
IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES PAR IMMUNOEMPRIENTE

Michel Trudel et Pierre Payment

1. INTRODUCTION

Une approche nouvelle pour l'identification des protéines virales connaît, depuis quelques années, un essor important. Il s'agit de l'immunodétection de protéines séparées par électrophorèse, transférées sur papier de nitrocellulose ou diazo-benzyloxyméthyle avant d'être révélées par un sérum polyclonal ou un anticorps monoclonal. Le nom d'immunoempreinte semble de plus en plus réservé pour identifier cette technique; en anglais, on la désigne sous le nom de Western-blotting. Les ouvrages à consulter sont ceux de Renart *et al.* (1979), Towbin *et al.* (1979) et Burnette (1981) Gooderham (1982) et Beisiegel (1986). Cette technologie, dérivée des méthodes d'immunofixation directe sur gels d'électrophorèse, donne une meilleure résolution. Elle a aussi donné lieu au développement d'épreuves rapides d'immunodétection ponctuelle mieux connue en anglais sous le nom de "dot-blot" (Sternberg et Jeppesen 1983, Alric *et al.* 1986, Heberling et Kalter 1986). Tout comme la technique d'immunoprécipitation précédemment décrite, cette technique tire avantage de l'affinité de la protéine A pour le fragment Fc des

IgG ou de l'affinité d'un anti-IgG, afin de détecter le complexe immunitaire (Burnette 1981): la protéine A ou l'anti-IgG peuvent être couplés à un marqueur fluorescent (fluorescéine), radioactif (radioiodination) ou enzymatique (peroxydase). On a aussi rapporté l'utilisation de lectines pour la détection des glycoprotéines (Ramirez *et al.* 1983). Récemment, la détection par marquage à l'or colloïdal connaît aussi une popularité grandissante (Hsu 1984, Brada et Roth 1984).

2. MÉTHODE

La méthode que nous préférons utiliser pour la détection des complexes immunitaires tire avantage de l'affinité de la protéine A marquée à la peroxydase. L'électrophorèse initiale pour la séparation des protéines virales est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Le transfert électrophorétique des protéines virales isolées est effectué sur feuilles de nitrocellulose selon la méthode de Towbin *et al.* (1979). La détection des complexes protéines-anticorps s'effectue avec la protéine A couplée à la peroxydase

(Burnette 1981, Tsang *et al.* 1983), sauf que l'iode radioactif est remplacé par l'enzyme.

Solutions

Tampon TBS (Tris-Buffered-Saline)

Tris base (50 mM)6.57 g

NaCl (150 mM)8.77 g

Merthiolate 0.01% (p/v)0.1 g

Compléter à 1 L avec H₂O et ajuster à pH 7.4 avec HCl 12 N

Tampon TBS-T

Tampon TBS999 mL

Tween 20 (0.1%)1 mL

Solution colorante

Dissoudre 50 mg de DAB (3-3' diamino benzydine hydrochloride) dans 100 mL de tampon TBS. Filtrer la solution sur papier Whatman No 1 et immédiatement avant son utilisation, ajouter 100 µL de peroxyde d'hydrogène (30% v/v)

2.1. TRANSFERT ÉLECTROPHORÉTIQUE

- Remplir la cellule de transfert (Bio-Rad, Trans-Blot Cell, Mississauga, Ontario, Canada) de tampon d'électrophorèse additionné de 20% (v/v) de méthanol. La quantité requise est d'environ deux litres: on peut utiliser le tampon qui a déjà servi à l'électrophorèse.
- Placer une éponge déjà imbibée de tampon de transfert sur un côté de la cassette et y déposer un carré de papier filtre (Whatman No 1 ou équivalent) (Figure 1).
- Déposer le gel d'électrophorèse sur le papier filtre et recouvrir d'un papier de nitrocellulose (membrane de nitrocellulose, porosité 0.45 µm). Il faut bien identifier l'orientation du gel sur le papier et faire attention qu'il n'y ait pas de poches d'air entre la membrane de nitrocellulose et le papier filtre.
- Couvrir la feuille de nitrocellulose d'une seconde feuille de papier filtre déjà imbibée de tampon de transfert.
- Placer la seconde éponge sur le dernier papier filtre puis, refermer la seconde moitié de la cassette et presser la cassette de manière à la refermer. Insérer la cassette montée dans la cellule de transfert. Assurez-vous que la membrane de nitrocellulose est entre le gel et l'anode (pôle positif, électrode rouge; Figure 1).
- Si l'on désire contrôler la température durant le transfert, il faut brancher l'échangeur de chaleur au bain à température contrôlée et placer la chambre de transfert sur un agitateur magnétique: il faut maintenir l'agitation au minimum pour diminuer le courant généré et ainsi éviter que le tampon de transfert soit poussé entre le gel et la membrane de transfert. La séparation du gel de la membrane de nitrocellulose entraîne une distortion dans le patron de transfert.
- Pour effectuer le transfert, monter le couvercle de branchement et raccorder à la source de tension (ex.: Bio-Rad, modèle 250/2.5). Pour le transfert des protéines, ajuster le courant à 50 volts, durant 1 à 1.5 h).
- Lorsque le transfert est complété, fermer la source de tension, enlever

la cassette de la chambre et récupérer le papier de nitrocellulose et le gel. Le papier de nitrocellulose peut être conservé à -20°C durant 6 mois ou utilisé immédiatement pour l'immunoempreinte.

9. Afin de vérifier si le transfert s'est bien effectué, le gel peut être coloré dans une solution de bleu de Coomassie (0.25% (p/v) dans 30% (v/v) de méthanol et 12% (v/v) d'acide acétique, durant la nuit et décoloré dans trois bains successifs de méthanol 30%-acide acétique 12%.

2.2. IMMUNOEMPREINTE

1. La feuille de nitrocellulose sur laquelle on a transféré les protéines provenant du gel d'électrophorèse est placée dans un sac de plastique à fermeture hermétique, genre Ziplock. On y ajoute 10 mL de solution de bloquage (1.5% d'albumine bovine dans du tampon TBS), sous agitation constante, sur un plateau basculant (Rocker plate, Bellco, Vineland, N.J. USA) à la température de la pièce. Après utilisation, la solution de bloquage est jetée.
2. On ajoute ensuite 10 mL de sérum convalescent ou d'anticorps monoclonal à la dilution appropriée (1/100 pour sérum polyclonal, 1/20 pour surnageant d'hybridome ou 1/100 pour liquide d'ascite) puis on incube à température de la pièce, durant 2 h, sous agitation constante.
3. L'immunoempreinte est alors lavée trois fois dans du tampon TBS-T pour des périodes de 10 min.
4. On ajoute ensuite 10 mL d'une solution de protéine A ou d'anti-immunoglobulines, marquées à la peroxydase, spécifiques aux sérums ou

aux anticorps monoclonaux utilisés pour former les complexes protéine A-fragments Fc des immunoglobulines ou aux anticorps anti-immunoglobulines (sérum anti-IgG de souris pour les anticorps monoclonaux murins, anti-IgG de cobaye pour sérum convalescent de cobaye, etc.); puis on incube 2 h à température de la pièce, sous agitation constante. La dilution de la protéine A-peroxydase est généralement 1/2000 dans du tampon TBS-T, tandis que les sérums anti-IgG de haute affinité sont utilisés à des dilutions de 1/3000 à 1/6000.

5. L'immunoempreinte est alors lavée trois fois dans du tampon TBS-T, comme précédemment décrit; elle est ensuite révélée par l'addition de 10 mL d'une solution de DAB (3-3'diamino benzidine hydrochloride), durant 10 à 15 min, sous agitation constante, jusqu'à l'obtention de l'intensité désirée. Le papier de nitrocellulose est ensuite rincé à l'eau déionisée pour arrêter le développement de la couleur.
6. L'immunoempreinte est séchée dans un incubateur ventilé.

3. DISCUSSION

En général, les antisérums réagissent bien en immunoempreinte; par contre plusieurs anticorps monoclonaux, ayant une spécificité pour un seul épitope, ne se fixent pas. L'épitope reconnu est probablement détruit par les conditions d'électrophorèse. Dans ces cas, l'immunoprécipitation est tout indiquée pour déterminer leur spécificité (Figure 2).

la majorité des chercheurs préfèrent utiliser les membranes de nitrocellulose: elles permettent la détection de 10 à 50 pg de

protéines et ne nécessitent pas d'activation; cependant elles n'acceptent pas les transferts électrophorétiques d'acides nucléiques. D'autres types de membranes sont disponibles: en particulier le zeta-probe (Bio-Rad) avec une sensibilité similaire au nitrocellulose, mais qui permet la fixation d'acides nucléiques; il existe aussi les papiers aminobenzoyloxyméthyle (AMB; Bio-Rad) et diazo (DBM) qui acceptent les protéines et acides nucléiques mais qui requièrent une étape d'activation. Les papiers diazo fixent aussi les acides aminés libres, c'est pourquoi les tampons tris-glycine ne peuvent être utilisés: il faut alors utiliser un tampon phosphate ou borate. Enfin, mentionnons les papiers échangeurs d'anions DEAE (diethyl-amino-ethyl): leur avantage principal la récupération du matériel transféré.

Il est important de noter que toutes les protéines ne sont pas transférées à la même vitesse et que les protéines d'une masse moléculaire supérieure à 60 000 Da sont retardées par rapport à

celles de masse moléculaire inférieure. Pour le transfert de protéines de masse moléculaire élevée, Gibson (1981) propose une digestion enzymatique partielle; cependant, cette approche risque de détruire certains épitopes qui ne seraient plus reconnus par les anticorps monoclonaux. Il est à noter que les transferts par capillarité sont de 10 à 100 fois moins efficaces.

Enfin, un mot sur les marqueurs de poids moléculaire. En général, on utilise des standards de faible ou haute masse moléculaire (14 400 à 92 500 ou 45 000 à 200 000 Da), que l'on colore sur le papier de nitrocellulose après transfert. La coloration utilisée est le bleu de Coomassie à 0.05% (p/v), durant 3 minutes, suivie de bains décolorants dans la solution méthanol (30%)/acide acétique (12%). Les différentes compagnies telles que Bio-Rad, Pharmacia ou Sigma offrent maintenant des marqueurs précolorés qui sont visibles lorsque transférés.

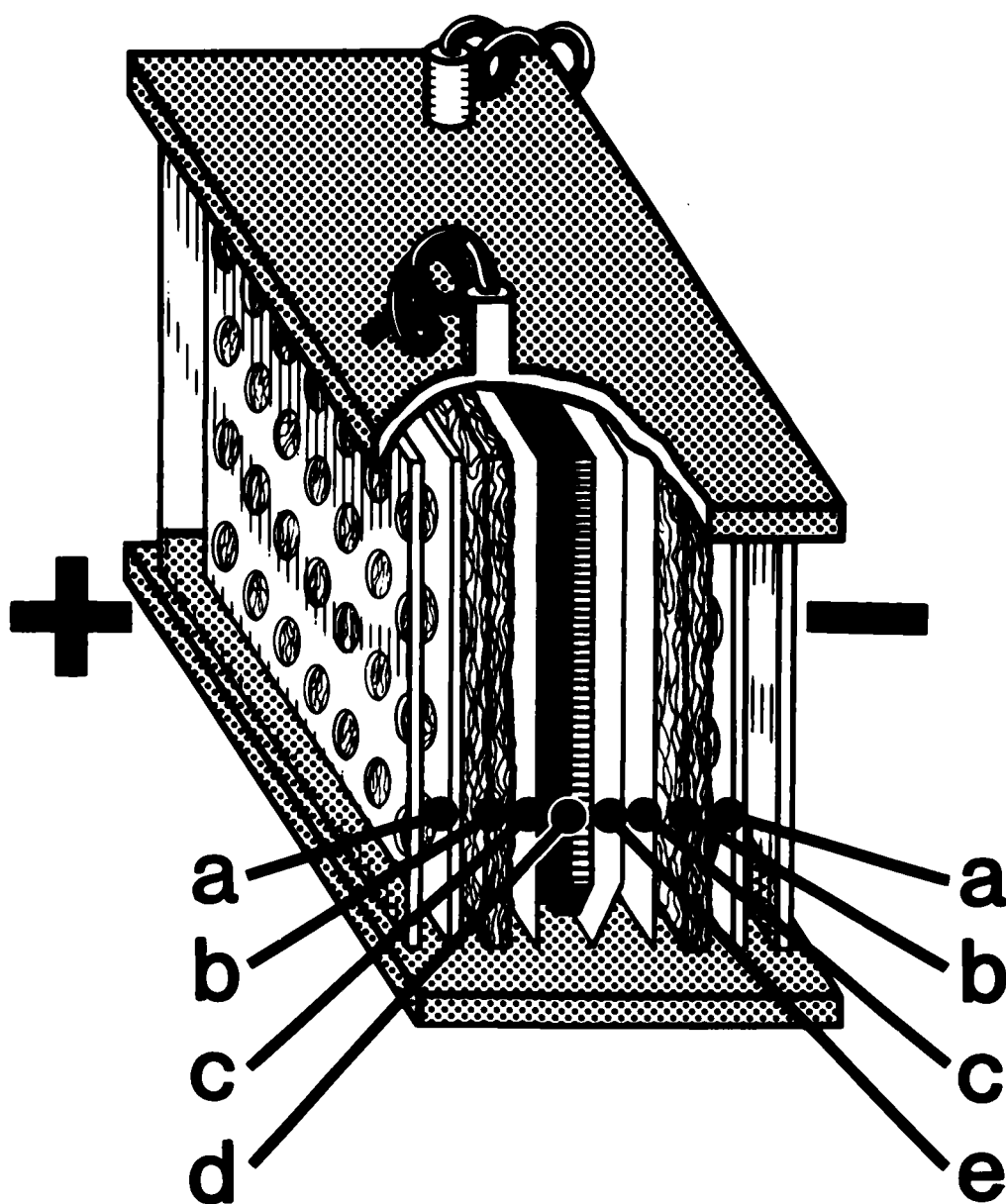


Figure 1

Représentation schématique de la disposition des divers éléments d'une cassette de transfert, identifiant les positions respectives du gel et de la feuille de nitrocellulose: parties supérieure et inférieure de la cassette (a), éponges (b), papier filtre (d), gel d'électrophorèse (e), et feuille de nitrocellulose (f).

