

TUT'RENTREE 2013 / 2014
UE11

Méthodes d'étude et analyse du génom



Présentation

- ✧ L'épreuve d'UE11 dure **10 petites minutes** le jour du concours
- ✧ **2 cours de 2h** enseignés par S. **Bannwarth** et V. **Paquis-Flucklinger**
- ✧ Contrairement à la Biomol', il y a des **RONEOS**

OBJECTIFS

- ✧ Connaître les principales techniques de Biologie Moléculaire
- ✧ Comprendre ses applications en génétique médicale

Les principales techniques de Biologie Moléculaire

- ✧ **Analyse** à partir du support de l'IG: **ADN** ou **ARN**
- ✧ De n'importe quel type **de cellule nucléée** (ATTENTION GR !!!)
- ✧ Quelques **microgrammes** suffisent car techniques **sensibles +++** :
- Diagnostic possible à partir d'1 cellule
- Risque de **contamination élevé** donc précaution à prendre

1. Extraction d'ADN

A partir de sang, d'une cellule, d'un cheveu ...

Cas à partir de sang :

A- Prélèvement de sang sous anti-coagulant (EDTA)

B- Lyse des GR avec solution **HYP**Otonique

C- Récupération des GB après centrifugation qu'on resuspend dans un mélange détergent (lyse membrane plasmique) + protéinases K (lyse protéines)

D- Extraction au phénol-chloroforme : séparation ADN/protéines restantes en 2 phases non-miscibles (solubilité différentielle des molécules)

- Ajout du phénol-chloroforme
- Agitation puis centrifugation
- Récupération de la **phase aqueuse** avec l'ADN

E- Précipitation à l'éthanol froid (-20° C) avec **SEL**

- Ajout de sel et d'éthanol 95° froid
- Apparition d'une **méduse d'ADN**
- Méduse lavée à l'éthanol 70°
- Conservation dans DNAtèque à 4°C

2. Extraction d'ARN

+ délicat car ARN très sensible aux ribonucléases (Rnases A); - utilisée, permet d'analyser l'expression du gène

A- Homogénéisation des cellules/du tissu dans un tampon qui :

- Inhibe les Rnases endogènes
- Dénature les acides nucléiques
- Dégradent les protéines

B- Extraction par **précipitation différentielle** entre ARN et ADN

Extraction des ARN polyA

C- Passage des ARN dans une colonne d'oligo-dT permettant la fixation des ARN polyA (purification par affinité)

D- Elution (abaissement force ionique)

E- Précipitation à l'alcool éthylique absolu froid

3. Amplification par PCR

Objectif : Obtention en grande quantité/Amplification d'une région d'ADN à étudier

Fragment d'ADN double brin de 150pb à 3kb

Attention : Il n'est pas nécessaire de connaître la séquence de la région à amplifier : les bornes d'amont et d'aval doivent par contre être connues (18-20nuc)

ADN polymérase spécifique thermorésistante (Taq)

- Très sensible
- Risque de contamination élevé

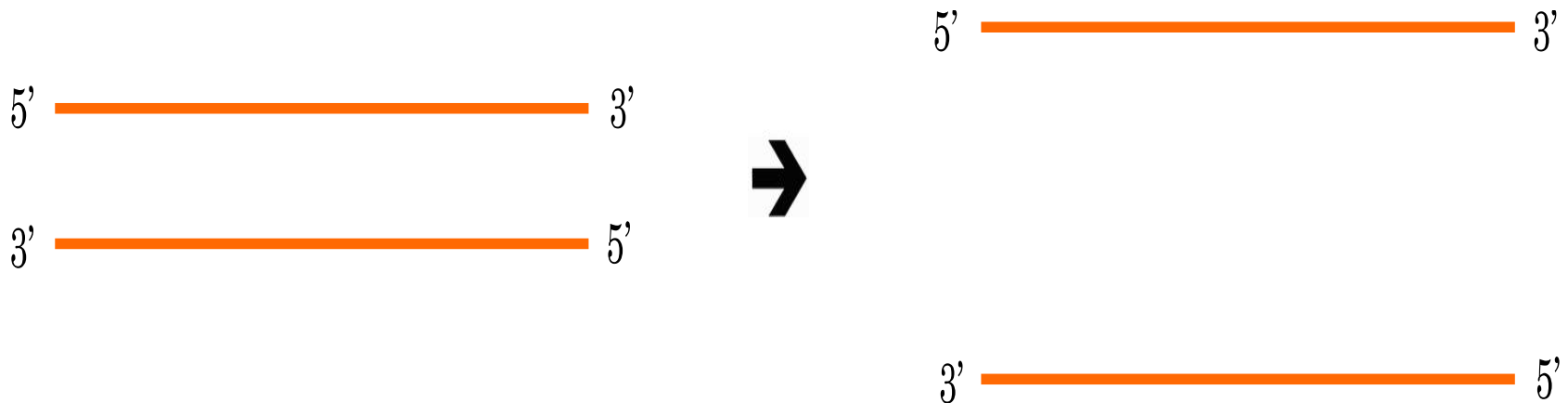
3 étapes se succèdent (n cycles)

A- Dénaturation

B- Hybridation des amorces

C- Elongation

A- Dénaturation = Séparation des 2 brins



B- Hybridation des amorces/primers

Amorces : oligonucléotides simple brin de 18-20 nucléotides

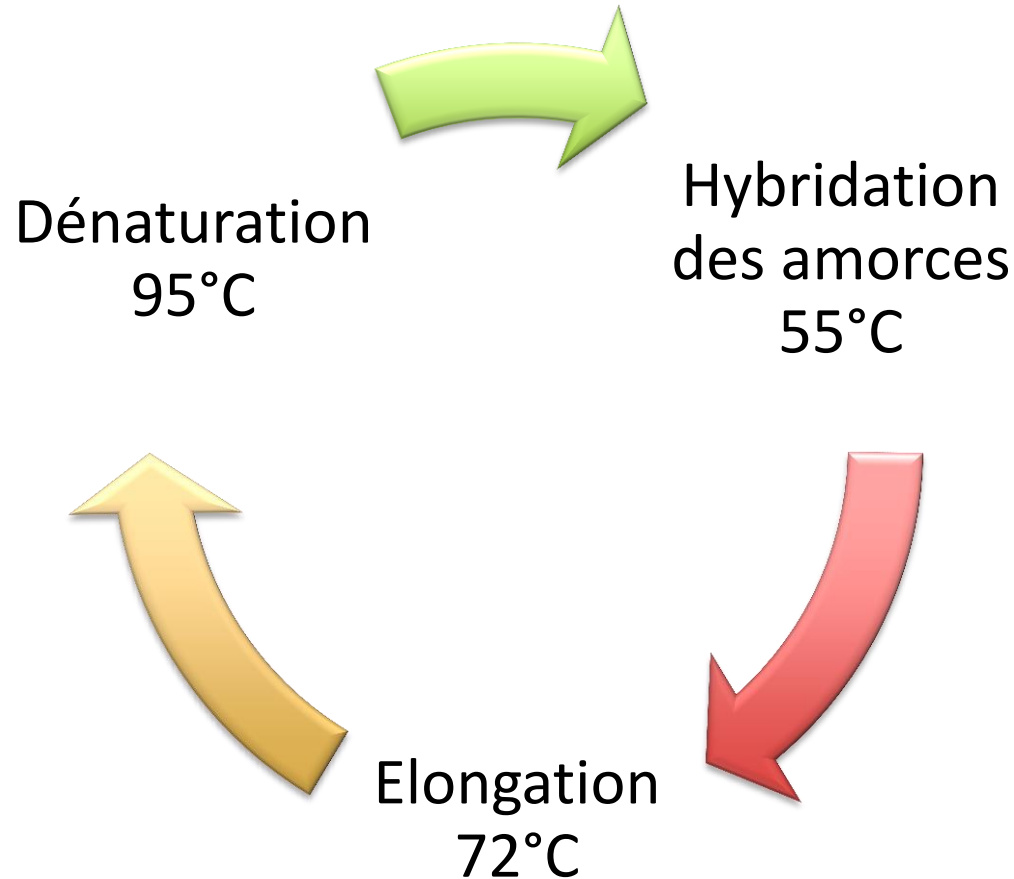


C- Elongation = Synthèse du nouveau brin complémentaire au brin matrice



On obtient 2^n molécules au bout de n cycles

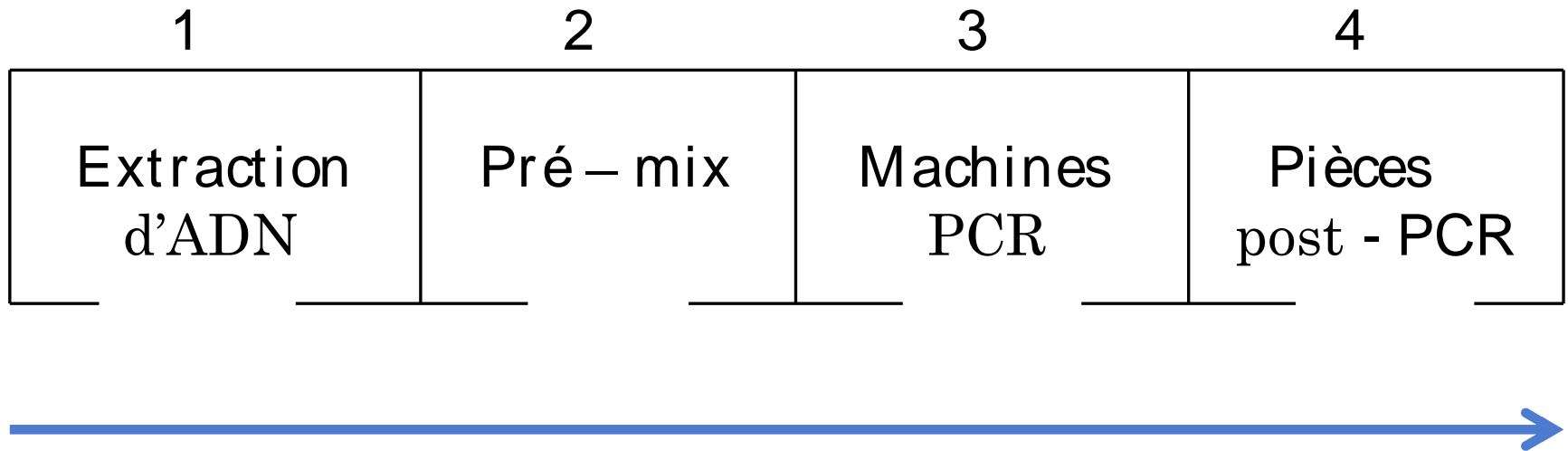
Dans l'automate : ADN du patient, amorces, désoxynucléotides, Taq polymérase, tampon ($MgCl_2$)





Les risques de contamination sont très élevés :

-> **circuit mono-directionnel** constitué de 4 chambres



Le matériel ne doit pas revenir dans les chambres précédentes !

