

26

CLONAGE DES GÈNES DE VIRUS À ADN

Claire Simard

1. INTRODUCTION

L'analyse de la structure et de la fonction des gènes comprend leur isolement et leur amplification de façon à permettre leur caractérisation physique. Les techniques du génie génétique fournissent le moyen de purifier un gène et ses séquences associées à partir de génomes complexes. L'obtention de quantités importantes d'ADN du gène à étudier se fait via son insertion dans un vecteur de clonage (réplicon). Un vecteur de clonage est une molécule d'ADN (virale ou plasmidique) qui est capable de se répliquer de façon autonome dans un organisme-hôte compatible.

1.1. FRAGMENTATION DE L'ADN À CLONER

Pour pouvoir être inséré et maintenu efficacement dans un vecteur de clonage, l'ADN à cloner doit être fragmenté de façon à générer des molécules de grosseur acceptable pour le vecteur choisi. La digestion par les enzymes de restriction est la façon la plus simple de fragmenter

l'ADN; deux types de digestion sont possibles et seront décrits.

1.1.1. Méthode des digestions totales

L'ADN viral à cloner peut être digéré totalement en utilisant une enzyme de restriction qui reconnaît une séquence de six nucléotides (*e.g.* *EcoR* I, *Hind* III). Les fragments générés peuvent être insérés dans un vecteur plasmidique linéarisé avec la même enzyme et préalablement déphosphorylé afin d'empêcher la recircularisation du vecteur et ainsi de diminuer le bruit de fond. Cette méthode possède quelques inconvénients:

- Les fragments d'ADN viral produits étant de grosseurs variables, les plus petits seront favorisés au moment de la ligature dans le vecteur.
- Deux fragments ou plus d'ADN viral pourront être insérés dans la même molécule de vecteur.
- Cette méthode ne permettra pas de cloner deux des fragments générés,

dans le cas où le génome viral est constitué d'un ADN linéaire tel que l'adénovirus, le virus herpès et le poxvirus. En effet, il manquera un site cohésif aux deux fragments qui correspondent aux extrémités du génome. Pour pallier à cet inconvénient, l'ADN viral pourrait être traité avec le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I en présence des quatre désoxynucléotides de façon à rendre les extrémités rases; l'ADN serait ensuite digéré avec une enzyme produisant des extrémités rases (*e.g.* *Sma* I) et les fragments seraient insérés dans un vecteur linéarisé par une enzyme à coupure franche (voir aussi Hammerschmidt *et al.* 1986).

1.1.2. Méthode des digestions partielles

L'ADN génomique purifié est digéré partiellement avec une enzyme de restriction reconnaissant une séquence de 4 nucléotides (habituellement *Sau* 3A ou *Mbo* I) de façon à générer des fragments de grosseur adéquate pour le vecteur choisi, soit d'environ 10 kilo paires de base (kpb) pour un plasmide, 20 kpb pour un vecteur Lambda (Frischauf *et al.* 1983, Maniatis *et al.* 1982) et 35-40 kpb pour un cosmide (Yu-Sun *et al.* 1986). Les fragments sont ensuite insérés dans le site *Bam*H I du vecteur choisi. Cette méthode offre quelques avantages par rapport à la précédente:

- Comme les fragments seront relativement de la même grosseur, la ligation dans le vecteur ne favorisera aucun d'eux.
- Il est fortement recommandé de déphosphoryler les fragments obtenus de l'ADN génomique avant la ligation avec le vecteur pour éviter qu'ils se relient entre eux (et que plus d'un fragment soit inséré dans le même

vecteur). Dans ce cas, le vecteur ne doit pas être déphosphorylé, sinon la ligation sera irréalisable.

- Les fragments obtenus seront statistiquement dérivés à partir de toutes les régions du génome et il sera donc possible de faire du "chromosome walking" pour sélectionner les gènes juxtaposés à un recombinant X.
- Cette méthode ne permettra probablement pas non plus de cloner les extrémités d'un génome linéaire; cependant, comme il y est plus probable d'avoir des sites *Sau* 3A que par exemple des sites *Eco* R I près des extrémités, la banque génomique produite sera complète.

1.2. CHOIX DU VECTEUR DE CLONAGE

1.2.1. Les vecteurs lambda et les cosmides

Le bactériophage λ est constitué d'un ADN génomique de 50 kpb. La molécule linéaire double brin possède à ses deux extrémités une séquence d'ADN simple brin de 12 nucléotides complémentaires: cette séquence a été appelée "site *cos*". En modifiant le bactériophage, plusieurs vecteurs lambda ont été construits et le site *cos* du bactériophage a été utilisé pour construire des vecteurs cosmides (Collins 1979)

Ces types de vecteurs offrent deux avantages très importants pour la construction de banques génomiques:

- Des fragments d'ADN jusqu'à environ 20 kpb (ou 35-40 pour les cosmides) peuvent être insérés dans la plupart des vecteurs.
- Le nombre de recombinants obtenus peut être aussi grand que 10^8 - $10^9/\mu\text{g}$

d'ADN initial, grâce aux systèmes d'encapsulation *in vitro* développés pour l'introduction des molécules recombinantes dans *E. coli* (Enquist et Sternberg 1979, Rosenberg *et al.* 1985).

Grâce à cette efficacité de clonage, ces vecteurs seront souvent utilisés au cours de la construction de bibliothèques complètes de très gros génomes, tels que les ADN chromosomiques de cellules eucaryotes ou procaryotes. Cependant, étant donnée que les fragments insérés sont très gros, l'ADN génomique de départ doit être intact.

1.2.2. Les vecteurs plasmidiques

On a construits de nombreux vecteurs vecteurs plasmidiques pour permettre le clonage d'ADN complémentaires ou d'ADN génomiques; le plus populaire est sans contredit le plasmide pBR322 construit par Bolivar *et al.* (1977), puis séquencé par Sutcliffe (1978).

Plusieurs vecteurs ont été dérivés à partir de pBR322 et du bactériophage M13; mentionnons la série des pUC (Vieira et Messing, 1982), les vecteurs pTZ (Pharmacia Fine Chemicals) et Bluescript (Stratagene). Ils offrent l'avantage de pouvoir sélectionner les recombinants directement par leur phénotype négatif d'activité de la β -galactosidase, si un substrat chromogène a été ajouté au milieu de culture pour la croissance des colonies bactériennes (Ruther 1980).

Les familles pTZ, Bluescript et pEMBL (Dente 1983) permettent d'amplifier les gènes clonés sous la forme d'ADN double brin (pour les cartographies physiques et le séquençage chimique) ou d'ADN simple brin (pour les mutagénèses dirigées et le séquençage selon la méthode des didésoxynucléotides).

Tous ces vecteurs devraient offrir la même efficacité d'insertion et de transformation. Le choix du vecteur dépendra du genre d'analyses que l'on veut effectuer avec les recombinants sélectionnés (expression de protéines, séquençage, transcription *in vitro*, mutagénèses dirigées, etc.).

Les techniques du génie génétique permettent donc d'insérer des fragments d'ADN provenant de n'importe quel organisme, dans un réplicon plasmidique ou viral, pour former des molécules chimériques, lesquelles pourront être répliquées dans l'organisme-hôte correspondant au réplicon utilisé. Nous décrivons maintenant un protocole détaillé permettant la construction de banques génomiques de virus à ADN.

2. MÉTHODE

La méthodologie présentée ici illustre le clonage du virus herpès bovin BHV. Le génome linéaire de ce virus est de 140-150 kpb et l'ADN peut être purifié et obtenu en grande quantité avec peu de contamination provenant de l'ADN cellulaire de l'hôte. Dans ces conditions, il est avantageux d'effectuer le clonage dans un vecteur plasmidique (nous choisissons le vecteur Bluescript KS+ de Stratagene parce qu'il est universel, mais un autre vecteur contenant un site unique *Sal* I peut aussi être utilisé). La technique de clonage utilisée a été décrite par Zabarovsky et Allikmets (1986). Le principe de la méthode est le suivant (Figure 1):

1. L'ADN génomique est partiellement digéré avec *Sau* 3A pour générer des fragments d'environ 10 kpb; les bouts cohésifs générés de quatre nucléotides simple brin sont ensuite partiellement remplis avec les nucléotides dATP et dGTP, laissant

- seulement 2 nucléotides en simple brin à chaque extrémité.
2. Le vecteur plasmidique Bluescript est linéarisé par digestion totale avec *Sal I*; les bouts cohésifs de quatre nucléotides simple brin sont partiellement remplis avec les nucléotides dTTP et dCTP, laissant 2 nucléotides en simple brin à chaque extrémité.
 3. Les fragments d'ADN génomique sont liés avec le vecteur linéarisé dans une réaction de ligature. En conséquence des extrémités libres restantes, il se produira ce qui suit:
 - a) les fragments d'ADN génomique ne pourront pas se religaturer les uns aux autres, ni se circulariser (donc tout l'ADN est disponible pour l'insertion dans le vecteur)
 - b) une molécule de vecteur ne pourra pas se lier à une autre de même type, ni se circulariser (par conséquent un bas niveau de bruit de fond après transformation)
 - c) tous les clones obtenus seront des recombinants (à l'exception de ceux qui auront été obtenus à la suite d'une digestion incomplète du vecteur)
 2. Compléter le tube avec du TEN et équilibrer.
 3. Centrifuger à 25 000 rpm dans le rotor SW 28, à 5°C, durant 2 h.
 4. Vider les surnageants par inversion (dans un contenant pour décontamination) et essuyer l'intérieur du tube avec un tissu absorbant.
 5. Resuspendre le culot viral dans 400 µL de TEN. Pour aider la suspension, passer quelques secondes aux ultra-sons.
 6. Transférer la suspension dans un micro-tube en polypropylène (tube Eppendorf). Rincer le tube initial avec 400 µL de TEN, mélanger au Vortex, et l'ajouter à celle obtenue en 5.

2.1.2. Purification de l'ADN viral

1. Ajouter à la suspension virale les éléments suivants et mélanger par inversion:

MgCl ₂ 1 M.....	8 µL
ADNase I (10 mg/mL).....	4 µL
RNAse A (10 mg/mL).....	4 µL
2. Incuber à 37°C, durant 1 h.
3. Inactiver l'ADNase par l'addition de 16 µL d'EDTA 0.5 M (10 mM final) et mélanger.
4. Ajouter:

20% SDS (1% final)	42 µL
Protéinase K (20 mg/mL)	10 µL
5. La solution virale deviendra claire. Incuber à 37°C durant 1 h.

2.1. ISOLEMENT DE L'ADN VIRAL

2.1.1. Concentration des virions

1. Déposer le surnageant viral sur un coussin de 5 mL de 40% saccharose dans du tampon TEN (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM) dans un tube pour le rotor SW-28.

6. Extraire pendant 2-4 min avec 0.5 volume de phénol équilibré, puis ajouter 0.5 volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) et extraire encore quelques minutes. Il est conseillé d'inverser le tube et non de mélanger au Vortex durant les extractions afin de ne pas briser mécaniquement l'ADN.
7. Centrifuger, prélever la phase aqueuse et transférer dans un tube propre.
8. Réextraire la phase aqueuse au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) puis une seconde fois au chloroforme: alcool isoamylique.
9. Ajouter 0.05 volume de 3 M NaOAc pH 5.2 et 2.2 volumes d'éthanol 95% à -20°C.
10. Mélanger (observer la précipitation de l'ADN) et conserver à -20°C durant la nuit.
11. Centrifuger à 4°C durant 10 min, laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70% froid.
12. Sécher à l'air et dissoudre dans 200-600 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM). Doser une aliquote à 260 nm en utilisant la relation:

$$DO_{260\text{ nm}} = 1 = 50 \mu\text{g/mL}$$

2.2. DIGESTION PARTIELLE DE L'ADN GÉNOMIQUE

Solutions

Tampon *Sau* 3A, 10X

Tris-HCl pH 7.4	200 mM
MgCl ₂	50 mM
KCl	500 mM

Tampon *Mbo* I, 10X

Tris-HCl pH 8	500 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	500 mM

Tampon d'arrêt 5X/SDS

Glycérol	25%
EDTA pH 8	25 mM
SDS	1%
Bromophénol bleu	0.1%

Méthode

1. Dans un microtube sur glace, ajouter:

ADN génomique purifié	10 µg
Tampon de digestion 10X	15 µL
Eau distillée	à 150 µL

 Mélanger, centrifuger et replacer à 0°C.
2. Dans un autre tube à 0°C, diluer l'enzyme *Sau* 3A (ou *Mbo* I):

<i>Sau</i> 3A, 8 U/mL	2 µL
Tampon de digestion 10X	2 µL
H ₂ O	16 µL

 La concentration d'enzyme sera de 0.8 U/µL.
3. Identifier 9 tubes et placer les dans un bain de glace.

4. Distribuer le mélange ADN de la façon suivante:

<i>Tube</i>	<i>ADN(μL)</i>	<i>(unités d'enzyme/μg)</i>
#1	30	2.0
#2	15	1.0
#3	15	0.5
#4	15	0.25
#5	15	0.125
#6	15	0.0625
#7	15	0.0313
#8	15	0.0156
#9	15	0.0

5. Ajouter 5 μL de l'enzyme diluée au tube #1. Mélanger, centrifuger rapidement et replacer à 0°C.
6. Transférer 15 μL du tube #1 au tube #2 puis mélanger.
7. Transférer 15 μL du tube #2 au tube #3 et mélanger.
8. Continuer ainsi jusqu'au tube #8. *Ne rien ajouter au tube #9 qui sert de témoin non digéré.* La concentration finale d'enzyme par μg d'ADN est indiquée dans la colonne de droite.
9. Centrifuger rapidement tous les tubes.
10. Incuber dans un bain à température contrôlée à 37°C durant une heure. La température et le temps d'incubation sont importants puisque cette expérience permettra d'établir les conditions de digestion nécessaires pour obtenir la grosseur de fragments désirée.
11. Placer les tubes à 0°C.
12. Ajouter 4 μL de tampon d'arrêt 5X/SDS aux tubes #1-7 et #9; 8 μL de tampon d'arrêt/SDS au tube #8.
13. Analyser en gel d'agarose 0.6%; chauffer les échantillons à 60-65°C avant de les déposer dans les puits; faire migrer lentement toute la nuit à 15-20 V.
14. Déterminer les meilleures conditions (unités d'enzyme nécessaires par μg d'ADN) pour générer des fragments d'environ 10 kpb.
15. Effectuer une digestion préparative de 20-40 μg d'ADN en conservant les mêmes conditions dans la digestion analytique (mêmes proportions dans les volumes, etc).
16. Prélever une aliquote de 15 μL (donc contenant 1 μg d'ADN) et analyser en gel d'agarose pour vérifier l'état de la digestion.
17. Ajouter au reste de l'échantillon 1 volume de phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) et extraire pendant 3-4 min.
18. Centrifuger pendant 5 min à vitesse maximale dans une micro-centrifugeuse.
19. Transférer la phase aqueuse (supérieure) dans un micro-tube propre; réextraire la phase organique (inférieure) par 0.25 volume de TEN (10 mM Tris-HCl pH 8 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), centrifuger 10 min et rassembler les phases aqueuses.
20. Réextraire la phase aqueuse avec 1 volume de chloroforme: alcool isoamylique (24:1).
21. Extraire la phase aqueuse 2 fois avec 2 volumes d'éther diéthylique saturé d'eau. La phase aqueuse se retrouvera *sous* l'éther.

22. Ajouter 0.05 volume de 3 M NaOAc pH 5.2 à la phase aqueuse et 2.2 volumes d'éthanol 95% froid (à -20°C). Bien mélanger.
23. Conserver à -20°C toute la nuit.
24. Centrifuger à 4°C durant 10 min. Enlever le surnageant avec une pipette pasteur étirée au brûleur (attention au culot).
25. Laver le culot avec 500 μL d'éthanol 70% froid (-20°C), centrifuger pendant 1 min et enlever le surnageant.
26. Sécher à l'air, dissoudre dans du TE 1X pour avoir une concentration d'environ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Doser une aliquote à 260 nm en utilisant la relation: $\text{DO}_{260\text{nm}} = 1 = 50 \mu\text{g}/\text{mL}$

2.3. LINÉARISATION DU VECTEUR

Solution

Tampon 10X *Sal I*

Tris-HCl pH 7.5	1.0 M
NaCl	1.5 M
MgCl ₂	0.1 M

Méthode

1. Dans un microtube, ajouter

Plasmide Bluescript purifié.....	20 μg
Tampon 10X <i>Sal I</i>	10 μL
<i>Sal I</i> (environ 50 U)	5 μL
H ₂ O	100 μL
2. Mélanger, centrifuger durant 3 sec puis incubé à 37°C durant 2-4 h.

3. Analyser une aliquote (2 μL) sur mini-gel d'agarose 1% en ayant soin d'analyser en parallèle le plasmide non digéré. Si la digestion est incomplète, ajouter 5 μL de *Sal I* et laisser incubé à 37°C toute la nuit. Le lendemain, vérifier si la digestion est complète.
4. Extraire au phénol/chloroforme, puis à l'éther comme ci-haut, et précipiter l'ADN à l'éthanol.
5. Centrifuger 10 min à 4°C , laver le culot à l'éthanol 70% froid et sécher à l'air.
6. Dissoudre dans 20 μL de TE 1X et doser une aliquote.