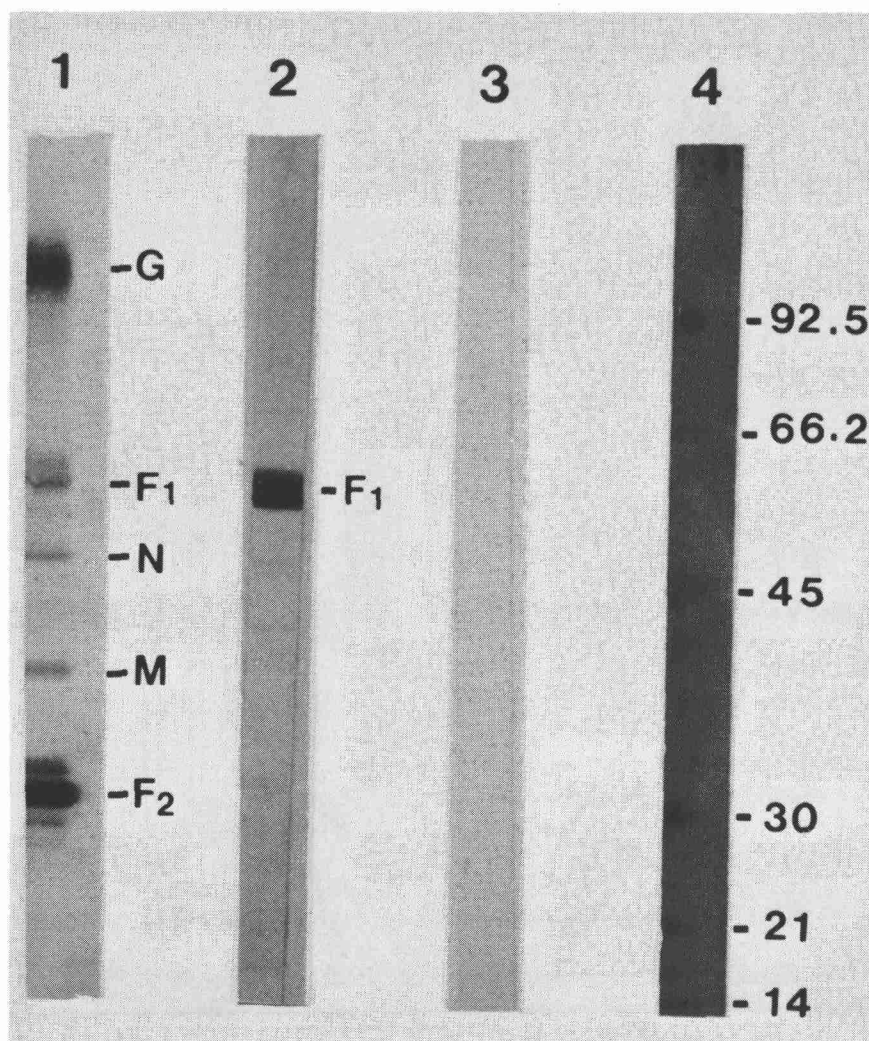


Figure 2

Immunoempreinte identifiant les protéines structurales du virus respiratoire syncytial humain à l'aide d'un sérum convalescent et d'un anticorps monoclonal neutralisant l'infectivité:

1. Sérum convalescent identifiant les cinq protéines structurales du virus.
2. Localisation d'un épitope de neutralisation sur la glycoprotéine F1 à l'aide d'un anticorps monoclonal.
3. Sérum négatif.
4. Marqueurs: phosphorylase B (92 500), albumine sérique bovine (66 200), ovalbumine (45 000), anhydrase carbonique (31 000), inhibiteur de trypsine (21 500) et lysozyme (14 400).

4. RÉFÉRENCES

- Alric, M., Cheyvialle, D. et Renaud, M. 1986. Cross-blot and cross-dot system: A high-performance system for the detection of antigen-antibody complexes on nitrocellulose. *Anal. Biochem.* 155: 328-334.
- Beisiegel, U. 1986. Protein blotting. *Electrophoresis* 7: 1-18.
- Brada, D. et Roth, J. 1984. "Golden blot"-Detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein A-gold complexes. *Anal. Biochem.* 142: 79-83.
- Burnette, W.N.. 1981. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- Gibson, W. 1981. Protease-facilitated transfer of high molecular weight proteins during electro-transfer to nitrocellulose. *Anal. Biochem.* 118: 1-3.
- Gooderham, K.. 1984. Protein blotting, dans *Methods in molecular biology 1: Proteins*, 165-178. J.M. Walker (Edit), Humana Press, N.J., 365 pages.
- Heberling, R.L. et Kalter, S.S. 1986. Rapid dot-immunobinding assay on nitrocellulose for viral antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 23: 109-113.
- Hsu, Y.H. 1984. Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 142: 221-225.
- Ramirez, P., Bonilla, J.A., Moreno, E. et Leon, P. 1983. Electrophoretic transfer of viral proteins to nitrocellulose sheets and detection with peroxidase-bound lectins and protein A. *J. Immunol. Meth.* 62: 15-22.
- Renart, J., Reiser, J. et Stark, G.R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3116-3120.
- Sternberg, J. et Jeppesen, P. 1983. Dot-blotting: A novel screening assay for antibodies in hybridoma cultures. *J. Immunol. Meth.* 64: 29-44.
- Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. et Simmons, A.R. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Meth. Enzymology* 92: 377-391.

CARTOGRAPHIE PEPTIDIQUE

Michel Trudel et Pierre Payment

1. INTRODUCTION

Le développement des méthodes de séparation des protéines par électrophorèse a mené, entre autres, à la cartographie peptidique pour caractériser les protéines et identifier les sites actifs des enzymes ou la localisation des déterminants antigéniques. La méthode *in situ* fut développée par Cleveland *et al.* (1977). Elle consiste à cliver chimiquement avec le bromure de cyanogène (Lonsdale-Eccles *et al.* 1981) ou le N-chlorosuccinimide (NCS) (Lischwe et Ochs 1982), ou à cliver avec des endopeptidases telles que la protéase V8 (Drapeau *et al.* 1972), l'endoprotéinase arginine C (Levy *et al.* 1970), la pepsine (Fruton 1976) ou la papaïne (Berger et Schechter 1970) les protéines préalablement séparées par électrophorèse en gels de polyacrylamide. L'hydrolyse ou la digestion se fait directement dans le gel avant la réélectrophorèse dans le cas du CNBr et du NCS, et durant celle-ci avec les enzymes protéolytiques (Tableau 1). En anglais, on désigne cette technique sous le nom de "peptide mapping" ou "finger-printing". Les fragments générés sont séparés par électrophorèse et révélés au bleu de Coomassie (Cleveland *et al.*

1977), à l'argent (Merrill *et al.* 1980), par autoradiographie (Fairbanks *et al.* 1965), par fluorographie (Bonner et Laskey 1974) ou par immunoempreinte (Towbin *et al.* 1979, Burnette 1981, Tsang *et al.* 1983) après transfert électrophorétique sur membrane de nitrocellulose. Les utilisateurs éventuels sont invités à consulter les revues de James (1978), Allen (1981), Gooderham (1984) ainsi que de Salinovich et Montelaro (1986a, b).

2. SÉPARATION DES PROTÉINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Méthode

1. L'électrophorèse de protéines virales en plaques verticales, s'effectue selon la méthode de Laemmli (1970) en gel de polyacrylamide 7.5%. Les différentes solutions et tampons sont décrits dans le Tableau 2.
2. Un peigne plein est utilisé pour le puits d'échantillon afin que la bande de protéine séparée soit continue et occupe toute la largeur du gel.

3. Après l'électrophorèse, une mince bande de gel est prélevée de chaque côté de la plaque et sert à l'identification des protéines, soit par coloration au bleu de Coomassie, à l'argent ou encore à l'identification par immunopempreinte.
4. Une fois la protéine d'intérêt repérée, la bande non colorée est localisée par alignement des bandes du gel et est découpée de la plaque non colorée. Des fragments d'environ 1 cm de cette bande serviront pour la cartographie avec les différents produits chimiques ou enzymes. Chaque fragment devrait contenir environ 25 µg de la protéine.

3. CLIVAGE CHIMIQUE

3.1. BROMURE DE CYANOGENÈ (CNBr)

1. Équilibrer un fragment de gel, contenant la protéine désirée dans l'acide formique 70% (v/v): deux bains de 10 min dans 4.5 mL seront suffisants.
2. Faire réagir des fragments de gel dans un tube vissé contenant 4.5 mL d'acide formique 70% et du CNBr à différentes concentrations: en général, 5 mg/mL donne de bons résultats. La digestion s'effectue à 37°C, durant 16 h, à l'abri de la lumière. Préparer aussi un témoin gel/acide acétique sans CNBr.
3. Décanter la solution de CNBr et laver les gels trois fois dans l'acide acétique 10% (v/v), durant 10 min, sous agitation constante.
4. Rééquilibrer les fragments de gel en effectuant 4 lavages de 10 min dans

4.5 mL de tampon Tris-HCl (0.5 M, 0.04% SDS, pH 6.8).

5. Placer chaque fragment broyé dans un puits d'un gel de 15 à 20% (p/v) d'acrylamide ou encore sur un gel de 15% et séparer par électrophorèse.

Note: Le CNBr doit être manipulé sous une hotte chimique. Il doit aussi être désactivé par l'addition d'une concentration équimolaire d'hypochlorite pendant 24 h avant d'être jeté.

3.2. N-CHLOROSUCCINIMIDE (NCS)

1. Laver le fragment de gel dans deux bains de 10 min d'eau distillée (25 mL).
2. Équilibrer le fragment de gel dans une solution urée-eau-acide acétique (urée 1 g, H₂O 1 mL, acide acétique glacial 1 mL). Effectuer deux lavages de 10 min dans 10 mL de solution.
3. Effectuer le clivage en ajoutant le NCS 0.15 M dans 10 mL d'une solution urée/ H₂O/ acide acétique et en incubant durant 30 min à la température de la pièce.
4. Effectuer deux lavages avec 25 mL d'eau distillée.
5. Équilibrer le gel (trois bains de 50 min) dans 10 mL de tampon Tris (Tris-HCl 0.625 M; 0.1% (p/v) SDS, pH 6.8).
6. Placer chaque fragment de gel broyé dans un puits d'un gradient de gel de 15 à 20% d'acrylamide ou encore un gel de 15% et séparer par électrophorèse.

3.3. CLIVAGE ENZYMATIQUE

Le clivage ou digestion enzymatique comporte trois étapes:

- le contact de la protéine et de l'enzyme dans le gel de regroupement
- un arrêt de 30 min pour favoriser la digestion
- la séparation des peptides dans le gel de séparation

1. Placer chaque fragment de gel broyé resuspendu dans 50–100 µL de tampon Tris-HCl pH 6.8 (0.125 M, 0.1% SDS, 10% glycérol) dans un puits d'un gel de regroupement (voir Solutions au Tableau 3, gel riboflavine) à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 18G 1–1/2".
2. Ajouter au dessus du gel, dans chaque puits, 25 µL d'enzyme à la concentration appropriée (5 à 20 µg), diluée dans du tampon Tris-HCl pH 6.8 (0.125 M, 0.1% SDS, 20% glycérol, 0.001% bleu de bromophénol).
3. Effectuer l'électrophorèse avec un tampon Tris/ glycine/SDS à un courant constant de 25 mA et voltage continu (devrait commencer à 50 V). Cette étape doit se faire très lentement (environ 2 h) pour favoriser le contact entre l'enzyme et la protéine.
4. Arrêter le courant après 30 min, lorsque le bleu de bromophénol arrive à l'interface du gel de regroupement et du gel de séparation, encore une fois pour favoriser la digestion.
5. Continuer l'électrophorèse pour la séparation des peptides dans un gra-

dient de gel de 15–20%, à un courant se situant entre 50 à 70 mA, pendant environ 3 h.

6. Prélever le gel et le fixer pour la coloration au bleu de Coomassie ou à l'argent, ou transférer sur papier de nitrocellulose pour détection par immunoempreinte. Le transfert électrophorétique se fait à l'aide d'un appareil Trans-Blot (Bio-Rad; voir section Immunoempreinte) pendant environ 1 h à 50 V.

La Figure 1 illustre les résultats obtenus.

4. DISCUSSION

Certains points méritent d'être examinés afin d'obtenir une meilleure séparation des peptides digérés. L'utilisation d'un gel de séparation en gradient de 15 à 20% en remplacement d'un gel de 15% donne une meilleure séparation des fragments de faible masse moléculaire.

La concentration d'enzyme à utiliser doit être établie en fonction de l'activité spécifique de l'enzyme et du mode de détection des peptides générés. Certains auteurs recommandent d'utiliser des échantillons de 0.05 µg. Nous préférons utiliser des échantillons plus concentrés, soit d'environ 0.1 à 5 µg: pour identifier des peptides conservant leurs déterminants antigéniques, nous utilisons 25 µg ou plus car la sensibilité en immunoempreinte est faible. Certains laboratoires utilisent des marqueurs moléculaires inclus dans le gel pour identifier la masse des peptides digérés parce que les protéines libres migreraient plus rapidement causant ainsi une surévaluation de la masse moléculaire. En travaillant avec les fragments de gel broyés, nous n'avons pas noté cette surévaluation et nous utili-

sons directement les marqueurs de masse moléculaire. Nous utilisons les marqueurs de Pharmacia (Uppsala, Suède): myoglobine 17 200 Da, myoglobine I+II 14 600 Da, myoglobine I 8 240 Da, myoglobine II 6 380 Da, myoglobine III

2560 Da. Les protéines isolées en gel peuvent être préparées d'avance pour la digestion. Elles sont entreposées dans des sacs hermétiques et conservées à -20°C pendant plusieurs mois.