QCM 1

A propos des principales techniques de biologie moléculaire, donnez la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) L'information moléculaire génétique ne peut être analysée qu'à partir de l'ADN
- B) La quantité d'échantillon nécessaire pour l'analyse est très faible (ordre du microgramme) car les techniques de biologie moléculaire sont très spécifiques
- C) Le principal risque de ces techniques est la destruction des acides nucléiques
- D) Ces techniques sont applicables pour n'importe quelle cellule en dehors des globules rouges
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

Correction QCM 1

A propos des principales techniques de biologie moléculaire, donnez la ou les réponse(s) exacte(s) :

A) L'information moléculaire génétique ne peut être analysée qu'à partir de l'ADN

B) La quantité d'échantillon nécessaire pour l'analyse est très faible (ordre du microgramme) car les techniques de biologie moléculaire sont très spécifiques

C) Le principal risque de ces techniques est la destruction des acides nucléiques

D) Ces techniques sont applicables pour n'importe quelle cellule en dehors des globules rouges

E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

QCM 2

A propos de l'amplification PCR, donner la ou les réponse(s) vraie(s) :

- A) Cette méthode permet d'obtenir une grande quantité d'une région précise de l'ADN
- B) Il est nécessaire de connaître la borne d'aval ou la borne d'amont, mais pas la séquence complète de la région
- C) On utilise des enzymes dites thermorésistantes
- D) L'amplification PCR se fait en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

Correction QCM 2

A propos de l'amplification PCR, donner la ou les réponse(s) vraie(s) :

- A) Cette méthode permet d'obtenir une grande quantité d'une région précise de l'ADN
- B) Il est nécessaire de connaître la borne d'aval ou la borne d'amont, mais pas la séquence complète de la région
- C) On utilise des enzymes dites thermorésistantes
- D) L'amplification PCR se fait en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

4. Electrophorèse

Objectif : Vérification de la PCR

Gel d'agarose

Champ électrique

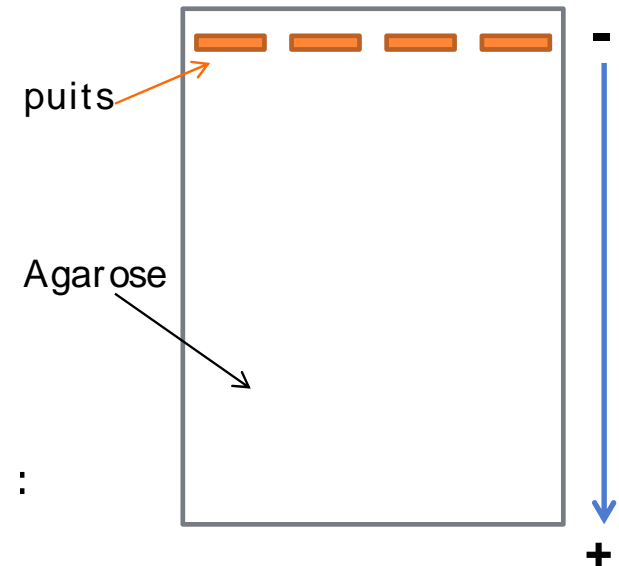
Puits avec amplicons

Vitesse de migration fonction de :

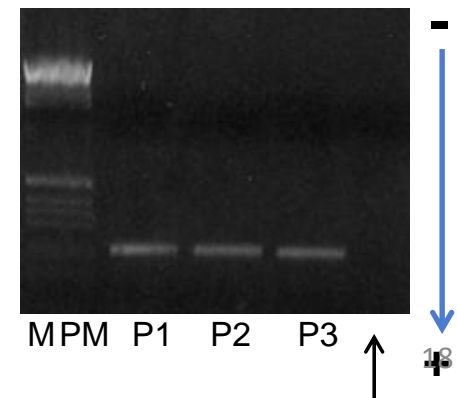
- Masse moléculaire (nb pb)
- Concentration en agarose du gel

Après migration :

- Coloration au bromure d'éthidium
- Visualisation sous UV



:



5. Digestion enzymatique par une enzyme de restriction

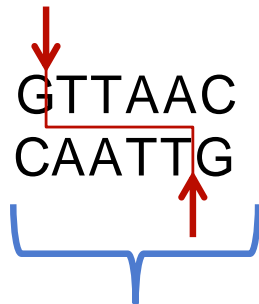
Endonucléase bactérienne qui coupe l'ADN double brin

Coupure spécifique et reproductible d'une séquence nucléotidique
3 types d'enzymes de restriction (coupure à distance ou non)

-> Enzyme de restriction de type II :

- Reconnaissance de 4 à 8 pb
- Coupure au niveau de la séquence reconnue (II)
- Séquence palindromique

Exemple :
Eco RI



Séquence Palindromique

GCCATT
CGGTAA

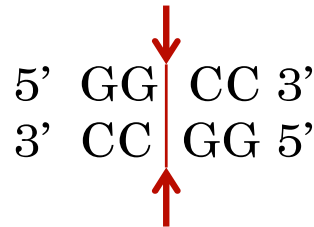


Séquence non - palindromique

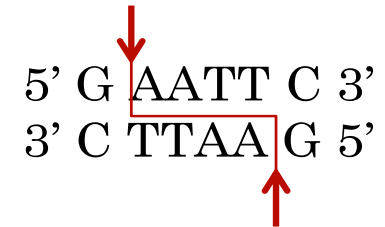
Enzyme de restriction de type II

2 types de coupure:

A bouts francs :



A bouts cohésifs :



Remarques :

- Séquences palindromiques
- Pas d'association spontanée possible (T4 ligase)

Application en Génétique Médicale

- Diagnostic de maladies monogéniques
- Un grand nombre de techniques
- Evolution technologique rapide
- ...

Exemple de l'Achondroplasie

Maladie génétique : mutation du gène FGFR3 (K4)

La + **fréquente** des chondrodysplasies

Diagnostic évoqué sur signe d'appel
échographique (fémurs courts)

Petite taille, membres courts, hyperlordose, mains
courtes, macrocéphalie, front haut, ensellure
nasale marquée



Intelligence normale !

Complication neurologique (myélopathie)

Diagnostic radiologique



Transmission autosomique **dominante**

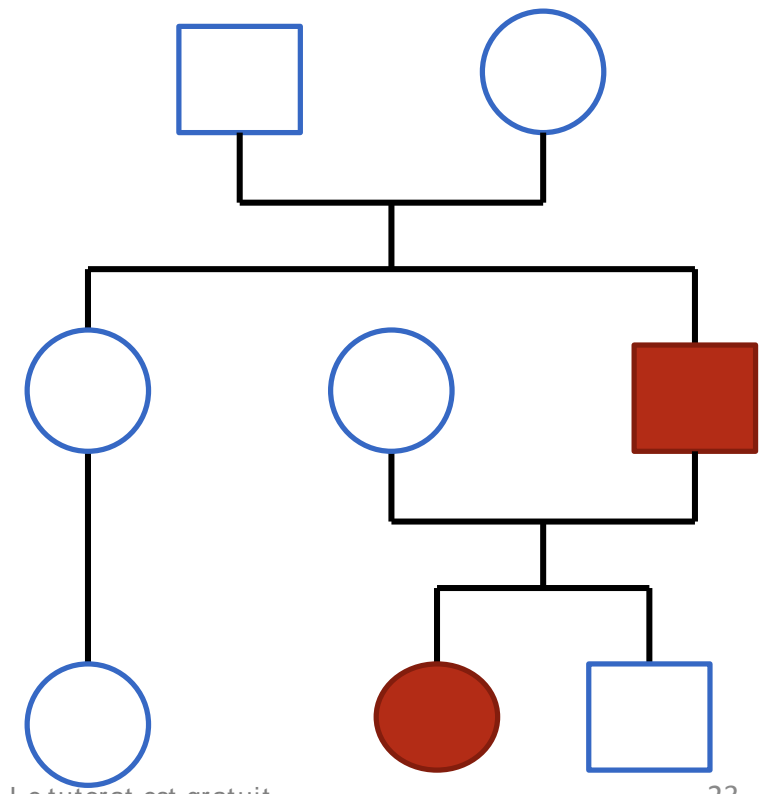
90% des enfants malades naissent de parents non-atteints -> **NEOMUTATIONS**

Forme + grave chez les homozygotes

Parents sains

Un enfant malade hétérozygote
-> néomutation

Un petit-enfant malade
Un petit-enfant sain
-> Parent hétérozygote



Gène responsable (FGFR3) code pour le RC d'un **facteur de croissance fibroblastique** qui régule la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse

2 mutations (**substitutions**) différentes au niveau du même nucléotide (position 1138/codon380) :

Séquence sans mutation : TAC ³⁷⁹ GGG ³⁸⁰ GTG ³⁸¹
Gly

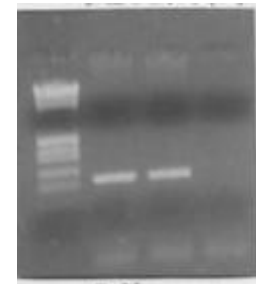
Séquences mutées : TAC **AGG** GTG OU TAC **CGG** GTG

Arg Arg

G → A G → C

Devant un signe d'appel échographique :

- 1- Extraction d'ADN à partir de cellules amniotiques
- 2- Amplification (PCR) d'un fragment de 164pb encadrant la position 1138
- 3- Vérification des amplicons sur électrophorèse
- 4- Digestion des amplicons par 2 enzymes:
 - > si G > A : Bmfl
 - > si G > C : Hpall

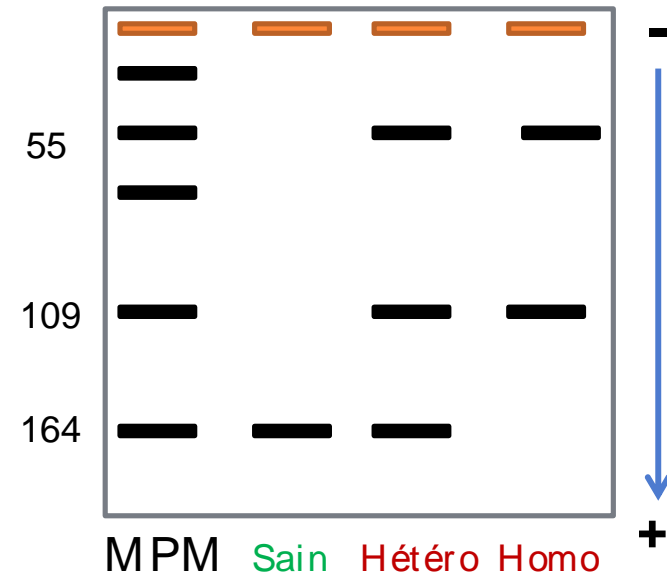


← 164pb

Si l'une ou l'autre des enzymes coupe le fragment de 164pb, c'est qu'il y a reconnaissance de la séquence mutée provoquant l'achondroplasie -> individu malade.

Mutation **G** > **A** -> *Bfml*

- Si sain : 164 pb
- Si malade hétérozygote : 164 + 55 + 109
- Si malade homozygote : 55 + 109



Mutation **G** > **C** -> *HpaII*

- Si sain : 164 pb
- Si malade hétérozygote : 164 + 55 + 109
- Si malade homozygote : 55 + 109

Remarque : à partir du nombre de fragments, on sait s'il y a mutation ou non mais on ne sait pas laquelle !

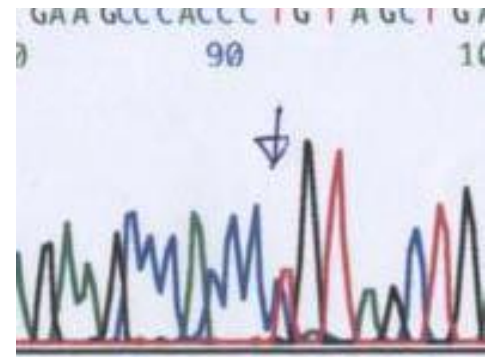
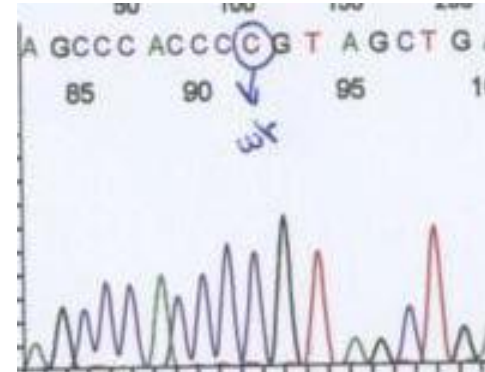
5- Vérification par séquençage

Séquencer : connaître la succession des nucléotides sur la séquence étudiée

- Wild – type : 5' ... TAC **G**GG GTG ... 3'
3' ... ATG **C**CC CAC ... 5'

- Mutation **G** > **A** : 5' ... TAC **A**GG GTG ... 3'
3' ... ATG **T**CC CAC ... 5'

Remarque : deux pics (T et C) car hétérozygote



On séquence le brin complémentaire !