2.4. REMPLISSAGE PARTIEL DES BOUTS COHÉSIFS

Solution

Tampon Klenow 10X

Tris-HCl pH 7.5	0.5 M
MgCl ₂	0.1 M
Dithiothréitol	1 mM

Méthode

1. Dans un microtube, ajouter:

ADN viral- <i>Sau 3A</i>	10 μg
Tampon Klenow 10X	5 μL
dATP 2 mM pH 7	2.5 μL
dGTP 2 mM pH 7	2.5 μL
H ₂ O	à 48 μL
Fragment de Klenow (6 U/ μL)	2.0 μL

2. Dans un autre tube, ajouter:

ADN Bluescript-*Sal* I 10 µg
 Tampon Klenow 10X 5 µL
 dCTP 2 mM pH 7 2.5 µL
 dTTP 2 mM pH 7 2.5 µL
 H₂O à 48 µL
 Klenow (6 U/µL) 2.0 µL

3. Incuber les deux tubes à 30°C, durant 30-45 min.
 4. Extraire au phénol/chloroforme et à l'éther comme d'habitude et précipiter l'ADN.
 5. Dissoudre dans du TE 1X pour obtenir environ 1 µg/µL.

2.5. LIGATURES

Solution

Tampon ADN ligase 10X

Tris-HCl pH 8 500 mM
 MgCl₂ 70 mM
 Dithiothréitol 10 mM

2.5.1. Ligatures témoins

1. Dans quatre microtubes sur glace, ajouter:

Tampon ADN ligase 10X 1 µL
 ATP pH 7 10 mM 1 µL
 H₂O 6 µL
 ADN ligase de T4 (10 U) 1 µL

2. Ajouter aux microtubes respectifs:

#1 ADN viral-*Sau* 3A
 (1 µg/µL) 1 µL

#2 ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-
 dGMP (1 µg/µL) 1 µL

#3 Bluescript-*Sal* I (1 µg/µL) 1 µL

#4 Bluescript-
Sal I-dTMP-dCMP (1 µg/µL) 1 µL

3. Incuber les quatre microtubes à 4°C toute la nuit.
 4. Le lendemain, analyser en gel d'agarose 0.6% (analyser en parallèle des standards de masse moléculaire, de l'ADN viral-*Sau* 3A non ligaturé, de l'ADN Bluescript-*Sal* I non ligaturé et de l'ADN Bluescript non digéré).

Par comparaison avec l'ADN-*Sau* 3A ligaturé et non ligaturé, déterminer si les bouts cohésifs de l'ADN viral *Sau* 3A-dAMP-dGMP ont bel et bien été partiellement remplis:

- a) si les extrémités sont correctes, les molécules de l'ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-dGMP ne se lieront pas les uns les autres et la migration de l'ADN sera équivalente à l'échantillon ADN-*Sau* 3A non ligaturé.
 b) l'échantillon ADN viral-*Sau* 3A ligaturé aura une migration moindre (puisque certaines molécules sont liées entre elles par des liens covalents) que l'ADN de départ non ligaturé. Cet essai permet de certifier que la ligase était bien active et ne peut donc être la cause de l'absence de ligature de l'ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-dGMP.

De la même façon, déterminer si les bouts cohésifs de l'ADN Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP sont inaptes à la ligature inter ou intramoléculaire.

Si ces analyses sont positives, passer à l'étape suivante, sinon il faudra refaire l'étape avec le fragment de Klenow.

2.5.2. Ligature de l'ADN viral avec le vecteur

La ligature de l'ADN viral dans le vecteur se fait ici en équimolarité. Comme l'ADN viral (fragments de 10 kpb) est environ 3 fois plus gros que le vecteur (environ 3 kpb), il faut 3 fois moins de vecteur que d'ADN viral dans le milieu réactionnel.

1. Dans un microtube sur glace, ajouter:

Tampon ligase 10X 1 μ L
 ATP 10 mM pH 7 1 μ L
 H₂O 5 μ L

ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-dGMP
 (1 μ g/ μ L) 1 μ L

Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP
 (0.3 μ g/ μ L) 1 μ L

Mélanger puis ajouter:

ADN ligase de T4 (10 U) 1 μ L

2. Dans un deuxième microtube, ajouter:

Tampon ligase 1 μ L
 ATP 10 mM pH 7 1 μ L
 H₂O 6 μ L

Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP
 (0.3 μ g/ μ L) 1 μ L

ADN ligase T4 (10 U) 1 μ L

3. Incuber à 4°C durant toute la nuit. Utiliser ce matériel ligaturé pour transformer des cellules compétentes de *E. coli*.

2.6. TRANSFORMATION DE *E. COLI*

Les techniques les plus courantes pour la transformation de *E. coli*, sont celles décrites par Mandel et Higa (1970) et par Hanahan (1983); le nombre de transformants attendus par ces méthodes est respectivement de 10⁶ et de 10⁷-10⁸/ μ g de plasmide circulaire. Nous détaillons ici la première méthode.

Solutions

Milieu LB

Extrait de levure Bacto 5 g
 Tryptone Bacto 10 g
 NaCl 10 g
 Eau distillée à 1 L

Pour un agar dur, ajouter 1.5 g de Bacto-Agar/100 mL de milieu LB.

Autoclaver.

CaCl₂ 100 mM

CaCl₂.H₂O 7.35 g
 Eau distillée 500 mL

Autoclaver.

IPTG (*Isopropylthio- β -galactoside*)

100 mM

Isopropyl-thio- β -galactoside
 0.119 g

Eau distillée 5 mL

Filtrer stérilement sur une membrane 0.22 μ m, répartir en petits volumes et conserver à -20°C.

2% X-Gal

5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactoside0.1 g

N'-N'-diméthylformamide5 mL

Répartir en petits volumes et conserver à 4°C.

Note: Les manipulations doivent être effectuées stérilement.

2.6.1. Préparation des cellules compétentes

Jour 1

1. À l'aide d'un fil à boucle chauffé au brûleur puis refroidi, étaler des cellules d'*E. coli* XL1-Blue (Tet^r) sur un Petri d'agar dur contenant 10 μ g/mL de tétracycline.
2. Incuber le Petri en position inversée jusqu'au lendemain à 37°C, en atmosphère humidifiée.

Jour 2

3. À l'aide d'un fil à boucle stérile, ensemer 100 mL de milieu LB avec une colonie isolée.
4. Incuber avec agitation forte à 37°C jusqu'à ce que la $DO_{650\text{ nm}} = 0.2$
5. Refroidir les cellules dans un bain d'eau glacée durant 10 min.
6. Centrifuger à 2500 g durant 5 min, à 4°C.
7. Suspendre **doucement**, par rotation, le culot cellulaire dans 1 mL de la solution de $CaCl_2$ stérile, à 0°C.

8. Ajouter 40 mL de la solution de $CaCl_2$ et transférer dans un tube de polycarbonate de 50 mL. Incuber sur glace durant 30 min.

9. Centrifuger à 2500 \times g durant 5 min.

10. Suspendre le culot cellulaire dans 1 mL de $CaCl_2$. Conserver à 0°C.

2.6.2. Transformation proprement dite

11. Distribuer 0.1 mL de cellules compétentes dans des tubes stériles en polypropylène. (Note: On peut conserver le reste des cellules compétentes à 0°C jusqu'au lendemain pour les réutiliser).

12. Ajouter:

Tube		
#1	5 μ L	TE 1X (témoin sans ADN)
#2	5 μ L	Bluescript intact, 2 ng/ μ L (témoin d'efficacité)
#3	5 μ L	milieu de ligature Bluescript- <i>Sal</i> I-dTMP-dCMP
#4	5 μ L	milieu de ligature ADN viral- <i>Sau</i> 3A-dAMP-dGMP avec le Bluescript- <i>Sal</i> I-dTMP-dCMP

13. Mélanger doucement et incuber à 0°C durant 30 min.

14. Effectuer un choc thermique à 42°C durant 90 sec, puis placer à 0°C.

15. Ajouter 1 mL de milieu LB et incuber à 37°C durant 1 h afin de permettre l'expression du gène de résistance à l'ampicilline.

Durant le temps d'incubation et afin de permettre une estimation visuelle du nombre de recombinants versus le nombre de transformants, ajouter l'inducteur (IPTG) et un substrat chromogène (X-Gal ou Blue-Gal) du gène de la β -galactosidase à 3 Petris d'agar dur contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline, de la façon suivante :

- Au centre d'un Petri, déposer 10 μL de 100 mM IPTG et 50 μL de X-Gal 2% (ou de Blue-Gal 2%).
- Étendre le mélange sur toute la surface du Petri à l'aide d'un râteau de verre (ou d'une pipette Pasteur stérile recourbée au brûleur).
- Incuber à 37°C durant 30-60 min pour permettre la diffusion des composés.

2.6.3. Étalement des cellules transformées

2.6.3.1. Détermination de la viabilité cellulaire

1. À partir du tube #1, effectuer une dilution de 1:10⁶ avec du milieu LB. Étaler 100 μL sur un Petri d'agar dur LB. Cet essai est facultatif mais il permet de vérifier la viabilité des cellules compétentes. En utilisant la relation: $\text{DO}_{650 \text{ nm}} = 1 = 8 \times 10^8$ cellules de *E. coli*/mL, on peut déterminer le pourcentage de cellules qui ont été sacrifiées durant les manipulations.
2. Étaler 100 μL directement du tube #1 (non dilué) sur un Petri LB contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline (Petri AMP). Aucune croissance ne devra être observée.

2.6.3.2. Détermination de l'efficacité de transformation

On s'attend à une efficacité de 10⁶ transformants/ μg de plasmide circulaire. Nous avons utilisé 10 ng de Bluescript circulaire donc environ 10 000 transformants sont attendus dans 1.1 mL total.

1. Étaler 50 μL de milieu du tube #2 sur un Petri AMP contenant aussi de l'IPTG et du X-Gal afin de vérifier que les colonies non recombinantes sont bleues.
2. Étaler 50 μL d'une dilution 1:10 sur un Petri AMP.

2.6.3.3. Étalement des transformants et détermination du bruit de fond

1. Étaler:
 - 50 μL du tube #3 sur un Petri AMP-IPTG-X-Gal
 - 50 μL du tube 4 sur un Petri AMP-IPTG-X-Gal
2. Une fois que le liquide a été absorbé dans l'agar, incuber tous les Petris en position inversée à 37°C toute la nuit.
3. Ajouter 2.2 μL d'ampicilline 25 mg/mL aux tubes 3 et 4, mélanger et conserver à 4°C pour étalement ultérieur.
4. Le lendemain, dénombrer les colonies.

Résultats

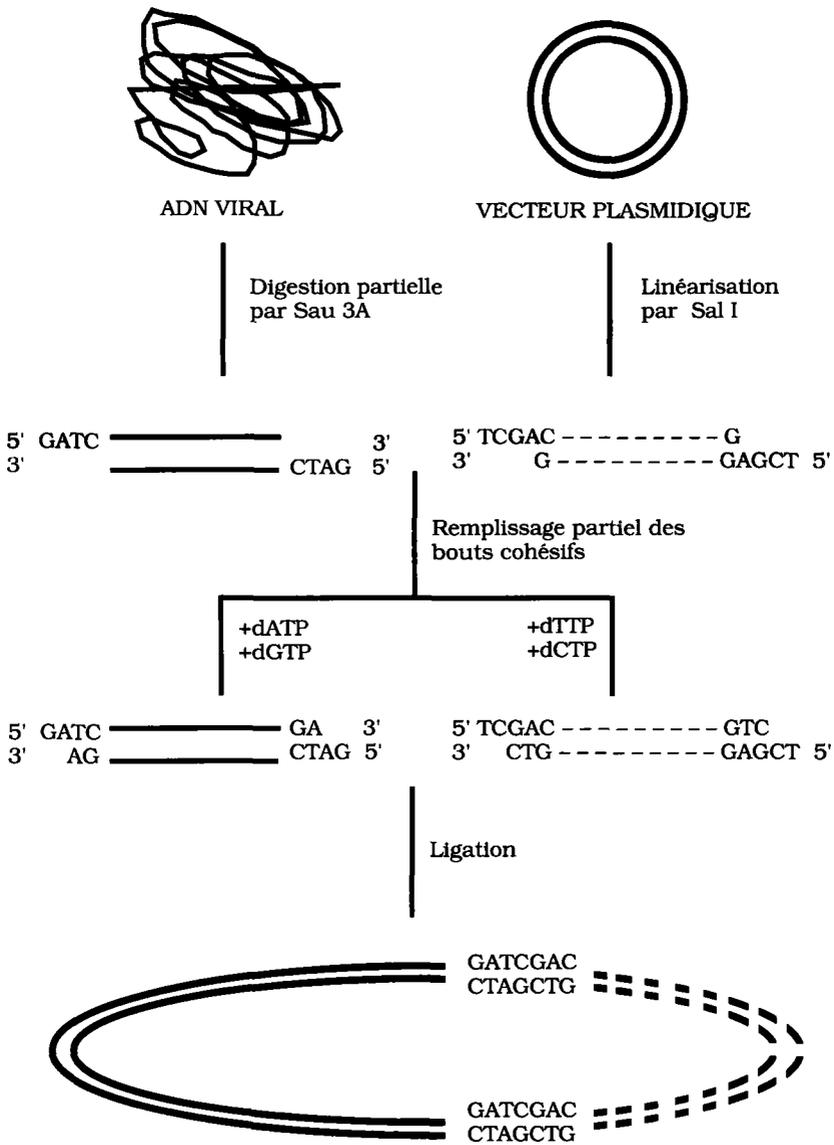
Déterminer, quant au nombre de transformants obtenus/ μg de vecteur circulaire, le niveau de compétence des cellules à partir du Petri étalé avec le tube #2.

L'étalement effectué avec le tube#3 donnera une indication du niveau de linéarisation du vecteur par *Sal* I: moins il y a de colonies, meilleure a été la digestion.

Le bruit de fond est déterminé en comparant le nombre de colonies bleues et blanches obtenues à partir de l'étalement du tube #4: les colonies bleues correspondent aux cellules transformées avec le

vecteur alors que les blanches sont de vrais recombinants (vecteur contenant une insertion).

Selon le nombre de transformants obtenus, étaler le reste des cellules transformées du tube #4 de façon à obtenir des colonies isolées. À ce moment, il n'est pas nécessaire d'utiliser des Petris contenant de l'IPTG et du X-Gal.



3. RÉFÉRENCES

- Bolivar, R., Rodriguez, R.L. *et al.* 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multi-purpose cloning system. *Gene* 2: 95.
- Collins, J. 1979. *Escherichia coli* plasmids packageable *in vitro* in Lambda bacteriophage particles. *Meth. Enzymol.* 68: 309.
- Dagert, M. et Ehrlich, S.D. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23.
- Dente, L., Cesareni, G. and Cortese, R. 1983. pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res.* 11: 1645.
- Enquist, L. et Sternberg, N. 1979. *In vitro* packaging of λ Dam vectors and their use in cloning DNA fragments. *Meth. Enzymol.* 68: 281.
- Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A. et Murray, N. 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170: 827.
- Hammerschmidt, W., Ludwig, H. et Buhk, H.-J. 1986. Short repeats cause heterogeneity at genomic terminus of bovine herpesvirus I. *J. Virol.* 58: 43.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. et Cesareni, G. 1980. Novel bacteriophage Lambda cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5172.
- Mandel, M. et Higa, A. 1970. Calcium-dependent Bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. et Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 545 pages.
- Mayfield, J.E., Good, P.J. *et al.* 1983. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus I Cooper Strain. *J. Virol.* 47: 259.
- McCarron, R.J., Cabrera, C.V., Esteban, M. *et al.* 1978. Structure of vaccinia DNA: analysis of the viral genome by restriction endonucleases. *Virology* 86: 88.
- Natt, E. et Scherer, G. 1986. EMBL 12, a new lambda replacement vector with sites for *Sal* I, *Xba* I, *Bam* HI, *Sst* I and *Eco* RI. *Nucleic Acids Res.* 14: 7128.
- Paez, E. et Esteban, M. 1987. Inhibition of host protein synthesis by DNA viruses: Mechanism of action. In *Mechanisms of viral toxicity in animal cells*, Carrasco, L. ed., CRC Press, Inc.: 59.
- Roizman, B. et Batterson, W. 1985. Herpesviruses and their replication, In *Virology*, Fields, B.N., Knipe, D.M. *et al.* eds., Raven Press, New York: 497.
- Rosenberg, S.M., Stahl, M.M. *et al.* 1985. Improved *in vitro* packaging of coliphage lambda DNA: a one-strain system free from endogenous phage. *Gene* 38:165.
- Ruther, U. 1980. Construction and properties of a new cloning vehicle, allowing direct screening for recombinant plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 178: 475.
- Sutcliffe, J.G. 1978. pBR322 restriction map marked from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucleic Acids Res.* 5: 2721.

- Vieira, J. et Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259.
- Yu-Sun, K., Liu, C. et Manning, J.S. 1986. Identification of the thymidine kinase gene of infectious bovine rhinotracheitis virus and its function in *Escherichia coli* hosts. *Gene* 44: 279.
- Zabarovsky, E.R. et Allikmets, R.L. 1986. An improved technique for the efficient construction of gene libraries by partial filling-in of cohesive ends. *Gene* 42: 119.

27

SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE

J. Arnold Verbeek et Max Arella

1. INTRODUCTION

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) comporte l'action de l'enzyme ADN polymérase ARN-dépendante (ou transcriptase inverse) pour synthétiser des molécules d'ADN en utilisant des molécules d'ARN mono ou bicaténares comme matrices. Depuis la découverte de la transcriptase inverse (Temin et Mizutani 1970, Baltimore 1970) normalement impliquée dans le processus de répllication des rétrovirus, on a largement fait usage des propriétés de cette enzyme pour le clonage de molécules d'ARN messager (ARNm) et le génome de plusieurs virus à ARN. Les conditions d'utilisation de la transcriptase inverse ont été établies pour optimiser l'action de l'enzyme et obtenir la synthèse de transcripts d'ADNc ayant pleine longueur (Maniatis *et al.* 1982, Efstratiadis *et al.* 1976, Buel *et al.* 1978, Retzel *et al.* 1980). Cependant, on ne peut appliquer aucun protocole bien standardisé, puisque différents ARN sont copiés en ADN avec une efficacité variable (Maniatis *et al.* 1982).