Tableau 1
Identification des sites de clivage des protéines

A) Digestion chimique

Produit	Acide aminé cible	Références
CNBr (bromure de cyanogène)	méthionine	Gross, 1967 Londsdale-Eccles <i>et al</i> , 1981
NTCB (acide 2-nitro-5-thiocyanobenzoïque)	cystéine	Stark, 1977
NCS (N-chlorosuccinimide)	tryptophane	Lischwe et Ochs 1982

B) Digestion enzymatique

Enzyme	Acide aminé cible	Références
Protéase V8 <i>S. aureus</i>	glutamine	Drapeau <i>et al</i> , 1972
Endopeptidase	proline	Koida et Water, 1976 (proline)
Trypsine	arginine, lysine	Butler et Hartley, 1972 Patthy et Smith, 1975
Clostripane	arginine	Mitchell et Harrington, 1968
Protéases A et D (submaxillaire souris)	arginine	Schenkein <i>et al</i> , 1977
Chymotrypsine	tryptophane, tyrosine, phénylalanine, leucine, et méthionine	Wilcox, 1970 Walasek et Margoliash, 1977
Pepsine	phénylalanine-X (ac. am. hydrophobe)	Fruton, 1974 Lumsden et Coggins, 1978
Thermolysine	leucine, valine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane	Heinrikson, 1977
Papaïne	phénylalanine-X-Y	Berger et Schechter, 1970

Tableau 2
Solutions pour électrophorèse

<i>Tampon d'électrophorèse</i>	<i>Solution A</i>	<i>Solution C</i>
Tris-HCl 12 g	Tris-HCl 18.3 g	Acrylamide 30 g
Glycine 57.6 g	Temed 115 µL	Bis-acrylamide 0.8 g
SDS 4 g	SDS 0.4 g	H ₂ O 100 mL
H ₂ O à 4 L	H ₂ O 50 mL	
Ajuster pH 8.4	Ajuster pH 8.4	

Tableau 3
Préparation des gels

Produit/Solution	Gel de regroupement	Gel de séparation	
		15%	20%
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	5.0 mL	2 mL	2 mL
SDS 10% (p/v)	0.2 mL	–	–
H ₂ O	9.8 mL	1.9 mL	0.3 mL
Solution A	–	2 mL	2 mL
Solution C	2.5 mL	8.1 mL	10.7 mL
Ammonium persulfate (0.28%)	–	4 mL	4 mL
Riboflavine 0.004% (p/v)	2.5 mL	–	–
TEMED	20 µL	–	–

Note: Le persulfate d'ammonium peut interférer avec certains enzymes: nous utilisons donc la riboflavine pour le gel de regroupement. Ceux qui utilisent le persulfate d'ammonium effectuent une pré-électrophorèse. Nous trouvons suffisant de ne modifier que le gel de regroupement. On doit toujours utiliser une solution fraîche d'ammonium persulfate.

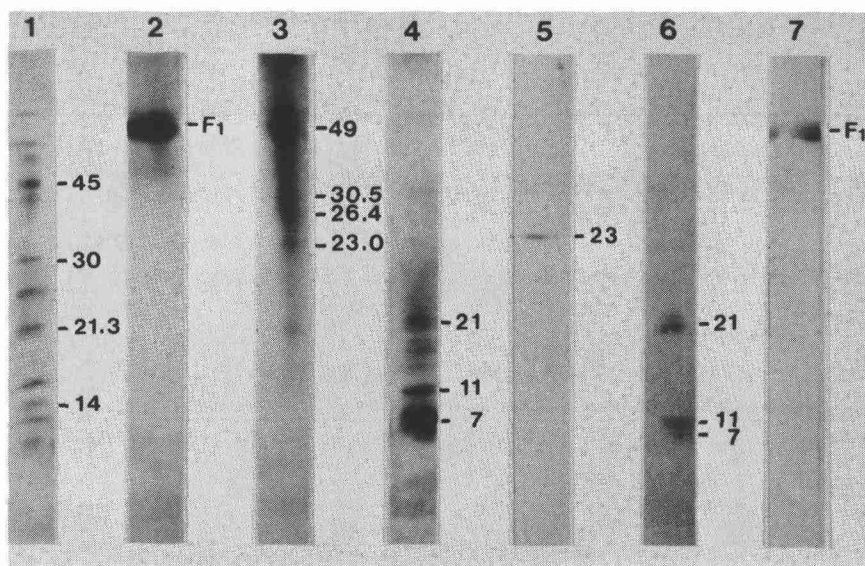


Figure 1

Coloration à l'argent du profil peptidique de la protéine F1 du virus respiratoire syncytial humain (masse moléculaire 49 kDa).

1 et 6. Marqueur de masse moléculaire.

2 et 7 Protéine F1 isolée à partir d'un gel de polyacrylamide de 10%.

3. Digestion chimique de F1 avec le N-chloro-succinimide (NCS) qui clive les résidus tryptophane.

4. Digestion enzymatique de F1 avec la protéase V8 qui clive les résidus glutamine.

5. Immunoempreinte de F1 clivée au NCS et révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal neutralisant (site sur le fragment de 23 kDa).

6. Immunoempreinte de F1 clivée par V8 et révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal neutralisant (sites sur les fragments de 21, 11 et 27 kDa).

7. Immunoempreinte de F1.

5. RÉFÉRENCES

- Allen, G. 1981. Sequencing of proteins and peptides. Dans *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. T.S. Work et R.H. Burdon (Édit.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 327 pages.
- Berger, A. et Schechter, I. 1970. Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B* 257: 249-264.
- Bonner, W.M et Laskey, R.A. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-88.
- Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- Butler, P.J.G. et Hartley, B.S. 1972. Maleylation of amino groups. *Meth. Enzymol.* 25: 191-199.
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. et Laemmli, U.K. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252: 1102-1106.
- Drapeau, G.R., Boily, Y. et Houmar, J. 1972. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 247: 6720-6726.
- Fairbanks, G., Levinthal, C. et Reeder, R.H. 1965. Analysis of C¹⁴-labelled proteins by disc electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 20: 393-399.
- Fruton, J.S.. 1976. The mechanism of the catalytic action of pepsin and related acid proteinase. *Adv. Enzymol.* 44: 1 - 36.
- Gooderham, K. 1984. In situ peptide mapping of proteins following polyacrylamide gel electrophoresis. Dans *Methods in molecular biology* 1. Proteins. J.M. Walker (Édit.), Human a Press, Clifton, New Jersey, 365 pages.
- Gross, E. 1967. The cyanogen bromide reaction. *Meth Enzymol.* 11: 238-255.
- Heinrikson, R.L. 1977. Application of thermolysin in protein structural analysis. *Meths Enzymol.* 47: 175-188.
- James, G.T. 1980. Peptide mapping of proteins. *Meths. Biochem. Anal.* 26: 165-200.
- Koida, M. et Water, R. 1976. Post-proline cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* 251: 7593-7599.
- Laemmli, U.K.. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
- Levy, M., Fishman, L. et Schenskein, I. 1970. Mouse submaxillary gland protease. *Meth. Enzymol.* 19: 672-681.
- Lischwe, M.A. et Ochs, D. 1982. A new method for partial peptide mapping using N-chlorosuccinimide/urea and peptide silver staining in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 127: 453-457.

- Londsdales-Eccles, J.D., Lynley, A.M. et Dale, B.A. 1981. Cyanogen bromide cleavage of proteins in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Biochem. J.* 197: 591-597.
- Lumsden, J. et Coggins, J.R. 1978. The subunit structure of the aromatic multienzyme complex of *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 169: 441-444.
- Merrill, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. et Ebert, M.H. 1980. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211: 1437-1438.
- Mitchell, W.M. et Harrington, W.F. 1968. Purification and properties of clostridiopeptidase B (clostripain). *J. Biol. Chem.* 243: 4683-4692.
- Patthy, L. et Smith, E.L. 1975. Reversible modification of arginine residues. *J. Biol. Chem.* 250: 557-564.
- Salinovich, O et Montelaro, R.C. 1986a. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156: 341-347.
- Salinovich, O. et Montelaro, R.C. 1986b. Comparison of glycoproteins by two-dimensional mapping of glycosylated peptides. *Anal. Biochem.* 157: 19-27.
- Schenkein, I., Levy, M., Franklin, E.C. et Frangione, B. 1977. Proteolytic enzymes from the mouse submaxillary gland. *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 64-70.
- Stark, G.R. 1977. Cleavage at cysteine after cyanylation. *Meth. Enzymol.* 47: 129-132.
- Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. et Simmons, A.R. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 92: 377-391.
- Wilcox, P.E., 1970. Chymotrypsinogens-Chymotrypsins. *Meth. Enzymol.* 19: 64-108.
- Wolasek, O.F. et Margoliash, F. 1977. Transmission of the cytochrome C structural gene in horse-donkey crosses. *J. Biol. Chem.* 252: 830-834.

ÉLECTROPHORÈSE DE MOLECULES D'ADN EN GEL D'AGAROSE

Claude Hamelin

1. ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse en gel d'agarose est l'une des techniques les plus couramment utilisées en recherche sur les acides nucléiques. La séparation de molécules d'ADN selon la taille, le degré de double-hélicité et de superhélicité, la présence de courbures ou de structures en épingle à cheveux, la concentration en protéines liées est réalisée de façon avantageuse dans des gels en plaque (de types submergés ou pontés) pourvus de nombreux puits. Les gels de taille importante offrent la haute résolution des séparations sur longue distance qui est requise pour l'analyse de mélanges complexe d'ADN. Des gels d'agarose miniatures sont toutefois utilisés lorsque vitesse, résolution et sensibilité sont essentielles aux expériences effectuées.

Les appareils à électrophorèse fabriqués selon des plans connus ou achetés de différentes compagnies, ne peuvent habituellement contenir qu'un seul gel de taille plus ou moins grande entraînant souvent une pénurie d'unités et/ou de générateurs de courant dans le labora-

toire. L'utilisation d'un appareil de construction simple et peu coûteux, permettant la séparation de nombreux échantillons d'ADN dans de multiples gels de tailles différentes, est décrite ici.

1.1. APPAREIL À ÉLECTROPHORÈSE

L'unité pour électrophorèse (Figure 1) est faite de Plexiglas transparent et comporte deux bassins (30 x 7 x 4.5 cm) contenant le tampon de migration et abritant les électrodes. Les électrodes faites de fil de platine No 28 (Johnson Matthey Ltée) sont attachées à des pièces de Plexiglas (ou de Teflon comme dans la Figure 2) mesurant 29 x 6 x 0.2 cm. Trois petits blocs faits des mêmes matériaux (l'un adossé au support à électrode et les deux autres de chaque côté du réservoir à tampon) sont utilisés pour maintenir l'électrode dans la position verticale. Les gels d'agarose, alignés sur la paroi interne des réservoirs à tampon se faisant face et couverts à chaque extrémité par des ponts à deux épaisseurs de Chiffons-J tout-usages ou de pansements Nu-Gauze (Johnson & Johnson), assurent le passage

du courant entre les deux électrodes, reliées à un générateur de puissance (Bio-Rad, Buchler, Hoefer, Pharmacia).

1.2. GELS D'AGAROSE EN PLAQUE

1. Une plaque de verre est placée horizontalement sur une plate-forme à niveau faite d'une pièce de Plexiglas mesurant 20 x 20 x 0.7 cm supportée par trois vis (deux du côté avant et une autre à l'arrière). Un peigne pour former les puits (maintenu à 2 mm au-dessus de la surface vitrée à l'aide d'une pince à trois griffes) est aligné parallèlement au sommet de la plaque de verre.
2. De l'agarose (pour électrophorèse) est préparé à une concentration finale de 0.5 à 1.5% en tampon Tris-acétate, Tris-phosphate ou Tris-borate.
3. La solution d'agarose fondu à la chaleur est refroidie à environ 50°C puis versée sur la plaque de verre à l'horizontale, en une ou deux étapes successives.
4. Après durcissement du gel, le peigne est enlevé et les échantillons (20 µL) sont déposés directement dans les puits pour électrophorèse.
5. Les cavités sont remplies de tampon pour éliminer les bulles d'air, et les gels sont couverts d'un film de plastique (Handiwrap, Dow Chemicals) pour prévenir leur assèchement au cours de l'électrophorèse.

Note: Pour obtenir des minigels d'environ 0.4 cm d'épaisseur verser 30 mL d'agarose sur des plaques de 10 x 7 cm (Bio-Rad). Les échantillons d'ADN sont légèrement réduits lorsque des gels miniatures sont utilisés.

Les grands gels (deux par unité d'électrophorèse, voir Figure 1) et les minigels (quatre par unité, voir Figure 2) sont utilisés à 50 V pendant 16 h et à 150 V pendant 90 min, respectivement, pour des résultats de qualité optimale (Figure 3). Le système assure des taux de migration équivalents dans tous les gels, grands ou petits. Un plus grand nombre d'échantillons peuvent être analysés dans une même période de temps en faisant l'électrophorèse dans des gels placés en série. La Figure 4 illustre comment deux paires de réservoirs à tampon peuvent être utilisés avec 50% plus de gels qu'à l'ordinaire, tout en ne monopolisant qu'une seule sortie du générateur de courant pendant l'électrophorèse. Les gels situés dans la partie médiane du "train" sont soutenus par des réservoirs sans électrode. Le voltage est ajusté selon le nombre de paires de gels utilisés en même temps. La Figure 5 illustre les résultats obtenus.

1.3. DISCUSSION

L'électrophorèse en gel d'agarose est devenue un outil indispensable à la cartographie physique et à l'analyse de génomes viraux, ainsi qu'au diagnostic rapide d'infections virales par la technologie des endonucléases de restriction. Deux types d'appareils à électrophorèse sont couramment utilisés pour la séparation de multiples échantillons en agarose: ceux qui emploient avec des gels verticaux et ceux qui utilisent des gels horizontaux. Des bandes d'ADN très minces sont normalement obtenues avec les gels verticaux, mais certains problèmes liés à un manque d'adhérence de l'agarose sur les plaques de verre font que leurs équivalents à l'horizontale sont plus pratiques dans une variété d'applications.

L'on utilise ici un appareil à électrophorèse de construction facile qui permet la séparation de multiples échantillons d'ADN dans plusieurs gels à l'aide d'une seule source de tension. Cet appareil assure des taux de migration équivalents dans tous les gels pour comparer la mobilité relative des bandes d'ADN, et les résultats sont très semblables à ceux obtenus avec des systèmes de fabrication plus coûteuse ou relativement chers à l'achat. Jusqu'à présent, le système a été efficacement utilisé pour tester l'activité endonucléasique dans les fractions éluées de colonnes à chromatographie et dans des échantillons d'enzymes de restriction, de même que dans la préparation et l'analyse de fragments de restriction, la cartographie physique et l'hybridation moléculaire.

Un autre avantage marqué de ce système est sa polyvalence: (1) des gels dont la taille varie entre 2.5×7.5 cm et 28×30 cm sont couramment utilisés dans ce laboratoire; (2) la migration simultanée de molécules d'ADN dans des gels à haute ou basse concentration est également possible. Pratiques, économiques et éprouvés, les gels d'agarose miniatures sont d'utilisation courante pour sélectionner des clones de bactéries recombinantes, pour suivre une digestion d'ADN avec des endonucléases de restriction, pour surveiller une réaction de ligation ou un marquage des extrémités, et autres applications (Hamelin *et al.* 1986).

