

Les bactériophages sont des virus qui infectent des bactéries. Certaines souches bactériennes possèdent des enzymes de restriction, capables de dégrader (couper) l'ADN de ces virus. Dans ce cas, le virus ne peut pas se multiplier et les bactéries sont alors protégées de l'infection virale.

Une souche bactérienne est cultivée en présence et en absence de bactériophages λ . L'ADN de ces bactériophages est ensuite isolé et analysé par électrophorèse pour identifier son intégrité en molécule complète ou sa dégradation en plusieurs fragments.

On cherche à savoir quelle enzyme protège la souche bactérienne étudiée de l'infection par le bactériophage λ .

Matériel commun

- ordinateur et logiciel ANAGENE, fichier adnphage.edi, à charger à partir du répertoire sauve d'ANAGENE, fichier Phage.zym, fiche technique ANAGENE
- une micropipette et deux embouts (ou équivalent)
- papier noir, chronomètre

Electrophorèse avec cuve classique :

- cuve à électrophorèse, support rempli de gel avec puits
- tampon d'électrophorèse TBE
- une « solution » d'ADN du bactériophage λ (avant contact avec bactéries) tube identifié en rouge
- une « solution » d'ADN du bactériophage λ (extrait de bactéries infectées) tube identifié en bleu

Electrophorèse avec kit APBG :

- cuve à électrophorèse LONZA « Flashdock » et alimentation en courant continu, cassette « Flashgel » remplie de gel prête à l'emploi
- une « solution » d'ADN du bactériophage (avant contact avec bactéries) = solution non hydrolysée tube identifié en rouge
- une « solution » d'ADN du bactériophage (extrait de bactéries infectées) = solution hydrolysée tube identifié en bleu

Activités et déroulement des activités	Capacités et principaux critères d'évaluation	Barème
1- Justifier l'utilisation des deux « solutions » d'ADN de bactériophages λ .	Comprendre la manipulation	2
2- Réaliser l'électrophorèse en suivant les indications de la fiche protocole-candidat. Pendant la migration, répondre aux questions. Appeler l'examineur pour vérifier le montage et obtenir les résultats de l'électrophorèse	Réaliser une manipulation en suivant un protocole - respect des étapes du protocole - utilisation maîtrisée du matériel - organisation de la paillasse	5
3- Ouvrir le fichier adnphage.edi, dans le logiciel ANAGENE puis traiter la séquence de l'ADN du phage λ par l'action des enzymes de restriction disponibles dans le fichier Phage.zym pour obtenir le tableau de comparaison du nombre de sites. Appeler l'examineur pour vérification	Utiliser un logiciel de traitement de données	4
4- Réaliser un schéma du résultat de l'électrophorèse.	Traduire une observation par un schéma	5
5- Comparer les résultats de l'électrophorèse et les résultats réalisés avec le logiciel ANAGENE, afin de déterminer quelle enzyme protège la souche bactérienne étudiée.	Appliquer une démarche explicative	3
6- Gérer le poste de travail, le ranger en fin d'épreuve.	Gérer et organiser le poste de travail – respecter les règles de sécurité	1

Principe de l'électrophorèse : en milieu basique, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Soumises à un champ électrique, elles migrent, dans un gel conducteur, de la cathode (borne négative) vers l'anode (borne positive). La distance de migration par rapport à la ligne de dépôt est caractéristique de la taille et de la charge de la molécule.

Remarque : la migration nécessitant plus de temps que la durée réservée à l'épreuve, des résultats sont fournis.

PROTOCOLE DE REALISATION D'UNE ELECTROPHORESE

NB : Organiser votre plan de travail pour manipuler proprement et en respectant les règles de sécurité.

PREPARATION DE LA CUVE

1. **Poser** la cuve sur le papier noir (les puits dans le gel seront plus visibles).
2. **Placer** le gel dans la cuve sans le casser, bien parallèlement aux côtés de la cuve, les puits devant être du côté de la cathode (borne négative).
3. **Verser** le tampon TBE dans les deux compartiments de la cuve, le gel doit être tout juste recouvert (environ 1mm au dessus du gel).