Généralement, en présence d'une population hétérogène de molécules d'ARNm,

ou de molécules mal caractérisées d'ARN viral génomique polyadénylées, un mélange réactionnel standard de synthèse d'ADNc contient un tampon Tris-HCl 0.1 M à pH 8.3, du potassium (140 à 150 mM), du magnésium (6 à 10 mM) et de 0.1 à 1 mM de chacun des quatre désoxynucléotides triphosphates (Efstratiadis *et al.* 1976, Buel *et al.* 1978, Retzel *et al.* 1980). La température optimale de l'activité de la transcriptase inverse avec le mélange réactionnel ci-dessus est observée à 43°C et, tout comme les "vraies" ADN polymérases, cette enzyme peut synthétiser l'ADN uniquement si elle se trouve en présence d'une amorce pré-existante ayant un groupement hydroxyl libre en 3' apparié à la matrice d'ARN. Puisque la plupart des ARNm d'eucaryotes ont une forme polyadénylée ayant jusqu'à 200 résidus adénylates à leur extrémité 3', ces séquences poly A peuvent être appariées à des molécules d'oligo(dT) (dodécamères ou plus), fournissant ainsi l'amorce nécessaire à la transcriptase inverse pour initier la synthèse de copies d'ADNc. Par la suite, la synthèse du second brin peut être réalisée par l'intermédiaire d'une ADN polymérase (e.g. le fragment de Klenow de l'ADN

polymérase I), ou même par l'utilisation subséquente de la transcriptase inverse, après hydrolyse alcaline ou digestion partielle par l'ARNase H de la matrice d'ARN. Pour pallier à l'absence de séquences poly(A) à l'extrémité 3' de molécules d'ARN bicaténaire tel que le génome segmenté des virus appartenant à la famille des réoviridés), il faut au préalable utiliser l'enzyme poly(A) polymérase d'*Escherichia coli* (Sippel 1973), afin de permettre l'amorçage de la réaction de transcription inverse.

Le produit final des réactions d'ADNc, à partir d'ARNm ou poly(A) ou d'ARN bicaténaire, sera des molécules d'ADN bicaténaire contenant l'information génétique présente originalement sur la matrice d'ARN. L'obtention des molécules pleine longueur d'ADNc dépend principalement de:

- la qualité de l'enzyme transcriptase inverse
- la qualité de la matrice d'ARN (i.e. son niveau de dégradation et/ou de torsion)
- l'absence ou l'efficacité de l'inhibition des ARNases dans les tampons utilisés pour la synthèse du premier brin d'ADNc
- la proportion de transcriptase inverse sur la matrice d'ARNm (Friedman et Robash 1977)

Dans ce chapitre, nous allons traiter de l'obtention d'ADNc à partir de molécules monocaténares (ARNmc) d'ARN polyadénylé, ainsi qu'à partir de molécules d'ARN bicaténaire (ARNbc).

2. SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE À PARTIR DE MOLÉCULES D'ARN MONOCATÉNAIRE

2.1. SYNTHÈSE DU PREMIER BRIN: UTILISATION D'AMORCES D'OLIGO(dT)

Le mélange réactif contient habituellement 150 à 200 µg/mL d'ARNm ou d'ARN génomiques viral purifiés et/ou sélectionnés sur colonnes d'oligo-dT cellulose. Les molécules d'ARN possèdent fréquemment d'importantes structures secondaires qui peuvent inhiber ou partiellement bloquer la lecture de la matrice par la transcriptase inverse. Ainsi, le DMSO (90%) ou l'hydroxyde de méthyl mercure (en concentration finale de 1 mM), un composé hautement toxique et volatil et qui agit également comme un puissant dénaturant, est ajouté à la solution d'ARN matriciel. Au même moment, des inhibiteurs d'ARNases, tels que les complexés vanadyl-ribonucléosides (concentration finale de 10 mM) ou la RNAasin® (500 unités/mL) sont ajoutés afin de prévenir la dégradation de la matrice. La solution est gardée pendant 15 min à la température ambiante, avant l'addition de β-mercaptoéthanol (β-ME) (concentration finale de 70 mM) afin de stabiliser l'enzyme et de séquestrer les ions mercuriques qui pourraient inhiber la transcription inverse de l'ARN matriciel. Après une incubation à la température ambiante, on procède à la synthèse du premier brin d'ADNc dans un tube de microcentrifugeuse (0.5 ou 1.5 mL) siliconné.

Le mélange réactionnel, dans un volume final de 20 à 40 μL , contient les composantes suivantes:

Tris-HCl pH 8.3 (mesuré à 43°C)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
Dithiothréitol (DTT)	10 mM
Sodium pyrophosphate.....	4 mM
dGTP.....	1.25 mM
dATP.....	1.25 mM
dTTP	1.25 mM
dCTP	0.5 mM
dCTP (α - ³² P) act. spéc. 3000 Ci/mmol	15 à 20 μCi
Oligo(dT) (12-18 mers)	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ARN poly(A)+	150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Ajouter en dernier:	
Transcriptase inverse	200 unités

L'incubation s'effectue à 43°C pendant 30 min. Cependant, on peut accroître l'incorporation en faisant une incubation pouvant aller jusqu'à 90 à 120 min et comportant l'addition supplémentaire de transcriptase inverse (1000 unités/ mL) après 60 min d'incubation. Cette incorporation accrue (de 2 à 4 fois) du (α -³²P) dCTP, a été observé lors de la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN génomique du coronavirus bovin (Figure 1). La réaction est arrêtée par l'addition d'EDTA jusqu'à une concentration finale de 20 mM.

Lorsque l'on désire utiliser la structure en épingle à cheveux se formant en 3' du premier brin de l'ADNc afin de copier le deuxième brin d'ADNc, la matrice d'ARN

doit être dégradée par l'addition d'une concentration finale en NaOH de 50 mM et une incubation à 65°C pendant 1 h. Le mélange réactionnel est extrait au phénol/ chloroforme et la phase organique ré-extraite avec un volume égal de 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl et 1 mM EDTA. Les deux phases aqueuses sont combinées et les copies d'ADNc monocaténaïres sont séparées des nucléotides non incorporés et des produits résultant de l'hydrolyse alcaline par chromatographie sur colonne-centrifugation (spun-column), par l'utilisation de Sephadex G-50. L'ADNc est ensuite précipité avec 2.5 volumes d'éthanol en présence d'acétate d'ammonium (2 M) à -20°C. Les produits de la réaction sont récoltés par une centrifugation de 15 à 30 min à 4°C dans une centrifugeuse de type Eppendorf.

Lorsqu'une digestion alcaline n'est pas requise, les molécules formant l'hétéroduplex ARN/ADNc sont extraites directement au phénol/ chloroforme et séparées sur colonne-centrifugation de Sephadex G-50.

2.2. SYNTHÈSE DU PREMIER BRIN: AMORCES SYNTHÉTIQUES, D'OLIGO(dT) OU D'ADN DE THYMUS DE VEAU

En présence de molécules d'ARN ayant une taille relativement importante, plusieurs problèmes peuvent survenir surtout à cause de la dégradation de l'ADNc ou de copies incomplètes (terminaisons prématurées) pendant le processus de transcription inverse. La présence de ces arrêts importants de la transcription découle probablement de la formation de structures secondaires sur l'ARN, ce qui provoque une diminution des probabilités de prolonger la formation de l'ADNc à partir de l'extrémité 3' de la matrice. Lorsque l'on connaît déjà des

séquences partielles, des oligonucléotides complémentaires à une région proche de l'extrémité 5' des clones obtenus peuvent être synthétisés et hybridés à la matrice d'ARN. Ainsi, il est possible d'allonger systématiquement, le long de la matrice d'ARN, les fragments d'ADNc clonés. Malgré les succès obtenus avec cette méthode "d'extension d'amorce" pour le clonage et le séquençage du gène codant pour les spicules du coronavirus bovin, ce n'est pas une voie à utiliser de façon prioritaire puisqu'elle requiert la connaissance de séquences terminales en 5' ainsi que la synthèse d'oligonucléotides. De plus, ce procédé s'avère coûteux et laborieux.

Une alternative à l'utilisation d'oligonucléotides synthétiques spécifiques consiste à utiliser des oligonucléotides (6-7 mers) préparés à partir d'ADN de thymus de veau afin d'amorcer au hasard sur la matrice d'ARN une synthèse efficace d'ADNc. Cette approche possède l'avantage de générer des clones représentant la totalité de la matrice d'ARN à l'exception d'une courte séquence de bases à l'extrémité 3'. L'addition simultanée d'amorces d'oligo(dT) et d'amorces aléatoires dans le même mélange réactionnel peut résoudre ce problème. Enfin, parmi les avantages de l'utilisation des amorces aléatoires dans la synthèse d'ADNc, notons qu'elle ne requiert pas la connaissance des séquences de la matrice: elle peut donc être utilisée pour l'obtention de clones provenant de l'intérieur de la matrice et elle est relativement peu dispendieuse.

La synthèse du premier brin d'ADNc, selon la méthode des amorces aléatoires, s'effectue en général dans un volume de 50 μ L contenant:

Tris-HCl pH 9.3
(mesuré à 43°C)50 mM

MgCl₂ 10 mM
Dithiothréitol 10 mM
Sodium pyrophosphate 4 mM
dATP 125 mM
dGTP 1.25 mM
dTTP 1.25 mM
dCTP 0.50 mM
dCTP (α ³²P)
(3000 Ci/mmole) 15 à 20 μ Ci
ARN viral 20 μ g
Amorces d'oligonucléotides
de thymus de veau 100 μ g
Transcriptase inverse 160 unités

Ce mélange réactionnel est incubé à 43°C pendant 30 à 60 min. La synthèse du premier brin d'ADNc peut être détectée en prélevant 1 μ L du mélange réactionnel au temps zéro et à différents moments au cours de la réaction afin de suivre l'incorporation de la radioactivité dans les chaînes en formation, par précipitation des macromolécules en présence d'acide trichloroacétique (TCA). Les produits de la synthèse du premier et second brin d'ADNc peuvent être analysés par leur taille après électrophorèse en gel d'agarose et autoradiographie du gel séché (Figure 1).

2.3. SYNTHÈSE DU SECOND BRIN

La synthèse du second brin de l'ADNc peut s'effectuer selon deux méthodes différentes. En effet, pour l'initiation de la synthèse du second brin de l'ADNc, une méthode utilise la formation de structures transitoires d'auto-amorçage en épingle à cheveux, qui sont retrouvées à l'extrémité

3' des molécules formant le premier brin d'ADNc, après l'hydrolyse alcaline de la matrice d'ARN. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* ainsi que la transcriptase inverse peuvent être utilisés indépendamment ou successivement dans la synthèse du second brin d'ADNc. L'action de la polymérase du fragment de Klenow peut subir une pause ou un arrêt prématuré à des séquences importantes d'arrêt qui peuvent être ignorées par la transcriptase inverse: il est donc conseillé d'utiliser les deux enzymes en succession puisque l'activité de la transcriptase inverse peut être inhibée par des séquences qui ne sont pas inhibitrices pour le fragment de Klenow. Une fois la synthèse du second brin initiée, la synthèse subséquente stabilise la structure en épingle à cheveux. Les produits finaux obtenus de cette réaction sont des molécules d'ADN bicaténaire, reliées à une extrémité par une boucle en épingle à cheveux.

Méthode

1. Les molécules d'ADNc venant d'une synthèse du premier brin sont récupérées par centrifugation à 4°C pendant 15 à 30 min dans une microcentrifugeuse.
2. Les produits sont rincés à l'éthanol 70%, recentrifugés et lyophilisés pendant quelques minutes pour éliminer l'éthanol résiduel.
3. Les culots sont resolubilisés dans le tampon réactionnel du second brin contenant un volume final de 100 µL:

Tampon HEPES (pH 6.9)	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Dithiothréitol	2.5 mM
KCl	70 mM

dCTP	0.5 mM
dGTP	0.5 mM
dATP	0.5 mM
dTTP	0.5 mM

Fragment de Klenow
20 à 50 unités

4. L'incubation est réalisée à 15°C pendant 20 h afin de permettre à l'enzyme de rechercher en 3' les structures transitoires et instables en épingle à cheveux et de synthétiser le second brin. D'autres protocoles ont également été publiés avec des différences mineures dans la concentration des composés mentionnés et des temps d'incubation pouvant être aussi courts que 30 min à 15°C.
5. La réaction est arrêtée par l'addition d'EDTA en concentration finale de 20 mM, suivie d'une extraction au phénol/chloroforme, d'une chromatographie/centrifugation sur Sephadex G-50 et d'une précipitation à l'éthanol.
6. Après centrifugation et lyophilisation, les produits de la réaction précédente sont resolubilisés dans 50 µL du tampon de transcriptase inverse contenant:

Tris-HCl (pH 8.3)

(mesuré à 43°C)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
Dithiothréitol	10 mM
Sodium pyrophosphate.....	4 mM
dNTP (dGTP, dCTP, dATP, dTT) chacun	1.25 mM

β -mercaptoéthanol20 mM

Transcriptase inverse150 unités

7. L'incubation se fait à 43°C pendant 60 min.

8. La réaction est arrêtée par l'addition d'EDTA et toutes les étapes subséquentes sont identiques à celles déjà décrites pour les produits de la réaction avec l'enzyme de Klenow. Enlever la structure en épingle à cheveux en 3' et toute partie monocaténaire de l'ADN à l'autre extrémité des molécules d'ADNc par un traitement avec la nucléase S1, spécifique des régions monocaténaires et qui donne ainsi des molécules bicaténaires entières.

2.4. DIGESTION AVEC LA NUCLÉASE S1

Il est suggéré d'effectuer une expérience pilote avec la nucléase S 1 afin d'établir les conditions expérimentales donnant des molécules avec une distribution modale similaire à celle obtenue après la synthèse du premier brin de l'ADNc. Si la nucléase est trop active, les molécules générées seront plus petites que le premier brin (ADNc). Par contre si la nucléase n'est pas assez active, les molécules analysées seront deux fois plus grandes que le premier brin de synthèse, indiquant que les deux brins sont reliés par un lien covalent.

1. Après centrifugation de l'échantillon précipité à l'éthanol, les molécules d'ADNc bicaténaires sont resuspendues dans 20 à 30 μ L d'eau bidistillée. Cinq aliquotes contenant chacune approximativement 2000 dpm de radioactivité incorporée (32 P) sont resuspendus dans un volume total de 20 μ L dans du tampon S1 composé de:

NaCl200 mM

Acétate50 mM

ZnSO₄1 mM

Glycérol5%

2. Additionner respectivement chaque aliquote de 0, 1, 2, 3 et 6 unités de nucléase S1 et incuber pendant 30 min à 37°C.

3. Les réactions sont arrêtées par l'addition de EDTA (concentration finale de 5 mM), et les échantillons sont analysés en gel d'agarose en conditions alcalines, en même temps qu'un aliquote de la réaction de synthèse du premier brin d'ADNc et de marqueurs de masses moléculaires radio-marqués (fragments de restriction de pBR-322, ADN lambda coupé par *EcoR* 1/ *Hind* III).

4. Le gel est fixé dans l'acide trichloro-acétique 7% pendant 30 min, lavé brièvement à l'eau, et séché avant d'être exposé pour la nuit en autoradiographie à -70°C, en présence d'écrans intensifiants.

Cette expérience préliminaire permet de sélectionner les conditions optimales permettant d'obtenir le même patron de migration que celui observé avec les molécules monocaténaires d'ADNc. Ces conditions peuvent être utilisées avec la préparation d'ADNc bicaténaire.

Une solution de rechange est de transférer l'ADN, séparé par électrophorèse en gel, à des feuilles de nitrocellulose par transfert de type Southern, après avoir submergé le gel dans une solution contenant 0.5 mM Tris-HCl pH 7.5 et 1 M NaCl. Les feuilles de nitrocellulose peuvent ensuite être exposées de la même manière que les gels séchés.

Après réalisation de la digestion de l'ADNc bicaténaire à l'aide de la nucléase S1, les oligonucléotides relâchés sont éliminés par chromatographie sur colonne; plusieurs matrices sont utilisées à cette fin (Sephadex G-50, G-75, Sepharose CL-4B etc.). Étant donné que le traitement à la nucléase S1 ne laisse pas toujours les bouts terminaux avec des extrémités franches, il est suggéré d'utiliser une incubation subséquente avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I afin d'obtenir une efficacité de clonage accrue des duplex d'ADNc.

2.5. SYNTHÈSE DU SECOND BRIN: UTILISATION DE L'ARN-ASE H

Cette méthode concerne la synthèse du second brin d'ADNc par l'utilisation de l'ARNase H dégradant partiellement l'ARN dans l'hétéroduplex ARN/ADN. On obtient un premier brin d'ADNc auquel des amorces d'ARN sont attachées. L'incubation de ce produit avec l'ADN polymérase I et l'ADN ligase donne naissance à des molécules bicaténaires d'ADN. Cette méthode évite l'utilisation de la nucléase S1 pour couper l'épingle à cheveux et est généralement plus rapide puisque la réaction peut être réalisée en une seule étape.

1. Cette réaction s'effectue dans 100 μ L du milieu réactionnel suivant et peut accommoder jusqu'à 1 μ g d'hybride (500 ng d'ADNc):

Tris-HCl (pH 7.5)	20 mM
MgCl ₂	5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
KCl	100 mM
β -NAD	0.15 mM
Albumine sérique bovine (qualité biologie moléculaire)	5 μ g

dNTP	40 mM
ARNase H	1 unité
ADN polymérase I	23 unités
ADN ligase (<i>E. coli</i>)	1 unité

2. Les incubations ont lieu de façon séquentielle pendant 60 min à 12°C, puis 60 min à 22°C.
3. Les produits de la réaction sont extraits au phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol en présence d'acétate d'ammonium (2 M) et lyophilisés. L'ADNc bicaténaire ainsi préparé est maintenant prêt pour l'addition de séquences homopolymériques à l'aide de l'enzyme transférase terminale ou pour l'addition de polylinkers à l'aide de l'ADN ligase.

