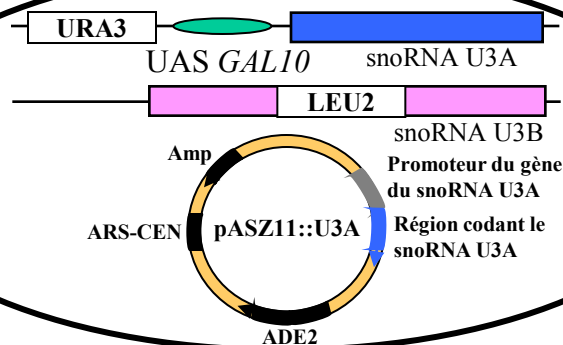


TP 1.04 - Étude de la fonctionnalité et de l'expression du snoARN U3

Le snoARN U3 est un petit ARN nucléolaire stable impliqué dans la maturation des ARN ribosomiques chez les Eucaryotes. Il fait partie de la famille des snoARN à boîtes C/D, qui classiquement guident la 2'-O-méthylation des ARNr. Toutefois le snoARN U3 constitue le seul membre de cette famille à n'être impliqué que dans les clivages précoces aux sites A0, A1 (dans la région 5'-ETS) et A2 (dans la région ITS1) de l'ARN pré-ribosomique, permettant la libération de l'ARNr 17S mature (Cf cours). Le snoRNA U3 étant essentiel, en cas de répression de son expression, la cellule n'est plus viable. L'étude de la fonctionnalité de ce petit ARN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est possible grâce à un système génétique. Ce système repose sur l'utilisation d'une souche de *S. cerevisiae* dans laquelle l'un des deux gènes codant pour le snoARN U3 (gène U3B ou snR17B) est inactivé par insertion du marqueur LEU2, et où l'autre gène (gène U3A ou snR17A) est placé sous contrôle d'un élément régulateur *GAL10*, permettant son expression contrôlée. En effet, en présence de galactose, le gène U3A est exprimé et la souche peut pousser. En revanche, en présence de glucose il y a répression du promoteur *GAL10* donc absence de production du snoARN U3 dans la cellule qui ne peut alors plus pousser. Elle ne peut alors pousser sur glucose que si elle est transformée par un plasmide codant un snoARN U3 fonctionnel. On peut donc ainsi tester la fonctionnalité des mutants du snoARN U3 en analysant la croissance sur milieu glucose des cellules transformées par des plasmides encodant différents variants du snoARN.

JH84



PLAN DE LA SEMAINE

Jour 1: -Objectifs de ce TP

- Extraction des ARN totaux de cellules de levure (M1)
- Étalement de cultures de levures sur boîtes (M2)
- Croisement des haploïdes et tests de double hybride en présence de 3 AT (M3)

Jour 2: -Fin de l'extraction des ARN totaux (M1)

- Quantification des ARN totaux obtenus (M1)
- Dépôt sur gel d'acryl dénaturant et coloration (M1)
- Repiquage des levures diploïdes sur milieu sélectif (M3)

Jour 3: -Gel acryl dénaturant et dépôt (M1)

- Transfert sur membrane de nylon et marquage de sondes du snoARN U3, hybridation (M1)
- PCR (M4)
- Premières lectures de boîtes (M2)

Jour 4: -Fin de la révélation sur la membrane (M1)

- Dépôt sur gel d'agarose des produits de PCR (M4)
- Lecture des boîtes à 20° C, 30° C et 37° C (M2)
- Lecture des résultats de double hybride (M3)
- Interprétation de l'ensemble des données

Établir un lien, si possible, entre les résultats obtenus pour la croissance des cellules, la stabilité des snoARN U3 mutants dans la cellule et la maturation des ARNr.

Jour 4: -Colle de 2 heures

Manipe 1: Analyse des ARN totaux de levure

Pour cette manipulation, il faut porter des gants propres

Jour 1. Extraction des ARN totaux de levure.

Au début de la séance, il faut penser à faire chauffer un bain sec à 70 ° C.

