

PRATIQUE
DE L'UTILISATION
DES SONDES
NUCLÉIQUES
ET DE L'HYBRIDATION
MOLÉCULAIRE



G é r a r d L U C O T T E





C

et ouvrage a été conçu essentiellement comme un manuel pratique. Il a pour objectif d'offrir un résumé de la technique récente la plus usitée en génétique moléculaire : celle de l'hybridation sur membrane après transfert, relayée depuis peu par le procédé préalable d'amplification génique.

L'auteur développe notamment les diverses modalités de marquage des sondes, ainsi que les procédés d'hybridation moléculaire d'usage fréquent. Une attention toute particulière a été réservée aux questions de production, d'utilisation et de détection des sondes courtes, ainsi qu'à la présentation des informations pratiques concernant l'ADN et l'ARN.

Chaque chapitre comporte une importante partie consacrée à la description précise des protocoles expérimentaux testés et mis au point par l'auteur, suivie d'une série d'exercices et questions de réflexion dont les solutions sont données en fin d'ouvrage.

Ce livre, dans la lignée pédagogique des précédents ouvrages de Gérard Lucotte, s'adresse aux étudiants en biologie moléculaire, aux techniciens et aux chercheurs débutants souhaitant se familiariser avec la technologie.

2-85206-814-1



9 782852 068148

14

TABLE DES MATIÈRES

<i>Abréviations et symboles</i>	X
Chapitre 1. L'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE	1
1. Réaction d'hybridation	1
2. Composition du milieu d'hybridation	3
3. La cinétique d'hybridation	5
<i>Exercices</i>	10
<i>Bibliographie</i>	12
Chapitre 2. L'EXTRACTION DE L'ADN CIBLE	13
<i>Exercices</i>	16
<i>Protocoles expérimentaux</i>	17
2-1 : Extraction au phénol – 2-2 : Précipitation à l'éthanol	
2-3 : Alternatives à la précipitation – 2-4 : Extraction de l'ADN à partir du sang – 2-5 : Extraction de l'ADN à partir des tissus	
<i>Bibliographie</i>	19
Chapitre 3. LA PRODUCTION DES SONDES	21
1. Sondes génomiques	21
2. Sondes clonées	21
3. Sondes oligonucléotidiques	23
<i>Exercices</i>	29

Chapitre 4. LE MARQUAGE RADIOACTIF DES SONDÉS	31
1. Considérations générales	31
2. Marquage par modification enzymatique	32
3. Marquage d'oligonucléotides	37
<i>Exercices</i>	38
<i>Protocoles expérimentaux</i>	39
4-1 : Marquage radioactif d'une sonde ADN par la procédure de déplacement de coupure – 4-2 : Optimisation des conditions de digestion par l'ADNase I – 4-3 : Mesure de l'activité spécifique	
4-4 : Marquage radioactif d'une sonde par la procédure d'utilisation des amorces au hasard – 4-5 : Marquage radioactif en 5' d'une oligosonde par la polynucléotide kinase de T4	
<i>Bibliographie</i>	41
 Chapitre 5. LES SONDÉS FROIDES	43
1. Marquage à la biotine	43
2. Marquage de sonde par modifications chimiques	45
3. Marquage d'oligodésoxyribonucléotides	46
<i>Exercices</i>	49
<i>Protocoles expérimentaux</i>	50
5-1 : Marquage froid par déplacement de coupure – 5-2 : Marquage à partir d'amorces au hasard – 5-3 : Estimation de l'efficacité du marquage – 5-4 : Incorporation de nucléotides biotinylés dans les transcrits d'ARN – 5-5 : Marquage à la photobiotine – 5-6 : Marquage enzymatique d'un oligonucléotide par le procédé d'additions de bases – 5-7 : Marquage d'un oligonucléotide activé par la biotine	
<i>Bibliographie</i>	52
 Chapitre 6. LES PRINCIPALES TECHNIQUES D'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE	53
A) L'HYBRIDATION SUR FILTRE	53
1. Méthode par dépôt	55
2. Transfert sudiste d'ADN	55
3. Transfert nordiste d'ARN	56
<i>Exercices</i>	57

<i>Protocoles expérimentaux</i>	59
6-1 : Extraction de l'ARN viral sérique – 6-2 : Dépôt de l'ARN sur filtre – 6-3 : Gel d'agarose – 6-4 : Transfert sur filtre de nitrocellulose – 6-5 : Particularités du transfert sur membrane de nylon – 6-6 : Hybridation par une sonde marquée radioactivement – 6-7 : Autoradiographie – 6-8 : Réutilisation d'une membrane – 6-9 : Utilisation des membranes avec les sondes marquées non-radioactivement – 6-10 : Extraction de l'ARN tissulaire – 6-11 : Gel et transfert d'ARN par la méthode à l'hydroxyde de méthyle mercure – 6-12 : Gel et transfert d'ARN par la méthode à la formaldéhyde	
<i>Bibliographie</i>	64
B) L'HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	65
<i>Protocoles expérimentaux</i>	66
6-13 : Traitement des lames dans la solution de Denhardt – 6-14 : Digestion enzymatique – 6-15 : Hybridation <i>in situ</i> par une sonde marquée au ³⁵ S – 6-16 : Coloration des lames à l'hématoxyline – 6-17 : Hybridation <i>in situ</i> par une sonde marquée à la biotine	
C) HYBRIDATION EN SOLUTION	68
<i>Bibliographie</i>	72
Chapitre 7. LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE ____	73
1. Réaction de polymérisation en chaîne	73
2. Amplification à partir de l'ARN	73
<i>Exercices</i>	79
<i>Protocoles expérimentaux</i>	80
7-1 : Préparation d'ADN par le RPC – 7-2 : Réaction typique d'amplification – 7-3 : Hybridation après transfert du produit d'amplification	
<i>Bibliographie</i>	82
<i>Bibliographie générale</i> _____	83
<i>Solutions des exercices</i> _____	85
<i>Glossaire</i> _____	91