3. DISCUSSION

La synthèse d'ADNc ne cause plus de nos jours de difficultés majeures puisque l'on peut obtenir des préparations de transcriptases inverses très actives et dépourvues d'activité ARNase. La difficulté principale pour l'obtention de molécules pleine longueur pour le premier brin de l'ADNc est reliée aux cassures et/ou dégradations que l'on peut provoquer sur les molécules d'ARN. Cependant, même s'il est parfois impossible d'isoler des molécules intactes d'ARN (surtout dans le cas où le génome est très long), il est toujours possible, par extension de l'amorce et/ou amorçage aléatoire de la réaction de transcription inverse par des oligonucléotides synthétiques, d'obtenir une population hétérogène d'ADNc représentant la totalité de la matrice d'ARN. La méthodologie d'amorces aléatoires pour la synthèse du premier brin de l'ADNc est très efficace; cependant, il faut prendre beaucoup de

précautions avec des préparations brutes d'ARN. En effet, des molécules contaminantes d'ARN ou d'ADN seront copiées, ce qui résultera en l'obtention de fragments clonés qui ne sont pas reliés aux matrices d'ARN que l'on désire cloner. Lorsqu'on se trouve en présence d'ARN obtenus de virions purifiés à partir de cellules cultivées, une sélection négative peut être réalisée par hybridation différentielle des clones obtenus en utilisant de l'ARN/ADN isolé de cultures cellulaires ou de fragments de tissus non infectés. La synthèse du second brin par l'utilisation de l'amorce en 3' (épingle à cheveux) est moins efficace que celle comportant un traitement à l'ARNase H, puisque les boucles de l'épingle sont transitoires; ceci résulte souvent en la perte de l'amorce pour la synthèse du second brin. Le procédé à l'ARNase H élimine le clivage par la nucléase S 1 de la boucle. Il est préférable d'utiliser cette méthode, puisque son application est à la fois simple et efficace. La synthèse de molécules bicaténaires d'ADNc doit être réalisée rapidement surtout lorsqu'on utilise le (^{32}P) dCTP pour vérifier l'incorporation dans les chaînes naissantes. En effet, l'atome ^{32}P subit une décroissance par émission d'une particule-bêta, tout en transmutant à un atome ^{32}S , qui conservera l'énergie d'excitation. Le soufre n'est pas aussi stable que le phosphore pour la formation de la liaison ester, ce qui permet à l'énergie d'excitation de causer la scission du brin contenant la formation du nouvel atome de soufre. Ce phénomène peut conduire à la dégradation de l'amorce après synthèse du premier brin d'ADNc. Cependant, le radio-marquage d'une aliquote du mélange réactionnel et l'utilisation d'un mélange non radio-marqué d'ADNc bicaténaire pour le clonage permettent d'éviter ce problème.

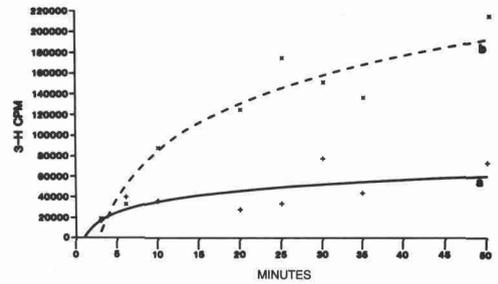


Figure 1

Synthèse du premier brin d'ADNc par la transcriptase inverse agissant sur l'arn génomique du coronavirus bovin.

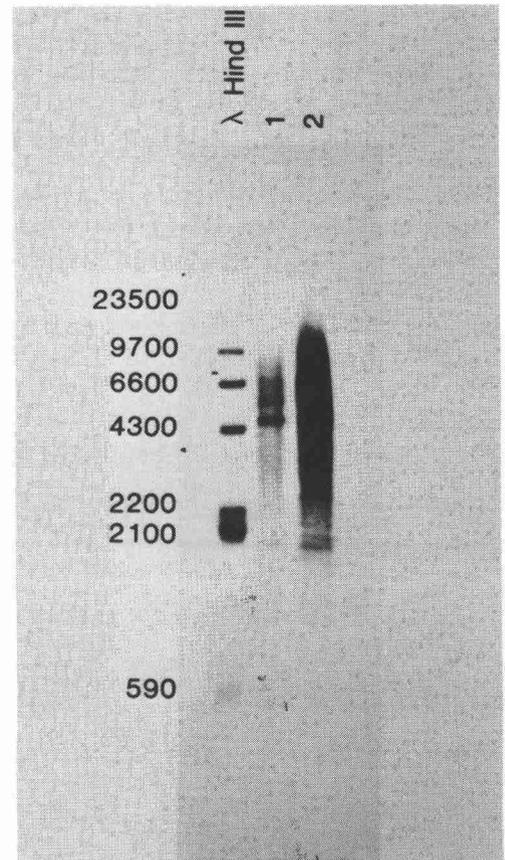


Figure 2

Synthèse du premier et du deuxième brin d'ADNc obtenu à partir de l'ARN génomique du coronavirus bovin. Analyse de la taille de cet ADNc par électrophorèse en gel d'agarose et autoradiographie. L'Adn du bactériophage λ coupé par *Hind* III est utilisé comme marqueur de la taille des nucléotides synthétisés.

4. RÉFÉRENCES

- Baltimore, D. 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature* 226: 1209-1211.
- Binns, M. M., Bournsnel, M.E.G., Cavanagh, D., Pappin, D.J.C. and Brown, T.D.K. 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the Coronavirus IBV. *J. Gen. Virol.* 66: 719-726.
- Binns, M.M., Bournsnel, M.E.G., Foulds, I.J. and Brown, T.D.K. 1985. The use of a random priming procedure to generate cDNA libraries of infectious bronchitis virus, a large RNA virus. *J. Virol. Meth.* 11: 265-269.
- Buel, G.N., Wickens, M.P., Payvar, F., and Schminke, R.T. 1978. Synthesis of full-length cDNA's from four partially purified oviduct mRNA's. *J. Biol. Chem.* 253: 2471.
- Efstratiadis, A., Kafatoc, F.C., Maxam, A.M. and Maniatis, T. 1976. Enzymatic *in vitro* synthesis of globin genes. *Cell*, 7: 279.
- Friedman, E.Y. and Rosbash, M. 1977. The synthesis of high yields of full-length reverse transcripts of globin mRNA. *Nucleic Acid Research* 4: 3455
- Gubler, U. and Hoffman, B.J.. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25: 263-269.
- Higuchi R., Paddock, G.V., Wall, R. and Salser, W. 1976. A general method for cloning eukaryotic structural gene sequences. *P.N.A.S.-USA* 73: 3146-3156.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.J. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- McDonnell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W. 1977. Analysis of restriction fragments of T-7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110: 119.
- Okayama, H. and Berg, P. 1982. High efficiency cloning of full length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* 2: 161-170.
- Perbal, B. 1984. *A practical guide to molecular cloning.* A Wiley-Interscience Publication, pages 422-425.
- Retzel, E.F., Collet. M.S. and Faras. A.J. 1980. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transcriptase *in vitro*: Optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates. *Biochemistry* 19: 513.
- Seeburg, P.H., Shine, J., Marshall, J.A., Baxter, J.D. and Goodman, H.M. 1977. Nucleotide sequence and amplification in bacteria of a structural gene for rat growth hormone. *Nature* 220: 486.
- Sippel, A.E. 1973. Purification and characterization of adenosine triphosphate: Ribonucleic acid adenylyltransferase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 37: 31-39.
- Temin, H.M. and Mizutani, S. 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature* 226: 1211-1213.

SÉQUENÇAGE D'ADN

François Fossiez

1. SÉQUENÇAGE PLASMIDIQUE

Le séquençage de l'ADN est l'une des techniques les plus importantes pour l'analyse des gènes. Il existe deux méthodes efficaces permettant de déterminer la séquence nucléotidique d'un ADN. Celle de Maxam et Gilbert (1977) est basée sur une dégradation chimique de l'ADN, alors que la technique développée par Sanger *et al.* (1977) consiste à bloquer la synthèse enzymatique d'un ADN à l'aide de didésoxyribonucléosides triphosphates (ddNTP). La rapidité et la simplicité de cette dernière méthode ont rendu son emploi plus fréquent.

Dans cette méthode, l'ADN le plus souvent utilisé comme brin gabarit est le génome monocaténaire et circulaire du bactériophage M13 recombinant. On a cependant observé que les insertions d'ADN de grande taille avaient tendance à s'exciser du bactériophage M13.

Une variante de la technique de Sanger s'applique directement aux ADN plasmidiques après dénaturation et présente les avantages suivants (Chen et Seeburg 1985, Deininger 1983, Guo *et al.* 1983,

Haltiner *et al.* 1985, Hattori et Sakaki 1986, Hong 1982, Koneluk *et al.* 1985, Vieira et Messing 1982, Zagursky *et al.* 1985):

- (1) L'insertion d'ADN est généralement plus stable dans un plasmide que dans le bactériophage M13.
- (2) Les ADN n'ont plus besoin d'être sous-clonés dans M13, ce qui représente une économie de temps appréciable.
- (3) L'ADN plasmidique devant servir au séquençage peut être purifié par la technique de lyse alcaline (Birnboim et Doly 1979), à partir de 1.5 mL de culture.
- (4) De nombreux plasmides permettent de séquencer chacun des deux brins de l'insertion en utilisant des amorces qui s'hybrident respectivement de chaque côté du site de clonage (voir Figure 1).

Cependant, la lecture de la longueur de la séquence après séquençage plasmidique est en général inférieure à celle que donnera la lecture faite après sous-clonage dans le bactériophage M13.

De nombreuses compagnies vendent des appareils d'électrophorèse pour gel de séquence: BRL, Bio-Rad, Pharmacia, IBI, etc.

Le protocole expérimental suivant s'applique à des culots d'ADN plasmidiques secs obtenus par la technique précédemment décrite dans ce volume (Chapitre 24, section 2.3.1.).

2. MÉTHODE

Solutions

Tampon de séquençage

Tris-HCl (pH 8.9)	0.60 M
NaCl	0.75 M
MgCl ₂	75 mM
DTT	5 mM

Mélange nucléotidique A,T,G et C, selon le tableau ci-contre.

Tampon d'électrophorèse 10X (pH 8.3)

Tris-base	1 M
Acide borique	1 M
EDTA	20 mM

Gel de polyacrylamide 8%
(rapport bis:acrylamide de 1:19)

Acrylamide	7.6 g
Bis-acrylamide	0.4 g
Urée	50 g
Tampon 10X.....	10 mL
H ₂ O	60 mL

Persulfate d'ammonium
10% 1 mL

TEMED 10 µL

Volume final de 100 mL

Solution d'arrêt

Formamide déionisée..... 980 µL

EDTA 1M pH 8..... 20 µL

Bleu de bromophénol..... 1 mg

Xylène cyanol 1 mg

Conserver à -20°C.

Méthode

Précipitation au polyéthylène glycol (PEG)

1. Afin d'éliminer les contaminants qui interfèrent lors de la réaction de séquençage, resuspendre l'ADN plasmidique dans 50 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8 et 1 mM EDTA.
2. Ajouter 30 µL de PEG 6000 20% NaCl 2.5 M (autoclavé). Laisser précipiter sur glace pendant 1 h, puis centrifuger à 12 800 x g pendant 5 min dans une centrifugeuse Eppendorf.
3. Jeter le surnageant et laver deux fois le culot avec de l'éthanol 70%.
4. Sécher le culot d'ADN plasmidique dans une centrifugeuse sous vide.

Dénaturation des plasmides

1. L'ADN plasmidique est resuspendu dans 18 µl de NaOH 0.2N, EDTA 0.2 mM et dénaturé à la température de la pièce pendant 5 min. Puis l'ADN est précipité par l'addition de 2 µl d'acétate d'ammonium 2M (pH

4.5) et 100 µl d'éthanol absolu. Après 20 min à -70°C, les tubes sont centrifugés à 12 000 x g et les culots d'ADN sont lavés à l'éthanol 70%. Les culots sont séchés sous vide et peuvent être ainsi conservés à -20°C.

Hybridation des amorces aux plasmides dénaturés

- Solubiliser les culots d'ADN plasmidiques dénaturés dans:

Amorce (10 µg/µL)7.0 µL

Tampon de séquençage1.5 µL

H₂O1.5 µL

- Chauffer le mélange plasmide-amorce à 50°C pendant 20 min.
- Pendant ce temps, préparer quatre tubes marqués A, T, G et C pour chaque plasmide à séquencer en y déposant 2 µL du mélange nucléotidique approprié (selon le tableau suivant). Conserver ces tubes sur glace.

Tableau de préparation des mélanges nucléotidiques

Solutions mères	A		T		G		C	
	µL	µM*	µL	µM*	µL	µM*	µL	µM*
2 mM dGTP	6.25	250	6.25	250	2.13	85	6.25	250
100 µM dATP	3.4	6.8	2.50	5	2.50	5	2.50	5
2 mM dTTP	6.25	250	1.28	51	6.25	250	6.25	250
2 mM dCTP	6.25	250	6.25	250	6.25	250	1.28	51
250 µM ddGTP	-	-	-	-	2.52	12.6	-	-
50 µM ddATP	1.26	1.26	-	-	-	-	-	-
250 µM ddTTP	-	-	2.52	12.6	-	-	-	-
250 µM ddCTP	-	-	-	-	-	-	2.52	12.6
H ₂ O	26.6		31.2		30.4		31.2	
Volume final	50.0		50.0		50.0		50.0	

* Concentration finale dans le mélange

La proportion de dNTP:ddNTP peut-être augmentée si l'on désire obtenir la séquence d'une région située près de l'amorce, ou diminuée si l'on désire au contraire lire les séquences éloignées de l'amorce.

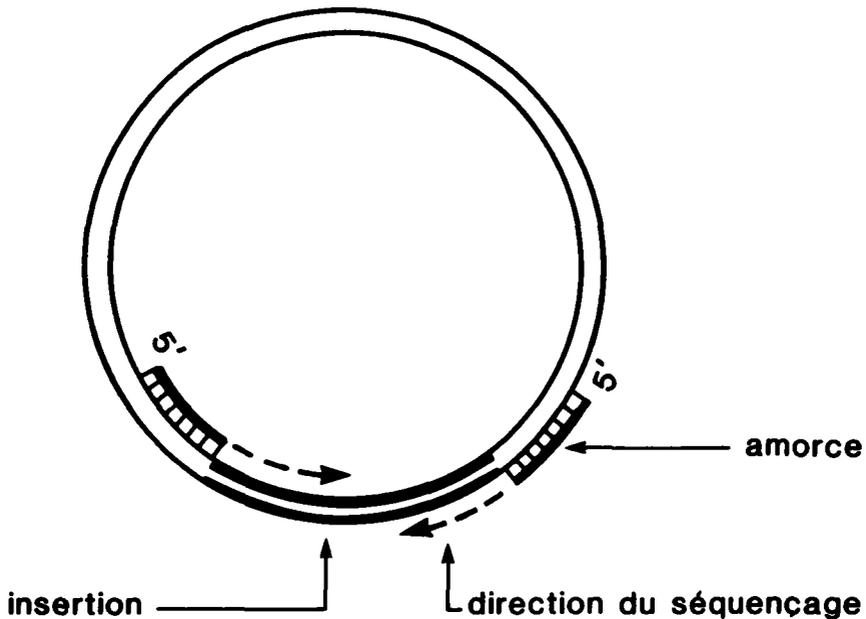


Figure 1

Schéma classique d'un plasmide recombinant contenant une insertion

Les amorces de séquençage, hybridées en 5' de l'insertion sur les plasmides dénaturés, permettent à la transcriptase inverse d'initier la synthèse d'un brin complémentaire. Cette réaction effectuée en présence de dATP^[35S], de dNTP et de ddNTP produit des brins d'ADN marqués de longueurs variables, qui, une fois séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée, révèlent la séquence d'une des extrémités de l'insertion.

Réaction de séquençage

5. Dans chaque tube de mélange plasmide-amorce ajouter:

Transcriptase inverse du virus
de la myéloblastose aviaire
(AMV)20 µL

dATP^[35S] (> 600 Ci/m mole,
10 mCi/mL)5 µL

Important: maintenir les tubes à 42°C afin de réduire le taux de renaturation des plasmides.

6. Distribuer 3.6 µL de ce mélange dans chacun des tubes marqués A, T, G et C.
7. Incuber à 42°C pendant 20 à 30 min.
8. Préparer un gel de polyacrylamide de 6 ou 8% contenant de l'urée (7M) et démarrer la pré-électrophorèse du gel. Ajuster le courant (environ 60 W) afin d'obtenir une température de 50°C à la surface du gel après 30 min de pré-électrophorèse.
9. Ajouter 2 µL d'une solution 0.25 mM de chaque désoxyribonucléoside triphosphate.
10. Continuer l'incubation à 42°C pendant 15 min.
11. Vérifier la température du gel.
12. Ajouter 7 µL de solution d'arrêt dans chaque tube. Chauffer à 100°C pendant 3 min, puis refroidir brusquement dans un bain de glace avant

de charger le gel de polyacrylamide-urée. Les échantillons peuvent éventuellement être conservés à -20°C pendant un maximum de 7 jours avant l'électrophorèse.

