l'acide nucléique.

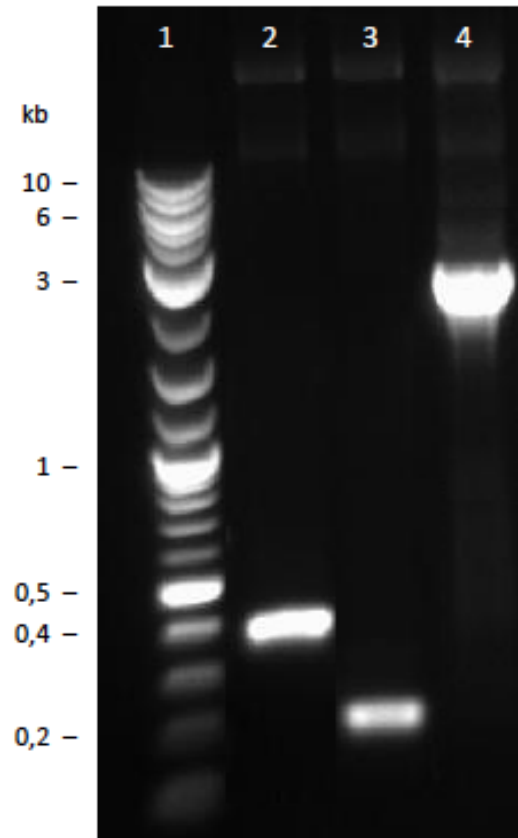


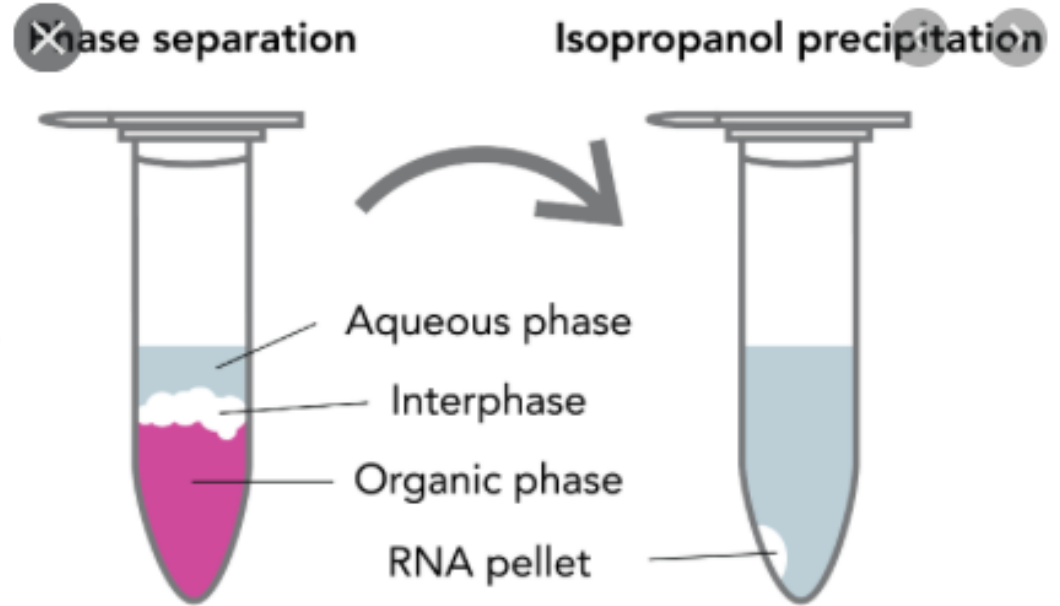
Figure : Electrophorèse sur gel d'agarose 1%. Contrôle de l'intégrité du plasmide recombinant

Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN est réalisé en utilisant la méthode de Sanger. Les résultats de séquençage sont analysés à l'aide du logiciel Chromaspro113 et comparés à des bases de données (NCBI Blast).