DEPOT D'ADN

ATTENTION Il faut réaliser les dépôts en stabilisant le mouvement par calage des coudes sur la paillasse et veiller à ne pas percer le fond du puits ; changer les embouts entre chaque dépôt.

4. **Déposer** avec une micropipette une solution d'ADN dans un puits sans débordement : les puits préparés peuvent contenir un volume d'ADN de μL .
5. **Déposer**, de la même manière, dans un deuxième puits à coté du précédent, la deuxième solution d'ADN ;
6. Si le dépôt ne paraît pas satisfaisant (débordement par exemple), un second essai peut être réalisé dans les puits situés à côté. Dans ce cas, bien **repérer** les puits conservés pour l'électrophorèse.

MISE EN ROUTE DE L'ELECTROPHORESE ET DE LA MIGRATION (la migration doit avoir lieu juste après les dépôts)

7. **Brancher** la cuve au générateur et **faire migrer** à volts ; le pôle négatif (= cathode) doit être du côté du dépôt ;
8. **Vérifier** le bon déroulement de l'électrophorèse : de la buée doit apparaître sur le couvercle dans les cinq premières minutes si le générateur et la cuve sont bien alimentés. Si ce n'est pas le cas, **appeler** l'examineur.

INFORMATION COMPLEMENTAIRE : le plus petit fragment n'est en général pas visible sur l'électrophorèse.

Principe de l'électrophorèse : en milieu basique, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Soumises à un champ électrique, elles migrent, dans un gel conducteur, de la cathode (borne négative) vers l'anode (borne positive). La distance de migration par rapport à la ligne de dépôt est caractéristique de la taille et de la charge de la molécule.

Protocole de réalisation d'une électrophorèse

NB : Organiser votre plan de travail pour manipuler proprement et en respectant les règles de sécurité.

PREPARATION DE LA CUVE

1. **Préparer** la cassette : enlever l'autocollant de protection blanc recouvrant la cassette.
2. **Inonder** les puits avec de l'eau distillée, incliner la cassette pour éliminer l'excès d'eau et essuyer avec un papier absorbant, sans toucher les puits.
3. **Placer** la cassette sur l'appareil ; les fils doivent rester débranchés lors de la manipulation suivante.

DEPOT D'ADN

ATTENTION Il faut réaliser les dépôts en stabilisant le mouvement par calage des coudes sur la paillasse et veiller à ne pas percer le fond du puits ; changer les embouts entre chaque dépôt.

4. **Déposer** avec une micropipette une solution d'ADN dans un puits sans débordement : les puits préparés peuvent contenir un volume d'ADN de 4 µL.
5. **Déposer**, de la même manière, dans un deuxième puits à côté du précédent la deuxième solution d'ADN.
6. Si le dépôt ne paraît pas satisfaisant (débordement par exemple), un second essai peut être réalisé dans les puits situés à côté. Dans ce cas, bien **repérer** les puits conservés pour l'électrophorèse.

MISE EN ROUTE DE L'ELECTROPHORESE ET MIGRATION (la migration doit avoir lieu juste après les dépôts)

7. **Brancher** la cuve au générateur et **faire migrer** à volts.
Appeler l'examineur.
8. **Mettre en route l'éclairage** et observer la migration. La source de lumière possède sa propre alimentation (fiche à l'arrière de l'appareil) : les divers fragments de chaque tube se séparent rapidement (ne jamais éclairer en absence de cassette sur l'appareil). Durée maximale de la migration = 8 min.
Appeler l'examineur pour vérification.
9. Pendant la migration, **répondre** aux questions.

INFORMATION COMPLEMENTAIRE : le plus petit fragment est en général peu visible sur l'électrophorèse