Électrophorèse

13. Nettoyer les puits avant de charger les échantillons afin d'éliminer l'urée, les débris de polyacrylamide et les bulles d'air. **RAPPEL: couper le courant avant de nettoyer ou de charger le gel.**
14. Déposer environ $3\ \mu\text{L}$ de chaque mélange réactionnel dans les puits et remettre le courant.
15. Laisser migrer le bleu de bromophénol jusque dans le bas du gel.
16. Couper le courant, vider le réservoir supérieur de son tampon et retirer le gel.
17. Séparer les plaques de verre à l'aide d'une spatule flexible.
18. Il est conseillé de fixer le gel pendant 20 min dans 2 L d'un mélange d'acide acétique 5% et de méthanol 5% (cette étape arrête la diffusion des ADN, élimine l'urée qui atténue le signal radioactif émis par le ^{35}S et rend le gel plus solide).
19. Récupérer le gel sur une feuille de papier Whatman 3MM. Recouvrir d'une pellicule plastique et sécher à 80°C pendant environ 30 min.
20. Mettre le gel sec en contact avec un film à autoradiographie pendant 16 à 36 h.
21. La lecture du gel s'effectue tel que décrit dans la Figure 2.

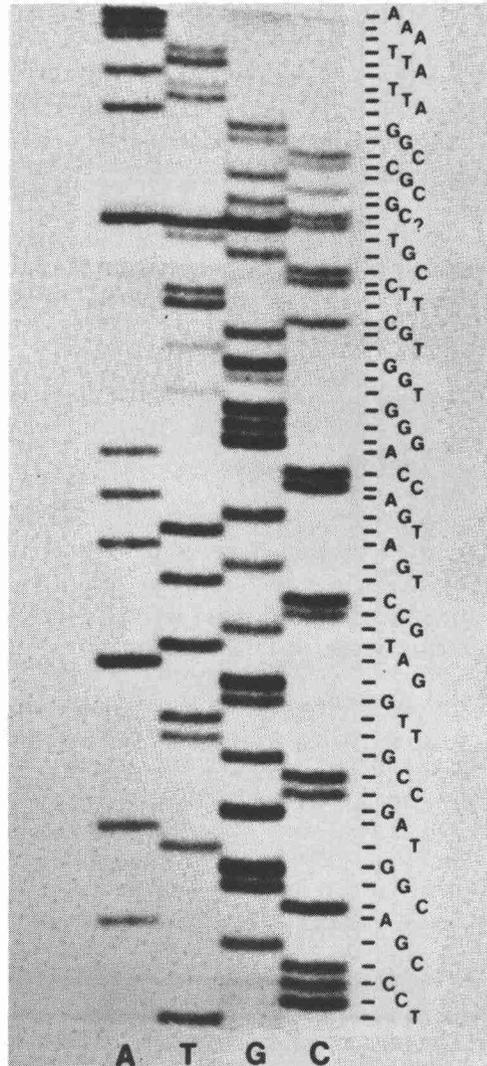


Figure 2

Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 8% contenant de l'urée 7M et soumis à un courant de 60 W pendant 3 h. A, T, G et C désignent les produits des réactions qui ont été déposés dans les puits. Une bande radioactive dans le puits A indique que la synthèse de l'ADN a été inhibée par l'incorporation d'un ddATP, démontrant la présence d'un A dans la séquence. Cette dernière est donc révélée par la succession des bandes radioactives et se lit du bas vers le haut (5'→3'). Certaines ambiguïtés peuvent éventuellement se produire lorsqu'une bande apparaît simultanément dans les 4 puits. La séquence exacte est alors déterminée par le séquençage du brin complémentaire.

3. RÉFÉRENCES

- Birnboim, H.C. et Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Chen, E.Y. et Seeburg, P.H. 1985. Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 165-170.
- Deininger, P. 1983. Approaches to rapid DNA sequence analysis. *Anal. Biochem.* 135: 247-263.
- Gino, L., Yang, R.C.A. et Wu, R. 1983. An improved strategy for rapid direct sequencing of both strands of long DNA molecules cloned in a plasmid. *Nucleic Acids Research* 11: 5521-5540.
- Haltiner, M., Kempe, T. et Tijian, R. 1985. A novel strategy for constructing clustered point mutations. *Nucleic Acids Res.* 13: 1015-1025.
- Hattori, M. et Sakaki, Y. 1986. Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* 152: 232-238.
- Hong, G.F. 1982. Sequencing of large double-stranded DNA using the dideoxy sequencing technique. *Bioscience Rept* 2: 907-912.
- Korneluk, R.G., Qnan, F. et Gravel R.A. 1985. Rapid and reliable dideoxy sequencing of double stranded DNA. *Gene* 40: 317--323.
- Vieira, J. et Messing, J. 1982. The pUC plasmids, and M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- Zagursky, R.J., Baunmeister, K., Lerman, N. et Berman, M. 1985. Rapid and easy sequencing of large linear double stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. *Gene Anal. Tech.* 2 : 89-94.

ÉTALEMENT DES ACIDES NUCLÉIQUES ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Robert Alain

1. INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années, de nombreuses techniques ont été développées pour l'examen des acides nucléiques ou des complexes acide nucléique-protéine. La première méthode a été décrite par Kleinschmidt et Zahn en 1959. Cette technique dite de Kleinschmidt a été modifiée en méthodes fiables et routinières pour la caractérisation et la cartographie génétique. Avec les enzymes de restriction et les techniques de séquençage, on a utilisé ces méthodes lors des études en microscopie électronique de la réplication, de la recombinaison, de la transcription et de la traduction (Fisher 1981).

La technique de Kleinschmidt consiste essentiellement à mélanger une solution d'acide nucléique à une protéine globu-

laire, tel que le cytochrome *c*. On observe alors la formation d'un complexe acide nucléique-protéine qui constitue l'hyperphase. Après étalement de ce mélange sur une surface liquide (hypophase), la protéine se dénature à l'interface air-solution pour constituer un film insoluble qui emprisonne l'acide nucléique et provoque son extension. On effectue ensuite le transfert du complexe sur une grille-support, puis on augmente le contraste par évaporation de métaux (platine, carbone-platine, platine-palladium, etc.) et, finalement à l'examen au microscope électronique.

Cette technique semble simple, mais plusieurs détails nécessitent une attention particulière si l'on veut en assurer le succès. De plus, la méthode varie selon le type d'acide nucléique étudié (ADN ou ARN) et les interactions avec les protéines.

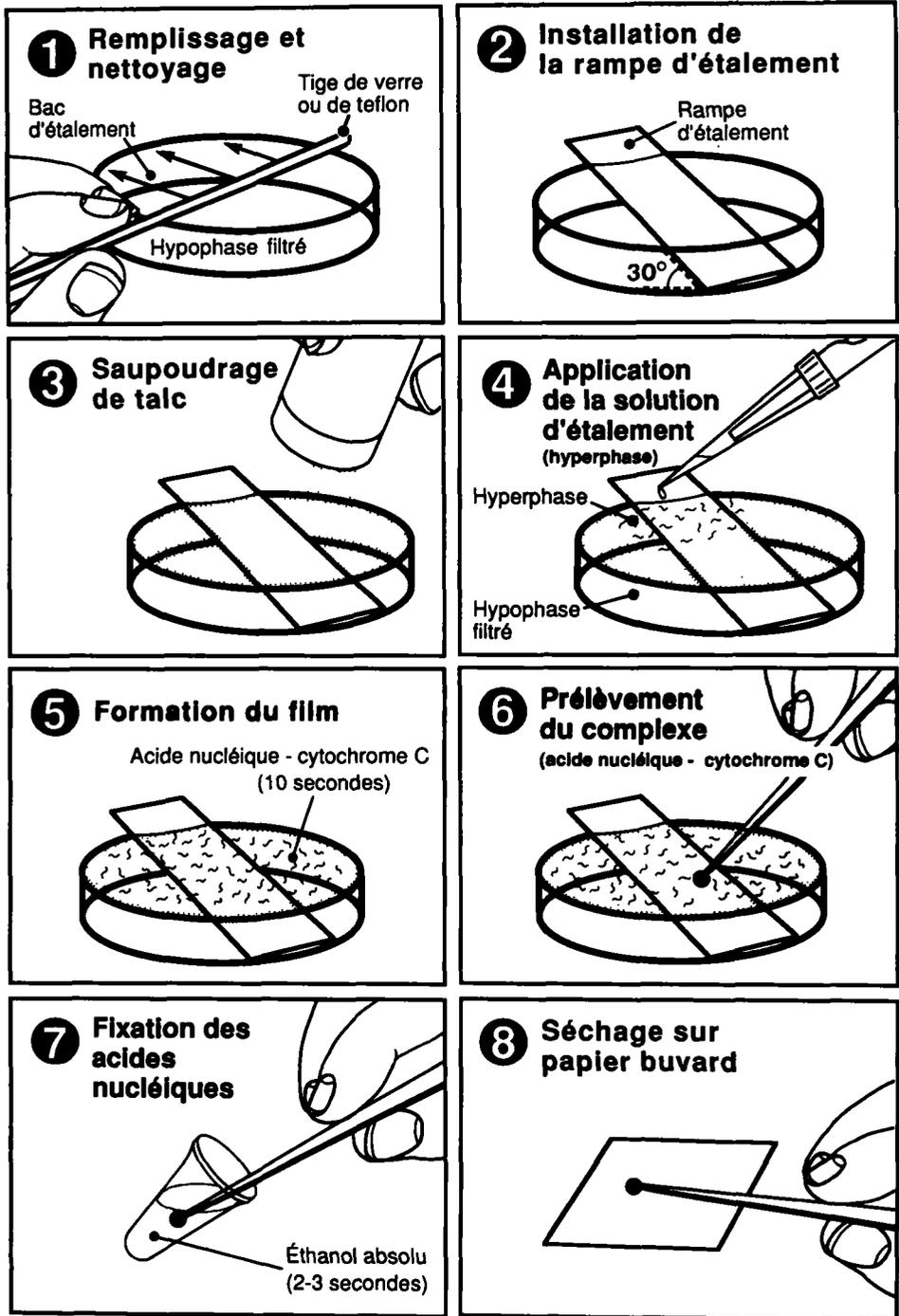


Figure 1

Méthode d'étalement d'acides nucléiques

2. MATÉRIEL

2.1. ACIDES NUCLÉIQUES

L'ADN ou l'ARN viral à étudier au microscope électronique peut être isolé selon les méthodes usuelles telle que l'extraction au phénol (Mandel et Hershey 1960). L'ADN, après son extraction, peut être conservé dans une solution contenant du tampon phosphate 0.01 M et de l'EDTA 1 mM (pour inhiber les nucléases), ou 0.1 SSC (NaCl 0.15 M, citrate de sodium 0.015 M, pH 7), ou du NaCl 0.02 M et EDTA 1 mM (pH 7), à 4°C pendant plusieurs semaines. L'ARN précipité à l'éthanol peut être resuspendu dans du tampon TEN (NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.01 M, EDTA 1 mM) et 0.1 SSC, ou dans 1 mM de dithiothréitol (DTT) (pH 7) et congelé le plus rapidement possible à -70°C en petits aliquots afin de prévenir une dégradation possible par des ribonucléases (Evenson 1977).

2.2. VERRERIE

Tout le matériel de verre ou de plastique doit être extrêmement propre et stérile. Dans l'étude d'un ARN, il est aussi très important de porter des gants pour éviter une contamination possible par les ARNases provenant de la peau.

2.3. SOLUTIONS

Toutes les solutions sans exception doivent être filtrées (filtre de 0.22 µm) avant usage pour éliminer les particules qui pourraient empêcher un bon étalement des molécules d'acide nucléique.

2.4. GRILLES PORTE-OBJET

Les grilles peuvent être en cuivre ou en nickel. Elles peuvent avoir de 50 à 400 mesh dépendant de la dimension des molécules et de la force du film-support

qui les recouvre. Le film-support doit être de très bonne qualité, très résistant aux bombardements des électrons et le plus mince possible pour bien voir les molécules d'acides nucléiques. Il peut être constitué de collodion ou de Formvar recouvert d'une couche de carbone, ou, mieux encore, d'une couche de carbone seulement. Selon Zollinger *et al.* (1977), le film-support de carbone doit avoir 10 à 12 nm d'épaisseur et devrait être utilisé moins d'une semaine après sa préparation. D'autres chercheurs suggèrent de charger positivement le film de carbone pour en améliorer les propriétés attractives. Cette charge est obtenue en soumettant les grilles recouvertes de carbone à des décharges de haut voltage ("glow discharge") sous un vide partiel en présence d'air ou de vapeur d'amylamine (Dubochet *et al.* 1971). D'autres auteurs (Ruben et Siegel, 1975) suggèrent d'évaporer de l'aluminium en même temps que le carbone pour former le film, l'aluminium fournissant une charge positive au film.

2.5. CYTOCHROME C

Le meilleur de choix comme film de protéine reste le cytochrome c. Des solutions stock de concentration finales de 0.1% (p/v) peuvent être préparées dans de l'eau ou de l'acétate d'ammonium 0.15 M. Les solutions peuvent être conservées à 4°C pendant plusieurs mois. Après dilution à la concentration désirée, le cytochrome c devrait être filtré à travers un filtre de 0.22 µm. La concentration du cytochrome c utilisé est souvent critique. Au moment de l'étalement sur une hypophase, on utilise généralement un milligramme de protéine par mètre carré (Kleinschmidt 1968).

3. TECHNIQUES DE TRANSFERT

3.1. FILM À BASE DE PROTÉINE

Les techniques les plus courantes pour le transfert des acides nucléiques d'une solution à une grille de microscope électronique sont la méthode d'étalement sur grande surface (Kleinschmidt et Zahn 1959, Zollinger *et al.* 1977), la méthode d'étalement sur une goutte (Kung *et al.* 1975) et la méthode de diffusion, (Lang *et al.* 1964, Lang et Mitani 1970).

Dans ces techniques, certains auteurs utilisent une hypophase aqueuse et, d'autres, une hypophase de formamide. La solution aqueuse est utilisée pour la visualisation des molécules bicaténaires sur toute leur longueur. La solution de formamide (Westmoreland *et al.* 1969) est utilisée pour la visualisation des molécules ou des portions monocaténares dans une molécule duplex (Evenson 1977).

3.1.1. Étalement sur une grande surface

3.1.1.1. ADN ou ARN bicaténaires

Le contraste final et la résolution d'un échantillon sont dépendant de la nature de l'hypophase. Un étalement sur l'eau donne un contraste pauvre par rapport à un étalement sur une hypophase contenant un sel ou de la formamide. Cependant, le contraste est avantageux aux dépens d'un bruit de fond plus élevé et d'une résolution plus faible (Evenson 1977). Zollinger *et al.* (1977) rapportent une modification de la technique classique de Kleinschmidt. Cette nouvelle technique utilise un détergent, le sodium lauryl sarcosinate (SLS) et le cytochrome c avec l'acide nucléique dans l'hyperphase; l'hypophase est constituée d'acétate d'am-

monium 0.2 M. Cette technique permet notamment de voir les liens enzymatiques sur des molécules d'ADN très bien étendues.

Préparation de la solution d'étalement

1. Préparer dans un tube:

Acétate d'ammonium 0.2 M0.8 mL

Cytochrome c 0.1% aqueux0.1 mL

SLS 0.05%20 µL

2. Filtrer cette solution sur une membrane de 0.22 µm juste avant utilisation et conserver la solution à 37°C.

Préparation des acides nucléiques

1. Solubiliser l'ADN ou l'ARN à une concentration de 14 µg/mL et maintenir à 37°C dans un tampon de liaison:

Tris-HCl pH 7.910 mM

NaCl.....50 mM

MgCl₂10 mM

Dithiothréitol0.2 mM

EDTA0.1 mM

2. Diluer 50 µL de l'échantillon avec 6 volumes du tampon de liaison, maintenir à 37°C à une concentration de 2 µg/mL et conserver le reste de l'échantillon à 37°C.

Étalement de l'ADN (Figure 1)

1. Remplir le bac d'étalement (un Petri stérile en plastique de 60 x 20 mm peut être utilisé) avec de l'acétate d'ammonium 0.2 M préfiltré à 25°C (hypophase).

2. Passer rapidement et plusieurs fois une tige de verre ou de Téflon sur toute la surface de l'hypophase (étape 1).
3. Installer la rampe d'étalement (une lame de verre propre et autoclavée) appuyée sur un côté du Petri et faisant un angle d'environ 30° (étape 2).
4. Ajouter 0.1 mL de la solution d'ADN à 0.92 mL de la solution d'étalement.
5. Repasser la tige de verre et attendre que l'hypophase se stabilise avant de saupoudrer quelques particules de talc près de la rampe à la surface de l'hypophase (étape 3).
6. Après 1 min appliquer lentement 50 µL de l'échantillon sur la rampe pour former une monocouche (étape 4).
7. Dix secondes après l'étalement (étape 5), appliquer une grille-support sur la monocouche au niveau du front de migration délimité par le talc (étape 6).
8. Sécher la grille avec un morceau de papier buvard.
9. Placer la grille 2-3 sec dans une solution d'éthanol absolu (étape 7).
10. Sécher la grille sur un morceau de papier buvard (étape 8).
11. Placer les grilles sur un papier filtre dans une boîte de Petri pour un séchage final.
12. Ombrager rotativement les échantillons à un angle d'environ 7° avec une épaisseur de 3.5-4.0 nm de platine.

13. Observer au microscope électronique et photographier (Figure 2).

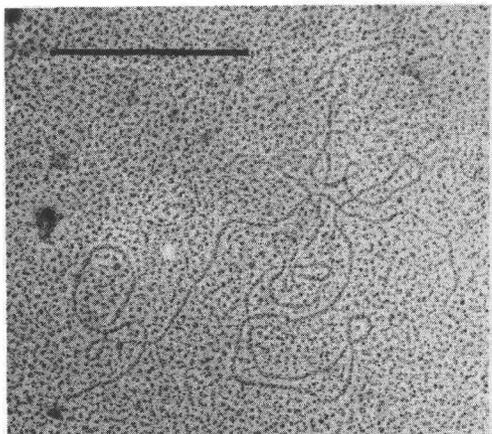


Figure 2

Molécule d'ADN du cytomégalo virus étalé selon la technique de Zollinger *et al.* (1977) (Échelle = 100 nm)

3.1.1.2. ARN monocaténaire

Les ARN monocaténaires étalés selon la technique aqueuse (avec une hypophase constituée d'eau, d'acétate d'ammonium ou de tampon Tris-HCl) apparaissent généralement déformés et difficiles à visualiser à cause du bruit de fond dû au cytochrome c. Ainsi, pour améliorer la visualisation et l'extension des molécules, il est préférable de choisir des méthodes utilisant des solutions non-aqueuses et/ou des dénaturants. La méthode de Zollinger *et al.* (1977), décrite plus haut, peut être aussi appliquée à l'ARN monocaténaire, à condition que la solution d'étalement contienne du formamide à une concentration de 70% (Lalague *et al.* 1984). Il existe d'autres méthodes utilisant le glyoxal formamide (Kung *et al.* 1974, 1975), le formaldéhyde-formamide (Chi et Bassel 1974) et l'urée-formamide (Robberson *et al.* 1971). Cette dernière méthode est décrite ci-après.

