

Chapitre V :

Les

Méthodes

De

Marquage

v. Les méthodes de marquage (les anticorps comme outils)

Méthodes d'immunolocalisation

En raison de sa haute spécificité pour son épitope, un anticorps dirigé contre un antigène particulier peut être utilisé en microscopie photonique d'immunofluorescence ou en microscopie électronique immunologique, pour déterminer l'emplacement de cet antigène dans une cellule.

Elisa

La méthode ELISA peut être utilisée pour mesurer la quantité d'un antigène spécifique protéique d'un échantillon. L'anticorps est lié à un support de polymère inerte puis sera exposé à l'échantillon. Une protéine non liée sera éliminée par un rinçage et un second anticorps est ajouté pour réagir avec l'antigène à un épitope différent. Le second anticorps utilisé est celui qui possède une enzyme liée convertissant un substrat incolore ou non fluorescent en un produit coloré ou fluorescent. La détermination de la quantité du second anticorps lié et donc de la quantité d'antigène présent sur l'échantillon original est estimée par la mesure de l'intensité de la coloration ou de la fluorescence produite.

Technique de buvardage de Western

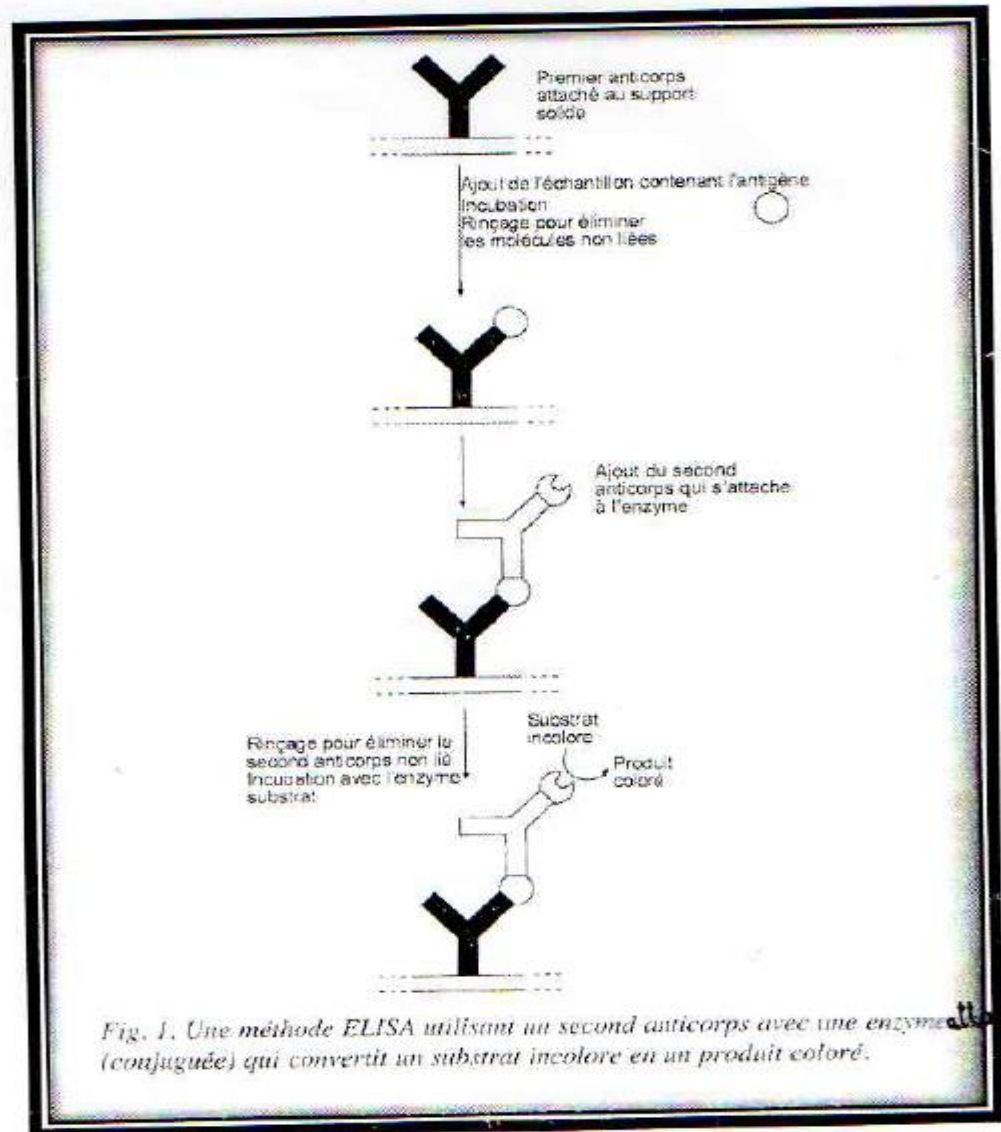
Des échantillons de protéines sont séparés par une PAGE-SDS unidimensionnelle ou par une électrophorèse sur des gels de polyarylamine bidimensionnelle. Les protéines séparées sont alors transférées (tachées) sur une nitrocellulose ou une feuille Nylon. Celle-ci est mise à incuber avec un anticorps spécifique de la protéine et par la suite l'anticorps non lié est éliminé par rinçage. Les protéines liées à l'anticorps contenues dans le gel sont détectées soit par autoradiographie (si l'anticorps spécifique est radiomarké) soit par utilisation d'un second anticorps marqué qui va se lier à l'antigène primaire.