Des culots cellulaires vous seront fournis, qui correspondent à des cellules JH84 non transformées, prélevées à différents temps après le moment de la répression sur glucose (temps de prélèvement: t0, t12 et t24 après la répression) ainsi que des cellules transformées par les plasmides contenant différents variants de U3 (voir détails manipe 2).

Chaque binôme est responsable de 2 conditions: 1 extraction par personne.

Les culots de cellules déjà réprimées vous seront fournis (environ 1DO).

-Reprendre les levures dans 300 µl de tampon d'extraction (+ protéinase K) fourni.

-Agiter sur un vortex jusqu'à ce que le culot soit parfaitement repris.

-Incuber à 70° C pendant 15 min. en vortexant toutes les 5 min.

-Placer les échantillons dans la glace pendant 5 min. puis ajouter 175 µl de tampon de précipitation des protéines. Vortexer pendant 10 sec.

-Culoter les débris cellulaires par centrifugation pendant 10 min. à 10.000g à 4° C.

-Transférer le surnageant dans un nouveau tube.

-Ajouter 500 µl d'isopropanol et mélanger par inversion 30-40 fois (pas de vortex!).

-Culoter l'ARN précipité par centrifugation pendant 10 min à 4° C à 10.000g. Eliminer le surnageant à la micropipette, attention à ne pas perdre le culot.

Jour 2-A. Fin de l'extraction des ARN totaux.

Au début de la séance, il faut penser à faire chauffer un bain sec à 96 ° C.

-Ajouter 700 µl d'éthanol à 70%.

-Centrifuger 5 min à 13000 rpm à 4° C.

-Enlever le surnageant à la pipette.

-Sécher les culots.

-Reprendre les culots d'ARN dans 20 µl d'eau stérile (à discuter).

Jour 2-B. Quantification des ARN totaux.

-Diluer chaque ARN au 1/500e dans de l'eau stérile.

-Mesurer la DO à 260 nm et 280 nm de chaque préparation d'ARN.

-Calculer la concentration en ARN dans chaque échantillon, sachant que: 1 U de DO₂₆₀ correspond à 40 µg d'ARN/ml.

Jour 2-C. Dépôt sur gel d'acryl des ARN totaux.

Préparation d'un gel d'acryl dénaturant 6%, urée 8M, TBE 1X pour toute la salle.

Chacun prépare et dépose son échantillon (2 par binôme).

-Prélever le volume adéquat pour 10 µg d'ARN totaux.

-Ajuster ce volume à 10 µl avec de l'eau stérile.

-Ajouter 10 µl de bleu de dépôt.

-Chauffer 2 min à 96° C et mettre immédiatement dans la glace.

-Migration à 25 mA pendant 3 heures en TBE 1X (XC sorti).

-Colorer le gel au bleu de toluidine

Jour 3-A. Préparation d'un gel de polyacrylamide dénaturant.

Au début de la séance, il faut penser à faire chauffer un B.M. à 65 ° C, le bain sec à 96 ° C.

Déterminez la concentration en acryl/bis acryl à utiliser dans le gel (un gel pour toute la salle).

Préparation d'un gel d'acryl dénaturant 6%, urée 8M, TBE 1X pour toute la salle.

Jour 4. Fin de la révélation de la membrane.**Jour 3-B. Dépôt des ARN sur gels dénaturants et migration.**

-Prélever le volume d'ARN nécessaire pour avoir 5 µg d'ARN totaux.

-Ajuster le volume à 6 µl.

-Ajouter 6 µl de bleu de dépôt.

-Dénaturer 3 min à 96 ° C.

-Déposer les échantillons dans des poches bien rincées (pour bien éliminer l'urée).

-Migration 25 mA.

(Pendant que le gel migre, s'occuper de la PCR (Manipe 4))

Jour 3-C. Transfert sur membrane de Nylon Hybond N+.

-Découper 6 morceaux de papiers Wattman 3M/gel de 14x16 cm.

-Découper la membrane Nylon Hybond N+ de 14x16 cm.

-Tremper les morceaux de Wattman 3M et la membrane dans du TBE 0.5X.

-Faire le « sandwich » suivant de haut en bas: 3 feuilles de Wattman, la membrane, le gel, 3 feuilles de Wattman.

-Éliminer bien les bulles avec une pipette.