1. Diluer l'ARN (10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans du tampon TEN (NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.01 M, EDTA 1 mM).
2. Diluer 1 μL du mélange d'ARN dans 40 μL d'une préparation fraîche contenant 1.2 g d'urée ultrapure dans 4.2 mL de formamide.
3. Chauffer ce mélange contenu dans un microtube à 53°C pendant 30 sec.
4. Refroidir sur glace pendant 2 min.
5. Diluer le cytochrome c (0.5 mg/mL) dans un tampon Tris 0.5 M, pH 8.5 et EDTA 0.05 M.
6. Ajouter 5 μL de la solution de cytochrome c à la solution d'ARN.
7. Prélever 40 μL de ce mélange pour l'étalement.
8. Faire l'étalement sur une hypophase constituée de Tris 0.15 M à pH 8.5 dans un bac entouré de glace.
9. Le reste de l'étalement est effectué tel que décrit précédemment.

3.1.2. Étalement sur une goutte

Lorsqu'il s'agit d'étaler un petit volume à faible concentration d'acides nucléiques, il est possible de miniaturiser les techniques d'étalement décrites précédemment. Ainsi, le bac d'étalement devient une simple feuille de paraffine sur laquelle on applique une goutte d'environ 100 μL de l'hypophase choisie. À l'aide d'une micropipette, il faut ajouter délicatement à la surface une goutte d'environ 5 μL de la solution d'étalement. Un film d'acide nucléique-protéine se forme en quelques secondes et une grille-support est appliquée délicatement à la surface de la goutte pour le recueillir. Celle-

ci est ensuite séchée et contrastée selon la méthode de son choix.

Pour permettre un bon étalement sur la goutte, Kung *et al.* (1975) suggèrent de laisser couler la solution d'étalement sur une tige de verre (0.3 cm de diamètre avec un bout arrondi et fin) ou une pipette Pasteur à bout scellé. Celle-ci est maintenue à un angle de 45° à 60° dans l'hypophase. La surface peut être légèrement réduite en retirant l'hypophase à l'aide d'une seringue.

3.1.3. Méthode de diffusion

Lang *et al.* (1964) ont décrit une méthode utilisant aussi un film de cytochrome c, la méthode de diffusion. Par la suite, celle-ci a été miniaturisée sur microgoutte (Lang 1972). Elle consiste à étaler un film de cytochrome c à la surface d'une solution de 0.2 M d'acétate d'ammonium contenant aussi peu que 5×10^{-8} $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN. Après une attente de 10-20 min, l'ADN a diffusé à la surface du film et est irréversiblement absorbé à la surface. Une grille-support est alors mise en contact avec la surface, lavée, séchée et contrastée ou ombragée.

Cette technique est très rapide, simple et permet de varier la concentration d'acide nucléique par aire de surface du film en augmentant ou en diminuant le temps de diffusion des molécules à la surface. La quantité d'acides nucléiques absorbés sur le film protéique est proportionnelle au temps (Lang et Mitani, 1970).

3.2. TECHNIQUE SANS PROTÉINE

Étant donnée la dimension du cytochrome c (environ 10 nm de diamètre) qui entoure les acides nucléiques, il est difficile de bien voir les petits détails structuraux avec la technique de monocouche protéique. Vollenweider *et al.*

(1975) ont donc développé une technique d'étalement où le cytochrome est remplacé par un composé de plus faible masse moléculaire, le chlorure de benzyl-diméthyl-alkyl-ammonium (BAC). Celui-ci est ajouté à la solution d'étalement à une concentration finale de 0.005% avec le tampon et l'acide nucléique. Cette méthode donne des résultats variables (Evenson 1977), mais elle permet notamment de bien visualiser les complexes acide nucléique-protéine, par exemple un complexe ARN polymérase d'*E. coli*-ADN du bactériophage T7 (Vollenweider *et al.* 1975).

4. COLORATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

4.1. COLORATION DES ACIDES NUCLÉIQUES À L'ACÉTATE D'URANYLE

La meilleure méthode permettant de bien visualiser les acides nucléiques est, sans contredit, l'ombrage à l'aide d'un métal évaporé. Les laboratoires ne possédant pas d'évaporateur peuvent contraster les acides nucléiques en les colorant à l'acétate d'uranyle (Evenson 1977):

1. Préparer une solution stock d'acétate d'uranyle 0.05 M dans 90% d'éthanol et 0.05 M HCl.

2. Diluer la solution stock 1:100 à 1:1000 dans 90% d'éthanol.
3. Filtrer la solution avant usage.
4. Rincer la grille contenant les acides nucléiques pendant 10-30 sec dans l'éthanol (90% ou plus) pour enlever les sels minéraux.
5. Placer la grille dans le colorant pendant 30 à 60 sec.
6. Rincer 10 sec dans l'éthanol à 90%.
7. Sécher à l'aide d'un morceau de papier buvard.
8. Examiner au microscope électronique ou ombrager d'abord avec un métal évaporé.

4.2. TECHNIQUE D'OMBRAGE

Bien que les acides nucléiques monocaténares et bicaténares peuvent être visualisés par une coloration seulement, un meilleur contraste peut être obtenu en ombrageant le spécimen obliquement avec un métal lourd immédiatement après la coloration et la déshydratation. Pour distinguer entre une molécule monocaténaire et bicaténaire, l'ombrage seul donne une plus grande résolution que le colorant seul.

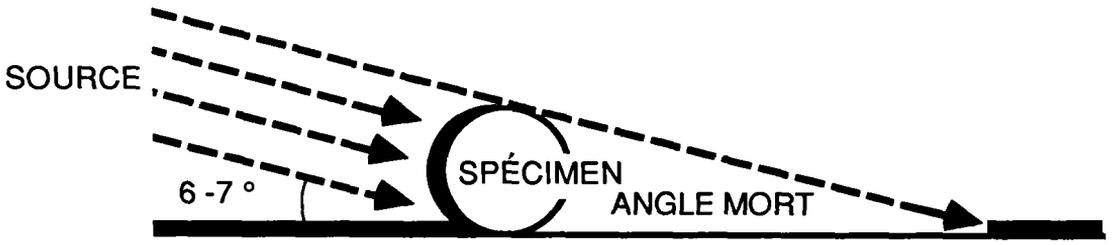


Figure 3

Schéma montrant la zone protégée (angle mort) lorsque le spécimen est soumis à une évaporation métallique

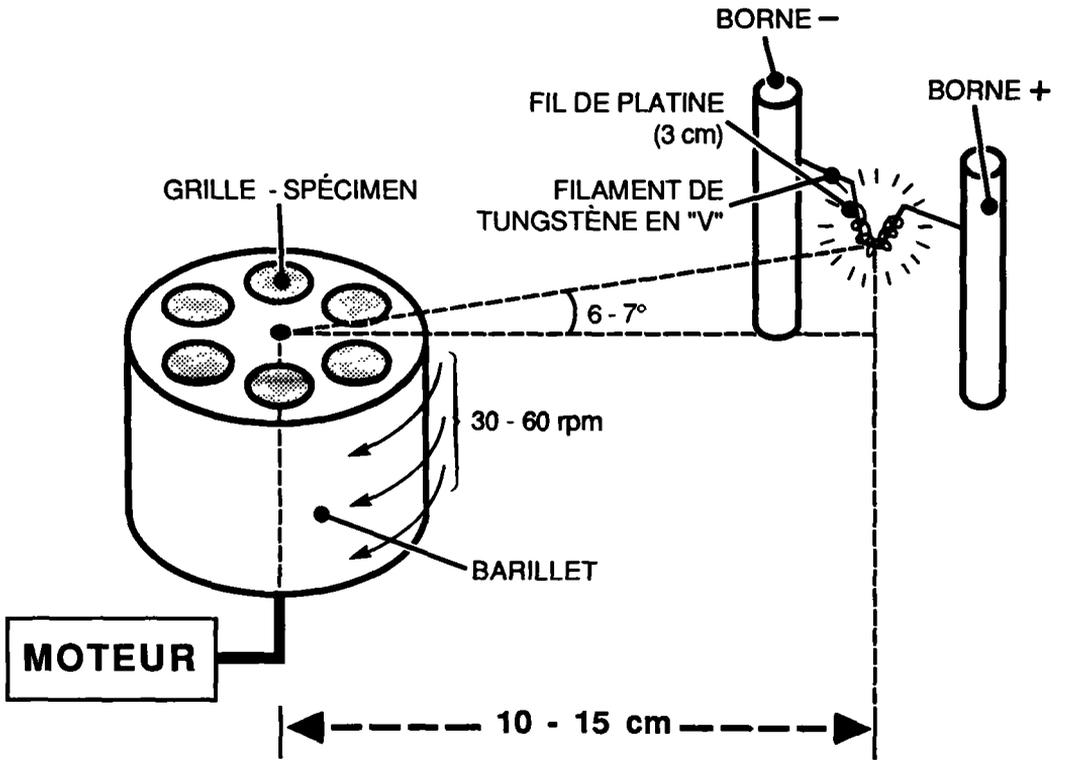


Figure 4

Schéma montrant la technique d'ombrage rotatif

La technique d'ombrage consiste à déposer par évaporation dans une cloche, sous vide (inférieur à 10^{-4} torr), une couche de matériel opaque aux électrons sur une grille contenant le spécimen à un certain angle (environ 6 à 7°). Les régions masquées (angle mort) par les irrégularités de surface ne sont pas contrastées (Figure 3). Pour contourner cet inconvénient, les grilles contenant les échantillons sont placées sur une plaque continuellement en rotation (30 – 60 rpm) au cours de l'évaporation: c'est l'ombrage rotatif (Figure 4).

La source d'évaporation est généralement constituée d'un bout de fil de métal de 3 cm ou d'alliage de métal (platine, platine-palladium, etc.) enroulé autour d'un fil de tungstène en torsade ou en forme de "V", ou autour d'une tige de carbone. Cet assemblage est situé à 10 – 15 cm de l'échantillon et est relié à une source de courant.

La résolution du matériel évaporé est dépendante du degré de vide atteint durant l'évaporation. Il est donc très avantageux d'obtenir un vide de moins de 10^{-4} torr pour l'évaporation. Il est important de d'abord dégazer le filament de tungstène en le chauffant quelques secondes à une température plus basse que son point de fonte, puis de couper le courant. Après l'obtention d'un vide optimal, le filament de tungstène est chauffé jusqu'à ce que le fil de métal qui l'entoure se mette à fondre. On baisse alors un peu le courant et on laisse évaporer aussi longtemps que le filament de tungstène résiste. Les échantillons sont ensuite récupérés et examinés au microscope électronique.

5. DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE

La microscopie électronique est un outil très utile pour l'évaluation de la masse moléculaire des acides nucléiques. La longueur des acides nucléiques peut varier de 0.01 à 80 μm . Celle d'un même acide nucléique peut aussi différer d'un étalement à l'autre. Il est donc important d'inclure un acide nucléique de masse moléculaire connue comme standard interne. Ce marqueur doit être du même type d'acide nucléique et de dimension semblable, mais il est préférable d'utiliser une molécule circulaire plutôt qu'une molécule linéaire. S'il est difficile de distinguer les molécules expérimentales des molécules-marqueurs, celles-ci peuvent être étalées séparément, mais immédiatement après les molécules expérimentales, de sorte que les conditions d'étalement soient presque identiques (Evenson 1977).

Les molécules peuvent être mesurées à l'aide d'un curvimètre ou d'un stylo électronique sur une impression photographique, le microscope électronique ayant été préalablement et adéquatement calibré.

La masse moléculaire d'une molécule inconnue est déterminée par le rapport entre sa longueur et la longueur d'une molécule de masse moléculaire connue. Généralement, la masse par unité de longueur est d'environ 2×10^6 Da/ μm pour une molécule bicaténaire, et de 1.2×10^6 Da/ μm pour une molécule monocaténaire (Evenson 1977)

6. RÉFÉRENCES

- Chi, Y.Y. et Bassel, A.R. 1974. Electron microscopy of viral RNA: Molecular weight determination of bacterial and animal virus RNAs. *J. Virol.* 13: 1194-1199.
- Dubochet, J., Ducommun, M., Zollinger, M. et Kellenberger, E. 1971. A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. *J. Ultrastruct. Res.* 35: 147.
- Evenson, D.P. 1977. Electron microscopy of viral nucleic acids. *Meth. Virology* 6: 219-264.
- Fisher, H.W. 1981. Use of electron microscopy in virology. *Compr. Virology* 17: 83-127.
- Kleinschmidt, A.K. 1968. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acids molecules. *Meth. Enzymol.* 12B: 361-371.
- Kleinschmidt, A.K. et Zahn, R.K. 1959. Über desoxyribonucleinsäure-molekülen in protein mischfilmen. *Z. Naturforsch.*, 14B: 770.
- Kung, H.J., Bailey, J.M., Davidson, N., Vogt, P.K., Nicolson, M.O. et McAllister, R.M. 1974. Electron microscope studies of tumor virus RNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39: 827-836.
- Kung, H.J., Davidson, N., Nicolson, N.O. et McAllister, R.M. 1975. Structure subunit composition and molecular weight of RD-114 RNA. *J. Virol.* 16: 397.
- Lalague, E.D., Corvellec, N.R., Dupuy, M. et Cousineau, G.H. 1984. Microscopie électronique à transmission des acides désoxyribonucléiques (DNA) et ribonucléiques (RNA). Dans *Biologie moléculaire*. Librairie des Presses de l'Université de Montréal, Montréal, pages 89-98.
- Lang, D. 1972. Nucleic acid molecules prepared by monolayer techniques. Dans *Proc. 30th Ann. Mtg. E.M.S.A.* (C.J. Arceneaux, Edit.), Claitor's Publishing Division. Baton Rouge, pages 178-179.
- Lang, D. et Mitani, M. 1970. Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers. *Biopolymers* 9: 373.
- Lang, D., Keinschmidt, A.K. et Zahn, R.K. 1964. Konfiguration und langengverteilung von DNA-molekülen in Lösung. *Biochim. Biophys. Acta* 88: 142.
- Mandel, J.D. et Hershey, A.D. 1960. A fractionating column for analysis of nucleic acids. *Anal. Biochem.* 1: 66.
- Robberson, D., Aloni, Y., Attardi, G. et Davidson, N. 1971. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. VI. Size determination of mitochondrial ribosomal RNA by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 60: 473-484.
- Ruben, G., et Siegel, B.M. 1975. Thin carbon-aluminium films for dark-field electron microscopy of DNA. *Proc. 32th Annual E.M.S.A. Meeting.* 66: 658.
- Stokrova, J., Korb, J. et Riman, J. 1982. Studies on the structure of avian myeloblastosis virus (AMV) RNA I. Factors affecting electron microscopic visualization of AMV RNA. *Acta Virol.* 26: 1-11.

Volleinweider, H.J., Sogo, J.M. et Koller, T.H. 1975. A routine method for protein-free spreading of double and single-stranded nucleic acid molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 83.

Westmoreland, B.C., Szybalski, W. et Ris, M. 1969. Mapping of deletions and substitutions in heteroduplex DNA molecules of bacteriophage λ by electron microscopy. *Science* 163: 1343.

Zollinger, M., Guertin, M. et Mamet-Bratley, M.D. 1977. A new electron microscopic method for studying protein-nucleic acid interactions. *Anal. Biochem.* 82: 196-203.

HYBRIDATION MOLÉCULAIRE

Max Arella et J. Arnold Verbeek

1. INTRODUCTION

Nous allons traiter dans ce chapitre des trois principales techniques d'hybridation moléculaire pouvant être utilisées en virologie pour rechercher:

- des colonies bactériennes ayant incorporé des insertions (ADN génomique ou ADN complémentaire)
- des fragments spécifiques d'ADN viral obtenus après coupure par différentes enzymes de restriction (hybridation de type "Southern")
- la présence et la taille d'un ARNm correspondant à un gène d'intérêt (hybridation de type "Northern").

Chacune de ces trois techniques fera l'objet d'une brève introduction ainsi que d'une description détaillée des étapes expérimentales à suivre pour leur réalisation. De plus nous décrirons des méthodes simples pour la détection de virus.

2. HYBRIDATION *IN SITU* DE COLONIES BACTÉRIENNES

Cette technique permet le criblage rapide de colonies bactériennes par hybridation ARN-ADN ou ADN-ADN afin de rechercher des séquences spécifiques d'ADN clonées dans des plasmides (Grunstein et Hogness 1975). En bref, elle consiste à faire croître en double sur des feuilles de nitrocellulose des colonies bactériennes, d'en effectuer une réplique (plaque maîtresse) gardée à 4°C et de lyser directement les cellules se trouvant sur le filtre. L'ADN des bactéries est dénaturé *in situ* sans déloger les cellules de leur site initial. Par la suite, de l'ADN ou de l'ARN marqué est utilisé comme sonde pour hybrider ces filtres, avant de procéder à des lavages et à l'autoradiographie, révélant les colonies contenant les séquences de l'ADN recherché et, par conséquent, les colonies de la plaque maîtresse ayant ces mêmes séquences. Ces colonies positives de la plaque maîtresse doivent rapidement être conservées par congélation ou en culture

penchées ou utilisées dans les procédés d'amplification des plasmides. Ce procédé d'hybridation *in situ* des colonies bactériennes a été modifié par plusieurs chercheurs afin de pouvoir effectuer un criblage des clones dans le bactériophage lambda (Benton et Davis 1977). Il a également été possible de combiner les avantages d'un clonage dans des plasmides ou le bactériophage lambda par la lyse partielle des bactéries lysogènes pour un bactériophage thermo-inductible. Ceci permet le criblage d'un nombre important de colonies et rend inutile l'utilisation de la plaque maîtresse (Canu et Kaurilsky 1978).

