

PREPARATION DE CHROMOSOMES DE LEVURE EN BLOC D'AGAROSE

PRINCIPE

L'électrophorèse en champ pulsé permet de séparer des fragments d'ADN linéaires dont la taille est comprise entre 50 kb et quelques mégabases. Il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter cette cassure mécanique des molécules d'ADN, l'extraction et la digestion de l'ADN sont directement réalisées sur cellules incluses dans des blocs d'agarose.

Référence : Schwarz, D. C., and Cantor, C. R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.

MATERIEL

- Tubes Falcon de 50 ml et centrifugeuse pour tubes Falcon
- Plaques de verre et peignes très propres pour mouler les blocs d'agarose
- Anses jetables

SOLUTIONS

- Agarose InCert (à conserver à 50°C) :

EDTA (pH 9)	125 mM	pour 1 ml	250 µl de 0,5 M
Incert (p/vol)	1%		0,01 g

- SCE (à conserver à température ambiante) :

Sorbitol	1 M	pour 10 ml	5 ml de 2 M
EDTA (pH 9)	10 mM		20 µl de 0,5 M
Citrate de sodium (ajusté à pH 5,8 avec acide citrique)	100 mM		1 ml de 1 M

- Solution I (à conserver à 4°C) :

SCE	1 M	pour 1 ml	1 ml
β-mercaptoéthanol (vol/vol)	2,5%		25 µl
Zymolyase (extemporanément) 100 unités/ml			10 µl de 100 mg/ml

- Solution II (à conserver à 4°C) :

EDTA (pH 9)	450 mM	pour 10 ml	9 ml de 0,5 M
Tris-HCl (pH 8)	10 mM		100 µl de 1 M
β-mercaptoéthanol (vol/vol)	7,5%		750 µl

- Solution III (à conserver à température ambiante) :

EDTA (pH 9)	450 mM	pour 10 ml	9 ml de 0,5 M
Tris-HCl (pH 8)	10 mM		100 µl de 1 M
N-lauryl sarcosyl (vol/vol)	1%		100 µl
Protéinase K (extemporanément)	150 µg/ml		1,5 mg

- β-mercaptoéthanol (**ATTENTION** : toxique s'il est inhalé ou absorbé à travers la peau.
Porter des gants et travailler sous la hotte).

- Protéinase K

- Solutions d'EDTA 50 mM pH 9 et EDTA 0,5 M pH 9

<i>Toujours travailler avec des gants et utiliser des solutions autoclavées, manipuler les blocs d'agarose le moins possible et avec précaution.</i>
--

PROTOCOLE

- La veille, ensemencer avec une colonie isolée 5 ml de milieu YPglu. Incuber la nuit à 30°C sous agitation.
- Compter les cellules sous le microscope avec une lame de Mallassez.
 - diluer la culture au 1/10 dans un tube Eppendorf (50 μ l de cellules + 450 μ l d'eau distillée)
 - transférer environ 30 μ l de cette dilution entre lame et lamelle,
 - compter les cellules de 20 petits carrés sous le microscope et faire une moyenne pour un,
 - calculer la concentration de cellule sachant que
nombre de cellules d'un carré $\times 10^5$ = concentration de cellules/ml (ne pas oublier le facteur de dilution)
- Prélever un volume de culture contenant 10^9 cellules et le transférer dans un tube Falcon.

Pour 10^9 cellules, on aura un volume final de 1 ml (cellules (0,33 vol) + solution I (0,11 vol) + agarose (0,56 vol), ce qui correspond à au moins 10 blocs de 8 mm x 5 mm x 2 mm.
- Centrifuger à 5 000 t/min 5 min à 4°C.

Pendant la centrifugation, faire fondre l'agarose InCert et le maintenir à 50°C. Préparer les moules pour la réalisation des blocs d'agarose : laver soigneusement les plaques de verre avec de l'eau distillée puis avec de l'éthanol, positionner le peigne entre les 2 plaques de verre et maintenir les plaques avec des pinces.
- Éliminer le surnageant et rincer le culot de cellules avec 5 ml d'EDTA 50 mM pH 9.
- Centrifuger à 5 000 t/min 5 min à 4°C. Éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot de cellules dans un volume final de 330 μ l EDTA 50 mM (prendre en compte le volume des cellules).

A cette étape, il est nécessaire de manipuler le β -mercaptoéthanol sous la hotte

- Ajouter délicatement 110 μ l de solution I.
- Ajouter rapidement 560 μ l d'agarose InCert 1% (conservé à 50°C).
- Homogénéiser délicatement le mélange et le verser rapidement dans les moules à blocs. Mettre en chambre froide 10 min.
- Avec des gants, démouler et couper des blocs d'environ 5 mm de hauteur avec une lamelle de verre et les mettre dans un tube Falcon.
- Ajouter la solution II de façon à couvrir les blocs (environ 2 ml).
- Incuber la nuit à 37°C sans agitation dans une étuve.
- Sortir les tubes contenant les blocs d'agarose et les placer dans la glace.
- Éliminer la solution II à la pipette sous la hotte.
- Remplacer la solution II par la solution III de façon à couvrir les blocs (environ 5 ml).
- Incuber 6 h à 65°C sans agitation dans une étuve.
- Placer les tubes Falcon contenant les blocs d'agarose 15 min dans la glace.

- Vider les tubes et ajouter 10 ml d'EDTA 0,5 M pH 9 pour une conservation longue des blocs. Les blocs d'agarose se conservent alors à 4°C pendant plusieurs mois.