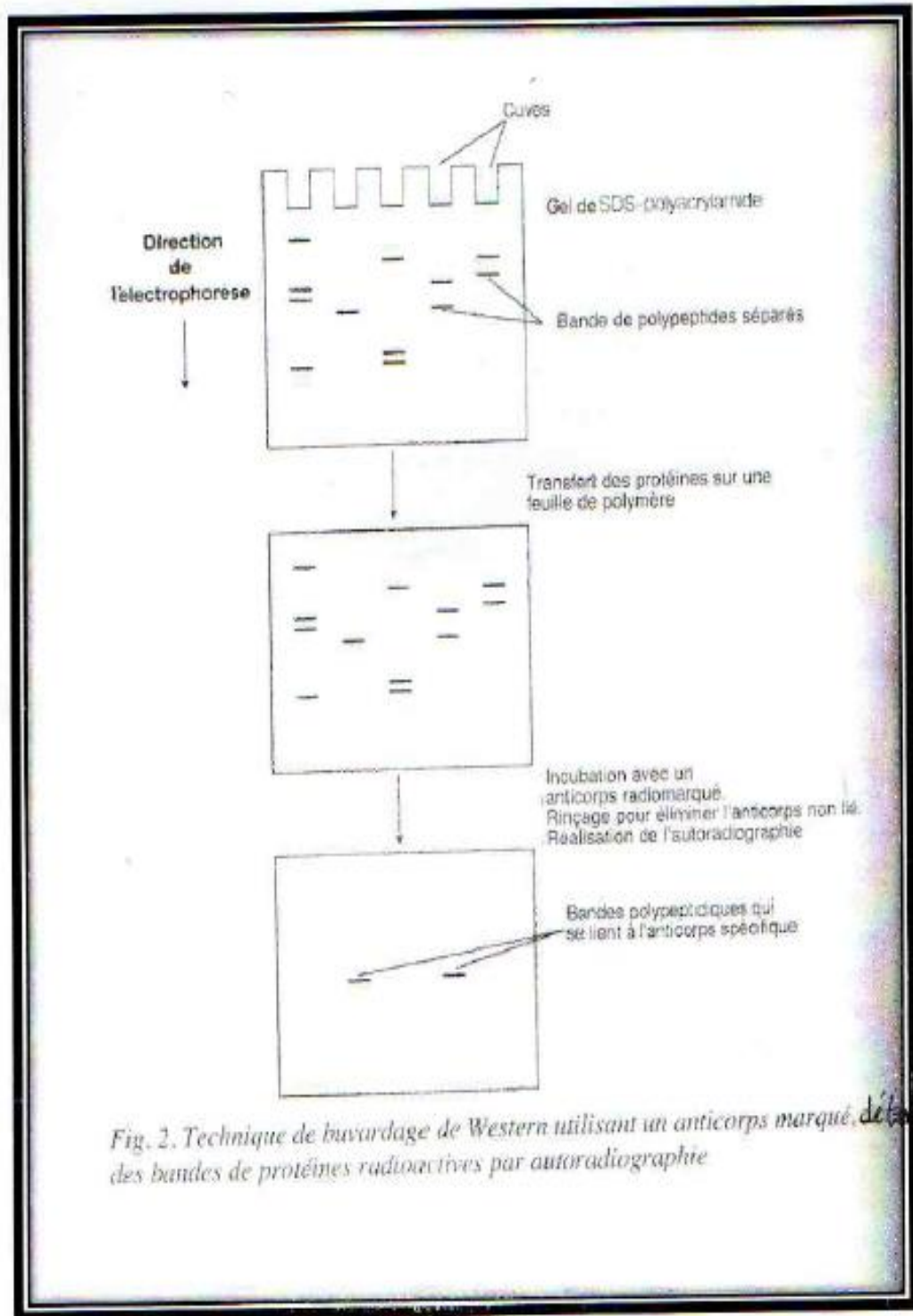
La chromatographie d'immunoaffinité

Une chromatographie d'immunoaffinité peut être utilisée pour purifier des protéines antigènes par immobilisation d'anticorps appropriés sur une matrice inerte comme des billes de polysaccharides. Après une exposition au mélange protéique, seule la protéine reconnue par cet anticorps va se lier aux billes et sera plus tard éluée sous une forme pure ou quasiment pure. Des cellules présentant l'antigène sur leur surface peuvent également être purifiées suivant une même procédure.

Thèmes relatifs

- Microscopie .
- Chromatographie des protéines .
- Electrophorèse des protéines .
- Le système immunitaire .





Les enzymes de restriction

Vue d'ensemble

Les enzymes de restriction permettent de couper l'ADN au niveau de sites spécifiques; l'hybridation d'acides nucléiques permet de détecter

des séquences d'un acide nucléique particulier; le séquençage de l'ADN sert à déterminer facilement la séquence nucléotidique d'une molécule ADN.

Digestion d'une enzyme de restriction(figure 1)

Les enzymes de restriction reconnaissent des séquences de reconnaissance spécifiques et coupent l'ADN pour libérer des extrémités cohésives (à bouts collants). Les extrémités des molécules d'un ADN de restriction peuvent être réunies par une ligature pour former de nouvelles molécules d'ADN recombinant.

Nomenclature (figure 2)

Les enzymes de restriction portent un nom de trois lettres basé sur le nom du genre et de l'espèce de la bactérie à partir de laquelle elles ont été isolées, complété par un chiffre romain défini pour indiquer l'identité de l'enzyme dans le cas où la bactérie contient plusieurs enzymes de restriction différentes.

Électrophorèse sur gel(figure 3)

Après digestion par une enzyme de restriction, la taille des fragments d'ADN peut être déterminée par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou d'agarose. Les gels de polyacrylamide sont utilisés pour séparer de petites molécules d'ADN tandis que les gels d'agarose, qui possèdent des pores de diamètre plus élevé peuvent séparer de plus grands fragments d'ADN.

Les enzymes de restrictions : (vue d'ensemble)

But : une procédure permettant la détection de séquences spécifiques d'ADN (et d'ARN) avec une grande précision.

Nomenclature :

Les enzymes de Res sont isolées à partir de bactéries chez lesquelles elles jouent un rôle de protection de la cellule hôte contre une infection virale.