QCM 3

Quelles sont les caractéristiques que l'on ne retrouve pas dans l'achondroplasie :

- A) Hyperlordose
- B) Macrocéphalie
- C) Complication neurologique
- D) Front bas
- E) Des myelopathies

Correction QCM 3

Quelles sont la ou les caractéristique(s) que l'on ne retrouve pas dans l'achondroplasie :

- A) Hyperlordose
- B) Macrocéphalie
- C) Complication neurologique
- D) Front bas
- E) Des myelopathies

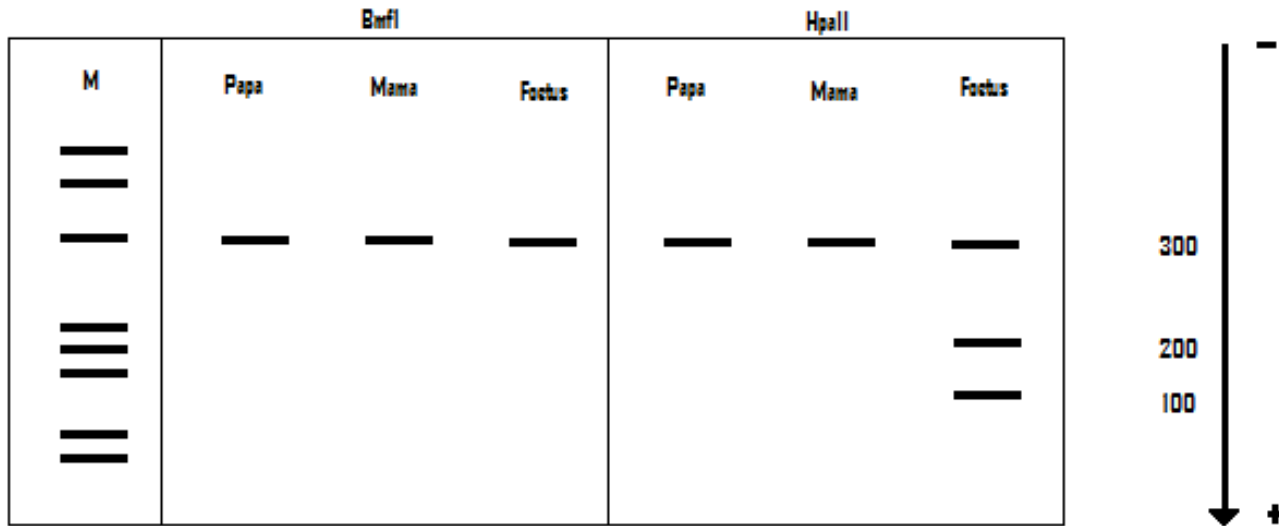
QCM 4

Après signe d'appel échographique, on suspecte chez un fœtus une achondroplasie. On amplifie alors un fragment de 300pb du gène FGFR3 à partir d'ADN extrait des lymphocytes des 2 parents et du liquide amniotique. Le fragment amplifié comporte le nucléotide (position 1138) qui s'avère être muté en cas d'achondroplasie :

- Si la mutation est 1138G>A, Bmfl coupe l'amplicon en 2 fragments de 100 et 200pb**
- Si la mutation est 1138G>C, HpaII coupe l'amplicon en 2 fragments de 100 et 200pb**

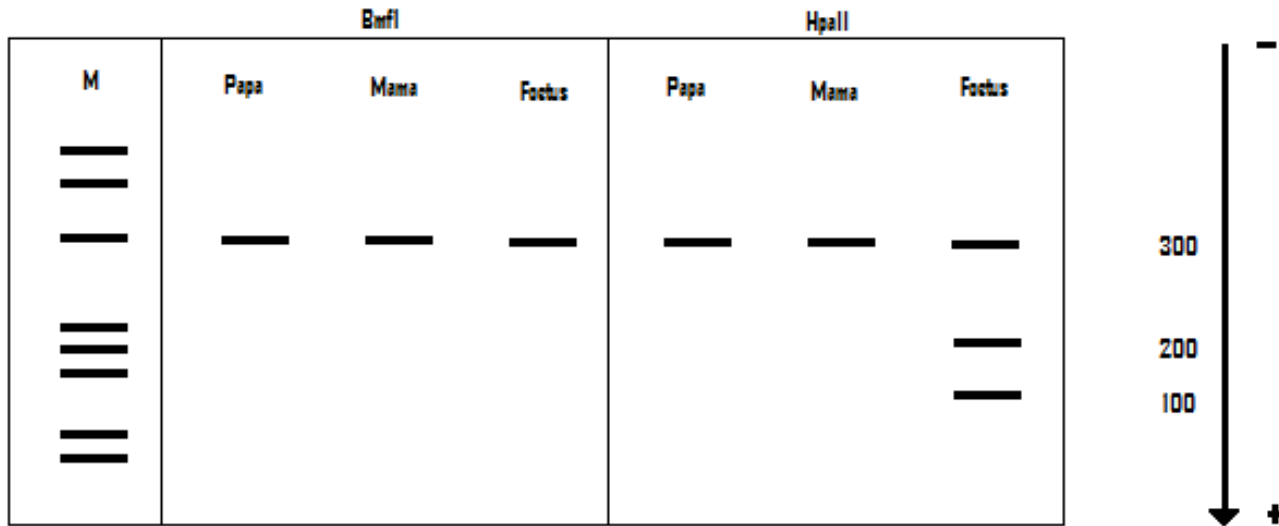
Le gel ci-dessous est obtenu après digestion des produits d'amplification par les deux enzymes et migration électrophorique.

QCM 4



- A) Sur l'échographie, le fœtus avait le signe des fémurs courts
- B) Le foetus est atteint d'achondroplasie par la mutation 1138G>C à l'état homozygote
- C) Le foetus est atteint d'achondroplasie par la mutation 1138G>A à l'état hétérozygote
- D) Les parents ont transmis la maladie à leur enfant
- E) Aucune de ces réponses n'est correcte

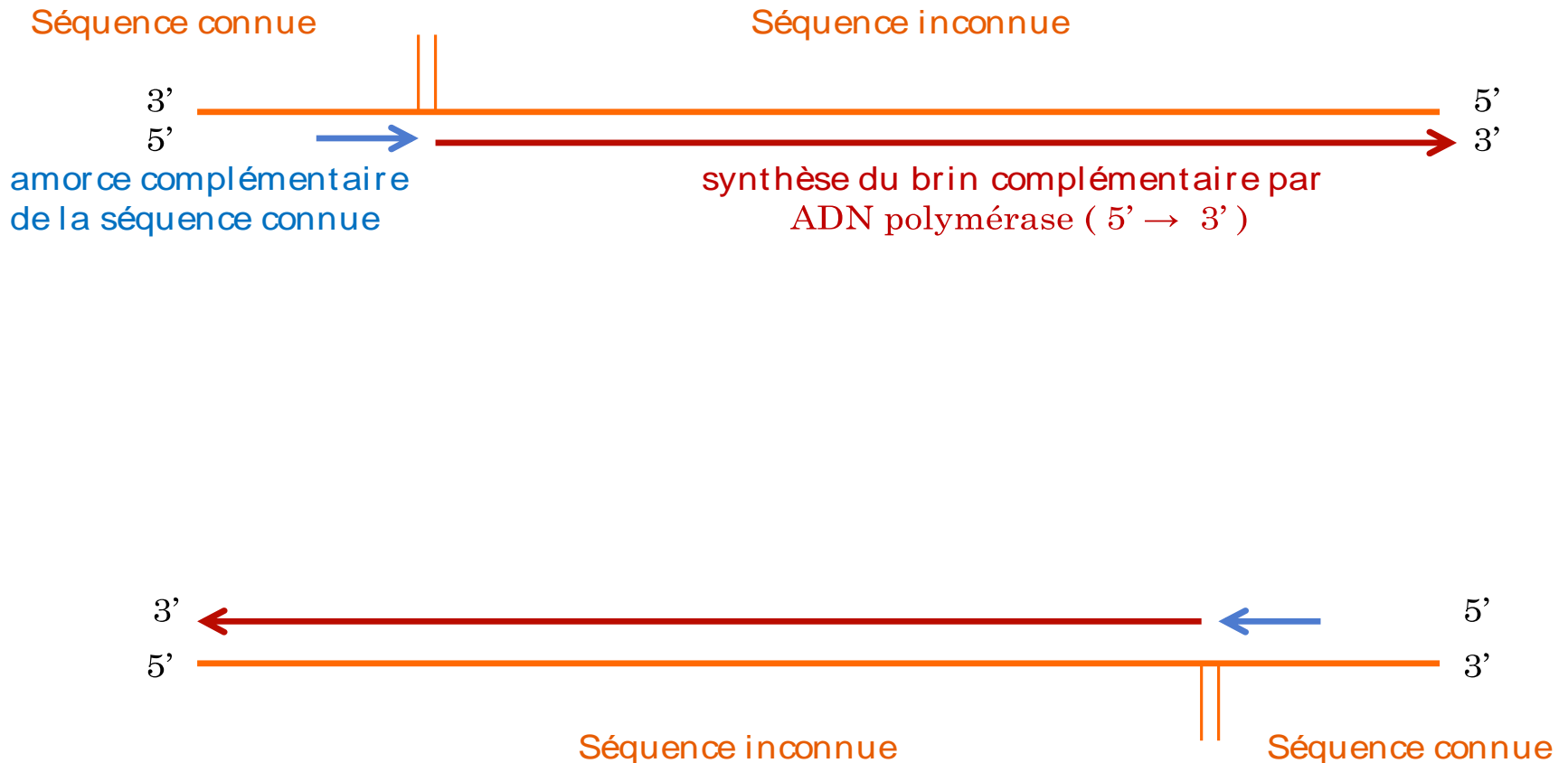
Correction QCM 4



- A) Sur l'échographie, le fœtus avait le signe des fémurs courts
- B) Le foetus est atteint d'achondroplasie par la mutation 1138G>C à l'état homozygote
- C) Le foetus est atteint d'achondroplasie par la mutation 1138G>A à l'état hétérozygote
- D) Les parents ont transmis la maladie à leur enfant
- E) Aucune de ces réponses n'est correcte