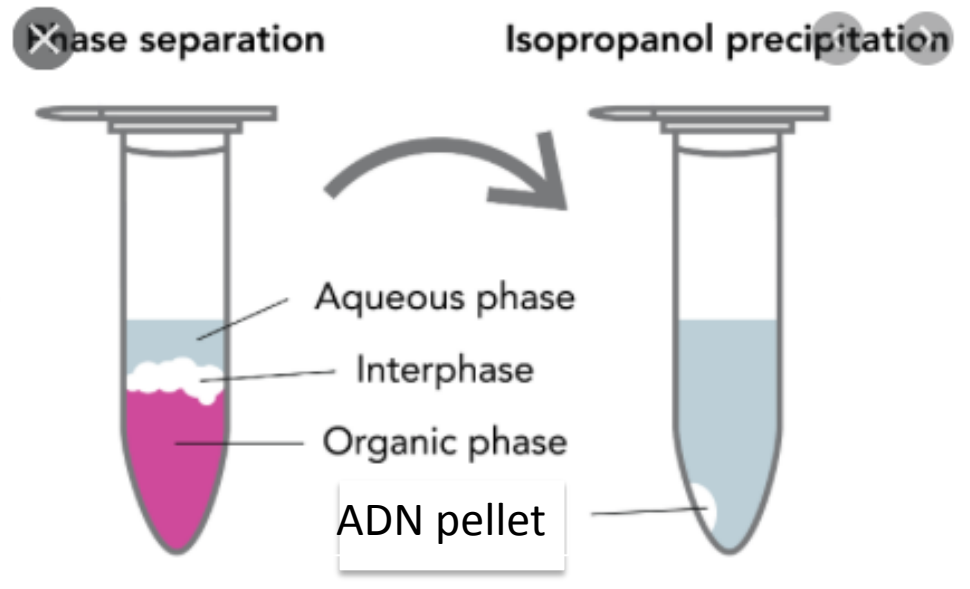
II- Extraction ADN – Trizol

1- Cellules



B- Extraction ADN – Trizol

2- Tissus (poudre)



Réduire en poudre les tissus sous l'azote liquide

La portion d'intérêt prélevée est plongée directement dans de l'azote liquide jusqu'à congélation complète de l'échantillon.

Pour réaliser une extraction des ADN, ARN et protéines, la portion est préalablement réduite en poudre sous azote liquide à l'aide d'un dispositif constitué d'un pilon dans lequel l'échantillon est disposé puis pulvérisé à l'aide d'un maillet.

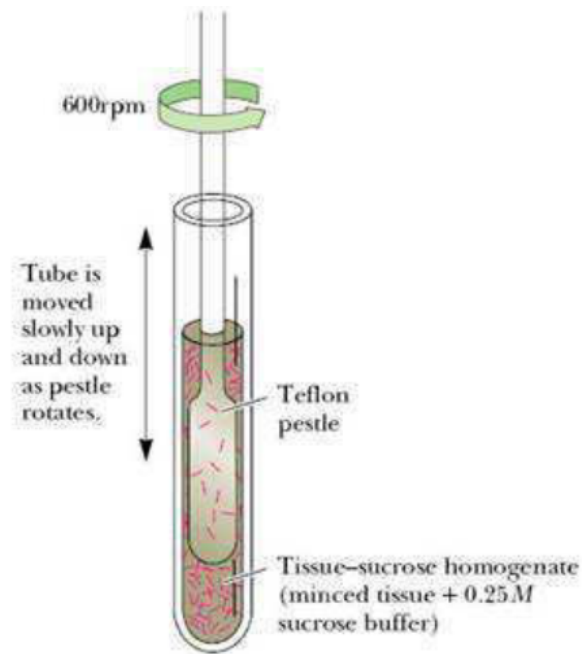
La poudre ainsi obtenue est ensuite conservée à -80 °C .

- Utilisation d'abrasifs :

L'agitation violente en présence de microbilles de verre désintègre les micro-organismes par rupture de la paroi et libération des constituants cytoplasmique.