-Transférer 30 min (3 mA/cm²).

-Mettre les membranes sur du papier Saran, fixer aux UV 5 min.

-Préhybridation/hybridation (primer 41, primer 943: snRNAU6 nt 58 à 71, primer 944: snRNAU6 nt 41 à 55 marqués au P³²) sur la nuit.

Génotype de la souche de *S. cerevisiae* JH84

JH84: *MATa snr 17a. Gal^d:URA3 snr 17b:LEU2 his3 ade2 can1* (Hughes et Ares, 1991)

La souche est fournie transformée par le plasmide pASZ11.

Le plasmide pASZ11 est un plasmide navette centromérique *E. coli*/*S. cerevisiae* qui possède les éléments de réplication utilisés chez *E. coli*, ainsi que le gène de résistance à l'ampicilline qui permet de sélectionner les bactéries ayant été transformées par ce plasmide. Il possède aussi des éléments de réplication utilisés par la levure *S. cerevisiae*. Le gène ADE2 est porté par ce plasmide et permet de compléter l'auxotrophie de la souche JH84 vis-à-vis de l'adénine.

Manipe 2: Fonctionnalité du snoARN U3

Pour toutes ces manipulations, il faut travailler stérilement

Jour 1. Étalement des souches de levure transformées.

Les précultures en milieu galactose (YPG) et la répression 24h en milieu glucose (YPD) ont été faites.

Vous devez diluer ces cultures afin d'étalement un nombre de cellules équivalent de chaque mutant.

On estime qu'1 unité de DO par ml à 600nm correspond à $3 \cdot 10^7$ cellules par ml de culture.

Vous devez diluer les cultures de façon à étalement 10 μ l de chaque culture, soit environ 10^5 cellules. (Faire 1 ml à 0,3 DO).

Par binôme, faire une dilution de la souche contenant le plasmide:

- codant le snoARN U3 sauvage: WT.
- ne codant pas de snoARN U3 (plasmide vide): pASZ11.

- faire une dilution des souches mutantes de façon à ce que tous les mutants soient testés au moins une fois: **répartition entre les binômes discutée en salle de TP.**

Vous disposerez des mutants 243, 1031, 1978, 1190, 1539, 1830, et U3BC (description des mutations à la fin du polycopié).

Les cellules sont étalées sur des boîtes YPD (milieu complet contenant du glucose comme source de carbone), en triple. Deux binômes feront également un étalement de tous les mutants sur des boîtes de milieu YPG

(milieu complet contenant du galactose comme source de carbone), en triple également.

Chaque binôme placera une de ses boîtes à 20° C, une à 30° C et une à 37° C. Les boîtes pourront être interprétées après 48h de croissance pour les cultures à 30° C et 37° C, et après 72h de croissance pour les cultures à 20° C.

Jour 3. Lecture des boîtes à 30° C et 37° C.**Jour 4. Lecture des boîtes à 20° C, 30° C et 37° C.**

Manipe 3: Tests de double Hybride

Pour toutes ces manipulations, il faut travailler stérilement

Jour 1-A. Croisement des haploïdes

Vous allez réaliser le croisement de souches haploïdes afin d'obtenir les diploïdes nécessaires aux tests de double hybride.

- Préparer un eppendorf avec 200 μ l d'eau stérile flamme.
- Diluer une pointe de cône de chaque souche haploïde dans l'eau.
- Faire des goutte de 5 μ l sur milieu YPD selon le schéma fourni.

Jour 1-B. Tests de double hybride.

En parallèle, des souches de levure diploïdes (que vous obtiendrez vous même au Jour 2) vous sont fournies et vous allez tester l'interaction entre les protéines Snu13p et Rsa1p ou un de ses fragment appelé N_{III}C_I.

- Préparer un eppendorf avec 200 μ l d'eau stérile flamme.
- Diluer une pointe de cône de souche diploïde dans l'eau.
- Faire une goutte de 5 μ l sur les différentes concentrations en 3 AT.

Jour 2. Repiquage des levures diploïdes sur milieu sélectif (issues de Jour 1-A)

- Préparer un eppendorf avec 200 μ l d'eau stérile flamme.
- Diluer une pointe de cône de souche diploïde dans l'eau.
- Faire une goutte de 5 μ l sur milieu sélectif.