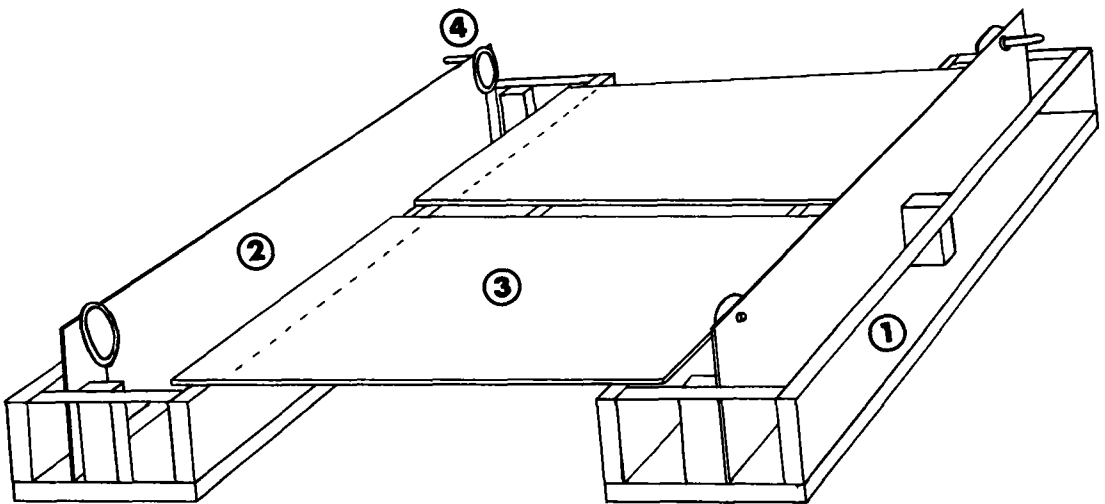


Figure 1

Schéma de l'appareil à électrophorèse utilisé pour gels d'agarose en plaque à l'horizontale: (1) chambre à tampon, (2) électrode amovible, (3) gel d'agarose, (4) prise menant au générateur de courant.

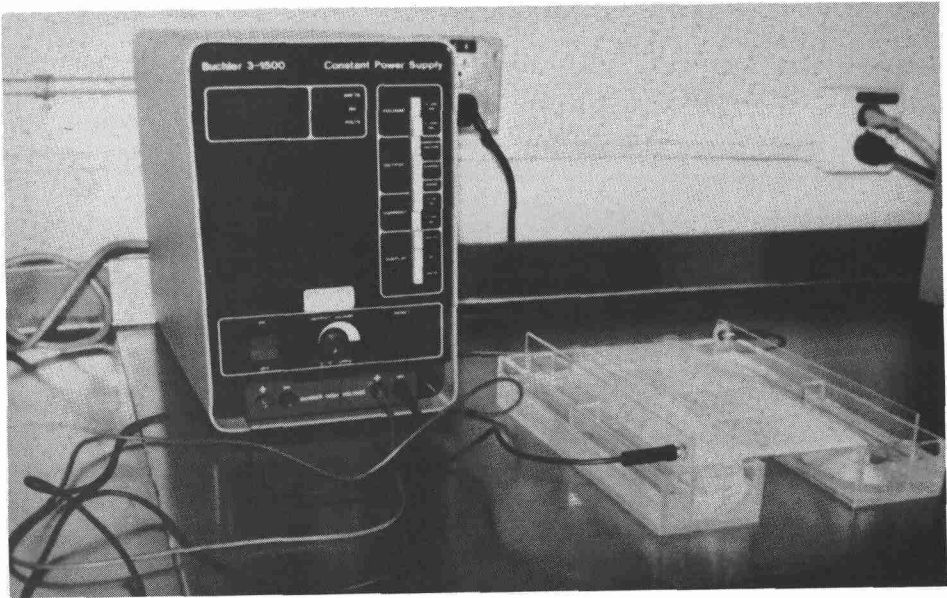


Figure 2

Gels d'agarose miniatures en position pour l'électrophorèse. Quatre minigels sont alignés sur le côté interne des chambres à tampon se faisant face. Une seule sortie du générateur de courant est utilisée pour tous les gels.

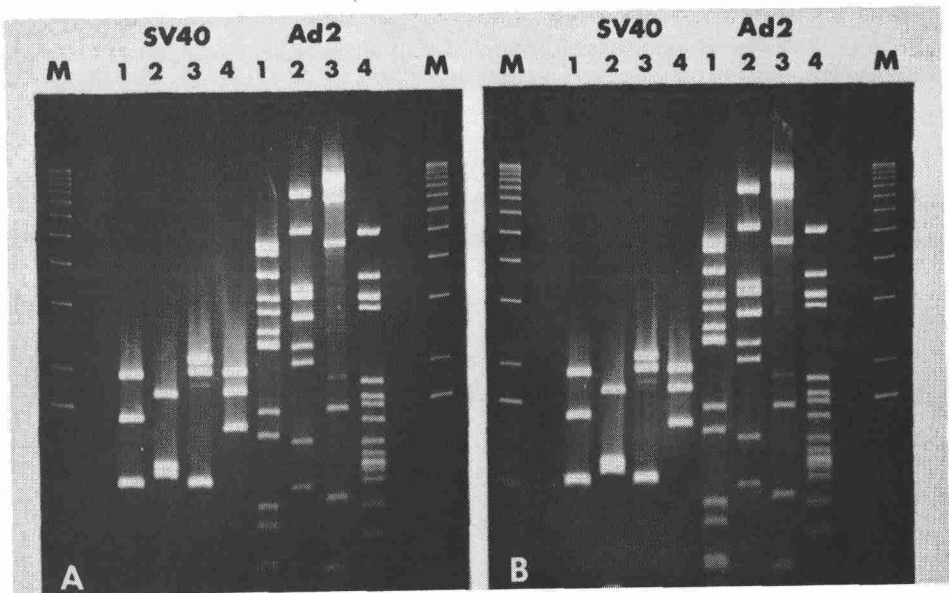


Figure 3

Fragments de restriction obtenus après digestion de l'ADN du virus simien 40 (SV40) et de l'adénovirus humain de type 2 (Ad2) avec les enzymes (1) *Hinc* II, (2) *Hind* III, (3) *Hpa* I et (4) *Pvu* II. L'électrophorèse des fragments d'ADN en agarose a été réalisée dans deux gels de grande taille tel qu'illustré dans la Figure 1. Les taux de migration sont équivalents pour les deux gels. L'échelle de 1 kilopaire de bases obtenue de GIBCO/BRL (M) a été utilisée comme mesure de taille.

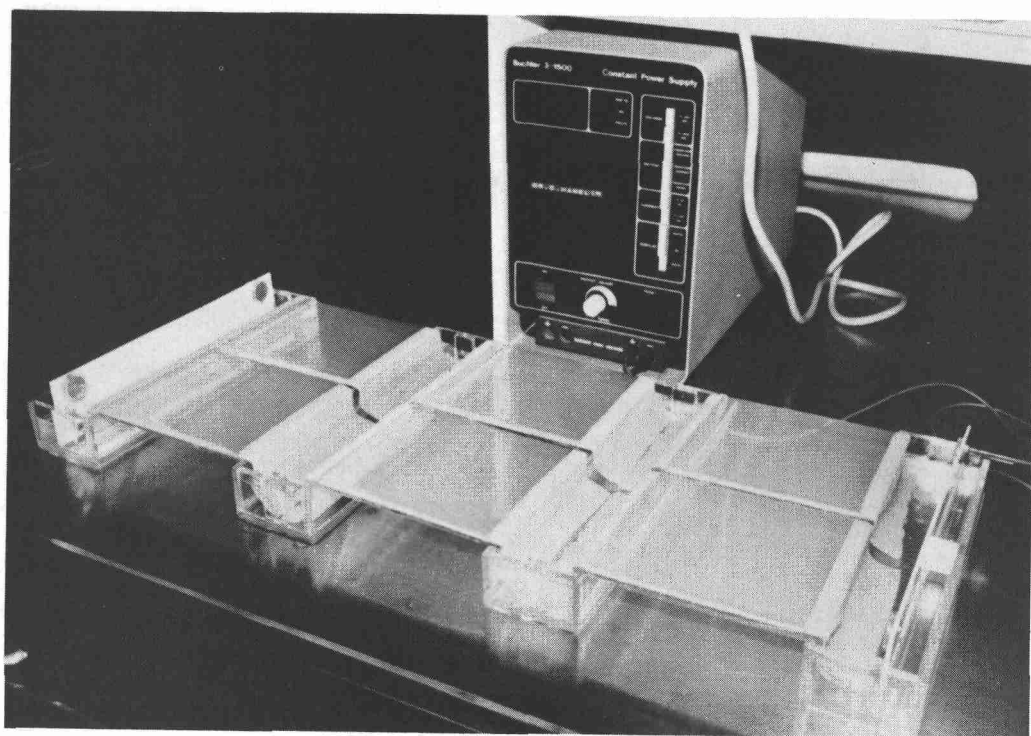


Figure 4

Six gels de grande taille utilisés en série. Des chambres à tampon sans électrodes soutiennent les gels dans la partie médiane du système à électrophorèse désigné sous le nom de "Chattanooga". Jusqu'à 20 gels ont été utilisés en série en employant plusieurs contenants en Plexiglas mais un seul générateur de courant.

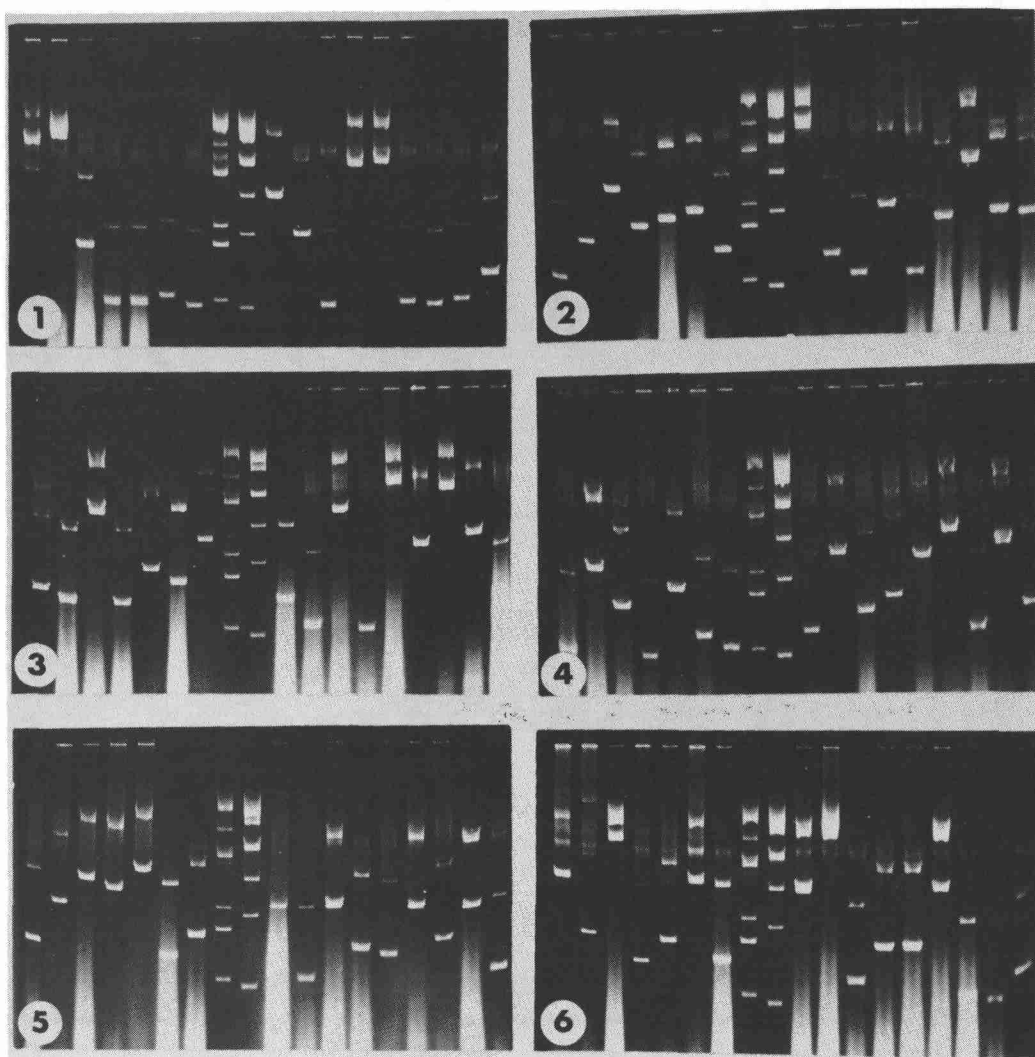


Figure 5

Analyse électrophorétique de plasmides pAT153 recombinants portant des fragments *Hind* III du cytomégalo­virus humain. Au total, 108 échantillons d'ADN ont simultanément été soumis à une électrophorèse de 4 h à 450 V dans six gels différents tel que montré dans la Figure 5. La bande d'ADN observée dans la partie inférieure des gels (colonne 9) contient pAT153 sans insertion. Tous les autres plasmides migrent plus lentement que le vecteur intact en agarose et contiennent donc au moins un fragment *Hind* III de l'ADN du cytomégalo­virus humain. Des marqueurs de taille migrant dans deux colonnes séparées au milieu de chaque gel mesurent respectivement 3.6, 3.9, 5.0, 8.9, 12.0 et 25.0 kilobases.