ECORI : Escherichia coli/PvuI : enz de Rés produite par proteus vulgaris

Bam HI : Bacillus amyloliquefociens

ECORI

Genre : Escherichia

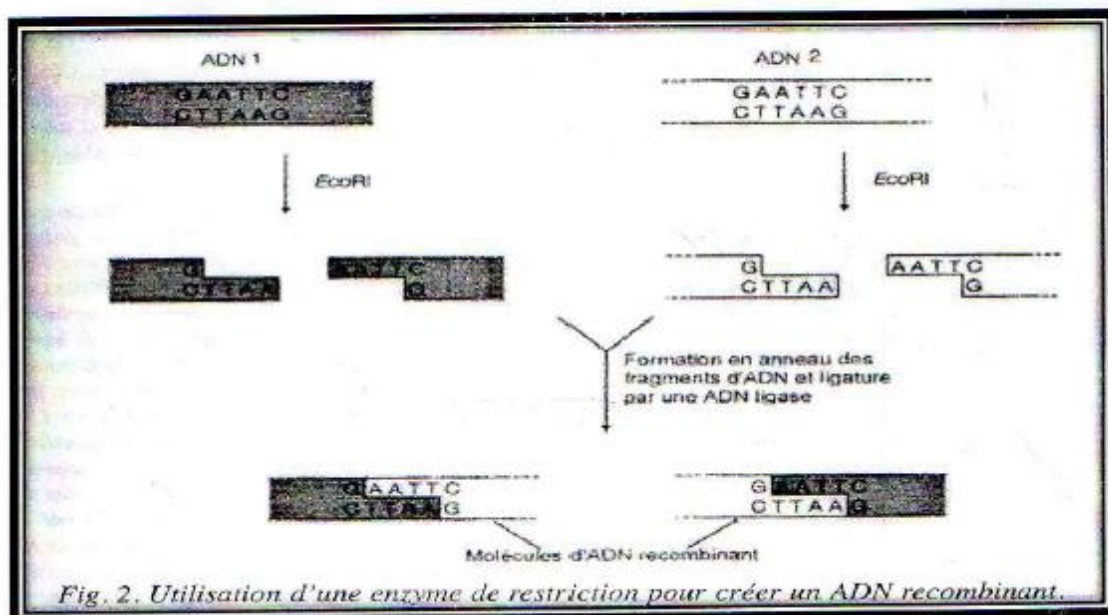
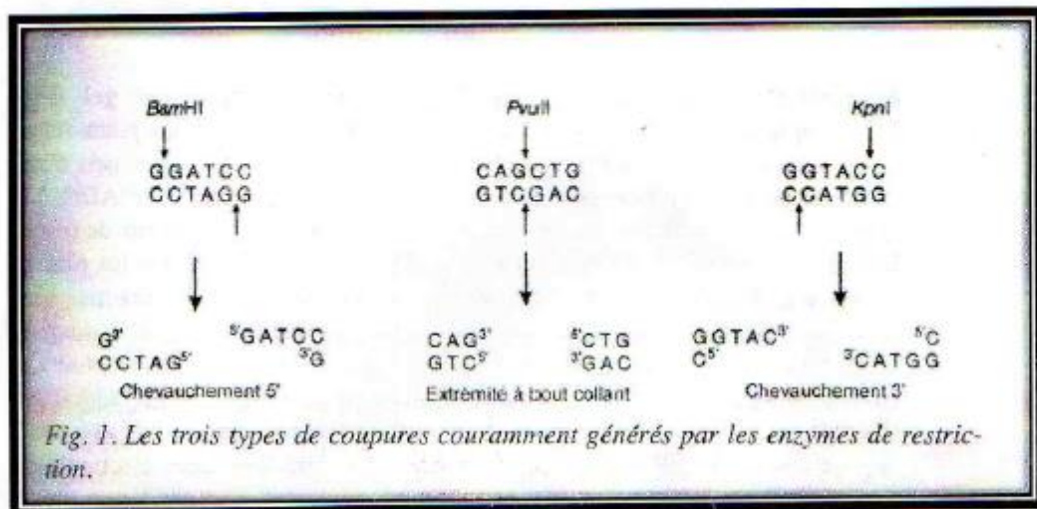
Espèce : Coli

Variété : R

Numéro d'ordre (S'il y a plusieurs enzyme)

(pb) : paire de base

Source : les bactéries et les enzymes de restriction (Pierre et Marie Curie)