Le séquençage de l'ADN

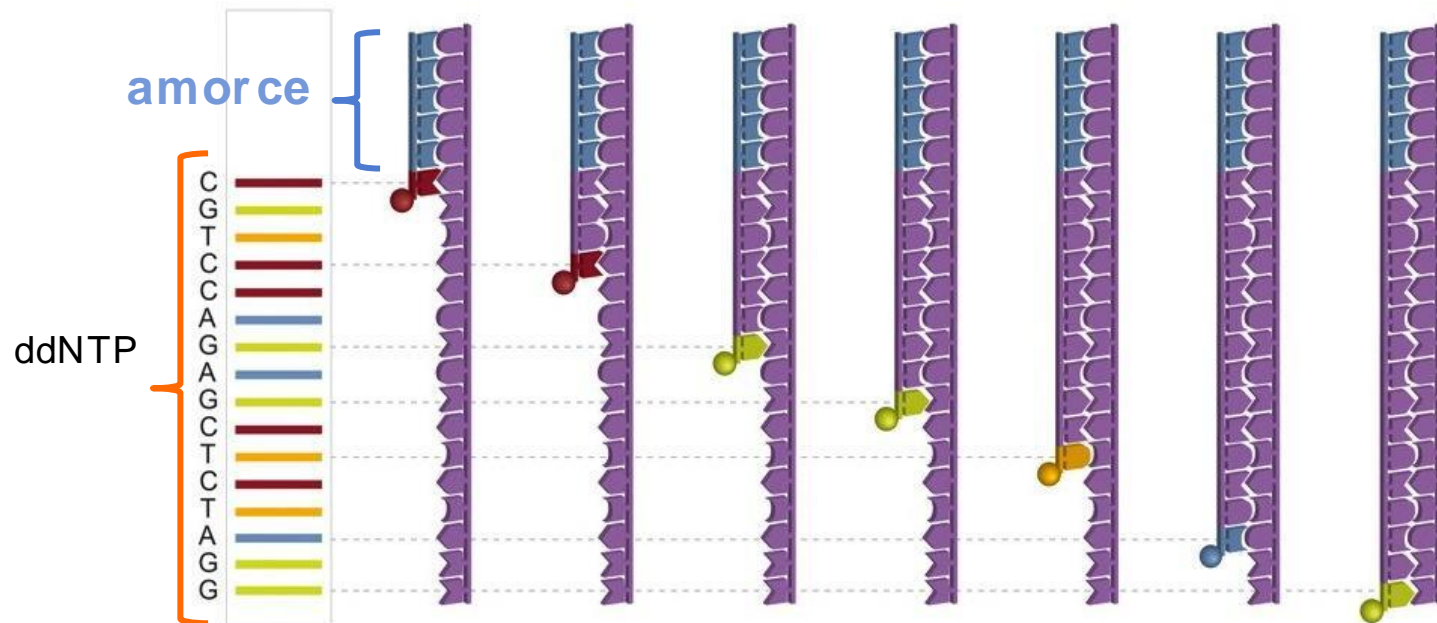
Principe général :



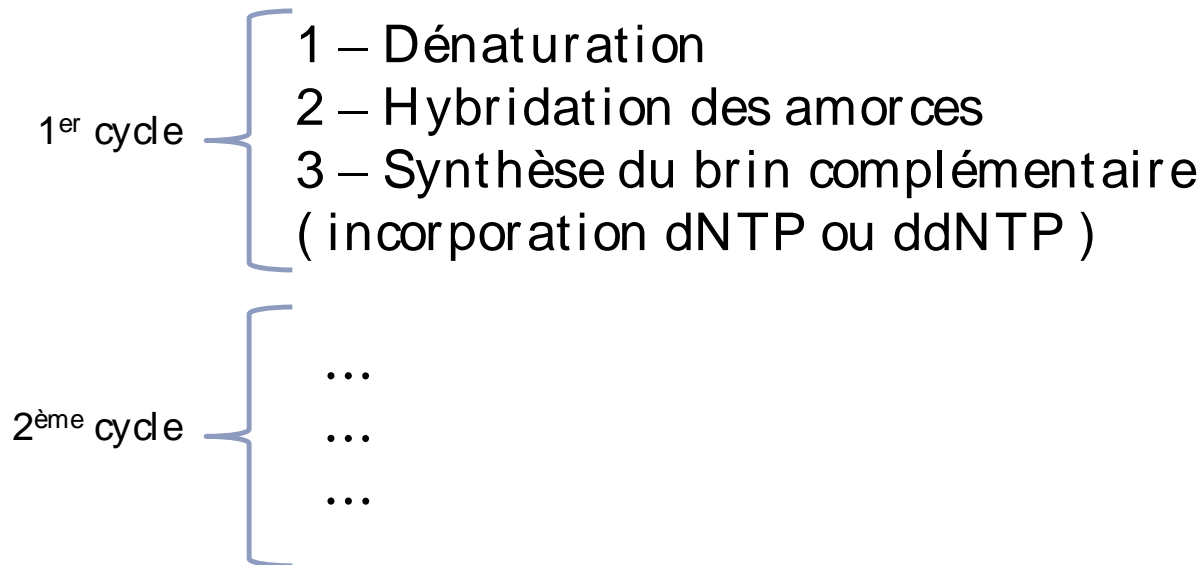
Méthode enzymatique des di-désoxynucléotides (Méthode de Sanger)

L'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire (à partir d'une **amorce**) en incorporant au hasard des dNTP ou des ddNTP.

Les ddNTP sont couplés à un fluorochrome (chacun de couleur différente) et leur incorporation stoppe l'**élongation** du nouveau brin.



Cycles successifs :



-> Obtention de tous les brins (toutes les tailles)

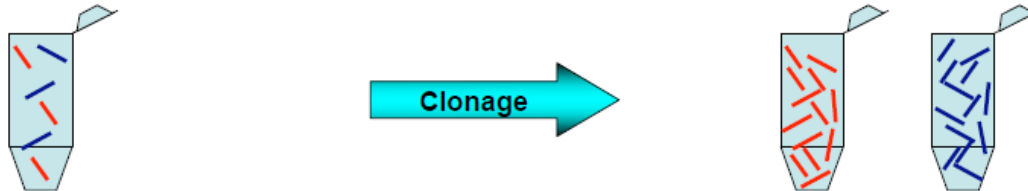
-> Lecture des derniers ddNTP par ordre croissant de taille des brins obtenus (aujourd'hui, séquenceur automatique qui détecte les fluorochromes)

-> Séquençage

Le clonage moléculaire

Objectif : obtenir un grand nombre de copies identiques et absolument pures d'une séquence donnée d'ADN

→ Permet la séparation de la population mutée et de la population saine



Principe en 4 étapes :

- 1- Préparation de l'ADN recombinant (=Vecteur + Insert)
- 2- Introduire le vecteur dans une cellule hôte (bactéries)
- 3- Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens
- 4- Obtenir un fragment d'ADN pur en grande quantité

1. Préparation de l'ADN recombinant

Le vecteur : ADN double brin circulaire

- Capable de se répliquer de façon **autonome** (= répllication épisomale)
- ADN de **petite taille** permettant l'insertion d'un fragment d'ADN étranger (insert)
- Possède des **gènes de sélection** permettant de différencier les cellules hôtes qui ont intégrées le vecteur



Ne pas confondre :
l'ADN plasmidique et l'ADN bactérien !



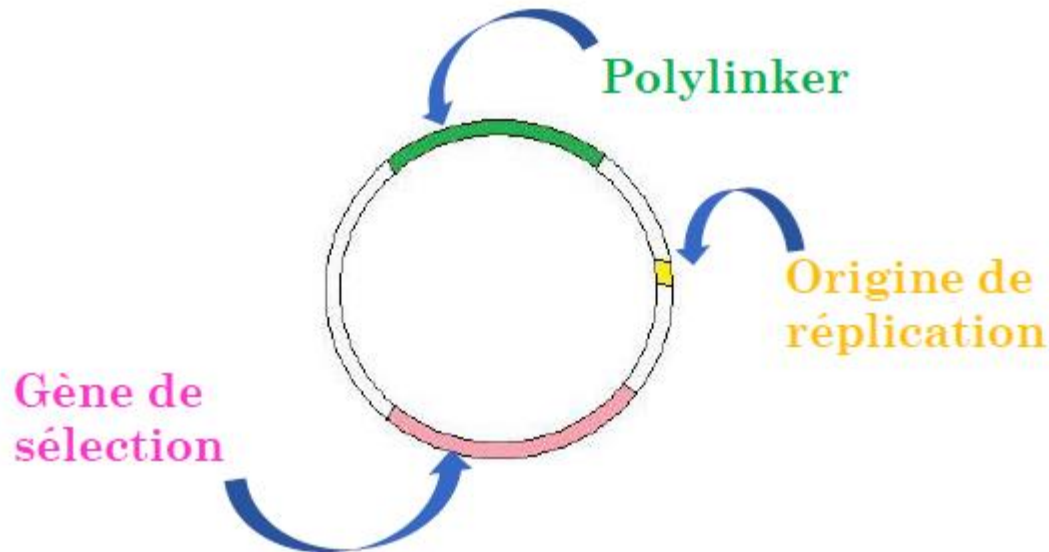
- Deux grandes catégories de vecteur :

- Vecteur de clonage : destiné à isoler physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et à amplifier le nombre de copies de cet ADN
- Vecteur d'expression : destiné à transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote

Il existe différents types de vecteurs en fonction de leur **taille**, le plus petit étant le plasmide (dont on parlera le plus)

3 zones :

- Origine de réplication
- Gène de sélection (le plus souvent, gène de résistance à un antibiotique : l'ampicilline)
- Polylinker : là où les enzymes de restriction vont couper