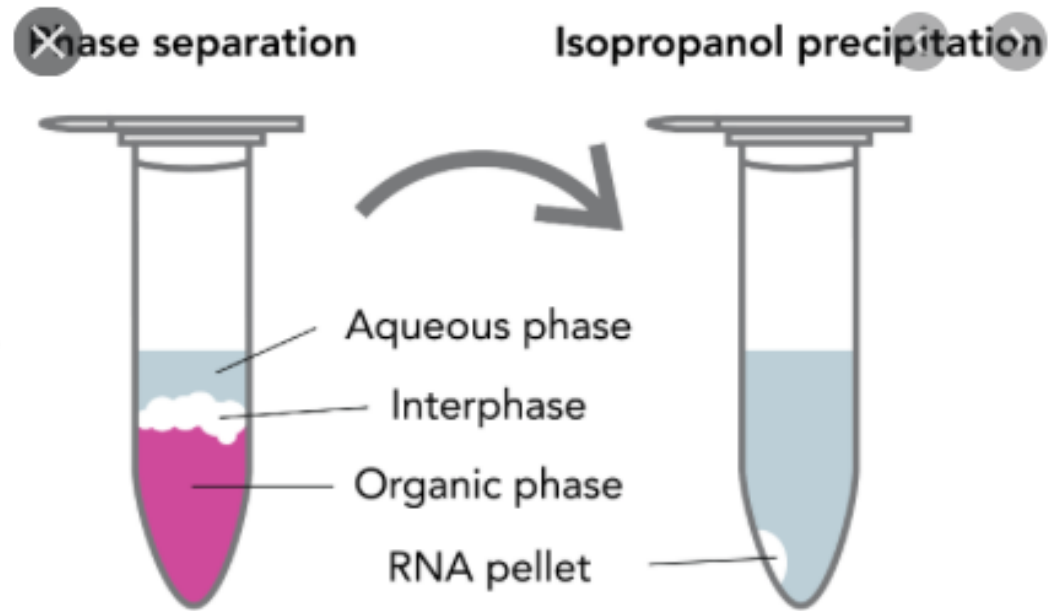
- Extraction par homogénéisation a haute pression :