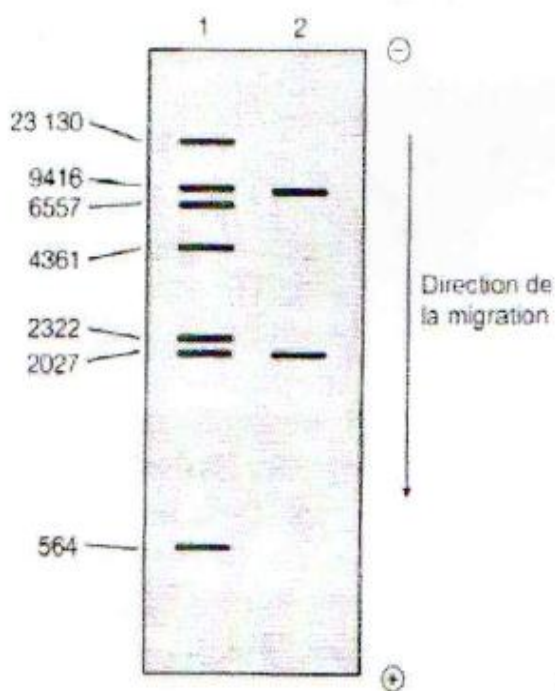


Fig. 3. Une électrophorèse sur gel de rose de fragments d'ADN. Des fragments d'ADN de taille connue ont subi une électrophorèse dans la rangée 1 (les tailles indiquées en pb sont données à gauche). Le même échantillon d'ADN a subi une électrophorèse dans la rangée 2. En comparant les positions des fragments dans la rangée 2, il est possible de voir que les deux échantillons de fragments d'ADN ont des tailles approximatives de 9000 pb et de 2000 pb. Les tailles peuvent être déterminées avec plus de précision en représentant les données de la figure 1 sous la forme d'un abaque (courbe de log de la taille de l'ADN en fonction de la distance de migration et en utilisant ensuite la courbe pour estimer la taille des fragments d'ADN de l'échantillon à partir de la mesure des distances de migration.

Cartes de restriction

Une carte indiquant la position des sites de coupure pour une variété d'enzymes de restriction est appelée carte de restriction d'une molécule d'ADN. Les cartes de restriction - permettent de comparer des molécules d'ADN sans qu'il n'y ait besoin de déterminer leur séquence nucléotidique et sont ainsi très couramment utilisées dans des expériences d'ADN recombinant.

Polymorphismes de la taille d'un fragment de restriction

Le polymorphisme de la taille des fragments de restriction ou RFLP est la variabilité de l'ADN des individus d'une population (c.à.d. le polymorphisme) qui affecte la taille des fragments produits par une enzyme de restriction spécifique. Si le RFLP se situe près d'un gène et provoque des modifications du gène pouvant engendrer une maladie génétique humaine, il peut être utilisé comme un marqueur de ce gène. Dans le passé, les RFLP ont prouvé leur efficacité tant pour dépister le

gène défectueux de patients que dans des études de clonage dirigé d'un gène. Cependant, les gènes eux-mêmes ayant été identifiés, les RFLP.

Sont actuellement moins couramment utilisés .La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est devenue la principale méthode de dépistage.

Thèmes relatif

Structure de L'ADN

Hybridation des acides nucléiques

Clonage de L'AND

Page1 : Méthodes d'immunocolisation :

Epitope : le site de l'antigène reconnu par l'anticorps est appelé déterminant « Déterminant antigénique ou épitope ».

Elisa : dosage d'immunocapture lié à une enzyme (Eliza), d'après l'anglais enzyme Linked immunosorbent assay).

Une technique de buvardage de western (Western Blotting) : peut être utilisée pour détecter un ou plusieurs antigènes d'un mélange.

- La matrice du gel ne laissant pas passer facilement de grandes protéines comme des anticorps, l'échantillon de protéines doit d'abord être transféré dans un milieu plus approprié. Ce procédé est appelé buvardage. Le gel est placé en contact d'une feuille de nitrocellulose ou de nylon et l'application d'un courant électrique permet de migrer ou protéines de migrer du gel vers la feuille ou elle, deviennent liées.

Buvardage des protéines---Western Blotting=Buvardage de Western.

Buvardage de l'ADN---Southern Blotting.

Buvardage de l'ARN---Northern Blotting.

- Les anticorps monoclonaux: sont des anticorps produits par une même lignée de lymphocyte B activé ou plasmocyte, reconnaissant le même épitope d'un antigène.

Afin de pouvoir être utilisés comme thérapie, ils sont produits grâce à une cellule issue de la fusion entre un lymphocyte B et une cellule cancéreuse (myélome) appelée hybridome.