Jour 4. Lecture des résultats.

Jour 3. PCR sur différents snoARN U3 clonés dans le pASZ11.

	U3 WT	U3 243	U3BC
pASZ11 (50 ng/μl)	2	2	2
dNTPs (10 mM chaque)	1	1	1
oligodéoxynucléotides 1/3 (15 pmol/μl chaque)	2	2 OU	2
oligodéoxynucléotides 2/3 (15 pmol/μl chaque)	2	2	2
Tampon de réaction 5X	10	10	10
GoTaq (1U/μl) Invitrogen	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μl	1,5 μl	1,5 μl
H ₂ O	qsp 50 ml		

ATTENTION: deux mix à faire:
1 X oligos 1 et 3; 1 X oligos 2 et 3

Faire un master mix pour
n réactions + 1 (sans matrice ni oligos)

Séquence de l'oligodéoxynucléotide 1 et 2 (923 ou 325):

1: 5'-AGCTCGTCGACGTACTTCA-3'

2: 5'-GTCGACGTACTTCATAGGATCA-3'

Séquence de l'oligodéoxynucléotide 3 (41):

3: 5'-ACTTGTCAGACTGCC-3'

agctcgtcgacgtacttca

gtcgacgtacttcataggatcatttctataggaatcgtcactctttgactcttcaaaaga
gccactgaatccaacttgggtgatgagtcceataaccttgtacccagagtgagaaa
ccgaaattgaatctaaattagcttggtcgcaatccttagcggtcggccatctataatt
ttgaataaaaaattttgctttggcggtgcattttagtttttcctttggaagtaattacaat
attttatggcgcatgatcttgacccatcctatgtacttctttttgaagggatagggtc
tatgggtgggtacaaatggcagtcgacaagt

En gras: U3 mature

Souligné: oligos 1, 2 ou 3

*Cycles de PCR à effectuer: **Déterminez le protocole le + adapté***

Cycles	fonction	température	temps
1	dénaturation		
2 à 31	dénaturation		
	hybridation		
	élongation		
32	élongation		
33	stockage		

Jour 4. Dépôt sur gel des produits PCR

Gel agarose 1,2 % Vf= 200 ml

Agarose en poudre

TBE 1x

Bet ou col. fluo.

Composition des tampons, milieux de culture et solutions de polyacrylamide

Tampons

TBE: Tris borate 89 mM pH 8,3; EDTA 2 mM (TBE 1X)

Tampon de pré-hybridation: SSPE 6X, Denhardt's 5X, SDS 0,5%

SSPE 20X: NaCl 1M, Na₂HPO₄, 2H₂O 150 mM, EDTA 25 mM

Milieux de cultures liquides

YPD: Milieu complet	bactopeptone	20 g
	extrait de levure	10 g
	glucose	20 g
	H ₂ O qsp 1 litre. Stériliser	

YPG: Milieu complet	bactopeptone	20 g
	extrait de levure	10 g
	galactose	20 g
	H ₂ O qsp 1 litre. Stériliser	

Grille d'analyse de croissance de la souche JH84 transformée par les différentes constructions

JH84	YPG			YPD		
	20° C	30° C	37° C	20° C	30° C	37° C
1) Plasmide vide (pAS 0)						
2) U3 WT (185)						
3) U3 243 (243)						
4) U3 mutH-II (1190)						
5) U3 mutH-IV (1539)						
6) U3 mutH-III (1031)						
7) U3Δ2,3,4 WT (BC)						
8) U3Δ2,3,4 mutB (1830)						
9) U3Δ2,3,4 mutD (1978)						

Tableau indiquant la correspondance entre % du gel et taille des fragments à séparer

