****

**Protocole 10.1 : Préparer des digestions par enzymes de restriction**

**Objectif :** Couper le génome de votre phage en plusieurs fragments en fonction de sa séquence d'ADN

**But** **:** Les enzymes de restriction reconnaissent et coupent l'ADN à des séquences spécifiques de 4 à 6 pb appelées sites de restriction. La digestion d'un génome de phage avec une enzyme de restriction donnée a pour résultat que le génome est coupé en fragments de différentes tailles, selon le nombre et l'emplacement des sites de restriction. Étant donné que les séquences du génome des phages sont très variables et spécifiques pour chaque phage, la fréquence et l'emplacement(s) d'un site de restriction particulier ne sont pas constants dans tous les génomes des phages. En conséquence, la digestion de différents génomes avec la même enzyme peut donner différents nombres et tailles de fragments d'ADN. Ces fragments constituent une « empreinte digitale » génétique unique à chaque phage.

**Matériel requis** **:**

* ADN de phage
* Bain-marie à 37°C
* Bloc thermique 65°C
* Microtubes
* Enzymes de restriction\* avec tampons

\*Il est recommandé d’utiliser des enzymes de restriction spécifiques pour chaque phage isolé à partir d’un hôte bactérien donné. Référez-vous à la page d'informations spécifiques à l'hôte pour sélectionner les meilleures enzymes à utiliser.

**Protocole** **:**

1. Préparez l'ADN génomique.
2. Mélangez votre échantillon d'ADN en tapotant délicatement le tube fermé avec votre doigt ou en le vortexant à basse vitesse.
3. Incubez le tube à 65°C pendant 10 minutes, puis placez-le rapidement sur glace. Centrifuger le microtube dans une microcentrifugeuse pendant moins de 1 minute pour faire descendre tout le liquide au fond du tube.
4. En utilisant la concentration de votre échantillon d'ADN, calculez le volume d'échantillon d'ADN nécessaire pour obtenir 0.5 µg d'ADN.

Exemple : vous voulez digérer 0.5 µg de votre ADN phagique. Si votre échantillon d'ADN a une concentration de 125 µg / ml, calculez combien de µl d'ADN sont nécessaires pour obtenir 0.5 µg :

µl d'ADN = 0.5 µg (ml / 125 µg) (1000 µl / 1 ml) = 4 µl

1. Préparez les réactions de digestion par enzymes de restriction.
2. Pour chaque enzyme de restriction à tester, préparez les réactions dans des microtubes, en en incluant un pour le contrôle négatif, selon le Tableau 10.1-1.

|  |
| --- |
| Tableau 10.1-1. Constituents des réactions de digestion par les enzymes de restrictions. |
| **Solution** | **Volume** |
| H2O ultra pure et stérile | Pour un volume final de 25 µl |
| Tampon de réaction 10X | 2.5 µl |
| Enzyme de restriction | 0.5 µl |
| ADN génomique de phage | Equivalent à 0.5 µg |

Important : Ajoutez votre ADN phagique en dernier pour éviter la contamination des stocks d'enzymes !

1. Mélangez le contenu de chaque tube doucement et centrifugez le tube dans une microcentrifugeuse pendant moins de 1 minute pour faire descendre tout le liquide au fond du tube.
2. Incubez à 37°C pendant 1 heure maximum. (Remarque : Certaines enzymes peuvent nécessiter seulement 15 minutes, alors suivez les instructions de votre enseignant.)
3. Centrifugez les tubes dans une microcentrifugeuse pendant moins de 1 minute pour laisser descendre tout le liquide au fond du tube. Conservez à -20°C jusqu'à utilisation.
4. Pour visualiser votre ADN de phage digéré, suivez les protocoles de **Préparation de gels d'agarose** (10.2) et **Analyse des gels de digestion par enzymes de restriction** (10.4).

**Conseils utiles :**

* Ne pas vortexer l'ADN génomique trop fortement car cela peut l’endommager et le fragmenter.
* Les enzymes de restriction doivent être maintenues froides en tout temps. Gardez-les dans un bloc réfrigérant ou sur glace, sauf s'ils sont utilisés. Lorsque vous manipulez les tubes, tenez-les par le haut pour éviter de chauffer l'enzyme avec vos doigts.
* Soyez attentif lors du pipetage de petits volumes. Il est préférable de pipeter de petits volumes directement dans du liquide déjà dans le tube car les petits volumes peuvent rester dans l’embout de pipette par cohésion.
* L'ADN génomique de phage hautement concentré a tendance à s'agréger en solution. Le chauffage pendant 15 minutes à 55°C avant le pipetage peut aider à préserver une mise en suspension constante.
* N'oubliez pas que 1 ng / µl = 1 µg / ml.