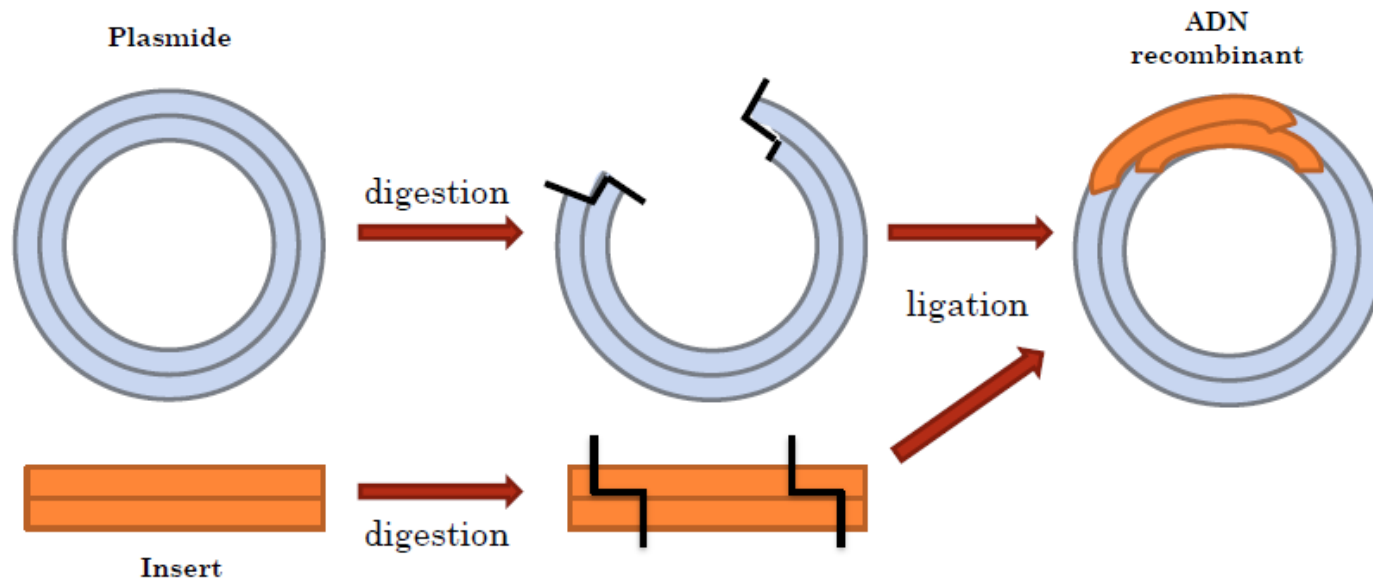


L'insert : fragment d'ADN que l'on veut copier

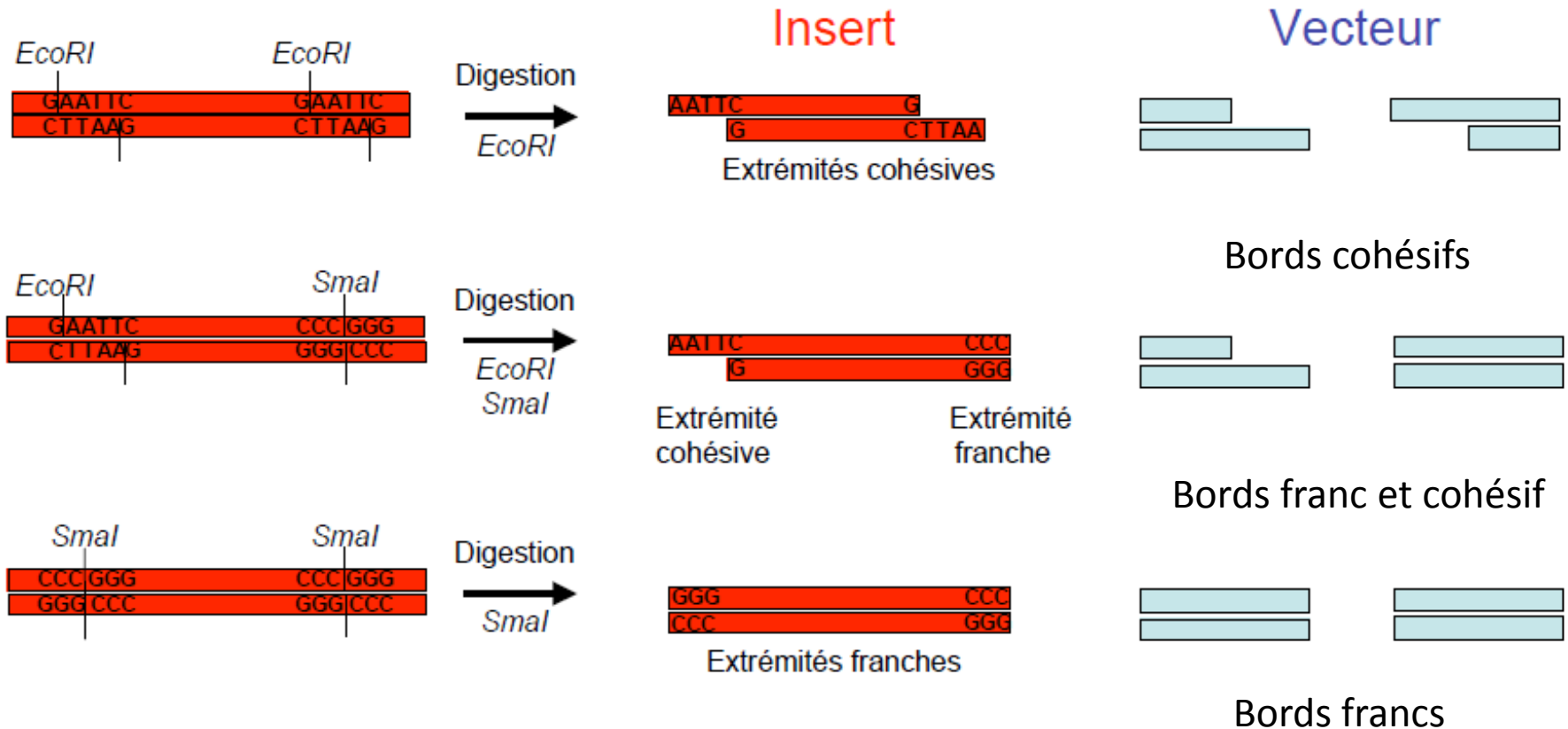
→ Soit produit par PCR

→ Soit produit par une reverse transcriptase

Pour que les extrémités du vecteur et de l'insert soient compatibles, il faut qu'ils soient digérés par la **même enzyme de restriction**



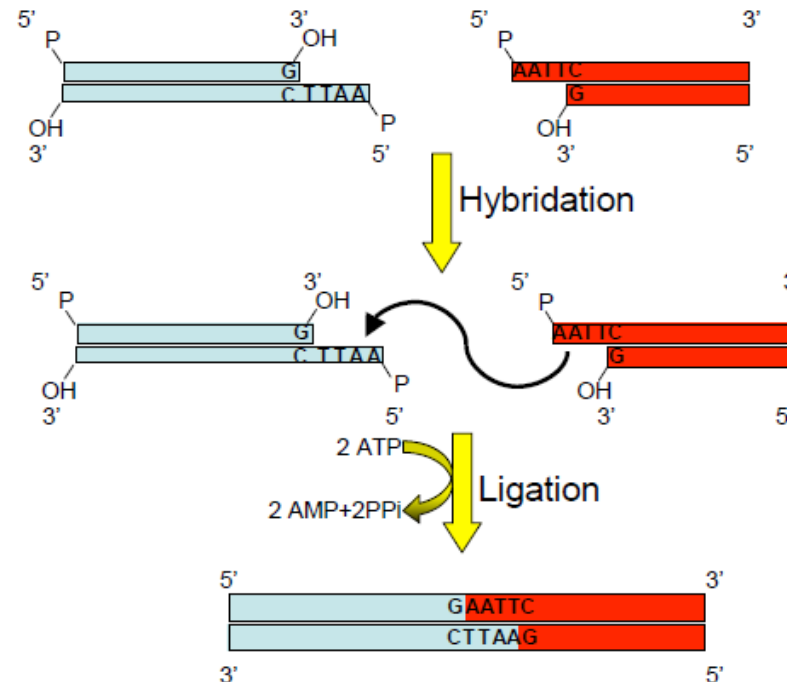
- En fonction des enzymes de restriction :



Dans le cas des **bords cohésifs**, l'appariement vecteur – insert est **facilité** par la **complémentarité**

- La ligation :

Par la T4 DNA ligase : enzyme qui catalyse la formation d'une **liaison phosphodiester** entre un 3'OH et un 5'Phosphate en présence d'ATP et d'ions divalents



La ligase n'intervient pas dans l'hybridation !

QCM 5

A propos du clonage moléculaire, donner la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Il permet la séparation de population mutée et saine
- B) Le vecteur est la portion d'ADN que l'on veut étudier
- C) L'insert est toujours produit par PCR
- D) L'insert est inséré au niveau de la zone polylinker du vecteur
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

Correction QCM 5

A propos du clonage moléculaire, donner la ou les réponse(s) exacte(s) :

A) Il permet la séparation de population mutée et saine

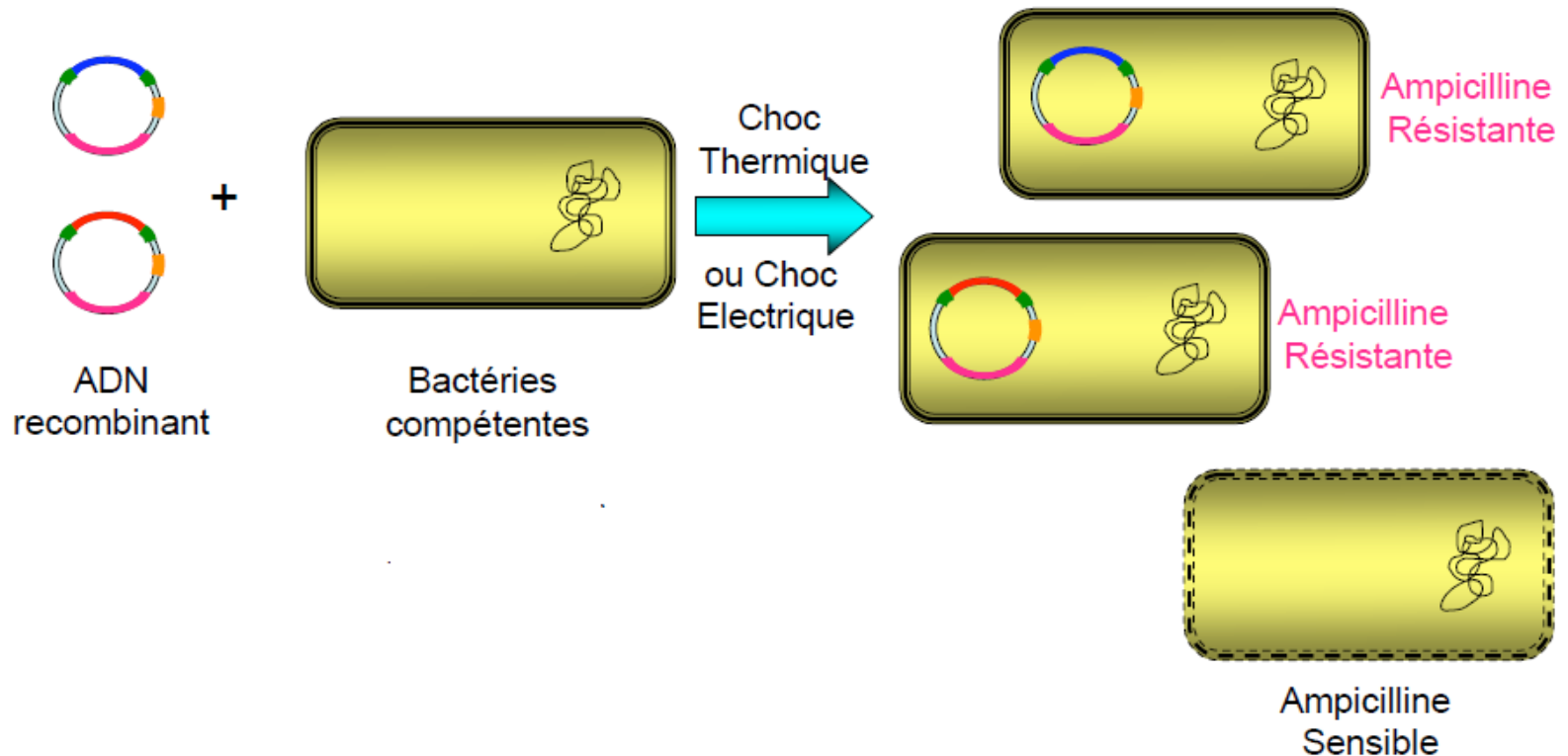
B) Le vecteur est la portion d'ADN que l'on veut étudier

C) L'insert est toujours produit par PCR

D) L'insert est inséré au niveau de la zone polylinker du vecteur

E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

2. Introduire l'ADN recombinant dans une cellule hôte

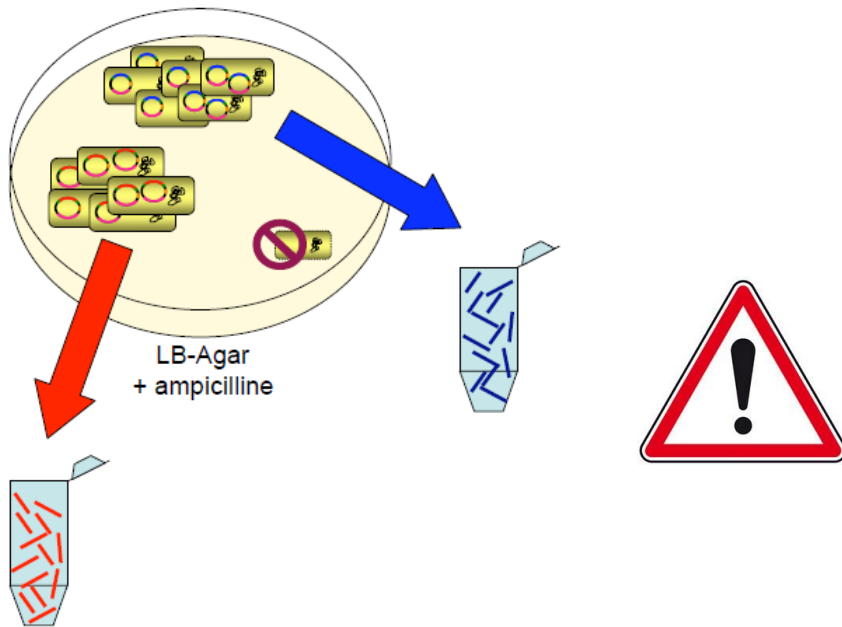


Les bactéries sont ensuite étalées sur une boîte de Pétri avec gel d'Agar et un antibiotique

3. Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens

Sélection :

Seules les bactéries ayant intégrées l'ADN recombinant et le gène de résistance à l'antibiotique pourront survivre et formeront des colonies



Parfois, certaines bactéries intègrent des vecteurs qui n'ont pas d'insert
Test à la bêta galactosidase pour vérifier

- Le test à la bêta galactosidase :

Les vecteurs que l'on utilise possède leur polylinker au milieu du gène codant pour la **bêta galactosidase**

→ Lorsque l'insert est intégré, le gène ne s'exprime pas

→ Lorsque l'insert n'est pas intégré, le gène s'exprime

Lorsque le gène s'exprime, il y a production d'une enzyme dont le substrat est le X-gal (initialement incolore) qui **devient bleu** après action enzymatique

Donc les bactéries qui ont des vecteurs **sans insert** vont se colorer en **bleu**

4. Obtenir un fragment d'ADN pur en grande quantité

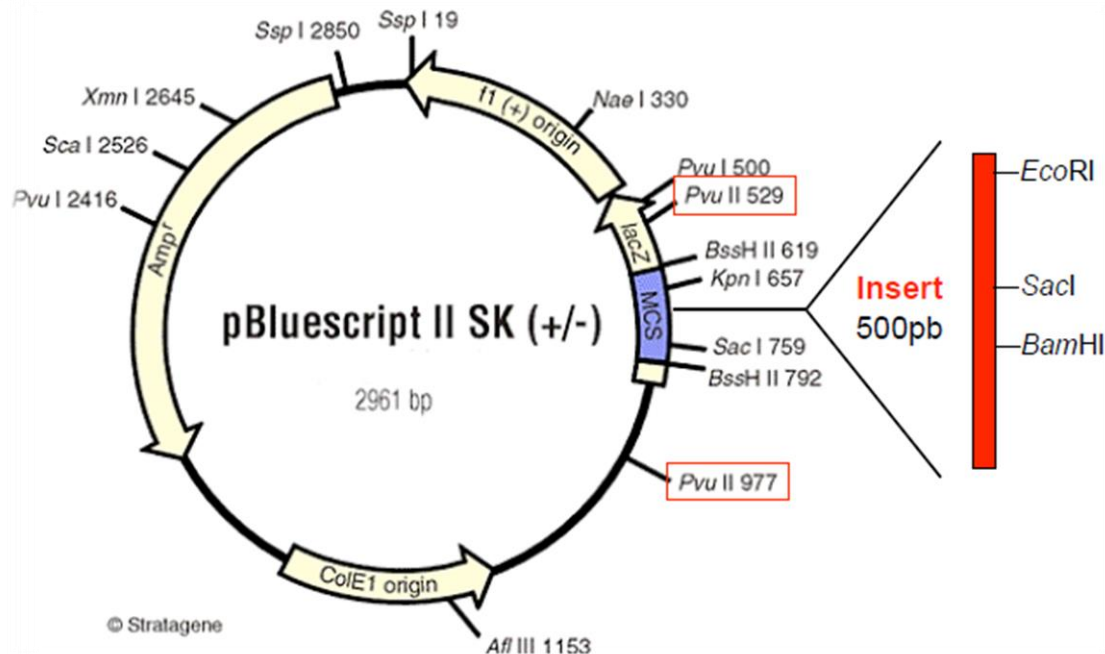
Chaque colonie est bien isolée avec un seul allèle :

1. On met chaque colonie dans un milieu liquide propice au développement des bactéries (mais toujours avec antibiotique)
2. Incubation à 37°C toute une nuit
3. Centrifugation
4. Mise en suspension
5. Lyse alcaline (dénaturation des protéines, paroi ...)
6. Neutralisation (pour stopper la lyse)
7. Précipitation de l'ADN plasmidique

Les cartes de restriction

Objectif : caractériser l'ensemble du plasmide et vérifier que l'on a bien l'insert

La carte de restriction est une cartographie des sites de clivages des enzymes de restriction sur le vecteur (ou ADN recombinant)

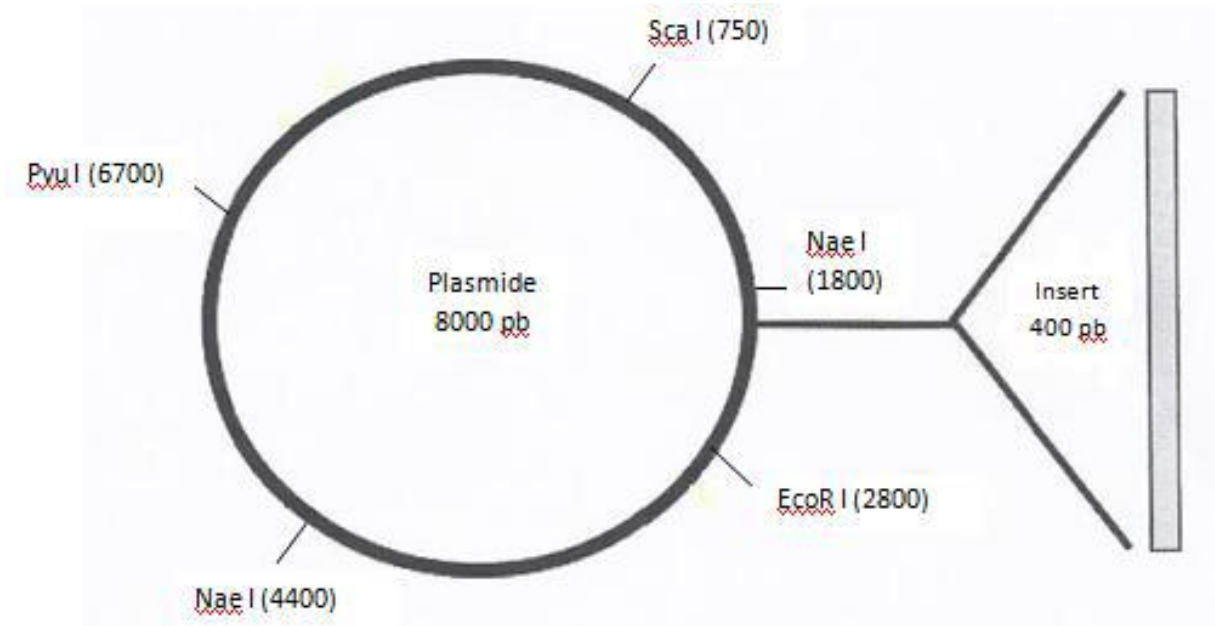


Application type concours

Après digestion enzymatique avec l'enzyme EcoR I, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorique sur gel d'agarose ? Donner la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide sans insert : ... pb + ... pb
- B) Plasmide sans insert : ... pb + ... pb
- C) Plasmide avec insert : ... pb + ... pb
- D) Plasmide avec insert : ... pb + ... pb
- E) Aucune de ces réponses n'est correcte

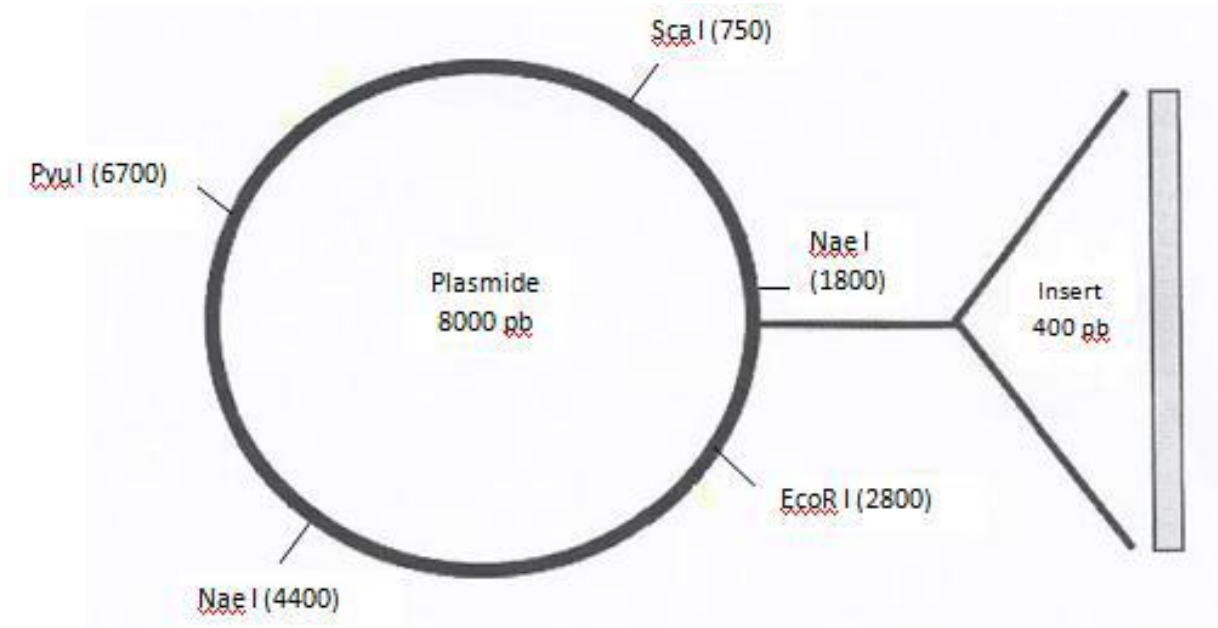
QCM 6



Après digestion enzymatique avec l'enzyme Nae I, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorique sur gel d'agarose ? Donner la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide sans insert : 2600pb + 5400pb
- B) Plasmide sans insert : 6200pb + 5400pb
- C) Plasmide avec insert : 6600pb + 5400pb
- D) Plasmide avec insert : 3000pb + 5400pb
- E) Aucune de ces réponses n'est correcte

QCM 6



Après digestion enzymatique avec l'enzyme Nae I, quels sont les fragments obtenus après migration électrophorique sur gel d'agarose ? Donner la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Plasmide sans insert : 2600pb + 5400pb
- B) Plasmide sans insert : 6200pb + 5400pb
- C) Plasmide avec insert : 6600pb + 5400pb
- D) Plasmide avec insert : 3000pb + 5400pb
- E) Aucune de ces réponses n'est correcte