Culture cellulaire infectée avec effet cytopathique maximal

Obtenir un culot cellulaire par centrifugation à basse vitesse et resuspendre dans 1 mL

A 0.5 mL de cellules ajouter 40 μ L de pronase (2 mg/mL) et 40 μ L de SDS (10%) Incuber à 37°C

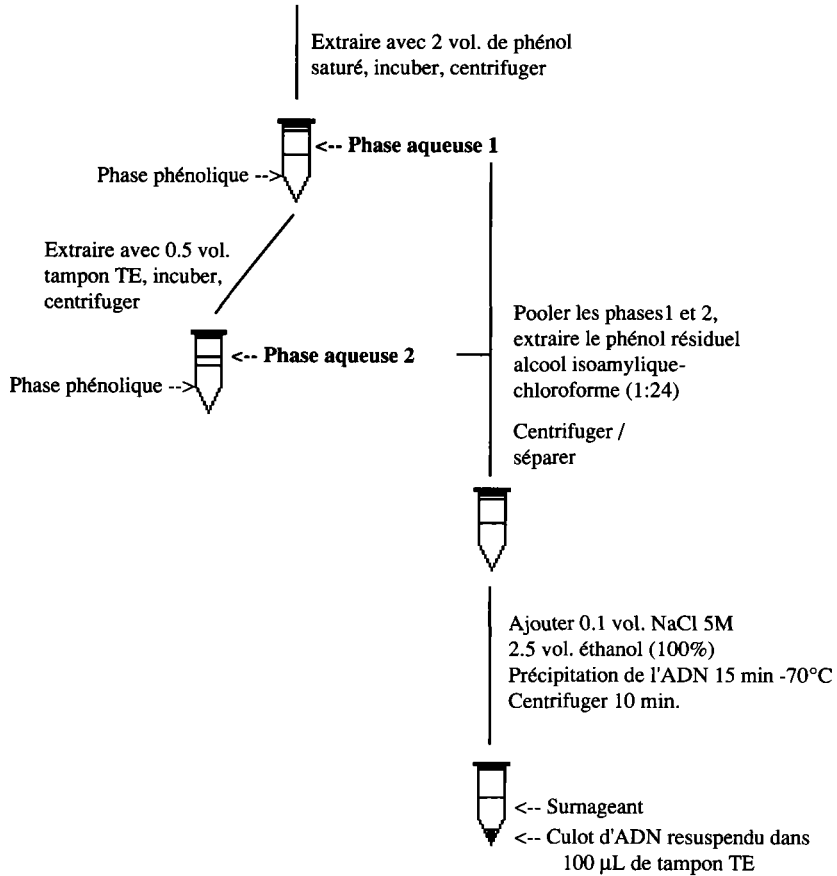


Figure 6

Représentation schématique des étapes requises pour l'extraction de l'ADN viral

2. GÉNOTYPAGE

Les endonucléases de restriction clivent l'ADN double-brin en des sites de reconnaissance comprenant 4 à 6 nucléotides ordonnés de façon spécifique. L'électrophorèse des fragments oligonucléotidiques en agarose donne des patrons de digestion hautement spécifiques pour les souches et espèces virales. La méthode relativement simple décrite dans cette section peut servir au génotypage d'une grande variété de virus à ADN. L'analyse de souches d'herpès simplex de types 1 et 2 est donnée ici comme exemple.

2.1. INFECTION DES CELLULES

1. Cultiver des cellules Vero dans des flacons de 25 cm² (2.5 x 10⁶ cellules), dans un milieu (10 mL) constitué de parties égales de Milieu Minimum Essentiel (MEM) (base saline de Earle) et de Milieu 199 (base saline de Hank) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 50 µg/mL de gentamicine.
2. Infecter les cellules confluentes avec 1 mL de virus pendant 1 h à 37°C. Ajouter 9 mL de milieu contenant 2% SVF, et incuber la culture à 37°C pendant 24 h ou jusqu'à ce que plus de 90% des cellules soient arrondies, plus grandes et réfringentes lors de l'observation au microscope.
3. Disperser les cellules infectées à l'aide d'une solution de trypsine et les recueillir dans 0.8 mL de saline tamponnée au phosphate (PBS). Répartir la suspension cellulaire à raison de 0.4 mL/tube dans des tubes coniques en polypropylène de 1.5 mL (Eppendorf) et sont congeler à -70°C ou utiliser immédiatement pour la préparation d'ADN viral. Les cellules infectées peuvent être gardées

plusieurs semaines à -70°C sans perte d'ADN.

2.2. PRÉPARATION DE L'ADN

1. Extraire l'ADN du virus herpès simplex (HSV) des cellules infectées par traitement avec 1% de sodium dodécyl sulfate (SDS) et 0.2 mg/mL de pronase exempte de nucléases (Calbiochem) pendant 30 min à 37°C (Figure 6).
2. Ajouter deux volumes de phénol bidistillé tamponné avec 1/4 volume de tampon Tris HCl (10 mM, pH 7.4 et 1 mM EDTA) au tube puis mélanger doucement au Vortex.
3. Après une incubation de 10 min dans la glace, centrifuger les cellules traitées au phénol à 12 800 x g pour 1 min à la température ambiante dans une centrifugeuse Eppendorf modèle 5412.
4. Prélever la phase aqueuse (couche supérieure) en évitant de toucher au matériel blanchâtre et floconneux à l'interface. Déposer dans un autre tube à centrifugation d'une capacité de 1.5 mL et récupérer l'ADN encore présent dans la phase phénolique par l'addition d'un demi-volume de tampon TE, mélanger et centrifuger le tout dans les mêmes conditions.
5. Regrouper les deux phases aqueuses et centrifuger pour éliminer le phénol résiduel (normalement une petite goutte au fond du tube à centrifugation).
6. Extraire la solution contenant l'ADN trois ou quatre fois avec un même volume de chloroforme et d'alcool isoamylique (24:1) ou, plus facilement, avec un mélange de phénol et de chloroforme (1:1) et plusieurs fois

avec du chloroforme seulement. À la fin de cette opération, aucun flocon blanchâtre ne devrait être observé à l'interface après centrifugation.

7. Transférer la phase supérieure dans un autre tube, et ajouter 0.1 volume de NaCl 5M et 2.5 volumes d'éthanol 100%. Précipiter les acides nucléiques pendant 15 min à -70°C (ou dans un bain contenant de l'éthanol et de la glace sèche) et centrifuger pendant 10 min.
8. Laver le culot final (environ la taille d'une tête d'épingle) avec de l'éthanol 75%. Sécher, puis dissoudre dans 100 μL de tampon TE. À cette étape, la solution d'ADN peut être gardée à 4°C ou congelée à -70°C pour analyse ultérieure.

2.3. CLIVAGE ET ÉLECTROPHORÈSE

1. Pour l'analyse de restriction avec les endonucléases, 2 à 15 μL d'ADN en solution, mettre en présence de 5 à 10 unités d'enzymes de restriction (Boehringer Mannheim, GIBCO/BRL, New England Biolabs, Pharmacia) dans un mélange réactionnel totalisant 25 μL . Les conditions de tampon et de température sont celles recommandées par les producteurs d'enzymes.
2. Incuber 1 à 2 h à la température requise puis, arrêter la réaction par l'addition de 3 μL d'une solution contenant 5% de SDS, 25% de saccharose et 0.05% de bromophénol.
3. Charger l'ADN digéré sur un gel d'agarose 1% préparé dans 90 mL de tampon TBE (Tris base 0.1 M, acide borique 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 8.3).

4. Effectuer l'électrophorèse des produits de digestion à 50 V pendant 16 h.

5. Après l'électrophorèse, colorer les gels avec 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromure d'éthidium pendant 30 min. Mettre en évidence les bandes d'ADN dans le gel par illumination directe avec des rayons ultraviolets courts (transilluminateur modèle C-61, Ultraviolet Products) et photographier avec un film Polaroid Type 107 au travers d'un filtre rouge Kodak Wratten 23A.

2.4. RÉSULTATS

Les résultats de la Figure 7 illustrent comment des souches des virus HSV-1 et HSV-2 peuvent être identifiées de façon non ambiguë en se basant sur des différences spécifiques et claires entre marqueurs d'ADN. La détection de changements mineurs dans les patrons de digestion d'isolats viraux des deux types est également possible après digestion des molécules d'ADN avec différentes endonucléases de restriction (Figure 3). En utilisant la même méthode et les mêmes réactifs, il est également possible d'identifier d'autres virus à ADN (Figure 9). Dans chacun des cas, un patron d'ADN typique est obtenu, lequel peut être utilisé pour distinguer des espèces virales rapprochées ou distinctes.

3. DISCUSSION

De l'ADN viral assez pur et en quantité suffisante pour permettre de multiples digestions avec des endonucléases de restriction a jusqu'à présent été obtenu de cellules aviaires, bovines, canines, humaines, simiennes et murines infectées par différentes espèces d'adénovirus et d'herpèsvirus. Une contamination excessive des préparations d'ADN viral avec de l'ADN cellulaire (traînée blanchâtre ou

bandes pâles apparaissant à intervalles réguliers dans l'arrière-plan) ou avec de l'ARN (matériel à migration rapide à la base du gel) est prévenue en utilisant pour l'infection, des cellules transformées (e.g., CMT-93, MDCK, Vero, etc.) obtenues de l'American Type Culture Collection plutôt que des cellules en culture primaire. Seulement des cultures jeunes (en pleine croissance) sont infectées avec le virus. Isolats cliniques et souches du champ sont propagés une ou deux fois sur cellules permissives avant d'être utilisés et ce, afin d'augmenter le titre initial du virus. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des virus produisant des effets cytopathiques 4+ en moins de 5 jours. L'incubation à 37°C dure tant que les cellules infectées restent attachées à la paroi de plastique. Il faut, en d'autres termes, essayer d'obtenir le plus de copies possible du génome viral sans toutefois détruire la cellule et briser son ADN. Dans ce contexte, l'utilisation du Vortex doit être limitée au strict minimum pendant l'extraction de l'ADN.

La quantité d'ADN viral récupéré d'un seul flacon de 25 cm² d'une culture de cellules infectées dépasse, dans ces conditions, ce qui est requis pour l'identification certaine et le typage par analyse de restriction. Les fragments produits lors du clivage des molécules d'ADN par les enzymes de restriction sont facilement localisés dans les gels après coloration au bromure d'éthidium. Des différences dans le nombre et la taille des fragments de restriction permettent la séparation entre espèces virales reliées ou distinctes. De la variation intratypique peut également être détectée entre souches d'adénovirus et d'herpèsvirus lorsqu'une batterie de 4 à 8 enzymes de restriction est utilisée. Les cultures cellulaires à grande échelle, une manipulation prudente de produits radioactifs et/ou une préparation longue et laborieuse d'extraits cyto-

plasmiques, de nucléocapsides ou d'ADN viral libre sont éliminés par notre méthode d'empreinte de l'ADN.

Une centaine d'endonucléases de restriction sont présentement disponibles sur le marché. Quand seulement un petit nombre de fragments de restriction sont requis pour l'identification correcte d'un virus, son génome sera préférentiellement clivé avec des enzymes qui reconnaissent des séquences hexanucléotidiques riches en AT (i.e., *Aha* III ou *Dra* I). Si plus de fragments d'ADN doivent être comparés pour différencier, par exemple, une souche vaccinale d'une souche isolée sur le terrain, des endonucléases de restriction telles que *Msp* I (C/CGG) seront utilisées. Les ADN d'adénovirus et d'herpèsvirus sont caractérisés par un contenu en GC relativement élevé et un plus grand nombre de bandes pourraient être obtenues. Maintenant, le génome cellulaire est fortement méthylé et des enzymes de restriction sensibles à la méthylation pourraient, en certaines occasions, être employées pour réduire les traînées d'ADN dans le gel. Il existe, en fait, des endonucléases de restriction pour répondre à la plupart de nos besoins. Des fragments nombreux et bien distribués entre 1 et 12 kilobases sont habituellement recherchés. Une digestion incomplète des molécules d'ADN pouvant semer de la confusion peut être évitée en utilisant un excès d'enzyme (± 10 unités/ μ g d'ADN).

L'analyse de l'ADN par les endonucléases de restriction constitue une méthode puissante pour établir des liens entre virus au niveau génomique. Cette technique a été utilisée avec succès pour l'identification de souches d'adénovirus et d'herpèsvirus qui pouvaient difficilement ou ne pouvaient pas être différenciées par d'autres moyens. De nouvelles espèces d'adénovirus ont été découvertes

en utilisant notre méthode simplifiée d'empreinte de l'ADN. L'analyse d'ADN par les endonucléases de restriction est

assurément la méthode de choix pour mesurer les associations naturelles entre micro-organismes apparentés.

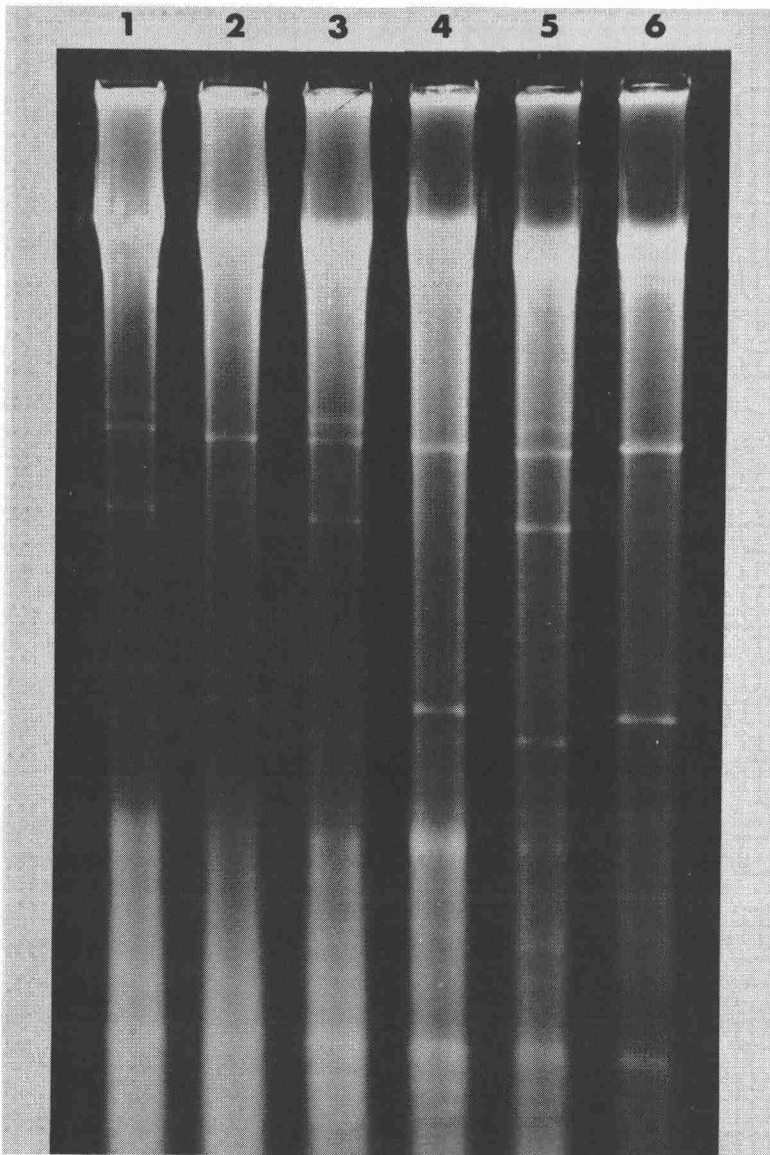


Figure 7

Patrons électrophorétiques de l'ADN extrait de souches du virus herpès simplex de type 1 (1, 3, 5) et de type 2 (2, 4, 6) après clivage avec l'endonucléase de restriction *EcoR*. I. Les fragments HSV-1 K, L, M et N avec des masses moléculaires respectives de 3.5, 3.3, 2.7 et 1.5 MDa et les fragments HSV-2 M et N avec des masses moléculaires respectives de 3.3 et 1.6 MDa sont facilement observés dans le gel et permettent l'identification non-ambiguë des souches virales. L'analyse de restriction par endonucléases s'ajoute avec profit aux techniques biologiques et immunologiques déjà utilisées dans les laboratoires de diagnostic pour distinguer les isolats HSV-1 et HSV-2.