2.1. MÉTHODE

2.1.1. Fixation et dénaturation sur papier filtre

La méthode que nous présentons dans cette section (Gergen *et al.* 1979) est simplifiée par rapport à la méthode originale de Grungstein et Hogness (1975).

1. Permettre une croissance des colonies bactérienne jusqu'à un diamètre de 1 à 4 mm. Elles sont transférées sur du papier filtre de type Whatman 541 déposé sur les colonies et incubé à 37°C pendant 2 h. Il est important d'empêcher la formation de bulles d'air entre le papier et la surface d'agar.
2. Si les plasmides utilisés pour la transformation sont du type relâché pour le contrôle de leur répllication, il est possible de procéder à une amplification en transférant le papier filtre, directement sur du milieu Luria (LB) contenant 250 µg/mL de chloramphénicol et en poursuivant l'incubation pendant 12-24 h à 37°C.
3. Lyser les colonies bactériennes, dénaturer et immobiliser l'ADN par deux

lavages successifs de 5 min dans les solutions suivantes:

- NaOH0.5 M
- Tris-HCl, pH 7.40,5 M
- 2X SSC, pH 7

4. Laver brièvement dans 95% éthanol et sécher à l'air. Les filtres Whatman 541 ont la propriété de fixer rapidement l'ADN et ils peuvent être utilisés sans nécessiter d'autres traitements pour la pré-hybridation et l'hybridation.

2.1.2. Fixation et dénaturation sur membrane de nitrocellulose

1. Déposer des filtres de nitrocellulose stériles sur une boîte de Petri contenant du milieu nutritif et les antibiotiques appropriés, choisis selon le type de plasmide utilisé. Le filtre doit être mouillé complètement par capillarité à la surface de l'agar.
2. Isoler les colonies d'une transformation et les inoculer sur une nouvelle plaque et sur le filtre de nitrocellulose. Cette opération est réalisée par l'intermédiaire de cure-dents en bois préalablement stérilisés et en prenant soin de ne pas dépasser 50 colonies sur un filtre de 10 cm de diamètre afin d'éviter de mélanger les colonies au cours des d'étapes ultérieures.
3. Incuber les boîtes de Petri renversées à 37°C. Les plasmides relâchés peuvent être ultérieurement amplifiés en transférant pendant 12-24 h les filtres de nitrocellulose sur un milieu contenant 250 µg/mL de chloramphénicol.
4. Lyser les colonies et dénaturer l'ADN en transférant successivement les

filtres de nitrocellulose, les colonies bactériennes sur la partie supérieure, sur trois épaisseurs de papier Whatmann 3MM préalablement imbibé dans les solutions suivantes:

- NaOH 0.5 M (8 min ou plus jusqu'à ce que les colonies aient pris une apparence luisante)
 - Tris-HCl 1M pH 7.5 (3 min à répéter une ou deux fois pour neutraliser la solution alcaline)
 - Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, NaCl 1.5 M
5. Sécher délicatement les filtres de nitrocellulose sur du papier Whatmann 3 MM.
 6. Tremper les filtres dans de l'éthanol absolu (attention: cette étape est facultative et certains filtres de nitrocellulose ne sont pas résistants à l'éthanol, si c'est le cas passer directement à l'étape 7).
 7. Tremper les filtres 5 fois dans le chloroforme pour extraire les lipides bactériens.
 8. Sécher les filtres sur du papier Whatmann 3 MM.
 9. Tremper les filtres dans NaCl 0.3 M pendant 3 min.
 10. Sécher à la température ambiante et cuire sous vide à 80°C pendant 2 h avant de procéder à la pré-hybridation et l'hybridation.

Il est important de noter que les membranes de nitrocellulose, après la cuisson sous vide, sont extrêmement friables et, il

faut les manipuler avec beaucoup de précaution.

3. HYBRIDATION DE TYPE "SOUTHERN"

Ce type d'hybridation vise la recherche de fragments spécifiques d'ADN viral et/ou chromosomique, obtenus après coupure par des enzymes de restriction. La mise au point et les applications de cette méthode ont été décrites par Southern (1975, 1979).

Brièvement, après coupure par une enzyme de restriction, les fragments d'ADN sont séparés en gel d'agarose ou, si les fragments sont de petite taille, en gel de polyacrylamide (Maniatis *et al.* 1982). Après dénaturation de l'ADN et transfert par capillarité ou par électrophorèse, sur des filtres de nitrocellulose ou de nylon (Bittner *et al.* 1980, Stellway *et al.* 1980, Smith *et al.* 1984) à l'aide de la sonde spécifique l'ADN sera détecté.

3.1. FRACTIONNEMENT DE L'ADN

Les fragments d'ADN sont fractionnés sur gel d'agarose ou d'acrylamide selon des protocoles standards.

Afin d'effectuer l'hybridation de type Southern, il est essentiel de déposer dans chaque puits environ 0.5 µg d'ADN d'un bactériophage lambda recombinant, 0.2 µg d'un plasmide et jusqu'à 10 µg d'ADN total de mammifères (génomme haploïde de 3×10^9 paires de bases) si l'on veut détecter une séquence unique sur le génome.

Après coloration au bromure d'éthidium, les portions inutiles des gels peuvent être éliminées à l'aide d'un scalpel.

3.2. PRÉPARATIONS POUR LE TRANSFERT SUR FILTRES

Les filtres de nitrocellulose ou de nylon doivent être manipulés avec des pinces ou des gants.

3.2.1. Nitrocellulose

Les filtres de nitrocellulose sont d'abord immergés dans l'eau distillée (s'il reste des surfaces non imbibées, utiliser de l'eau bouillante).

Les filtres sont trempés dans du tampon 20X SSC ou 20X SSPE ou 1M NH₄ OAc (section 8).

3.2.2. Nylon

Les filtres de nylon sont imbibés dans l'eau et, par la suite, dans le tampon de transfert approprié.

3.3. FRAGMENTATION ET DÉNATURATION DE L'ADN

Les étapes de cette section sont identiques pour préparer un transfert sur nitrocellulose ou nylon.

1. Après électrophorèse, les gels sont immergés dans du HCl 0.25N (500 mL pour un gel de 200 mL) pendant 8-10 min à la température ambiante et sous agitation lente. Cette étape n'est pas nécessaire si l'on utilise des oligonucléotides comme sondes moléculaires.
2. Les fragments sont ensuite dénaturés dans le gel. Rincer dans l'eau distillée (2 min), tremper dans deux bains de 15 min (2 mL de NaCl 1 M NaOH 0.3 M par mL de gel), sous agitation lente. Neutraliser le gel par trempage

(2 x 15 min) dans soit: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4); 1,5 M NaCl soit: 1 M NH₄ OAc (pH 7,0). Ou, si l'on désire effectuer un transfert électrophorétique, dans les tampons TAE ou TBE (2 x 5 min) (section 8).

3.4. TRANSFERT ET IMMOBILISATION DE L'ADN

Selon le type de filtre utilisé, il existe différentes approches.

3.4.1. Nitrocellulose

Le filtre de nitrocellulose imbibé (voir section 3.2.1) est déposé sur le gel qui est lui-même plongé dans le tampon (2X SSC). Il est important d'éviter la formation de bulles d'air entre les gels et le filtre de nitrocellulose. Après avoir préparé plusieurs couches de papier Whatmann 3MM, de dimension identique à celle du gel d'agarose, imbibées dans du tampon 2X SSC, replacer à la surface de la nitrocellulose et du gel d'agarose (Southern 1979). Bien tenir en place les différentes couches de papier par un poids suffisant qui n'écrase pas le gel. Sous ces conditions, le transfert requiert approximativement 1 à 2 h, mais, il peut être prolongé toute la nuit.

Après cette période, l'efficacité de transfert peut être déterminée par coloration des gels avec 0.5 µg/mL de bromure d'éthidium.

L'immobilisation de l'ADN sur la nitrocellulose se fait après avoir séché celle-ci entre 2 feuilles de papier Whatmann 3MM et utilisé un four à vide à 80°C pendant 20 min à 2 h. Les filtres ainsi desséchés peuvent être entreposés à 4°C pendant 6 mois ou plus. A titre d'exemple de ce type de transfert voir la Figure 1.

3.4.2. Nylon

Le transfert par capillarité sur filtre de nylon se fait essentiellement de la même façon que sur nitrocellulose. Cependant, il est recommandé d'utiliser les tampons de transfert 10X SSPE ou SSC, même si des concentrations de 1 à 5X SSPE peuvent s'avérer efficaces.

Le transfert électrophorétique se fait dans du tampon 1X TAE ou 1X TBE (utiliser le type de tampon ayant servi à l'électrophorèse). La préparation du gel et du filtre de nylon à l'intérieur des supports est semblable à celle qui a été utilisée pour les transferts électrophorétiques des protéines avec le filtre situé à proximité de l'anode. Il faut appliquer environ 10V/cm pendant 30 min et passer ensuite à 40 V/cm pendant 2 h à une température de 4°C. Après le transfert, laver les filtres dans 5X SSPE à 60°C pendant 5 min et cuire pendant 30 min à 65-80°C pour immobiliser l'ADN. L'utilisation d'un four à vide n'est pas nécessaire pour ce type de membrane. Alternativement, l'immobilisation de l'ADN peut se faire à l'aide d'une source de rayons UV (254 nm) telle que celle émise par une lampe germicide ou un transilluminateur. L'exposition totale doit être de 1,6 KJ/m² pour les membranes sèches. Les filtres de nylon peuvent être entreposés à 4°C pendant 6 mois ou plus.

Une technique additionnelle peut également être employée pour certaines membranes de nylon exposées à des tampons alcalins (Chomezynski et Quasba 1984). Selon ce procédé, les membranes sont imbibées d'eau distillée et ensuite saturées dans le tampon de transfert (0.4 M NaOH/ 0.6 M NaCl). Le gel d'agarose ou d'acrylamide est plongé deux fois pendant 15 min dans ce tampon de transfert en utilisant 3-4 mL de ce tampon par mL de gel. Les gels peuvent

nécessiter un pré-traitement de 10 min dans du HCl 0.25 M lorsque les fragments d'ADN à séparer sont d'une taille importante (> 10 Kpb).

Les fragments sont ensuite transférés sur nylon avec le tampon sus-mentionné par la technique de capillarité (section 3.4.1). La membrane de nylon doit successivement être neutralisée dans du Tris-HCl 0,5 M (pH 7.0)/NaCl 0.1 M pendant 10-15 min à température ambiante, puis séchée ou traitée aux UV tel que décrit précédemment (section 3.4.2).

4. HYBRIDATION DE TYPE "NORTHERN"

Ce type d'hybridation concerne le fractionnement, le transfert, la fixation et l'analyse de la taille des ARN séparés sur des gels contenant des dénaturants tels que le glyoxal, la formaldéhyde ou l'hydroxyde de méthylmercure. La dénaturation complète de l'ARN, par ces trois produits chimiques, permet la mobilité électrophorétique dépendant uniquement de la masse moléculaire. De plus, cette dénaturation facilite l'élution et l'immobilisation sur la membrane (Bailey et Davidson 1976, Thomas 1980, Carmichael et McMaster 1980, Lehrach *et al.* 1977). La coloration des gels à l'acridine orange n'inhibe pas le transfert de l'ARN (Carmichael et McMaster 1980), cependant les processus de décoloration permettant l'utilisation du bromure d'éthidium peuvent interférer avec l'élution de l'ARN.

4.1. FRACTIONNEMENT DE L'ARN

L'ARN doit être fractionné en des gels d'agarose (0.8 à 1,5% avec une épaisseur pouvant varier entre 3 et 5 cm). Alternativement, des gels d'acrylamide contenant de l'urée peuvent être utilisés. La

coloration des gels se fait avec 33 µg/mL d'acridine orange préparé dans 10 mM NaPO₄ (pH 6.5), et la décoloration dans ce même tampon (3 fois 20 min).

4.1.1. Gels de glyoxal

Incuber l'échantillon d'ARN dans du glyoxal 1M/ NaPO₄ 10 mM (pH 6.5), pendant 60 min à 50°C. Ajouter 1/10 de volume de tampon d'échantillon 10X (0.3% bleu de bromophénol, 50% glycérol, EDTA 20 mM). Réaliser l'électrophorèse dans du NaHPO₄ 10 mM (pH 6.5) à 25-30V pendant la nuit, en effectuant une recircularisation du tampon, ou pendant 6 h à 90V (4.5V/cm de longueur de gel).

4.1.2. Gels de formaldéhyde

Toutes les manipulations s'effectuent sous une hotte chimique.

Les échantillons d'ARN sont chauffés à 65°C pendant 5 min dans le formamide 50% /formaldéhyde 2.2 M dans du tampon MOPS. Refroidir à la température ambiante et faire l'électrophorèse dans du tampon d'échantillon 1X. Le gel utilisé est constitué de 1% agarose dans du tampon MOPS et formaldéhyde 2.2 M (3,5V/cm de gel pendant 3-4 h). Après l'électrophorèse, rincer le gel dans l'eau distillée.

4.1.3. Gels d'hydroxyde de méthylmercure

Toutes les manipulations s'effectuent sous une hotte chimique.

Les échantillons d'ARN sont suspendus dans de l'eau déionisée stérile avec un volume équivalent de tampon E contenant 10% de glycérol, 0,06% de bleu de bromophénol, hydroxyde de méthylmercure 10 mM. L'agarose est préparé dans l'eau distillée; lorsque la température de l'agarose est à 50°C ou moins, ajouter 1/10

du volume final du tampon E. Ajouter 1/10 à 1/20 du volume d'hydroxyde de méthylmercure 100 mM pour obtenir une concentration finale de 5 à 10 mM. L'électrophorèse se fait à 15-25V pendant 17 à 20 h avec recirculation du tampon.

4.2. PRÉPARATIONS POUR LES TRANSFERTS SUR FILTRES

Contrairement à la technique de Southern, pour le transfert d'ARN sur filtres de nitrocellulose ou de nylon, il n'est pas nécessaire de pré-traiter les gels d'agarose ou d'acrylamide. Cependant il est conseillé de garder ceux-ci dans des conditions d'hypotonie pour créer un front de sels aidant l'élution (Thomas 1977).

4.2.1. Nitrocellulose

Les filtres sont préparés tel que décrit à la section 3.2.1 et sont ensuite immergés dans 20X SSC jusqu'à l'utilisation.

4.2.2. Nylon

Les filtres sont préparés tel que décrit à la section 3.2.2 et sont ensuite immergés dans le tampon 10X SSPE ou SSC, si l'on utilise le transfert par capillarité, ou dans 1X TAE, pour le transfert électrophorétique.

4.3. TRANSFERT ET IMMOBILISATION DE L'ARN

Selon le type de filtre utilisé, les méthodologies applicables (capillarité ou électrophorétique) sont semblables à celles décrites pour l'ADN (sections 3.4.1 et 3.4.2). L'ARN étant très sensible à l'hydroxyde de sodium, le transfert en milieu alcalin est à proscrire (section 3.4.2).

L'immobilisation est également effectuée tel que décrit pour l'ADN; cependant, il

est possible de réduire le bruit de fond en traitant les membranes à la chaleur ou aux UV dans 1X SSC (0.1% SDS à 65°C pendant 1 h), après immobilisation.

5. HYBRIDATION

La spécificité de l'hybridation dépend de plusieurs facteurs, notamment des conditions d'incubation de la sonde sur les filtres et des conditions des lavages subséquents. La température, la force ionique du tampon ainsi que la présence de détergents ou d'agents bloquants affectent le degré de réassociation entre la sonde et la cible. Une revue complète des stratégies d'hybridation a récemment été publiée (Hames et Higgins 1987). Les étapes de pré-hybridation servent à bloquer les sites actifs qui peuvent fixer les sondes libres. La pré-hybridation permet également d'équilibrer les filtres avec la solution d'hybridation, ce qui diminue le bruit de fond dû à l'attachement non spécifique de la sonde. Les solutions protéiques telles que le réactif de Deinhardt, servent à prévenir l'attachement des sondes sur la surface du filtre non occupée par les molécules d'acides nucléiques. D'autres réactifs tels que le SDS, l'ARN ou l'ADN hétérologues ont pour fonction de diminuer l'hybridation aléatoire des sondes sur des séquences non complémentaires, ainsi que le bruit de fond dépendant de l'hybridation avec l'ARN (Deinhardt 1966, Jefreys et Flavell 1977).

5.1. HYBRIDATION AVEC DES SONDES RADIOACTIVES

(³²P, ³⁵S) D'ADN

Les sondes sont préparées par coupure substitution ou à l'aide amorces aléatoires. Il faut utiliser approximativement 100 µL de sonde par cm² de filtre.

5.1.1. Pré-hybridation

Dans un sac de polyéthylène pouvant être scellé à la chaleur, ou autres contenants équivalents, utiliser 250 µL de tampon de pré-hybridation sans sonde par cm² de filtre, pendant 1 à 2 h à 42°C.

Tampon de pré-hybridation

50% formamide déionisé

5X SSPE ou 5X SSC, 50 mM NaPO₄
pH 7.4

1-5X Solution de Deinhardt

0.1% SDS

100 à 200 µg/mL d'ADN dénaturé
et fragmenté de faible masse
moléculaire

50 µg/mL d'ARN poly(A)

(optionnel)

10% de sulfate de dextran (optionnel)

Il est conseillé d'extraire au phénol l'ADN de faible masse moléculaire avant son utilisation.