L'homogénat est obtenu après passage dans un appareil de Potter-Elvehjem



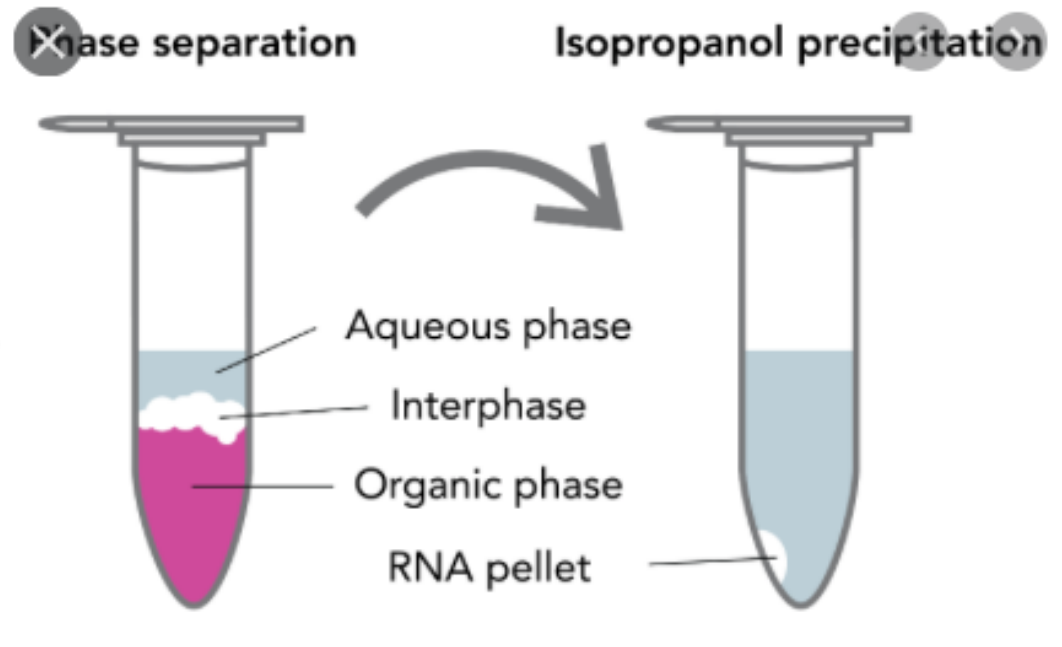
II- Extraction ARN – Trizol

1- Cellules



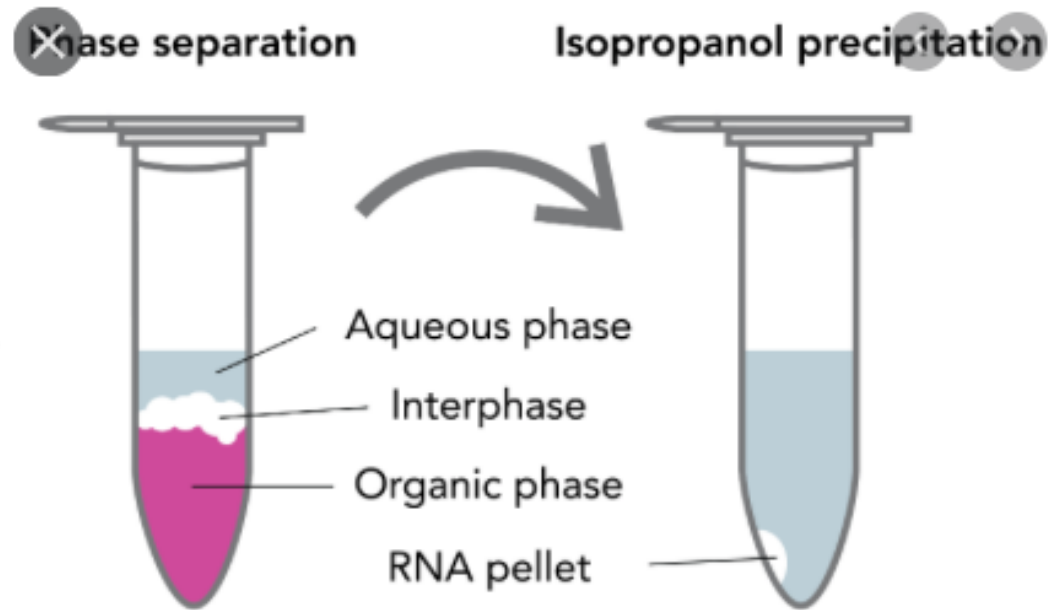
II- Extraction ARN – Trizol

2- Tissus a partir de la poudre



II- Extraction ARN – Trizol

2- Tissus avec ultrathurrax



Analyse quantitative : mesure de la concentration

Spectrophotomètre



Nanodrop



/56-FAM/CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT
CCC CCT TTT CCC

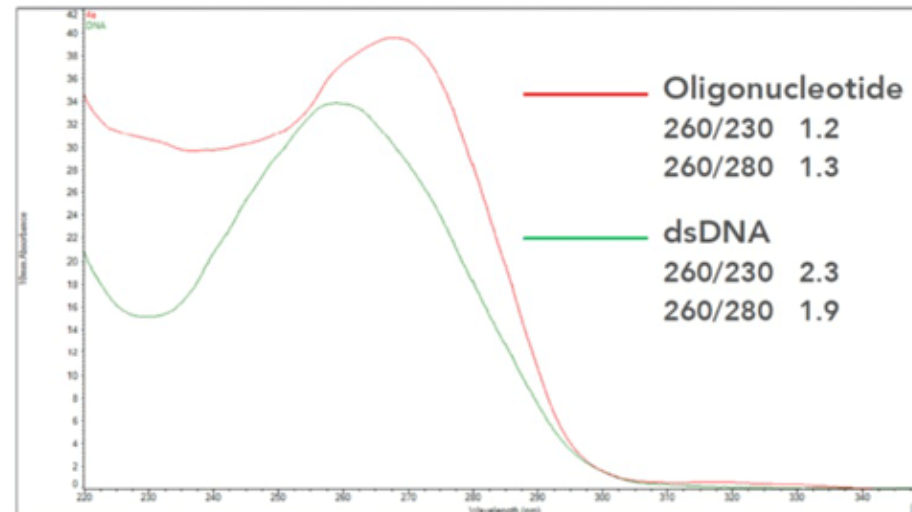


Figure 3. Le spectre d'UV d'un oligonucléotide pur.