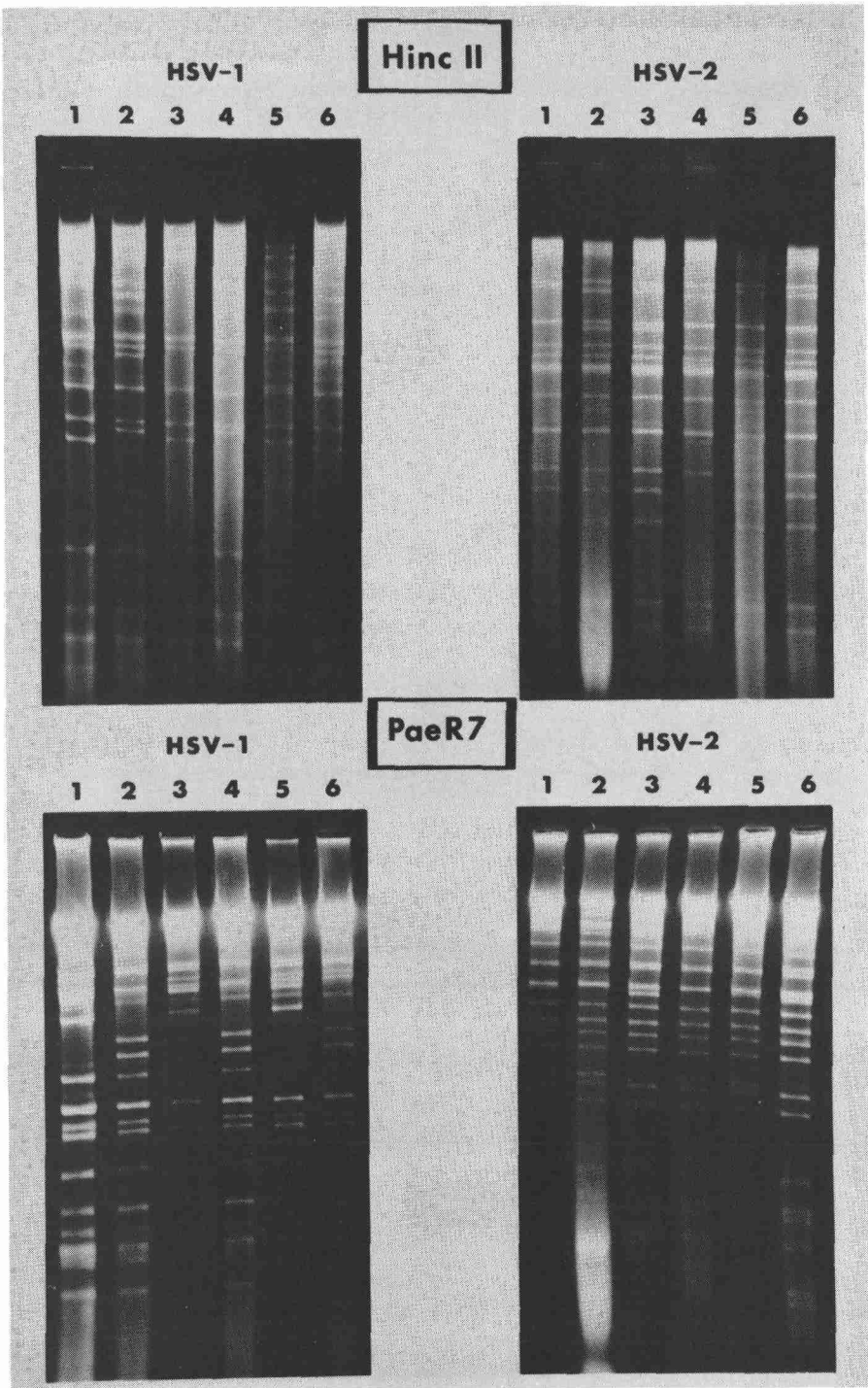


Figure 8

Profils de restriction *Hinc II* et *PaeR7* de souches HSV-1 et HSV-2. Des différences fines dans le nombre et la taille des fragments d'ADN peuvent être observées entre souches de même type. La variation intratypique détectée par empreinte de l'ADN peut s'avérer d'un grand intérêt en épidémiologie.

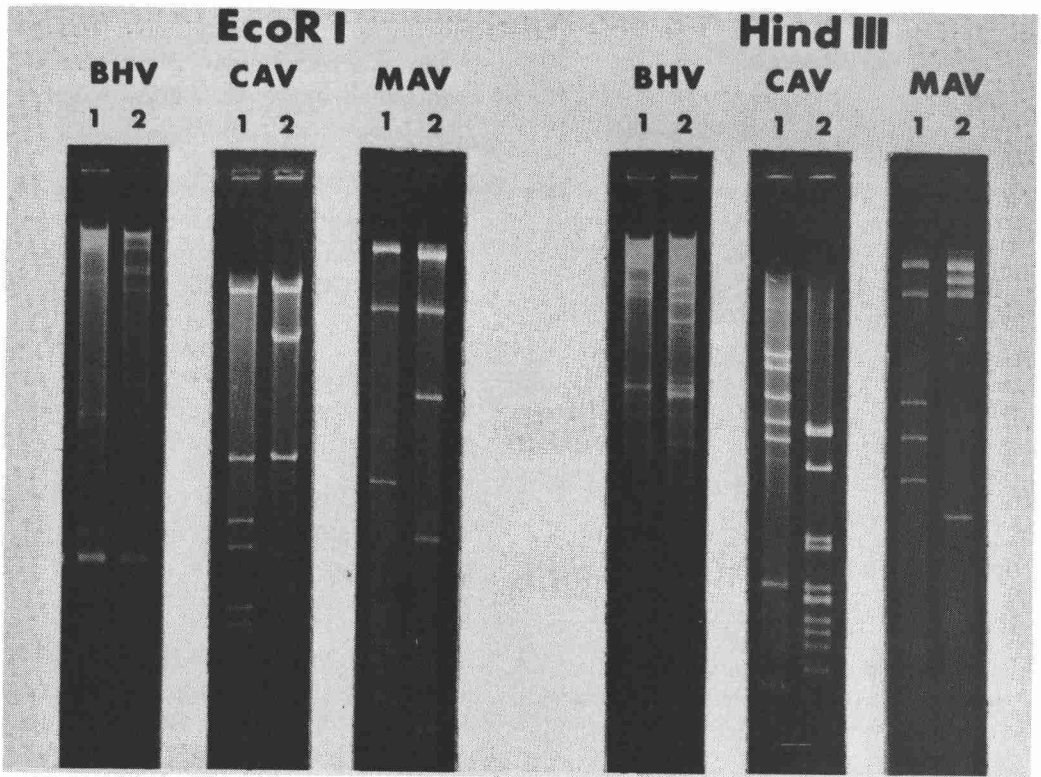


Figure 9

Profils de restriction de souches d'herpèsvirus bovin (BHV), d'adénovirus canin (CAV) et d'adénovirus murin (MAV) de deux types. Les mêmes tampons et réactifs ont été utilisés pour l'identification des différents virus. Seul un petit nombre de fragments *EcoR* I ou *Hind* III comigrant en agarose sont retrouvés dans les profils apparentés. Une telle absence d'homologie de séquence peut être employée, au niveau de leur taxonomie, pour faire accepter l'unicité d'espèces virales jusqu'alors confondues.

4. RÉFÉRENCES

- Andrews, A.T. 1986. *Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*, 2nd Edition. Monographs on Physical Biochemistry, Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford. 452 pages.
- Assaf, R., Marsolais, G., Yelle, J. et Hamelin, C. 1983. Unambiguous typing of canine adenovirus isolates by deoxyribonucleic acid restriction-endonuclease analysis. *Can. J. Comp. Med.* 47: 460-463.
- Belloncik, S., Lavallée, C. et Hamelin, C. 1986. Relative pathogenicity of nuclear polyhedrosis viruses from *Mamestra brassicae*, *Euxoa messoria*, *Agrotis segmentum*, *Autographa californica*, and *Heliothis* spp. for larvae of *Euxoa scandens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invert. Pathol.* 47: 8-11.
- Boffe, S.A. 1984. Agarose gel electrophoresis of DNA. *Meth. Mol. Biol.* 2:43-50.
- Davis, L.G., M.D. Dibner et J.F. Battey 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier, New York, 388 pages.
- Hamelin, C. 1980. A simple electrophoresis system for multiple agarose slab gels. *Anal. Biochem.* 108: 207-211.
- Hamelin, C., Chagnon, A. et Fauvel, M. 1984a. Identification of atypical strains of herpes simplex virus using a simplified DNA fingerprinting method. *Microbiol. Immunol.* 28: 723-729.
- Hamelin, C., Dion, M. et Yelle, J. 1984. Analysis of recombinant plasmids using multiple agarose slab gels in series. *Gene Anal. Techn.* 1: 79-83.
- Hamelin, C., Jouvenne, P., et Assaf, R. 1986. Genotypic characterization of type-2 variants of canine adenovirus. *Am. J. Vet. Med.* 47: 625-630.
- Hamelin, C., Marsolais, G. et Assaf, R. 1984. Interspecific differences between the DNA restrictions profiles of canine adenoviruses. *Experientia* 40: 482.
- Hamelin, C., Yelle, J. et M. Dion. 1986. Fast electrophoresis in superposed agarose minigels for DNA topoisomerase assays. *Electrophoresis* 7: 323-326.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. et Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 545 pages.
- Roizman, B. et Tognon, M. 1983. Restriction endonuclease patterns of herpes simplex virus DNA: Application to diagnostic and molecular epidemiology. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 104: 273-286.
- Schleif, R.F. et Wensink, P.C. 1981. *Practical Methods in Molecular Biology*. Springer-Verlag, New York. 220 pages.
- Sealey, P.G. et Southern, E.M. 1982. Gel electrophoresis of DNA. Dans *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A practical Approach*. IRL Press Ltd, Oxford, pages 39-76.

EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX

Patricia Jouvenne et François Fossiez

1. INTRODUCTION

L'étude moléculaire des virus nécessite la purification des acides nucléiques viraux, qu'il s'agisse d'ADN génomique, d'ARN génomique ou d'ARN messager (ARNm). Les ADN génomiques sont ensuite directement clonés dans un vecteur plasmidique, tandis que les ARN génomiques et les ARNm doivent préalablement être transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Après le clonage, les plasmides recombinants sont produits et purifiés en quantité appréciable pour fin d'analyse (cartographie physique, hybridation, séquençage, etc.).

Dans ce chapitre, nous décrirons les diverses techniques d'extraction des acides nucléiques permettant d'isoler:

- les génomes à partir de virus purifiés,
- les ARNm provenant de cellules infectées
- et les plasmides recombinants.

2. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX

2.1. EXTRACTION DES GÉNOMES À PARTIR DE VIRUS PURIFIÉS

Toutes les techniques ont le même but: séparer les protéines des acides nucléiques viraux. Pour ce faire, on utilise généralement des centrifugations en gradient de chlorure de césium (CsCl) ou de sulfate de césium (Cs_2SO_4). La compagnie Pharmacia a mis sur le marché un autre sel de césium, le trifluoroacétate de césium (CsTFA) qui est vendu sous la forme d'une solution aqueuse d'une densité approximative de 2 g/cm^3 et qui présente plusieurs avantages:

- L'ADN et l'ARN forment des bandes distinctes en gradient de CsTFA , les protéines flottant à la surface.
- Il dénature fortement les protéines qui se dissocient alors des acides nucléiques. Cette propriété élimine les étapes d'extraction précédant les gradients de CsCl ou de Cs_2SO_4 .

- Grâce à ses propriétés dénaturantes, le CsTFA inactive également les nucléases.
- Enfin, les acides nucléiques peuvent être récupérés par une simple précipitation à l'éthanol sans qu'il soit nécessaire de dialyser le milieu de centrifugation.

Méthode

1. Préparation de l'échantillon: en présence de césium, le dodécyl sulfate de sodium forme des sels insolubles qui doivent être éliminés de la préparation virale. Une alternative consiste à utiliser un détergent compatible avec le CsTFA, comme le N-lauroyl sarcosinate de sodium.
2. Préparation des gradients: afin de préparer correctement les gradients de CsTFA, il est important d'estimer la densité de l'acide nucléique à purifier (voir Tableau 1). Dans le cas des virus possédant un génome d'ARN bicaténaire (bc), ce dernier migre à une densité voisine de celle de l'ADN bc.

Tableau 1

Densité des acides nucléiques
et des protéines dans le CsTFA

ADN	1.60 - 1.63 g/cm ³
ARNm	1.83 - 1.90 g/cm ³
Protéines	1.20 - 1.50 g/cm ³

Précautions

- Ne pas utiliser de tubes en nitrate de cellulose.

- Diluer le CsTFA avec des tampons normalement utilisés pour conserver les acides nucléiques (par exemple: Tris HCl 0.1 M (pH 7.5), KCl 0.1 M, EDTA 1 mM).
- Diluer le CsTFA à la densité estimée de l'acide nucléique. La méthode idéale consiste à mélanger la totalité de l'échantillon avec le CsTFA afin d'optimiser la dénaturation des protéines et l'inactivation des nucléases (pendant l'ultracentrifugation, le CsTFA formera un gradient dans lequel les acides nucléiques se regrouperont en une bande isopycnique).
- Pour obtenir une solution de CsTFA de densité voulue, calculer le volume de tampon et d'échantillon à employer à l'aide de la formule suivante:

$$V_x = \frac{V_o (\rho_o - \rho)}{(\rho - \rho_x)}$$

où V_x = volume de tampon de dilution (mL)

V_o = volume de la solution originale de CsTFA (mL)

ρ_o = densité de la solution originale de CsTFA (g/cm³)

ρ_x = densité du tampon de dilution (g/cm³)

ρ = densité voulue de la solution diluée de CsTFA (g/cm³)

3. Conditions de centrifugation: les conditions typiques de centrifugation sont de 100 000 x g pendant 36 à 72 h. La température recommandée

se situe entre 4°C et 25°C (la déprotonisation est d'autant plus efficace que la température de centrifugation est élevée).

