

Séquençage des ADN et ARN

1° Méthode de Maxam et Gilbert :

- Découpage de l'ADN en fragments de restriction. En effet, les molécules sont trop longues pour être décryptées en une seule fois. Les fragments obtenus se superposent.
- Les deux brins de l'hélice sont séparés par dénaturation de l'ADN, puis renaturés sur eux même.
- Chaque fragment obtenu est cloné par PCR (Polymérase Chain Réaction) en utilisant des amorces radioactives, qui servent de marquage. On possède ainsi plusieurs milliers d'exemplaires.
- Hydrolyse partielle du fragment étudié au niveau d'un site spécifique. Chaque fragment est coupé en un seul site, au niveau de l'un des quatre types de bases existants. Pour cela, on introduit un réactif spécifique de cette base dans l'une des quatre préparations. On obtient ainsi des morceaux d'ADN ayant des tailles différentes, terminés par une base spécifique, et portant un phosphore radioactif.
- Lecture de la séquence de bases par autoradiographie sur un gel dénaturant. Les fragments se séparent ainsi seulement par la taille : plus ils sont petits, et plus ils migrent loin. On obtient quatre bandes d'électrophorèse, chacune d'entre elles correspondant à l'une des quatre bases. On peut donc lire les bases dans l'ordre de distance de migration décroissante.

On séquence ainsi tous les fragments de l'ADN. Comme ces derniers se chevauchent, on peut réassembler les séquences dans le bon ordre et reconstituer la séquence complète de l'ADN de départ.

2° Méthode de Sanger :

- L'ADN à séquencer est fragmenté et cloné dans un vecteur.
- Les vecteurs recombinants obtenus sont dénaturés sous forme simple brin.
- On hybride une amorce synthétique à ce brin, qui servira de point de départ à la copie de l'ADN, à proximité de l'insert à séquencer.
- On réalise ensuite la copie de l'ADN selon quatre protocoles différents, correspondant à l'identification des quatre types de bases :

	C	G	T	A
Réactifs introduits	dCTP + ddCTP dGTP dTTP *(P)dATP	dCTP dGTP + ddGTP dTTP *(P)dATP	dCTP dGTP dTTP + ddTTP *(P)dATP	dCTP dGTP dTTP *(P)dATP + ddATP

Dans chaque préparation, on introduit le vecteur recombinant et son amorce, une polymérase I, qui en présence des quatre types de nucléotides va allonger l'ADN. On introduit donc les quatre désoxyribonucléotides nécessaires à cette élongation (dXTP). On choisit de marquer le dATP, afin de rendre l'ADN synthétisé radioactif. Dans chaque préparation, on met l'un des nucléotides en défaut, et on y ajoute un désoxyribonucléotide modifié (ddXTP) correspondant à la même base. Ce dernier, lorsqu'il est incorporé, stoppe la copie de l'ADN. On obtiendra ainsi des fragments d'ADN de taille différente, selon le lieu de cette incorporation, portant à leur extrémité une base spécifique de la préparation.

- On obtient des fragments d'ADN semblables à ceux obtenus avec la méthode de Maxam et Gilbert. La lecture de la séquence se fait de la même manière, par électrophorèse puis autoradiographie.

3° Méthode de la transcriptase reverse :

Elle copie l'ARN à séquencé en un ADN complémentaire.

4° Méthode de la kinase :

On réalise un marquage de l'ARN en C5 à l'aide d'un poly nucléotide kinase et d'un ARN marqué. Il est séquencé par coupure spécifique.

Les fragments sont caractérisés par une électrophorèse :

- **Endonucléase :**

- RNase T₁ : elle hydrolyse les ARN en 3' d'un résidu Guanine 3'G.
- RNase pancréatique : hydrolyse les ARN en 3' de tout les résidus pyrimidique (3'C et 3'U).
- RNase U₃ : hydrolyse les ARN en 3' les résidus puriques (3'A et 3'G).

- **Exonucléase :**

- Phosphodiesterase de rate de bœuf : hydrolyse en 5' s'il n'est pas phosphorylé. Elle libère des mono nucléotides.
- Phosphodiesterase de venin de serpent : hydrolyse en 3' si elle n'est pas phosphorylé. Elle libère des mono nucléotides.