Vérification de l'insert par séquençage

Après avoir **isolé** chaque allèle, on va pouvoir les **séquencer**

→ Dans un tube, on met une amorce **avant l'insert**

→ Dans un autre tube, on met l'amorce **après l'insert**

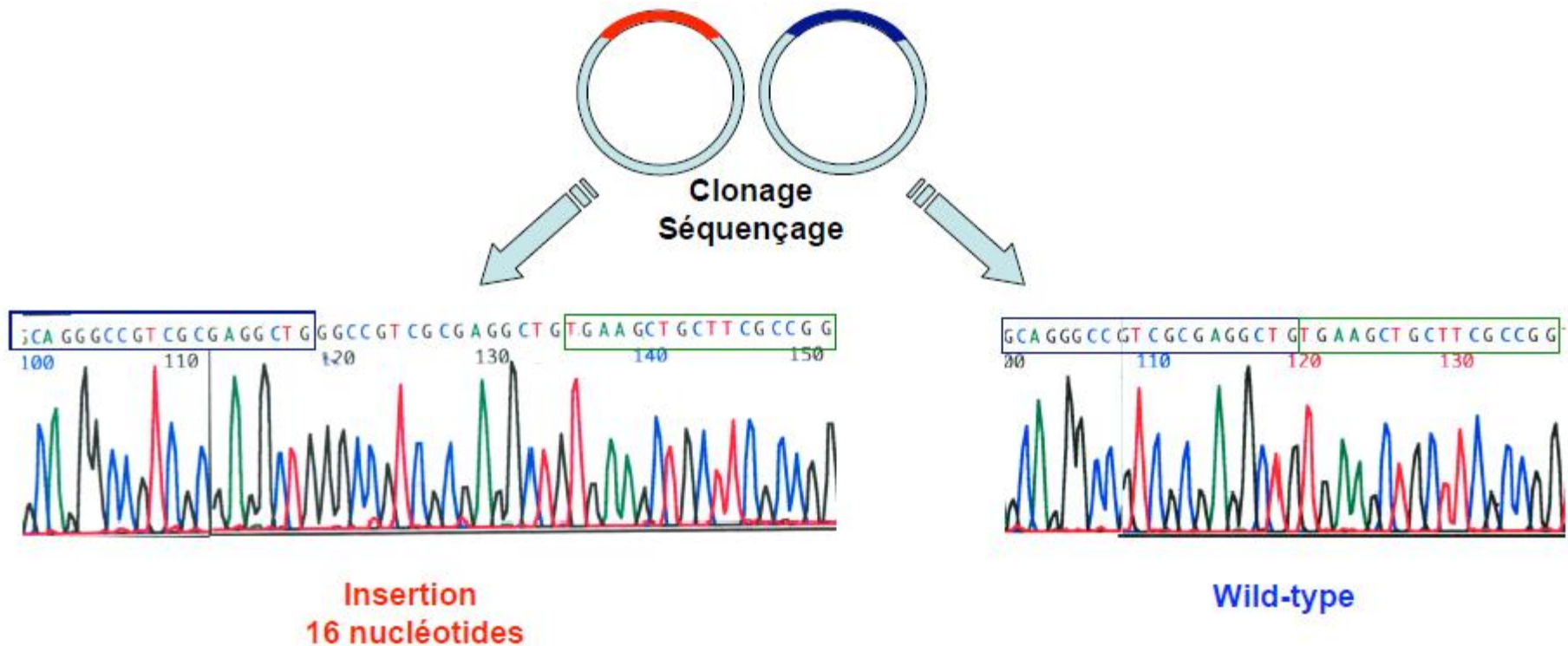
On a **deux réactions de séquençage indépendantes** qui nous permettent d'obtenir :

◇ Le complémentaire du brin 3'-5'

◇ Le complémentaire du brin 5'-3'

Le séquençage est lisible car on a pu **isoler** chaque allèle (évite la superposition)

Particulièrement pratique en cas **d'insertion** (ou **suppression**) de nucléotide



Pathogénicité d'une mutation

Avec le séquençage, parfois on découvre des variantes de certains gènes que l'on ne connaissait pas

On va alors définir le **caractère pathogène** (ou non) de cette variante :

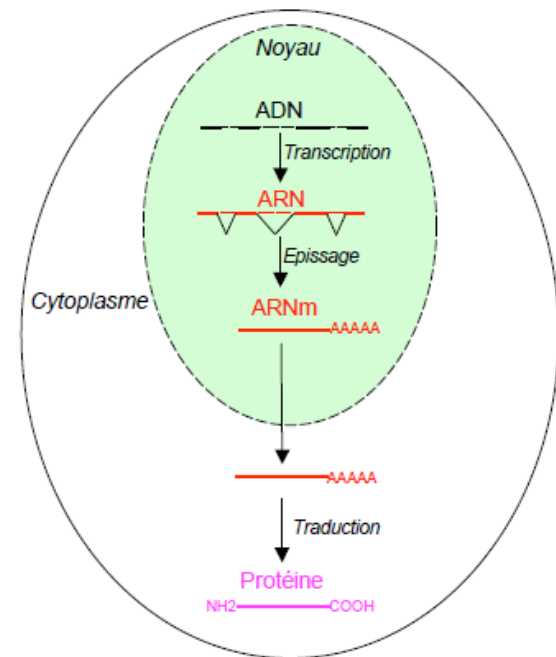
- ✓ On étudie la **protéine** issue de ce variant
- ✓ On utilise des vecteurs d'expression (plasmide)
- ✓ On teste les protéines dans des cellules **eucaryotes**

Rappels

- ✓ Chaque triplet de nucléotide code pour un acide aminé
- ✓ La séquence commence toujours par un triplet ATG
- ✓ La séquence s'arrête au codon stop



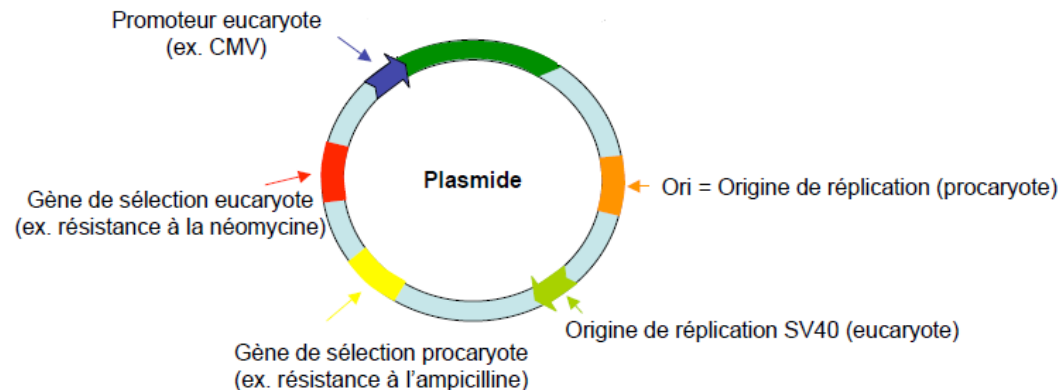
Un même acide aminé peut être codé par plusieurs triplets



1. Le clonage d'expression

Les plasmides utilisés contiennent :

- Une origine de réplication procaryote
- Le polylinker
- Un gène de résistance à un antibiotique procaryote
- Un gène de résistance à un antibiotique eucaryote
- Une origine de réplication eucaryote
- Un promoteur eucaryote dérivé du CMV



- **Notion de protéine de fusion :**

Une fois la protéine surexprimée, il faut pouvoir la suivre :

- ◇ Soit il existe déjà des anticorps
- ◇ Soit il faut utiliser des « étiquettes »

Les étiquettes sont des « TAG » : répétitions de petites séquences bien définies que l'on greffe en C-term ou N-term de la protéine

Ces TAG peuvent :

- Soit être reconnu par un anticorps
- Soit être fluorescent

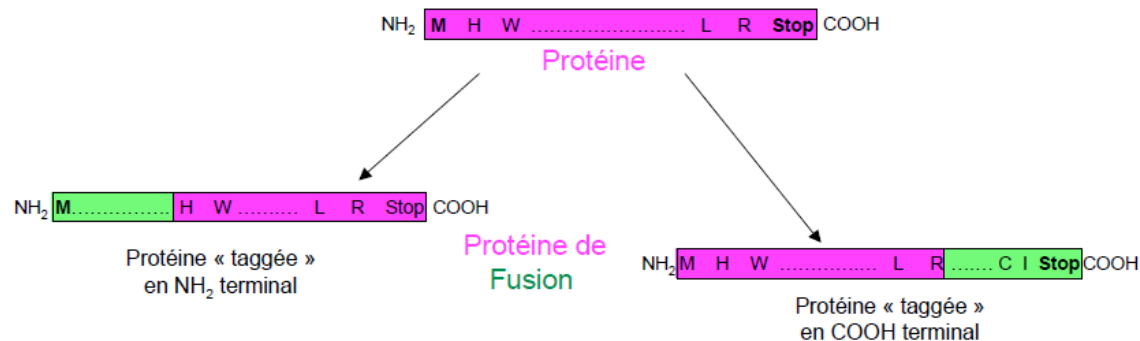
• Comment greffer une étiquette ?

En N-Terminal :

- Il faut couper le codon ATG
- Avoir une étiquette commence par le codon ATG

En C-Terminal :

- Il faut enlever le codon stop
- Avoir une étiquette avec un codon stop



QCM 7

Quelles sont les différences entre les vecteurs de clonage et vecteurs d'expression :

- A) La présence (ou non) d'un polylinker
- B) La présence (ou non) d'un promoteur dérivé du CMV
- C) La présence (ou non) d'une origine de réplication procaryote
- D) L'absence (ou non) d'un gène de résistance à la néomycine
- E) les réponses A, B, C et D sont fausses

QCM 7

Quelles sont les différences entre les vecteurs de clonage et vecteurs d'expression :

- A) La présence (ou non) d'un polylinker
- B) La présence (ou non) d'un promoteur dérivé du CMV
- C) La présence (ou non) d'une origine de réplication procaryote
- D) L'absence (ou non) d'un gène de résistance à la néomycine
- E) les réponses A, B, C et D sont fausses

2. Transfection des cellules eucaryotes

Il s'agit de faire rentrer l'ADN recombinant dans une cellule eucaryote

Pour cela plusieurs méthodes :

- ◇ Méthodes chimiques (les plus utilisées)
- ◇ Méthodes physiques
- ◇ Utilisation de particules virales

- **Méthodes chimiques :**

- **Phosphate de calcium**

- L'ADN recombinant est mélangé à une solution de Chlorure de calcium. On ajoute ensuite un tampon au phosphate : il y a formation d'un précipité qui entoure l'ADN

- **Liposome**

- On mélange l'ADN avec des lipides : formation d'un complexe qui pénètre dans la cellule

- **Méthodes physiques :**

- **Electroporation**

- Un envoie un choc électrique qui déstabilise un court instant la membrane cellulaire permettant à l'ADN de pénétrer dans la cellule

Les études d'expression

Après transfection dans des cellules eucaryotes, l'expression du gène d'intérêt portant la mutation à étudier est analysée.

1- Etude au niveau de l'ARN :

Expression -> Northern-Blot

2- Etude au niveau de la protéine :