TRIzol-based RNA extraction for detection protocol for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019

A. Amirouche^{1,2}, D. Ait-Ali^{2,3}, H. Nouri^{2,4}, L. Boudrahme-Hannou^{3,5,6}, S. Tliba^{3,5,7}, A. Ghidouche^{2,3} and I. Bitam^{8,9}

1) Laboratoire de Biochimie Appliquée, 2) Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 3) Laboratoire de Génie Biologique des Cancers, 4) Laboratoire de Microbiologie Appliquée, 5) Faculté de Médecine, Université de Bejaia, 6) Service des maladies infectieuses, 7) Service de Neurochirurgie, CHU de Bejaia, 8) Ecole Supérieure en Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires (ESSAIA), El Harrach, Alger, Algeria and 9) Aix-Marseille Université, IRD, VITROME, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

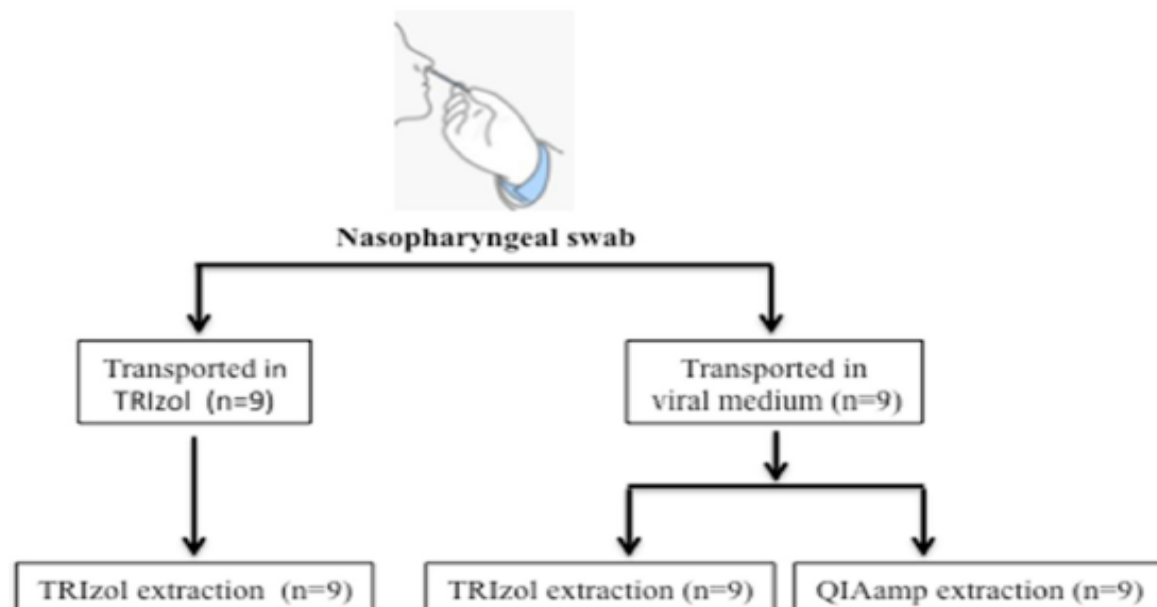
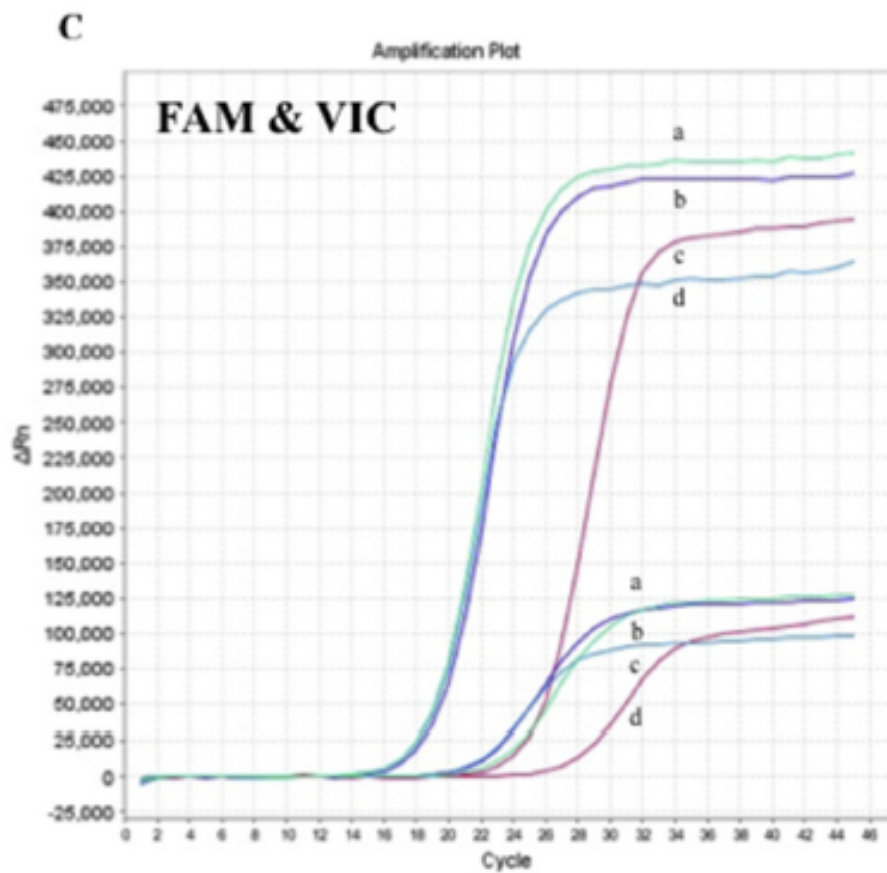
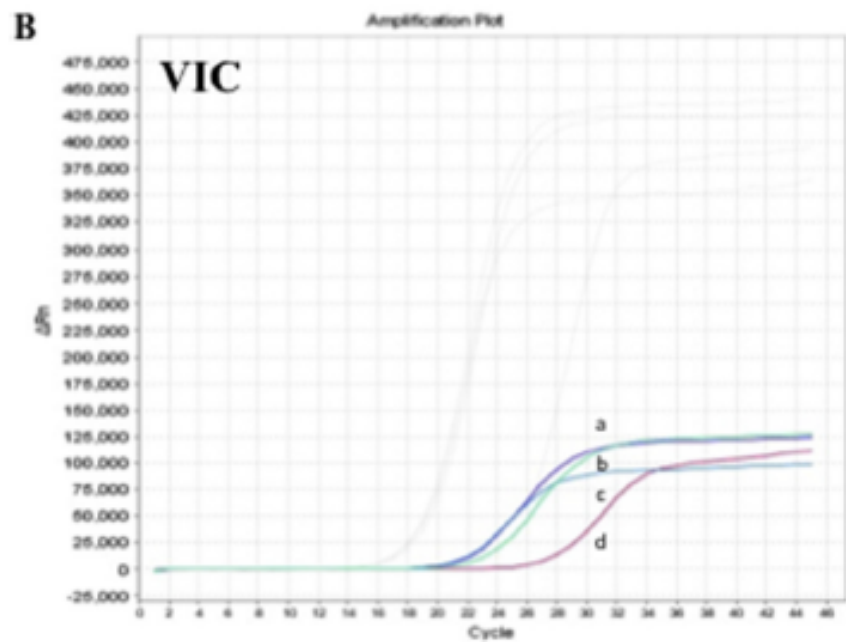
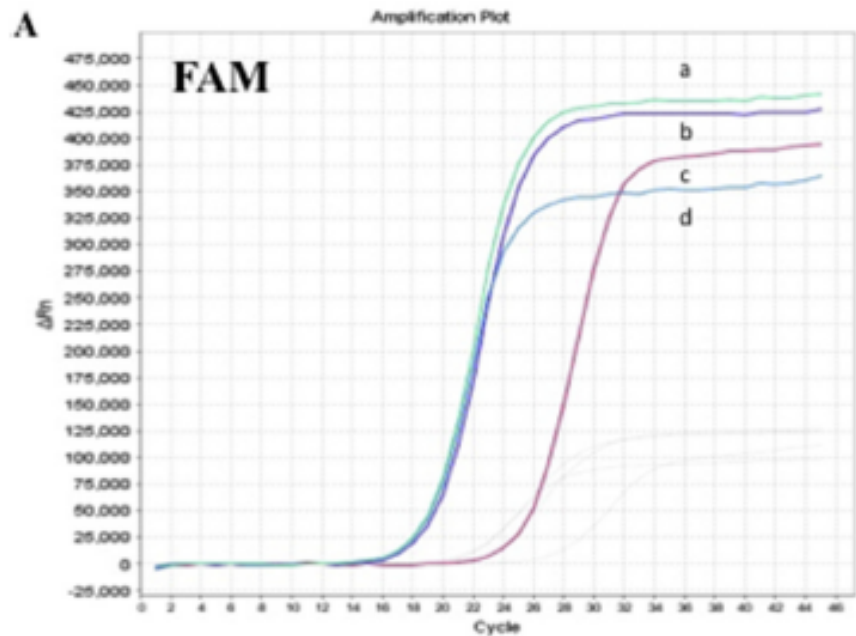


FIG. 1. Experimental design of different RNA extraction methods from human severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) samples. SARS-CoV-2 was confirmed by positive nasopharyngeal swab specimen at hospital admission. For each volunteer, at the same time point, two nasopharyngeal swabs were collected. The first was immediately placed in a 15 mL cone with 2 mL of TRIzol reagent. The second was immersed in viral transport medium.