5.1.2. Hybridation

1. Préparation de la sonde: dénaturer la sonde par l'addition de 0.1 volume de NaOH 1M à 37°C pendant 5 min, ou par chauffage à 100°C pendant 5 min et placer immédiatement dans la glace. Les sondes sont utilisées à une concentration de 5 à 20 ng/mL ou 1 à 5 x 10⁶ cpm/mL pour la détection de cible unique ou en faible quantité. Les séquences abondantes peuvent être détectées à partir de 1 à 5 x 10⁵ cpm/mL.

2. **Addition de la sonde:** Remplacer dans le sac de polyéthylène la solution de pré-hybridation par le tampon d'hybridation contenant la sonde dénaturée. Agiter à 42°C pendant 12-24 h (en absence de formamide l'incubation se fait à 68°C). La composition du tampon d'hybridation est identique à celle du tampon de pré-hybridation. Il est à remarquer que le polyéthylène glycol peut être utilisé à la place du sulfate de dextran (Amasino 1986) et que l'héparine ou la gélatine peuvent remplacer la solution de Deinhardt (Singh et Jones 1984, Renart *et al.* 1979).
3. **Lavages:** Les filtres sont trempés successivement dans 150 mL des solutions suivantes:
 - deux fois dans du 1X SSPE (ou SSC) /SDS 0.1%, pendant 1 à 5 min à la température ambiante
 - deux fois dans du SSPE 0.1% (ou SSC) /SDS 0.1%, pendant 15 min à 42°C. Des conditions plus strictes nécessitent un lavage à 68°C.
 - rincer brièvement dans 0.1X SSPE (ou SSC)

5.2. HYBRIDATION AVEC DES SONDÉS D'OLIGONUCLÉOTIDES

La température d'hybridation (Th) pour ce type de sondes (entre 14 et 20 résidus) est de 5°C inférieure à la température à laquelle 50% des hybrides, formés entre les oligonucléotides et l'ADN fixé sur la matrice (Tm), et elle dépend de la longueur et la composition en bases de l'oligomère (Suggs *et al.* 1981).

$$Th = Tm - 5^{\circ}C$$

$$= [2^{\circ}C (\text{nombre A-T}) + 4^{\circ}C (\text{nombre G-C})] - 5^{\circ}C$$

Les hybrides d'oligonucléotides non complémentaires sont plus facilement destabilisés par des températures élevées et une faible force ionique, ainsi la température d'incubation est le facteur critique pour une détection valable. Il est important de noter que des concentrations élevées de certains tampons (type Deinhardt) peuvent empêcher l'hybridation avec des oligonucléotides et qu'il est parfois nécessaire d'en modifier les concentrations selon ses applications. Par ailleurs, 0.5% de Nonidet P-40 peut remplacer le SDS et l'addition du sulfate de dextran ne changera pas la vitesse d'hybridation à cause de la faible taille des sondes utilisées. Pour le marquage radioactif de ce type de sonde il est conseillé d'utiliser la terminal-transférase, la polynucléotide kinase ou une méthode d'extension d'amorce (Collins et Hunsaker 1985).

5.2.1. Pré-hybridation

Utiliser le procédé décrit à la section 5.1.1

La pré-hybridation se fait au Th de l'hybride pendant 30 à 60 min dans:

6X SSPE

0.5% SDS

5X solution de Denhardt

5.2.2. Hybridation

1. Remplacer le tampon de pré-hybridation avec le même tampon additionné de:
 - 100-200 µg/mL d'ARN de transfert
 - 3-5X solution de Deinhardt
2. Hybrider pendant 12 à 243 heures avec la sonde (10^6 - 10^7 cpm/mL) à la

température déterminée (Th) selon la formule indiquée à la section 5.2.

3. Les filtres sont lavés successivement (3 fois) dans 2X SSPE/ 0.1% SDS à température ambiante pendant 20 min, suivis d'un dernier lavage au Th de l'hybride.

5.3. HYBRIDATION AVEC DES SONDES D'ARN

Les duplex ARN/ADN sont plus stables que les duplex ADN/ADN, ce qui nécessite des conditions strictes d'hybridation afin d'éliminer l'attachement non spécifique des sondes d'ARN sur l'ADN immobilisé.

De plus, il faut manipuler avec grandes précautions afin d'éviter des ARNases pouvant dégrader ce type de sondes. À ce propos, il est déconseillé d'utiliser du lait écrémé pour les solutions de blocage des membranes, à cause de l'énorme quantité d'ARNases contenues dans ce produit. Il est à remarquer que certaines sondes d'ARN peuvent s'hybrider non spécifiquement avec de l'ARN ribosomal et que la concentration de la solution de Deinhardt peut être diminuée avec ce type de sondes.

5.3.1. Pré-hybridation

Les mêmes conditions que pour les sondes d'ADN (section 5.1) sont conseillées à une température de 50-60°C.

5.3.2. Hybridation

1. Les sondes sont dénaturées par la chaleur à 100°C pendant 5 min, avant d'être ajoutées aux mêmes tampons d'hybridation que pour les sondes d'ADN.

2. Lavages: Le bruit de fond peut être éliminé par un traitement successif des filtres par 1 µg/mL d'ARNase A dans 2X SSC pendant 15 min à température ambiante, suivi par des rinçages dans 1X SSC/ 0.1% SDS.

5.4. SONDES BIOTINYLÉES

L'incorporation de nucléotides biotinylés dans des chaînes d'ADN permet d'obtenir des sondes pouvant détecter de l'acide nucléique cible variant entre 2 et 5 pg (Hames et Higgins 1987). Après hybridation, l'incubation des filtres avec des préparations de streptavidine conjuguée à un enzyme, permet la révélation de l'hybridation. Parmi les précautions à prendre avec ce type de sondes citons:

- une forte concentration de la sonde est nécessaire pour une détection acceptable de la cible
- les sondes doivent être dénaturées par la chaleur puisque les solutions alcalines peuvent cliver la biotine

5.4.1. Pré-hybridation

Utiliser les mêmes conditions que la section 5.1.1; cependant il faut ajuster le formamide à 45%.

5.4.2. Hybridation

Ajouter la sonde dénaturée par la chaleur à une concentration de 100-200 ng/mL dans le tampon décrit à la section 5.1.1 contenant 45% de formamide. Après hybridation pendant 12-24 h, effectuer les lavages décrits à la section 5.3.2 puis, deux autres avec du tampon 0.16X SSC/ 0.1% SDS à 50°C pendant 15 min.

6. DÉTECTION DE L'HYBRIDATION ET RÉUTILISATION DES FILTRES

L'utilisation des sondes radioactives permet une détection par autoradiographie selon les procédés usuels. Le temps d'exposition des filtres doit être déterminé empiriquement selon la radioactivité associée aux filtres (estimation au compteur Geiger).

Les sondes radioactives demeureront en permanence sur les filtres, cependant il est possible de les enlever en utilisant les étapes suivantes:

1. Chauffer jusqu'à ébullition le tampon 0.1X SSPE (ou SSC)/ 0.2% SDS; enlever de la source de chaleur et ajouter le filtre pendant 15 min. Répéter ces étapes 1 ou 2 fois.
2. Les filtres peuvent être ré-hybridés immédiatement ou conservés à l'état sec pendant plusieurs mois. Avant de ré-hybridiser, tremper les filtres dans 1X SSPE (ou SSC) et suivre les étapes de pré-hybridation usuelles.

7. DÉTECTION DE VIRUS PAR HYBRIDATION

Une application directe de l'hybridation moléculaire en virologie est la détection de préparations virus à partir d'échantillons cliniques ou d'extraits cellulaires. Pour ce faire, il existe sur le marché des appareils qui permettent de déposer en points (dot-blot) ou en fentes (slot-blot) sur des filtres de nylon ou nitrocellulose des préparations brutes d'échantillons, pour ensuite les fixer et les hybrider par une sonde d'acide nucléique homologue

complémentaire. En général, si on utilise une sonde radioactive, il n'est pas nécessaire d'extraire l'acide nucléique viral avant de le fixer sur le filtre. Un traitement à la protéinase K (100-500 µg/mL)/ 0.5% SDS suivi d'extractions au phénol/chloroforme et de précipitations à l'éthanol peut s'avérer nécessaire afin de ne pas saturer les filtres avec des constituants cellulaires ou viraux. Cette méthode peut être réalisée directement à partir des fractions de gradients de saccharose ou de chlorure de césium.

7.1. VIRUS CONTENANT UN GÉNOME D'ARN OU D'ADN MONOCATÉNAIRE

1. Utiliser des membranes de nitrocellulose, préalablement trempées dans 20X SSC (section 3.2.1). Identifier sur la membranes les lieux des dépôts avec un crayon mou de graphite (type 4B).
2. Effectuer, si nécessaire, des dilutions des préparations virales ou des fractions des gradients (nous suggérons un tampon phosphate 50 mM, pH 7)
3. Déposer 5-50 µL de la préparation aux endroits appropriés de la nitrocellulose et permettre l'absorption complète de la solution sur le filtre.
4. Recouvrir avec du papier Whatmann 3MM et cuire au four sous vide à 80°C pendant au moins 2 h.
5. Suivre les étapes de pré-hybridation et hybridation selon le type de sondes à utiliser (voir sections précédentes). L'exemple de ce type d'hybridation est donné aux figures 2 et 3.

7.2. VIRUS CONTENANT UN ARN OU UN ADN BICATÉNAIRE

1. Préparer la nitrocellulose tel qu'indiqué à la section 7.1
2. Prélever 8 μL de préparations virales (ou fractions de gradients) et ajouter 2 μL d'une solution fraîche de 0.5 M NaOH. Laisser à température ambiante 10 min pour l'ADN ou 5 min pour l'ARN.
3. Ajouter 2 μL d'une solution 3M d'acétate de sodium (pH 5.5); si nécessaire diluer les échantillons dans du tampon 1X SSC.
4. Appliquer des volumes de 5-50 μL sur les filtres de nitrocellulose et effectuer les étapes 4 et 5 de la section 7.1.

Il faut noter que pour de l'ADN super enroulé, il faut d'abord effectuer une dépurination par l'ajout de 0.5 M HCl à des aliquotes de 5 μL avant d'utiliser le NaOH (2 μL d'une solution de 3M).

8. SOLUTIONS

20X SSC

NaCl3M

Citrate de sodium 0.3 M

Ajuster à pH 7

20X SSPE

NaCl3.6 M

NaPO₄ pH 7.7.....0.2 M

EDTA20 mM

1X Solution de Deinhardt

Ficoll 0.02%

Polyvinylpyrrolidone0.02%

Albumine sérique bovine0.02%

Tampon MOPS

Acide morpholino-propane-sulfonique, pH 240 mM

Acétate de sodium10 mM

EDTA1 mM

1X Tampon TAE

Tris-Acétate40 mM

EDTA1 mM

Ajuster à pH 8 avec l'acide acétique glacial.

1X Tampon TBE

Tris base45 mM

Acide Borique45 mM

EDTA2 mM

Ajuster à pH 8 avec l'acide acétique glacial.

9. CONCLUSION

Nous avons décrit dans ce chapitre les principales techniques et protocoles pouvant être utilisés pour l'hybridation moléculaire. Il faut cependant mentionner que chaque application peut nécessiter des ajustements afin de réduire le bruit de fond et/ou d'améliorer le seuil de détection de l'acide nucléique cible.

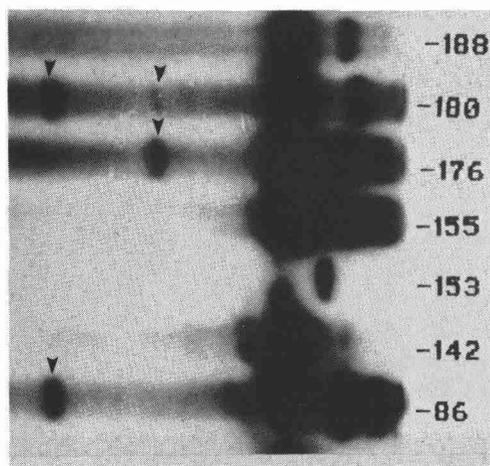


Figure 1

Hybridation de type "Southern": plusieurs plasmides (pUC 19) contenant des inserts d'ADN complémentaire du coronavirus bovin sont digérés par l'enzyme *EcoR* 1, séparés sur gel d'agarose et transférés sur nitrocellulose. Les clones 180, 176 et 86 contiennent des fragments homologues à la sonde utilisée (indiqués par les flèches).

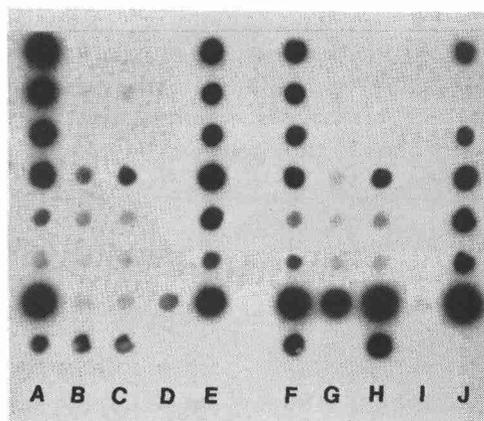


Figure 2

Hybridation d'échantillons cliniques du coronavirus bovin. Des échantillons sont déposés directement sur nitrocellulose (dot-blot) et hybridés avec une sonde d'ADN complémentaire pour démontrer la présence du virus.

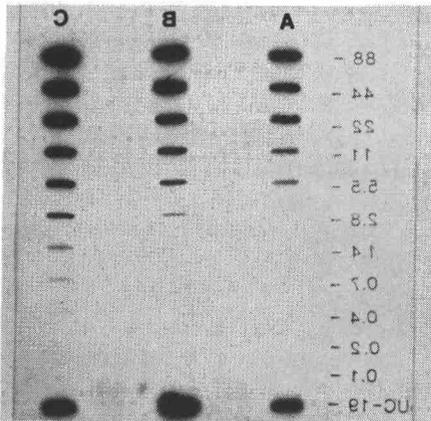


Figure 3

Hybridation entre des dilutions de coronavirus bovin et des sondes. Des dilutions de coronavirus purifiés (entre 0.1 à 88 ug de protéines virales sont déposées sur le filtre de nitrocellulose (slot-blot) et hybridées avec trois types de sondes d'ADN complémentaire (A, B, C). La sonde C permet une plus grande sensibilité de détection de la présence du virus. Le vecteur (pUC 19) contenant les différentes sondes est utilisé comme contrôleur positif de l'hybridation.

10. RÉFÉRENCES

- Amasino, R.M. 1986. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal. Biochem.* 152: 304-307
- Bailey, J.M. and Davidson, N. 1976. Methyl mercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 70: 75-85.
- Benton, W.D. and Davis, R.W. 1977. Screening gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196: 180-182.
- Bittner, M., Kupferer, P., and Morris, C.F. 1980. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slabs gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 102: 459-471.
- Cami, B., and Kourilsky, P. 1978. Screening of cloned recombinant DNA in bacteria by in situ colony hybridization. *Nucleic Acids Res.* 5: 2381-2390.
- Carmichael, G.G., and McMaster, G.K. 1980. The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Methods in Enzymology* 65: 380-391.
- Chomczynski, P., and Qasba, P.K. 1984. Alkaline transfer of DNA to plastic membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 122: 340-344.
- Collins, M.L., and Hunsaker, W.R. 1985. Improved hybridization assays employing tailed oligonucleotide probes: a direct comparison with 5'-end labeled oligonucleotide probes and nick translated plasmid probes. *Anal. Biochem.* 151: 211-224.
- Denhardt, D.T. 1966. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23: 641-646.
- Gergen, J.P., Stern, R.H., and Wensink, P.C. 1979. Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids. *Nucleic Acids Res.* 7: 2115-2136
- Grunstein, M., and Hogness, D.S. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 3961-3965.
- Hames, B.D., and Higgins, S.J. 1987. *Nucleic Acid Hybridization: a practical approach*. IRL Press, Washington, D.C., 245 pages.

- Jeffreys, A.J., and Flavell, R.A. 1977. A physical map of the DNA regions flanking the rabbit B-globin gene. *Cell* 12: 429-439.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., and Boetker, H. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743-4751.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 545 pages.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 3116-3120.
- Singh, L., and Jones, K.W. 1984. The use of heparin as a simple cost-effective means of controlling background in nucleic acid hybridization procedures. *Nucleic Acids Res.* 12: 5627-5638.
- Smith, M.R., Devine, C.S., Cohn, S.M., and Lieberman, M.W. 1984. Quantitative electrophoretic transfer of DNA from polyacrylamide or agarose gels to nitrocellulose. *Anal. Biochem.* 137: 120-124.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-512.
- Southern, E. 1979. Gel Electrophoresis of restriction fragments. *Meth. Enzym.* 64: 152-176.
- Stellwag, E.J., Dahlberg, A.E. 1980. Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto DBM-paper. *Nucleic Acids Res.* 8: 299-317.
- Thomas, P.S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 5201-5205

Universités francophones est la collection de l'Université des réseaux d'expression française (UREF). Cette dernière, qui fonctionne au sein de l'AUF comme une Université sans murs, a été choisie par le Sommet des Chefs d'État et de gouvernement des pays ayant en commun l'usage du français comme l'opérateur privilégié du Sommet en matière d'enseignement supérieur et de recherche.

Cette collection de manuels universitaires et d'ouvrages de référence s'adresse à tous les étudiants francophones. Elle est appelée à constituer une bibliothèque universitaire en langue française dont les ouvrages sont proposés à des prix modérés.



9 782760 505094

ISBN 2-7605-0509-X

Prix : 28 \$ Can

Diffusion: PUQ, ELLIPSES ou EDICEF selon les pays

59.4193.5