

Séquençage des acides nucléiques

Connaître la séquence primaire des acides nucléiques est une étape déterminante pour la mise en évidence de fonctions éventuelles codées par un ARN ou un fragment d'ADN cloné reconnaissance de séquences consensus, prédiction de séquences peptidiques, détermination de structures secondaires,

I\ Séquençage de l'ARN.

On utilise des endonucléases spécifiques ayant une spécificité pour un certain type de base:

RNase T1 : clive spécifiquement l'extrémité 3' des résidus **G**

RNase U2: clive spécifiquement l'extrémité 3' des résidus **A**

RNase PhyM : clive spécifiquement l'extrémité 3' des résidus **A** et **U**

RNase 13C : clive spécifiquement l'extrémité 3' des résidus **C** et **U**.

Ces ribonucléases sont utilisées sur un ARN marqué, à des concentrations telles que l'on ait une seule coupure par molécule et ce, statistiquement à chacune des positions possibles. On libère ainsi des fragments de taille variables, clivés spécifiquement, reflétant la position des bases. L'analyse s'effectue sur un gel d'acrylamide dénaturant permettant de séparer des fragments différents de un nucléotide en taille.

N.B. : Un gel séquence se lit du + vers le - = de 5' vers 3' si on marque l'ARN en 5' ou sur toute la longueur et de 3' vers 5' si on marque en 3'.

II\ Séquençage de l'ADN.

A\ Méthode de Maxam et Gilbert.

1\Préparation de l'ADN

Marquage des extrémités 5' du fragment à cloner.
Séparation des deux extrémités marquées.

2\clivage chimique de l'ADN.

Le principe de la méthode consiste à modifier spécifiquement par un réactif chimique un type de base et de cliver la chaîne d'ADN au niveau de ce nucléotide modifié. Les agents modifiant sont utilisés en concentration telle que l'on aura qu'une seule coupure par molécule, et ce à toutes les positions possibles.

Les réactifs utilisés sont

-> **DMS** (diméthylsulfate) - méthylation des purines puis 0,1 M **NaOH** -> coupe après **G** puis 0,1 M **HCl** -> coupe après **A** -> **hydrazine** - coupe après **C** et **T** -> **hydrazine** + **NaCl** -> coupe après **C**.

L'analyse et la lecture du gel sont identiques à celles décrites pour le séquençage de l'ARN.

B\ Méthode de Sanger.

Pour cette technique, il est nécessaire de disposer d'une amorce (court enchaînement de déoxynucléotides) ayant une séquence de bases complémentaires à une partie de la molécule d'ADN à étudier. Comme cette séquence n'est en général pas connue, on choisit cette amorce dans le vecteur de clonage (dont la séquence est connue).

1\ Préparation de l'ADN.

L'ADN à étudier doit être sous la forme simple brin pour permettre l'hybridation de cette amorce. Pour cela, on a deux possibilités :

- *dénaturation* (les résultats sont moins bons car une partie des plasmides à séquencer va se réhybrider)
- si le vecteur de clonage possède une origine de réplication d'un bactériophage simple brin (fd ou m13 par exemple), il suffit de *surinfecter* par ce bactériophage pour obtenir une grande quantité de notre plasmide sous la forme simple brin.

2\ Etape d'hybridation/élongation.

L'extension de la chaîne continue jusqu'à l'incorporation d'un didéoxynucléotide (pas de OH en 2' ni en 3' du ribose) à la place du déoxynucléotide correspondant, ce qui provoque la terminaison de la chaîne. Le rapport déoxynucléotide/didéoxynucléotide est choisi de façon à obtenir statistiquement un arrêt à chacune des positions du nucléotide étudié. Quatre essais sont donc réalisés (rajout soit du ddATP, soit du ddCTP ou du ddGTP ou du ddTTP). Chaque tube contient donc en fin de réaction une population de fragments de taille variable, ayant tous la même extrémité 5' et se terminant tous en 3' par le même didéoxynucléotide à toutes les positions possibles.

L'analyse et la lecture du gel sont identiques à celles décrites pour le séquençage de l'ARN (le marquage se fait soit en 5' de l'amorce, soit en réalisant l'élongation avec un dNTP $\alpha^{32}\text{P}$).