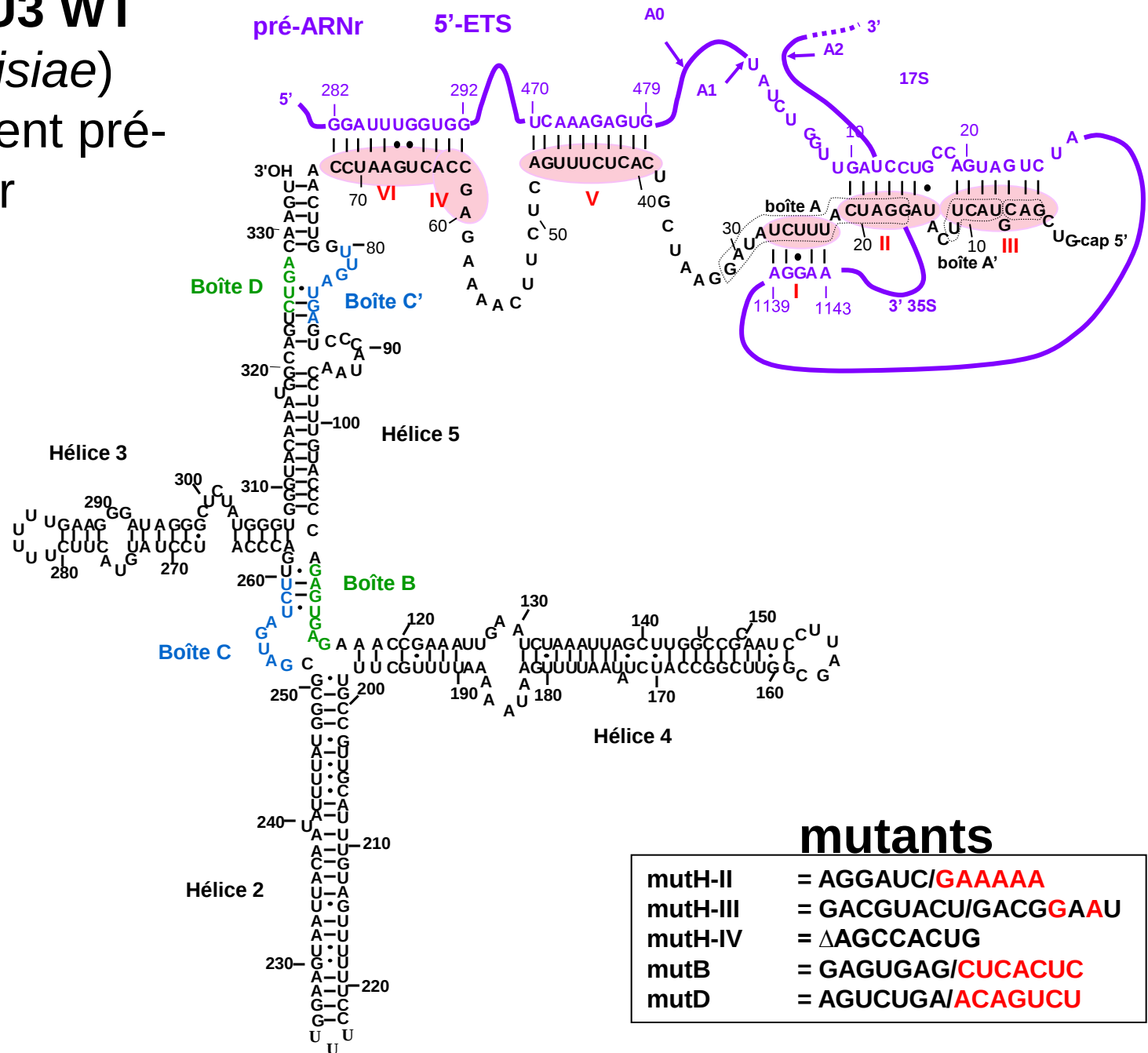
Agarose gel, %	Range of separation, bp	Polyacrylamide gel, %	Range of separation, bp	Recommended Gel Percentages for Separation of Linear DNA
0.5	1,000-30,000	3.5	100-1,000	
0.7	800-12,000	5.0	80-500	
1.0	500-10,000	8.0	60-400	
1.2	400-7,000	12.0	40-200	
1.4	200-4,000	20.0	5-100	
2.0	50-2,000			

