

MARQUAGE DE CDNA PAR METHODE INDIRECTE

PRINCIPE

Différentes techniques permettent d'étudier le transcriptome de la levure de *Saccharomyces cerevisiae* et d'obtenir ainsi le profil d'expression des 6000 et quelques gènes d'une population de cellules à un instant donné. Le principe repose sur la transcription reverse des ARNm trouvés dans ces cellules et sur le marquage des ADN complémentaires obtenus. Les ADNc marqués sont alors hybridés à des acides nucléiques représentatifs des ORFs de la levure. Il y a 10 ans les premiers systèmes fonctionnant sur ce principe, appliqués notamment à des cellules cancéreuses, ont été développés en utilisant des membranes sur lesquelles étaient déposés les clones cDNA ou les produits de PCR des gènes. L'hybridation se faisait en utilisant des sondes radioactives. La technologie évoluant, il est possible de déposer sur des lames de verre de dimensions réduites les produits de PCR des 6000 ORFs, ou éventuellement des oligonucléotides spécifiques de chacun d'eux. Le marquage des sondes n'est plus radioactif mais fluorescent, et généralement on hybride une lame avec deux sondes marquées par deux fluorochromes différents, une fluorescence pour une condition expérimentale, l'autre pour une condition témoin. On a ainsi sur une même puce un échantillon d'ARNs témoins et un échantillon expérimental. Les puces ADN peuvent également être utilisées pour étudier les remaniements du génome nucléaire d'un organisme. On compare alors l'ADN génomique de la souche étudiée avec l'ADN génomique d'une souche de référence. Des duplications de blocs de gènes, ou la présence de chromosomes supplémentaires peuvent alors se distinguer par l'analyse du rapport moyen sur toute la puce.

MATERIEL

- Bain-marie à 37°C, 42°C et 70°C

SOLUTIONS DE MARQUAGE POUR CDNA

- Kit CyScript Fluorescent Labeling kit
- Ethanol absolu 100% froid (-20°C) et à 70% froid (-20°C)
- Colonne de purification MicroSpin G-50 (Amersham)

SOLUTIONS DE MARQUAGE POUR ADN

- Amorces oligonucléotides pd(N)6 en solution à 0,15 unité/ μ l
- ADN polymérase (fragment de *Klenow* exonucléase free, 10 U/ μ l)
- Tampon " random priming " 10 X :

Tris-HCl (pH 7)	500 mM	pour 1 ml	500 μ l de 1 M
MgSO ₄	100 mM		100 μ l de 1 M
DTT	1 mM		1 μ l de 1 M
- Mélange de dATP, dGTP, dCTP (à 5 mM chacun) et dTTP à 2 mM

2,5 μ l de dATP 100 mM
2,5 μ l de dCTP 100 mM
2,5 μ l de dGTP 100 mM
1 μ l de dTTP 100 mM
41,5 μ l H ₂ O (qsp 50 μ l)
- Solution de dUTP-cy3 et dUTP-cy5 à 1mM
- ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé 5mg/ml
- Ethanol absolu 100% froid (-20°C) et à 70% froid (-20°C)

PROTOCOLE DE MARQUAGE DU CDNA

Marquage du cDNA avec les amino allyl-dUTP

- Mélanger délicatement dans un tube Eppendorf :

ARN total 10 μ g ou ARNm 1 μ g	max 8 μ l
oligo (dT) ancrés	3 μ l
Eau déionisée nucléase free	qsp 11 μ l
- Incuber pendant 5 min à 70°C.
- Mettre la réaction 10 min RT pour l'annealing puis centrifuger quelques secondes.
- Ajouter dans la glace, mélanger délicatement puis centrifuger quelques secondes :

Reaction buffer 5 X	4 μ l
DTT 0,1 M	2 μ l
dNTP mix 20 X	1 μ l
AA-dUTP (resuspendu dans 30 μ l H ₂ O)	1 μ l
CyScript Reverse Transcriptase	1 μ l
- Incuber pendant 1 h 30 min à 42°C.

Purification des amino allyl-cDNA

- Ajouter 2 μ l de NaOH 2,5 M, vortexer puis centrifuger quelques secondes.
- Incuber pendant 30 min à 37°C.
- Ajouter 10 μ l d'une solution HEPES (acid free) 2 M, vortexer puis centrifuger quelques secondes. Les cDNA sont prêts pour la purification et peuvent être conservés à -20°C.
- Ajouter 3 μ l d'une solution 3M d'acétate de sodium et 75 μ l d'éthanol absolu et vortexer.
- Incuber pendant minimum 1 h à -70°C ou toute la nuit à -20°C.
- Centrifuger pendant 30 min à 13000 rpm à température ambiante. Éliminer le surnageant.
- Rincer les culots avec 1 ml d'éthanol à 70% froid, fermer le tube et le retourner plusieurs fois pour laver le culot.
- Centrifuger pendant 15 min à 13000 rpm à température ambiante et éliminer le surnageant.
- Sécher le culot sous vide (Speed-Vac) pendant 5 min ou à 37°C pendant 30 min.
- Dissoudre le culot dans 15 μ l d'eau déionisée nucléase free. Les cDNA sont prêts pour le couplage avec les CyDye et peuvent être conservés à -20°C.

Marquage des amino allyl-cDNA avec les Dye

- Préparer les solutions stock de cyanines fluorescentes dans le noir! Centrifuger les tubes lyophilisés de Cy3 et Cy5 pour faire tomber la totalité du produit, puis ajouter 15 μ l de bicarbonate de soude 0,1 M pH9. Bien vortexer et centrifuger quelques secondes.
- Ajouter les 15 μ l de Dye aux cDNA. Bien mélanger et placer les tubes dans l'obscurité pendant 1 h à température ambiante.
- Ajouter 15 μ l de Hydroxylamine 4 M. Mélanger et placer les tubes dans l'obscurité pendant 15 min à température ambiante.

Purification des amino allyl-cDNA marqués

- Purifier la sonde avec les MicroSpin G-50 (protocole "removal of Dye-labelled nucleotides following cycle sequencing" du fabricant).
- Utiliser 2 colonnes par sonde (22,5 μ l par colonne). Resuspendre la résine en vortexant doucement. Casser l'embout de la colonne et dévisser légèrement le bouchon.
- Placer la colonne dans un tube Eppendorf et centrifuger pendant 1 min à 2000 g.
- Changer le tube Eppendorf, bien "buvarder" l'excès de tampon de la colonne. Déposer bien au centre de la résine la sonde à purifier.
- Centrifuger pendant 1 min à 2000 g. La sonde est prête mais doit être concentrée.
- Mélanger les 2 sondes (Cy3 et Cy5) allant sur la même puce.
- Déposer sur Microcon YM-30 et centrifuger pendant 5 min à 14000 g.
- Retourner les colonnes dans un nouveau tube et centrifuger pendant 3 min à 1000 g.