4. Fractionnement des gradients: étant donné que les protéines flottent à la surface du gradient, il est recommandé de récolter les fractions par le bas du tube afin d'éviter toute contamination des acides nucléiques.
5. Mesure de la densité de chaque fraction. Il existe deux façons de mesurer la densité des fractions:
 - Peser 100 µL de chaque fraction à l'aide d'une balance analytique. Cette technique permet de récupérer la totalité de l'échantillon.
 - Mesurer l'indice de réfraction et déduire la densité à l'aide de l'équation suivante:

$$\rho^{25} = 163.559 - 262.271 (\eta_D^{25}) + 105.281 (\eta_D^{25})^2$$

où ρ^{25} = densité du CsTFA à 25°C

η_D^{25} = indice de réfraction à 25°C

6. Détermination de la concentration en acides nucléiques. Le CsTFA absorbe peu les rayonnements UV permettant ainsi la détection des acides nucléiques à 260 nm. Quand $A_{260} = 1$, la concentration est de 50 µg/ mL pour l'ADN bicaténaire (bc) et l'ARNbc et de 40 µg/ mL pour l'ADN monocaténaire (mc) et l'ARNmc.

Bien que les gradients de CsTFA constituent la méthode la plus pratique pour purifier les génomes viraux, elle ne peut s'appliquer à tous les virus à ARN. En effet, dans certains cas, des polyribosomes sont co-purifiés avec les particules virales et des ARN ribosomiaux con-

taminent les préparations d'ARN génomique au cours de l'extraction. Pour éviter cette contamination, les nucléocapsides virales doivent être purifiées sur un gradient de saccharose avant l'extraction des acides nucléiques.

2.2. EXTRACTION DES ARNm VIRAUX

Certains virus inhibent fortement les transcriptions cellulaires permettant l'extraction d'ARNm viraux en grande quantité. Lorsque la production des messagers viraux est insuffisante, il est possible d'optimiser leur synthèse en bloquant les transcriptions cellulaires à l'aide de l'actinomycine D.

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des ARN cellulaires et viraux. L'une d'entre elles utilise le guanidinium isothiocyanate qui, à l'aide d'agents réducteurs, présente l'avantage d'inactiver efficacement les ribonucléases tout en lysant les cellules (Chirgwin *et al.* 1979). Les ARN sont ensuite séparés des ADN et des protéines dans un gradient de chlorure de césium (Glisin *et al.* 1974). Enfin, les ARN polyadénylés sont sélectionnés par chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne de cellulose-oligo(dT) (Aviv et Leder 1972) ou d'une colonne de Sepharose-poly(U) (Shapiro et Schimke 1975). Cette étape permet d'obtenir une préparation d'ARNm dont la pureté assure la qualité des résultats dans les expériences subséquentes (électrophorèse, traduction *in vitro*, synthèse d'ADNc, hybridation, etc.).

Quel que soit le but de la manipulation des ARN, la précaution majeure à prendre est d'éviter l'activité ribonucléasique. Toute la vaisselle en verre doit être passée dans un four Pasteur à 250°C pendant 4 h ou bien traitée à l'aide de l'acide sulfochromique, puis autoclavée. Le port

des gants est indispensable pour toute manipulation.

2.2.1. Extraction des ARN cellulaires et viraux

1. Déterminer le temps post-infection où la synthèse des ARNm viraux est maximale (à l'aide d'une cinétique d'incorporation de l'uridine [^3H]).
2. Laver le feuillet cellulaire avec du tampon phosphate de Dulbecco glacé et recueillir les cellules infectées.
3. Centrifuger les cellules à $1000 \times g$ pendant 10 min à 4°C .
4. Au culot cellulaire, ajouter 5 volumes de la préparation suivante:

Guanidinium isothiocyanate4 M

Citrate de sodium (pH 7)5 mM

β -mercaptoéthanol0.1 M

Dodécyl sarcosinate de sodium...0.5%

5. À l'aide d'un homogénéisateur de type Dounce, homogénéiser la suspension cellulaire jusqu'à ce que toutes les cellules soient brisées (vérifier par microscopie).
6. Ajouter 0.25 g de CsCl par mL d'homogénat.
7. Déposer l'homogénat sur un coussin de 2 à 3 mL de CsCl 5.7 M dans de l'EDTA 0.1 M (pH 8).
8. Centrifuger à $150\,000 \times g$ pendant 12 h à 20°C . En CsCl, la densité des ARN est plus grande que celle des ADN et des protéines. Durant la centrifugation, les ARN se retrouvent au culot tandis que protéines et ADN flottent au-dessus.

9. Jeter le surnageant, sécher les parois du tube et dissoudre le culot dans le tampon d'extraction: Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), EDTA 5 mM, SDS 1%.

10. Extraire les acides nucléiques à l'aide de 2 volumes du mélange chloroforme-n-butanol (4:1). Conserver la phase aqueuse.

11. Réextraire la phase organique en ajoutant un volume égal de tampon d'extraction.

12. Rassembler les deux phases aqueuses et ajouter 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5.2) et 2.5 volumes d'éthanol. Précipiter les ARN 2 fois à -20°C durant 2 à 24 h.

13. Conserver les ARN à -70°C dans l'éthanol 70%.

2.2.2. Sélection des ARN poly(A)⁺ sur colonne de cellulose-oligo(dT)

1. Équilibrer le gel de cellulose-oligo(dT) avec le tampon de chargement stérile contenant: 20 mM Tris 20 mM, HCl (pH 7.6), chlorure de lithium (LiCl) 0.5M, EDTA 1 mM et SDS 0.1%
2. Préparer une colonne contenant 1 mL de gel dans une pipette Pasteur ou une colonne à usage unique (Econo-column, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie).
3. Laver la colonne avec 3 volumes de chacune des solutions suivantes:
 - a. Eau stérile
 - b. NaOH 0.1 M et EDTA 5 mM
 - c. Eau stérile

4. Vérifier que le pH de l'éluat soit inférieur à 8.
5. Laver la colonne avec 5 volumes de tampon de chargement.
6. Dissoudre les ARN dans de l'eau stérile et les dénaturer à la chaleur (65°C pendant 5 min). Ajouter un volume égal de tampon de chargement 2X et laisser refroidir dans un bain de glace.
7. Déposer l'échantillon sur la colonne. Recueillir l'éluat, chauffer à nouveau (65°C pendant 5 min) et appliquer sur la colonne.
8. Laver la colonne avec 5 à 10 volumes de tampon de chargement, suivis de 4 volumes du même tampon contenant 0.1 M LiCl.
9. Éluer les ARN poly(A)⁺ à l'aide de 2 ou 3 volumes de la solution stérile: Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM, SDS 0.05%.
10. Ajouter 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5.2) et 2.5 volumes d'éthanol. Précipiter les ARN à -20°C pendant un minimum de 2 h.
11. Laver le culot avec quelques gouttes d'éthanol 70% et suspendre les ARN dans de l'eau stérile.
12. Par spectrophotométrie, déterminer la concentration et la pureté des ARNm. Quand $A_{260} = 1$, la concentration des ARNm est approximativement de 40 µg/mL. Quand $AS \frac{260}{280} = 2$, la préparation d'ARNm est pure. Une valeur inférieure indique la présence de protéines.

2.2.3. Discussion

Malgré une perte d'ARNm au cours de la chromatographie, il est recommandé de sélectionner et d'enrichir la préparation en ARN polyadénylés afin d'obtenir des résultats de qualité.

2.3. EXTRACTION DES PLASMIDES RECOMBINANTS PAR LYSE ALCALINE

La technique d'extraction des ADN plasmidiques comporte trois étapes: croissance des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) recombinantes, récolte et lyse des bactéries, séparation de l'ADN plasmidique du matériel génétique bactérien.

1. Selon la quantité de plasmides recombinants désirée, cette méthode sera appliquée à un petit volume de culture (1 mL) ou à un grand volume (100 mL à 1 L). En général, 1 mL de culture fournit 2 à 3 µg de plasmides, ce qui est suffisant pour déterminer la taille de l'insertion et/ou effectuer une réaction de séquençage plasmidique. Toutefois, si l'on désire une plus grande quantité (1 à 2 mg/L de culture), on peut "amplifier" la production plasmidique à l'aide du chloramphénicol (Maniatis *et al.* 1982). En inhibant les synthèses protéiques, cet antibiotique favorise la réplication des plasmides de type relâché.
2. Afin de relarguer l'ADN plasmidique, les parois bactériennes sont digérées à l'aide de lysozymes, puis la lyse est complétée par un traitement au SDS et au NaOH.
3. Le volume de NaOH ajouté à la suspension bactérienne est critique car on désire obtenir un pH 12-12.5.

C'est pourquoi la lyse bactérienne est effectuée en présence de glucose qui sert de tampon. Dans ces conditions, seul l'ADN chromosomique bactérien est dénaturé, tandis que l'ADN plasmidique reste intact. Quand le lysat est ensuite neutralisé à l'aide d'une solution d'acétate de potassium, l'ADN chromosomique forme des agrégats insolubles et les plamides restent en solution. Simultanément, la forte concentration d'acétate de potassium provoque la précipitation de complexes protéines-SDS et des ARN de haute masse moléculaire. L'ADN plasmidique se retrouve dans le surnageant avec les ARN de transfert et ribosomaux. Ces derniers sont éliminés à l'aide de la ribonucléase A. Les nucléases et les protéines résiduelles sont extraites à l'aide du phénol et du chloroforme et les plasmides sont récoltés par précipitation à l'éthanol.

L'ADN plasmidique ainsi obtenu est suffisamment pur pour être digéré par des endonucléases de restriction ou séquencé directement.

2.3.1. Extraction plasmidique à partir d'un petit volume de culture

Solutions

Milieu LB (Luria-Bertani):

- Bacto-Tryptone 10 g
 - Extrait de levure 5 g
 - NaCl 10 g
 - H₂O 700 mL
- Ajuster à pH 7.5 avec une solution de NaOH 1N. Compléter à 1 L avec de l'eau. Autoclaver pendant 20 min.

Acétate de potassium 3 M (pH 4.8):

- Acétate de potassium 5 M 60 mL
- Acide acétique glacial 11.5 mL
- H₂O tridistillée. 28.5 mL

Ribonucléase A (200 µg/mL) exempte de désoxyribonucléases

Préparer une solution contenant 200 µg/mL de ribonucléase A. Incuber dans un bain-marie à 100°C pendant 10 min afin d'inactiver les désoxyribonucléases.

Tampon TE (pH 8)

- Tris-HCl (pH 8) 10 mM
- EDTA (pH 8) 1 mM

Phénol-chloroforme

Utiliser une qualité de phénol redistillé pour la biologie moléculaire. Faire fondre à 68°C. Ajouter 0.1 % d'hydroxyquinoline (un antioxydant). Saturer le phénol avec un volume égal de Tris 1 M (pH 8) puis avec du Tris 0.1 M (pH 8) contenant 0.2% de β-mercaptoéthanol jusqu'à ce que la phase aqueuse atteigne un pH supérieur à 7.6. Préparer une solution contenant 24 parties de chloroforme pour 1 partie d'alcool isoamylique, puis mélanger 1 partie de phénol saturé avec 1 partie de chloroforme-alcool isoamylique.

Méthode

1. Inoculer 1.5 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié avec une colonie recombinante. Incuber à 37°C pendant 1 nuit avec agitation (250 rpm).

2. Transvaser 1.5 mL de culture dans un tube Eppendorf. Centrifuger à 12 800 x g pendant 1 min.
 3. Jeter le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans 200 µL d'une solution fraîchement préparée contenant: glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8), 5 mg/mL lysozyme.
 4. Incuber à la température de la pièce pendant 5 min.
 5. Ajouter 200 µL d'une solution fraîche de 0.2 N NaOH et 1% SDS. Mélanger en inversant le tube; ne pas utiliser un agitateur mécanique. Laisser dans un bain de glace pendant 5 min.
 6. Ajouter 150 µL d'une solution glacée d'acétate de potassium 3 M pH 4.8. Mélanger les tubes en position inversée à l'aide d'un Vortex, puis laisser dans la glace pendant 5 min.
 7. Centrifuger à 12 800 x g pendant 15 min dans une centrifugeuse Eppendorf.
 8. Transférer le surnageant dans un nouveau tube.
 9. Ajouter 50 µL de ribonucléase A (200 µg/ mL) exempte de désoxyribonucléases. Incuber à 37°C pendant 30 min.
 10. Ajouter 800 µL de phénol-chloroforme et mélanger à l'aide d'un Vortex pendant 30 sec. Centrifuger à 12 800 x g pendant 2 min et transférer le surnageant dans un tube Eppendorf.
 11. Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu, mélanger brièvement à l'aide d'un Vortex et incuber à la température de la pièce pendant 2 min.
 12. Centrifuger à 12 800 x g pendant 10 min.
 13. Jeter le surnageant et laver délicatement le culot avec de l'éthanol 70 %.
 14. Sécher le culot dans une centrifugeuse sous vide.
 15. Resolubiliser le culot dans 50 µL de tampon TE.
 16. Digérer 5 µL de la préparation plasmidique à l'aide d'une endonucléase de restriction et analyser le résultat par électrophorèse en gel d'agarose (voir Chapitre 23).
- 2.3.2. Extraction plasmidique à partir d'un grand volume de culture: amplification des plasmides**
1. Inoculer 10 mL de milieu LB (voir section 2.3.2) contenant l'antibiotique approprié avec une colonie bactérienne recombinante. Incuber à 37°C pendant une nuit avec agitation (250 rpm).
 2. Le lendemain matin, inoculer 25 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié avec 0.1 mL de la culture d'une nuit. Incuber à 37°C avec agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne la phase logarithmique tardive.
 3. Inoculer 25 mL de la culture en phase logarithmique tardive dans 500 mL de milieu LB préchauffé à 37°C et contenant l'antibiotique approprié. Incuber à 37°C pendant 2.5 h avec agitation (250 rpm).
 4. Ajouter 2.5 mL de chloramphénicol (34 mg/ mL d'éthanol 70%). La concentration finale dans la culture sera de 170 µg/ mL.