Migration Rates of the Marker Dyes through Polyacrylamide Gels

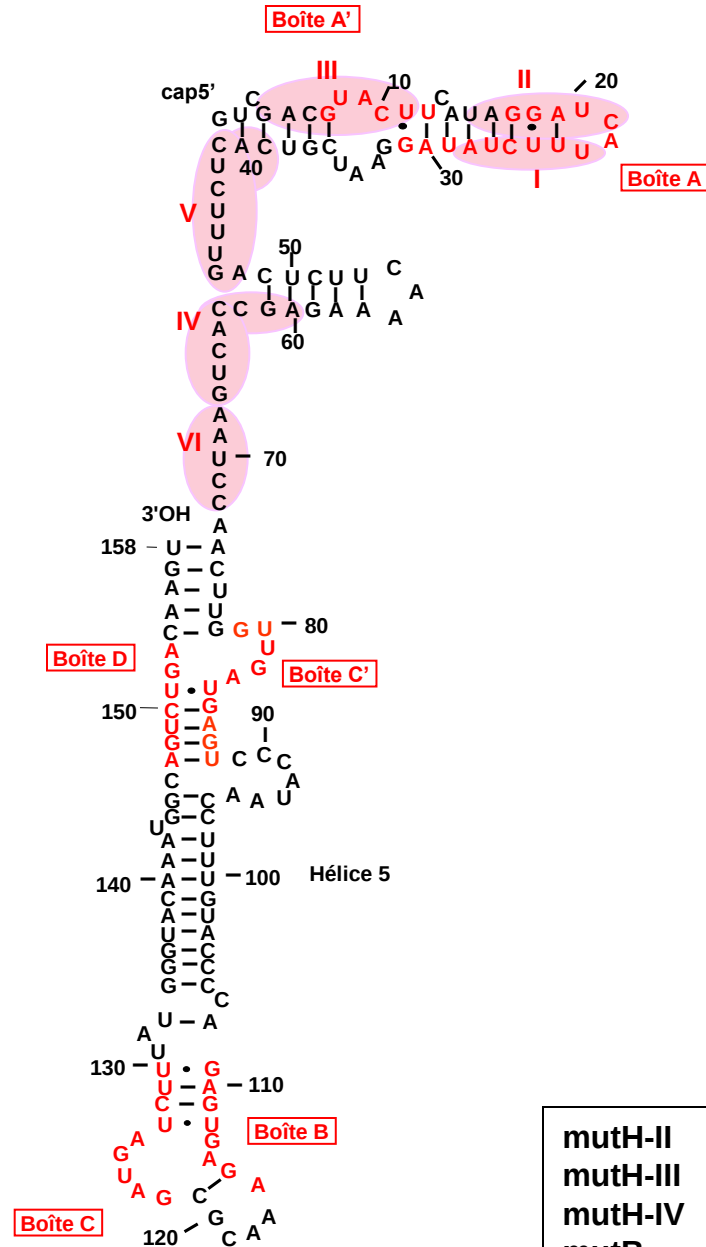
Polyacrylamide gel, %	Bromophenol blue*	Xylene cyanol FF*
Non-denaturing gels		
3.5	100 bp	460 bp
5.0	65 bp	260 bp
8.0	45 bp	160 bp
12.0	20 bp	70 bp
15.0	15 bp	60 bp
20.0	12 bp	45 bp
Denaturing gels		
5.0	35 bases	130 bases
6.0	29 bases	106 bases
8.0	26 bases	76 bases
10.0	12 bases	55 bases
20.0	8 bases	28 bases

Matrix	% of gel	Fragment size
Acrylamide	4%	400-100 pb
	5%	200-400 pb
	8%	50-200 pb
	10%	5-50 pb
	12%	1-10 pb
Agarose	0.5-1.0%	1-20 kb
	1.1-2.0%	0.5-8 kb
	2.1-3.0%	0.3-5 kb
	3.1-4.0%	0.2-3 kb

snoRNA U3 WT (*S. cerevisiae*) + appariement pré- ARNr



U3 Δ 2,3,4



mutants

mutH-II	= AGGAUC/ GAAAAA
mutH-III	= GACGUACU/GACG GAAU
mutH-IV	= Δ AGCCACUG
mutB	= GAGUGAG/ CUCACUC
mutD	= AGUCUGA/ ACAGUCU