TABLE 1. RNA yield, purity and time to handle different RNA extraction methods from human sample severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

Method	RNA yield (ng/μL)	RNA purity (260/280)	Time per ten samples (minutes)
TRIzol (<i>n</i> = 9)	104.50 \pm 19.51	1.77 \pm 0.21	45
VMT-QIAamp (<i>n</i> = 9)	82.67 \pm 11.12	1.86 \pm 0.17	30
VMT-TRIzol (<i>n</i> = 9)	49.83 \pm 10.76	1.68 \pm 0.22	45

Abbreviations: TRIzol, TRIzol reagent as transport medium and for RNA extraction; VMT-QIAamp, viral transport medium and QIAamp kit for RNA extraction; VMT-TRIzol, viral transport medium and TRIzol for RNA extraction.



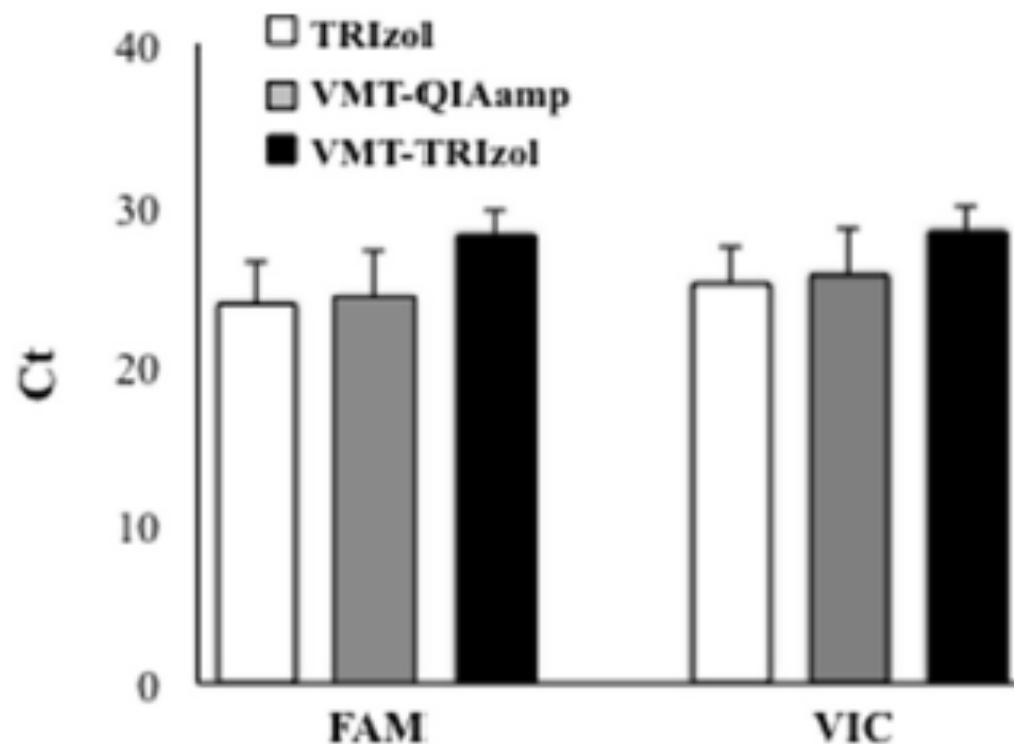


FIG. 3. Determination of detection efficiency of real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Average cycle threshold (Ct) values were compared between different procedures. Abbreviations: TRIzol, TRIzol reagent as transport medium and for RNA extraction; VMT-QIAamp, viral transport medium and QIAamp kit for RNA extraction; VMT-TRIzol, viral transport medium and TRIzol for RNA extraction. Values are expressed as mean \pm standard error.