5. Trente minutes après l'addition du chloramphénicol, diminuer l'agitation à 100 rpm et incubé pendant 16 h.
6. Centrifuger les bactéries à $4000 \times g$ pendant 10 min à 4°C et jeter le surnageant.
7. Resuspendre le culot bactérien dans 10 mL d'une solution fraîchement préparée contenant: glucose 50 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8), EDTA 10 mM, lysozyme 5 mg/ mL. Incuber à la température de la pièce pendant 5 min.
8. Ajouter 20 mL d'une solution fraîche contenant NaOH 0.2 N et SDS 1%. Mélanger en inversant le tube; ne pas utiliser un Vortex. Laisser à la température de la pièce pendant 10 min.
9. Ajouter 15 mL d'une solution glacée d'acétate de potassium 3 M pH 4.8 et mélanger en inversant brusquement le tube plusieurs fois. Laisser dans la glace pendant 10 min.
10. Centrifuger à $12\,000 \times g$ pendant 20 min.
11. Récolter le surnageant contenant les plasmides. Ajouter 0.6 volume d'isopropanol, bien mélanger et laisser précipiter pendant 15 min à la température de la pièce (les sels d'acétate de potassium précipitent à 4°C dans l'isopropanol).
12. Centrifuger à $12\,000 \times g$ pendant 30 min.
13. Jeter le surnageant et laver deux fois le culot avec de l'éthanol 70%. Inverser le tube sur du papier absorbant pour laisser sécher le culot qui deviendra transparent.
14. Pour débarrasser l'ADN plasmidique des protéines ainsi que des ARN de transfert et des ARN ribosomaux, on peut soit procéder à une centrifugation en gradient de CsCl, soit effectuer une purification sur colonne de Sephacryl. Nous recommandons la deuxième technique pour sa simplicité et sa rapidité. Les fractions recueillies peuvent être analysées par électrophorèse en gel d'agarose 0.8%.

2.3.3. Discussion

Cette méthode d'extraction plasmidique convient dans la plupart des cas, cependant elle possède une limite. Si les plasmides présentent une taille supérieure à 25 000 paires de bases, leur ADN se comporte comme l'ADN génomique et ils ne peuvent être séparés en utilisant seulement la technique d'extraction. Cependant, deux possibilités peuvent être envisagées: générer des plasmides plus petits en digérant l'ADN à cloner à l'aide d'endonucléases de restriction ou cloner les ADN de grande taille dans un bactériophage plutôt que dans un plasmide.

3. RÉFÉRENCES

- Avi, V. H. et Leder, P. 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1412.
- Birnboim, H.C. et Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Carter, C., Britton, V.J. et Haff, L. 1983. CsTFA: a centrifugation medium for nucleic acid isolation and purification. *Biotechniques* 1: 142-147.

- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. et Rutter, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- Glisin, V., Crkvenjakov, R. et Byus, C. 1974. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13: 2633-2637.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. et Sambrock, J. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mirkes, P.E. 1985. Simultaneous banding of rat embryo DNA, RNA, and protein in cesium trifluoroacetate gradients. *Anal. Biochem.* 148: 376-383.
- Shapiro, D.J. et Schimke, R.T. 1975. Immunochemical isolation and characterization of ovalbumin messenger ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 250: 1759-1764.

TRADUCTION *IN VITRO*

Patricia Jouvenne

1. INTRODUCTION

La traduction *in vitro* s'est avérée un excellent moyen de caractériser les ARN messagers (ARNm) et d'étudier les produits qui en résultent, comme par exemple les précurseurs des protéines. Diverses observations sont à l'origine de l'hypothèse du peptide signal expliquant le mécanisme de sécrétion des protéines. Les études réalisées à l'aide des systèmes de traduction *in vitro* ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la synthèse des protéines et de cerner le rôle des différents éléments impliqués (Revel et Groner 1978). Une application plus récente de ces systèmes est la méthode de "traduction arrêtée par hybridation" permettant d'identifier des ADN complémentaires à des séquences d'ARNm (Paterson *et al.* 1977).

Les systèmes employés le plus couramment dans la traduction *in vitro* sont: le germe de blé, le lysat de réticulocytes et les ovocytes d'amphibien. Nous avons choisi de ne traiter ici que des deux derniers systèmes, compte tenu des avantages qu'ils possèdent. En effet, malgré un emploi aisé et un bruit de fond relativement bas, le germe de blé ne permet pas

de traduire efficacement des ARNm codant pour des polypeptides supérieurs à 60 kDa (Clemens 1984). De plus, ce système présente des activités ribonucléasique et protéolytique élevées et produit de nombreux polypeptides incomplets (Pelham et Jackson 1976, Mumford *et al.* 1981).

2. SYSTÈMES DE TRADUCTION *IN VITRO*

2.1. LYSAT DE RÉTICULOCYTES

Ses qualités en font le système de choix pour la traduction des ARNm viraux de petite et grande tailles. Le lysat de réticulocytes est disponible commercialement, mais il peut également être préparé au laboratoire en lysant des érythrocytes immatures prélevés chez des lapins volontairement anémiés (Clemens 1984). Puis, afin de détruire les ARNm endogènes et ainsi d'atténuer le bruit de fond, il est parfois nécessaire de traiter le lysat de réticulocytes à l'aide de la nucléase micrococcalle de *Staphylococcus aureus* (Pelham et Jackson 1976). Ce traitement ne diminue ni l'efficacité ni la sensibilité du système. Ce dernier peut

traduire une faible concentration d'ARNm (0.3 µg/ mL) et n'atteindre sa saturation qu'avec une forte concentration (300 µg/mL). Chaque ARNm peut être traduit de 40 à 70 fois au cours d'une incubation de 90 min (Palmiter 1973). Enfin, à partir d'une préparation d'ARN cytoplasmiques totaux, il est fortement recommandé de sélectionner les ARN polyadénylés par chromatographie d'affinité afin d'améliorer la qualité des résultats.

On peut se procurer des lysats de réticulocytes d'origine commerciale déjà traités à l'aide de la nucléase micrococcale. De plus, les fabricants ajoutent les éléments essentiels à l'optimisation de la traduction, à savoir:

- un système générateur d'énergie (créatine phosphate et créatine phosphokinase)
- un agent qui empêche l'inhibition du facteur d'initiation eIF-2 (cristaux de chlorhydrate d'hème ou hémine)
- des ARN de transfert
- des sels (acétate de potassium et acétate de magnésium). Cependant, pour traduire efficacement certains ARNm, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster les concentrations ioniques

Juste avant la traduction, les ARNm sont dénaturés par la chaleur (100°C pendant 1 min), puis les autres composants de la réaction sont ajoutés (Tableau 1). Le mélange réactionnel est incubé à 30°C pendant 60 min. Néanmoins, la traduction peut se poursuivre au-delà de 2 h de manière à compléter la synthèse des grands polypeptides.

Simultanément à la traduction des ARNm viraux, trois témoins sont indispensables:

1. un témoin négatif: les ARNm extraits des cellules non infectée
2. un deuxième témoin négatif: le lysat de réticulocytes sans ARNm exogène
3. un témoin positif: les ARNm d'un virus connu (fournis avec les lysats de réticulocytes d'origine commerciale)

D'une façon générale, la synthèse des polypeptides à l'aide d'un lysat de réticulocytes s'accomplit essentiellement au cours des 45 premières minutes. Il est aisé de suivre la synthèse protéique en faisant une cinétique d'incorporation de la méthionine [³⁵S] après précipitation à l'aide de l'acide trichloroacétique. Pour terminer, les produits de la traduction sont analysés par immunoprécipitation, séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, puis révélés par fluorographie.

La préparation du lysat de réticulocytes et celle du germe de blé ne permet pas de préserver l'intégrité des membranes et détruit les enzymes impliquées dans les différentes modifications post-traductionnelles des protéines. Dans certains cas, il est nécessaire d'obtenir des polypeptides similaires aux protéines natives: il faut alors choisir les ovocytes d'amphibien.

Méthode

Lysat de réticulocytes	35 µL
Mélange d'acides aminés 1 mM (sans méthionine)	1 µL
Méthionine [³⁵ S] (1200 Ci/mmmole)	50 µCi

Inhibiteur de ribonucléases
(RNasin®, Promega Biotec,
Madison, Wisconsin)50 U

ARNm1 à 5 µg

Volume total50 µL

Incuber à 30°C pendant 60 min.

2.2. OVOCYTES D'AMPHIBIEN

Les ovocytes de *Xenopus laevis* renferment une impressionnante réserve d'éléments indispensables au développement embryonnaire. Ils contiennent environ 10 000 molécules supplémentaires d'ARN de transfert et 200 000 ribosomes de plus que les cellules somatiques de *Xenopus*.

Les ARNm injectés dans les ovocytes peuvent être traduits jusqu'à 100 000 fois car ils demeurent stables pendant près de deux semaines (Gurdon *et al.* 1973). Contrairement aux systèmes acellulaires, les ovocytes possèdent les enzymes qui modifient correctement les protéines nouvellement synthétisées, incluant le clivage des polypeptides précurseurs, la phosphorylation, la glycosylation, l'hydroxylation et l'acétylation (Colman 1984a). De plus, ce système permet la sécrétion des protéines telles que les interférons, les immunoglobulines, les hormones etc. (Colman 1984a). Cent à mille fois plus efficaces que les lysats de réticulocytes, les ovocytes de grenouille constituent un système complet pour étudier la synthèse et la sécrétion protéiques. Ils sont également utilisés pour la transcription d'ADN exogènes injectés dans le noyau (Colman 1984b). Les transcrits sont alors modifiés en ARNm matures et traduits sans changer de système (Gurdon 1976, De Robertis 1979). De plus, des protéines mutantes peuvent être synthétisées dans les ovocytes après l'injection d'ADN manipulé (McKnight et Gavis 1980).

Cependant, l'utilisation d'ovocytes requiert un équipement très sophistiqué pour la micro-manipulation et la micro-injection, ainsi que la dextérité du manipulateur. Les manipulations et le matériel requis sont détaillés dans Colman (1984a).

Méthode

1. Élever des grenouilles *Xenopus laevis* femelles.
2. Sous anesthésie, prélever une section de l'ovaire.
3. Laver les ovocytes dans une solution saline modifiée de Barth et les séparer par groupes de 5 à 20 (les ovocytes peuvent être gardés plusieurs jours à 19°C).
4. Confectionner et calibrer des micropipettes: cette étape est délicate et vise à obtenir des micropipettes servant à injecter 50 ± 20 nL de solution.
5. Préparer les ARNm: il est recommandé de sélectionner les ARN polyadénylés par chromatographie d'affinité afin d'augmenter leur concentration dans la solution à injecter (voir le Chapitre 24). De 50 à 500 ng d'ARNm peuvent être injectés par ovocyte; mais compte tenu de la sensibilité du système, 10 ng d'ARNm sont parfois suffisants.
6. Après immobilisation des plus gros ovocytes, injecter 50 ± 20 nL d'ARNm dans la partie végétative (jaune). Un manipulateur expérimenté peut injecter de 200 à 300 ovocytes en une heure.
7. Remplacer les ovocytes dans la solution saline modifiée de Barth, à 19°C.

8. Marquer les protéines nouvellement synthétisées à l'aide d'acides aminés radioactifs, principalement la méthionine [^{35}S], ou d'autres précurseurs radioactifs comme l'acétate [^3H], le phosphate [^{32}P] ou le mannose [^{14}C] selon que l'on veuille démontrer l'acétylation, la phosphorylation ou la glycosylation des polypeptides. Les ovocytes étant perméables aux acides aminés, le matériel radioactif est directement ajouté dans le milieu de culture (0.1 à 5 mCi/mL).
9. Analyser les protéines marquées: après homogénéisation des ovocytes et centrifugation, les protéines marquées se retrouvent dans le surnageant. Elles sont analysées directement, ou après immunoprécipitation, par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

3. CONCLUSION

Les ovocytes de *Xenopus* représentent le système de traduction le plus efficace. Jusqu'à présent, il est le seul système qui permet l'étude des modifications post-traductionnelles et des mécanismes de sécrétion protéique. Cependant, pour l'analyse courante des ARNm, le lysat de réticulocytes demeure le système de choix de la traduction *in vitro*.

4. RÉFÉRENCES

- Clemens, M.J. 1980. Translational control of protein synthesis in erythroid cells. Dans *Biochemistry of cellular regulation* Vol. 1. M.J. Clemens (Édit.). CRC Press, Boca Raton, FL, pages 159-191.
- Clemens, M.J. 1984. Translation of eukaryotic messenger RNA in cell-free extracts. In *Transcription and translation: a practical approach* B.D. Hames, B.D. et Higgins, S.J. (Édit.). IRL Press, Oxford et Washington, D.C., pages 231-270.
- Colman, A. 1984a. Translation of eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* Oocytes. Dans *Transcription and translation: a practical approach* B.D. Hames, B.D. et Higgins, S.J. (Édit.). IRL Press, Oxford et Washington, D.C., pages 271-302.
- Colman, A. 1984b. Expression of exogenous DNA in *Xenopus* Oocytes. In *Transcription and translation: a practical approach* B.D. Hames, B.D. et Higgins, S.J. (Édit.). IRL Press, Oxford et Washington, D.C., pages 49-69.
- De Robertis, E.M. et Olson, M.V. 1979. Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes micro-injected into frog oocytes. *Nature* 278: 137-143.
- Gurdon, J.B., De Robertis, E.M. et Partington, G. 1976. Injected nuclei in frog oocytes provide a living cell system for the study of transcriptional control. *Nature* 260: 116-120.
- Gurdon, J.B., Lingrel, J.B. et Marbaix, G. 1973. Message stability in injected frog oocytes: long life of mammalian and β globin messages. *J. Mol. Biol.* 80: 539-551.
- McKnight, S.L. et Gavis, E.R. 1980. Expression of the herpes thymidine kinase gene in *Xenopus laevis* oocytes: an assay for the study of deletion mutants constructed *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 8: 5931-5948.

- Mumford, R.A. Pickett, C.B., Zimmerman, M. et Strauss, A.W. 1981. Protease activities present in wheat germ and rabbit reticulocyte lysates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 565-572.
- Palmiter, R.D. 1973. Ovalbumin messenger ribonucleic acid translation. *J. Biol. Chem.* 248: 2095-2106.
- Paterson, B.M., Roberts, B.E. et Kuff, E.L. 1977. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 4370-4374.
- Pelham, H.R.B. et Jackson, R.J. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67: 247-256.
- Revel, M. et Groner, Y. 1978. Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 1079-1126.