Expression -> Western-Blot

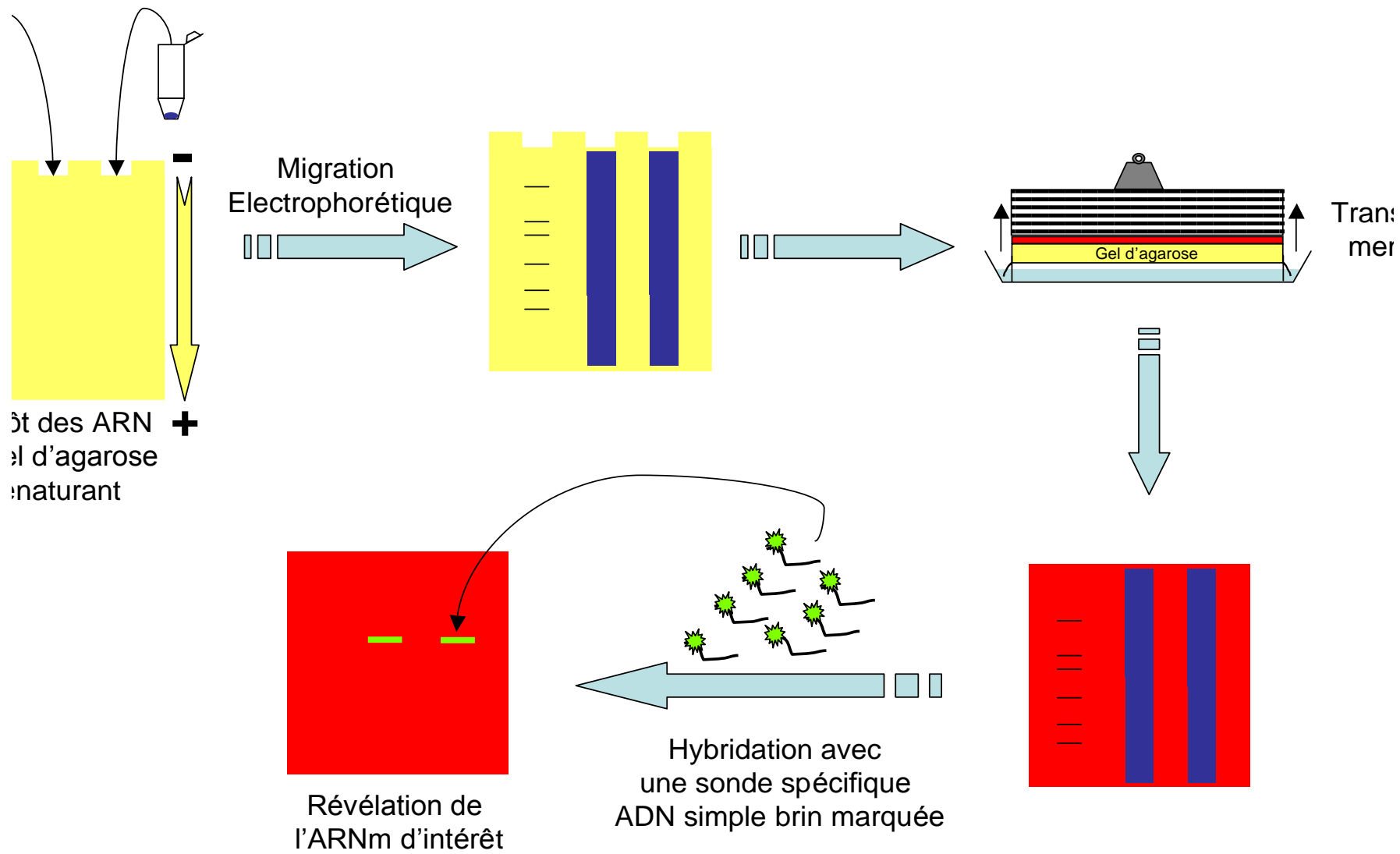
Localisation intracellulaire -> Immunofluorescence

Etude de l'expression des ARN

Le **Northern-Blot** : Technique équivalente à celle du Southern-Blot pour les ARN

Technique :

- 1- Les cellules/tissus sont **lysés** et les **ARN purifiés**
- 2- Les ARN sont séparés, en fonction de leur taille, sur un gel d'agarose dénaturant par **migration électrophorique**
- 3- Les ARN sont transférés sur une **membrane**
- 4- Les ARN d'intérêts sont **révélés** après hybridation d'une sonde complémentaire marquée



Extraction des ARN

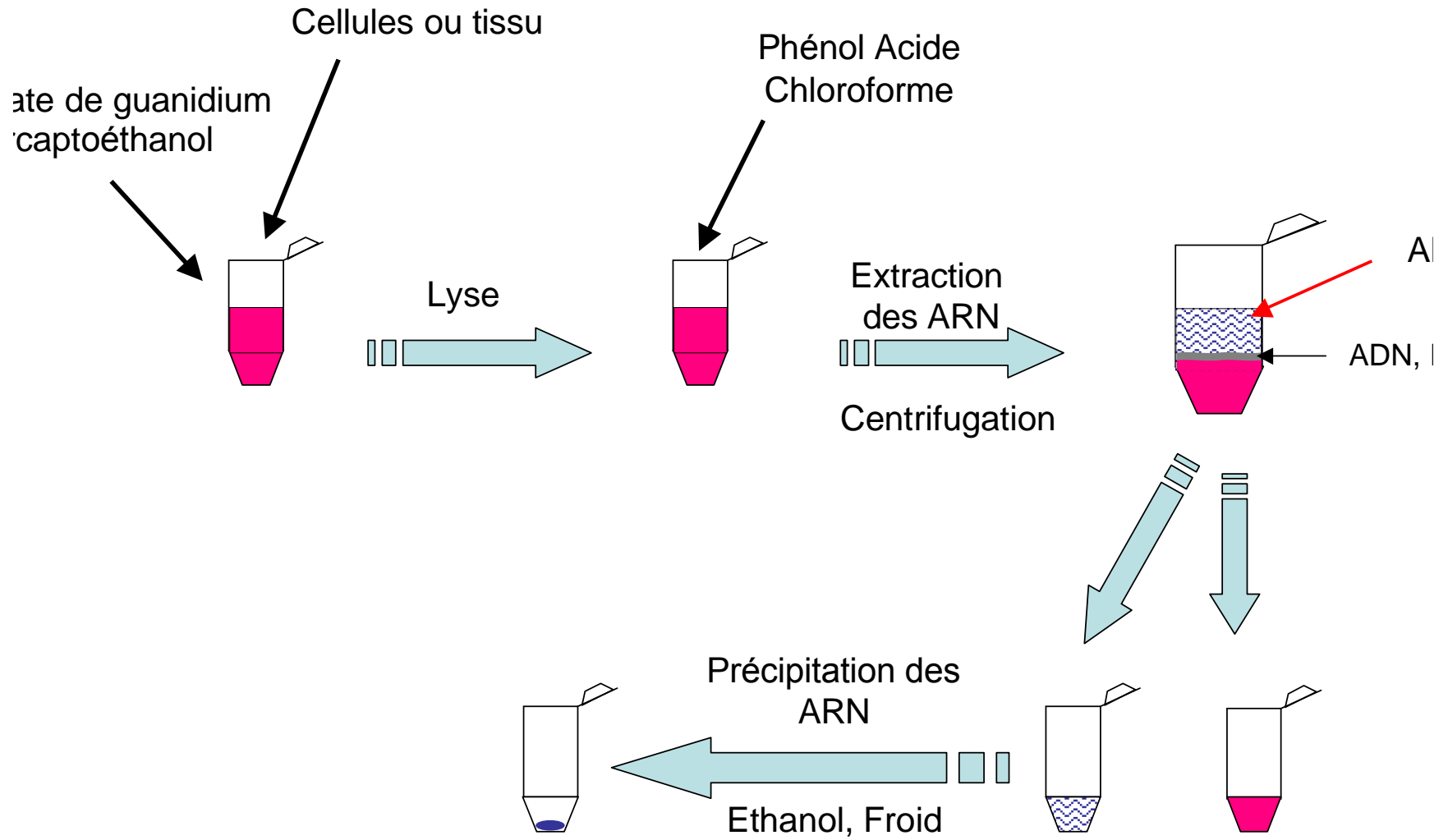
Technique :

1- **Lyse** des cellules en présence de **Thiocyanate de guanidium** + **inhibiteur de ribonucléase** (Béta-mercaptoéthanol)

2- **Extraction** des ARN par ajout de **phénol acide**, de **chloroforme** et **centrifugation** à froid à haute vitesse.

La séparation des ARN et des ADN repose sur une précipitation différentielle en fonction du pH : en condition acide, les ARN restent en solution aqueuse, l'ADN et les protéines se trouvent à l'interphase

3- **Précipitation** des ARN par ajout d'**éthanol** absolu à froid

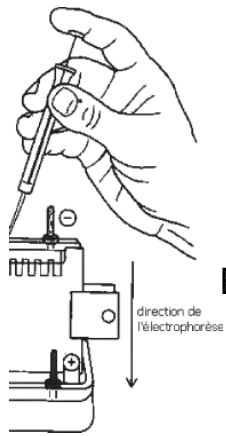


Etude de l'expression des protéines

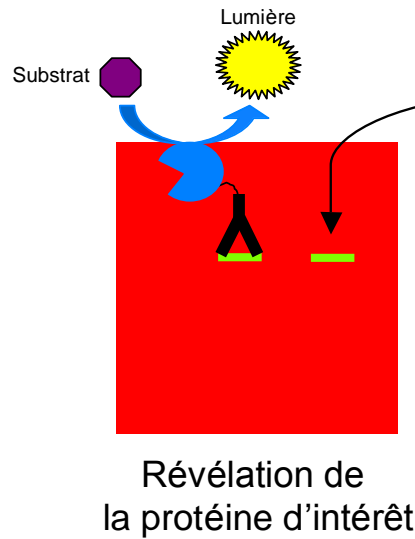
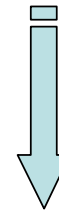
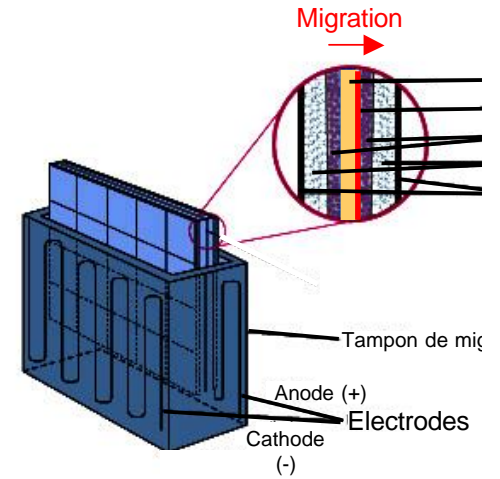
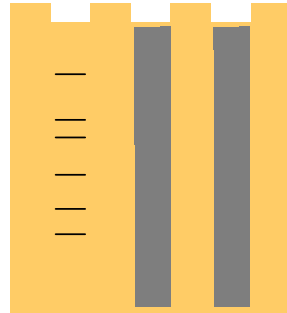
Western-Blot : Technique équivalente à celle du Southern-Blot ou du Northern-Blot mais pour les PROTEINES.

Technique :

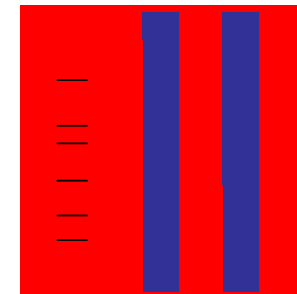
- 1- Les **cellules/tissus** sont **lysés** et les protéines dénaturées purifiées
- 2- Les protéines sont **séparées**, en fonction de leur masse, sur un gel d'**acrylamide** dénaturant.
- 3- Les protéines sont **transférées** sur une **membrane**.
- 4- La protéine d'intérêt est **révélée** grâce à un **Ac spécifique**



Migration
Electrophorétique



Hybridation avec
anticorps spécifique
couplé à une enzyme



Etude de la localisation des protéines

Immunofluorescence : Technique permettant de visualiser les protéines directement au niveau de la cellule

Technique :

- 1- Les cellules,ensemencées sur une lamelle en verre, sont **transfectées** avec le **plasmide** d'intérêt
- 2- Les cellules sont **fixées** et **perméabilisées**
- 3- Les protéines sont :
 - Soit **visualisées directement** en microscopie à fluorescence (protéines « taggées » GFP par exemple)
 - Soit **révélées et visualisées après fixation** d'un Ac couplé à un marqueur fluorescent (réaction Ag-Ac)

QCM 8

A propos de l'étude de l'expression des protéines, donner la ou les réponse(s) vraie(s) :

- A) On peut l'étudier à partir de l'ARN
- B) Lorsque l'on étudie l'ARN, on parle de southern blot
- C) Lorsque l'on étudie directement la protéine on parle de western blot
- D) Si on s'intéresse à la localisation de la protéine, il sera préférable de faire un western blot
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses

QCM 8

A propos de l'étude de l'expression des protéines, donner la ou les réponse(s) vraie(s) :

- A) On peut l'étudier à partir de l'ARN
- B) Lorsque l'on étudie l'ARN, on parle de southern blot
- C) Lorsque l'on étudie directement la protéine on parle de western blot
- D) Si on s'intéresse à la localisation de la protéine, il sera préférable de faire un western blot
- E) Les réponses A, B, C et D sont fausses