

Page facebook ; Domaine SNV :
Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie

• Séquençage de l'ADN

www.facebook.com/DomaineSNV/

CTAAGATGATCTTTAGTCCCGGTTTCGAA
CTTAGTCGCGTTGATAACACCAACC
GTAATACCAACCGCGGACTAAAGATCCCG
CGGACTAAGTCGACCCCTAAGATG

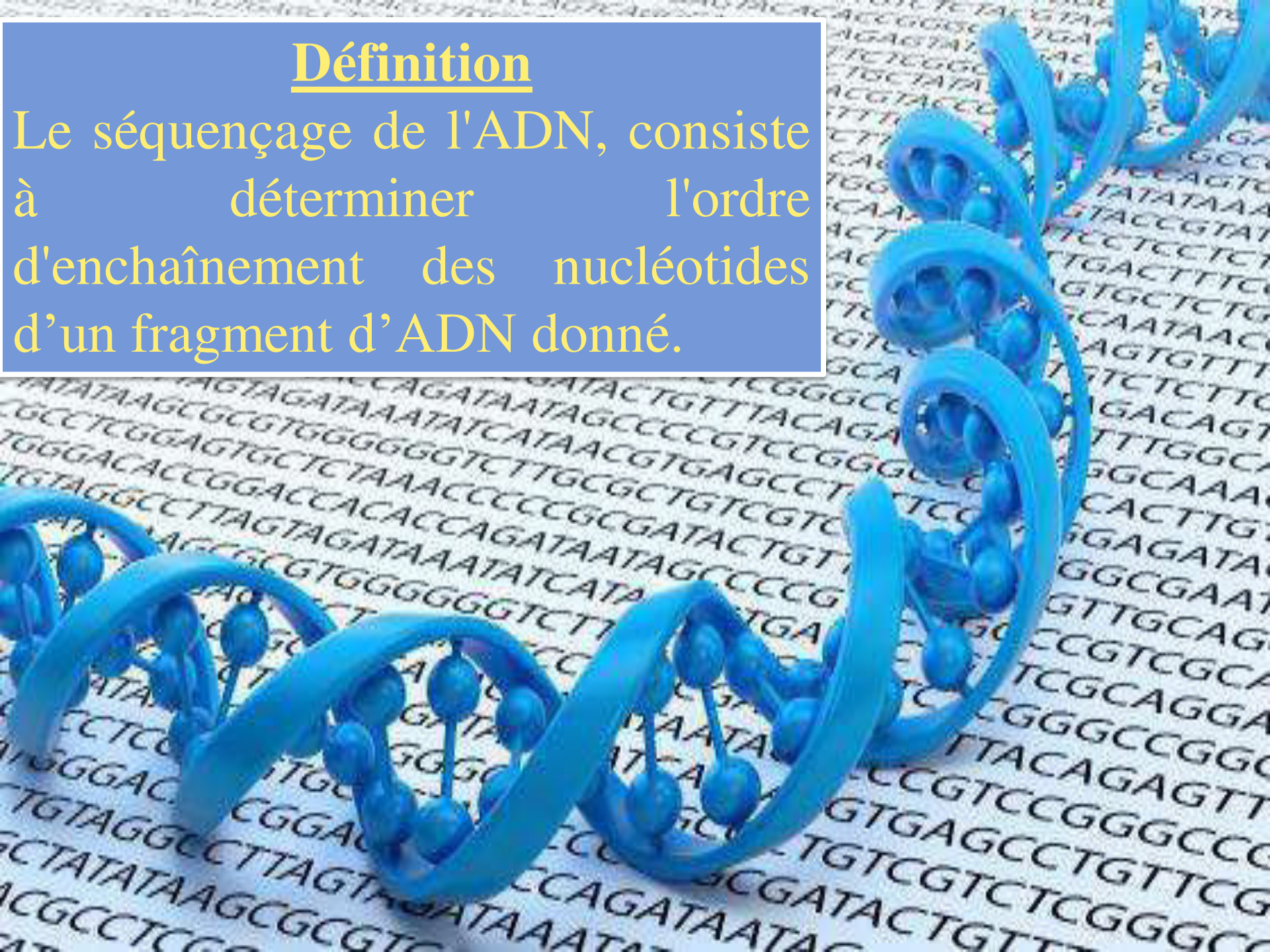
TTCAAATTTCTTCAAAAAAGAGGGGAG
GTGTTACATACATCCGACGGTGCCTA
TTTGTCATAGTCAATTGCACTATGTTTT
GTAAGTTGATGAGAGAGAAAATGTGTGT

TTTGCTAAACAAGGTTTTATAAAATAGTTG
AAATAATAGAAAACAACTAAAATGAAAAT
TATTACTTAACAAATAGTTTTTAAGAATTAT
AATAAAGATATCTTATAATATATGACT

ACGGTTTTTTTTGACTCATGTAGATGGATC
AGAGTTTATTGACGGCGTGCCTATTTTT
TTTTATTTGTTGTCCATGCAATAAGTGTA
TATTCATTTCCACTTGTTTGAGTCGGGGT

Définition

Le séquençage de l'ADN, consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.



Historique :

Les premières techniques de séquençage ont été développées en parallèle au milieu des années 1970.

Les méthodes de Sanger (Grande-Bretagne) et Gilbert (Etats-Unis) ont toutes deux été récompensées d'un prix Nobel de chimie en 1980.



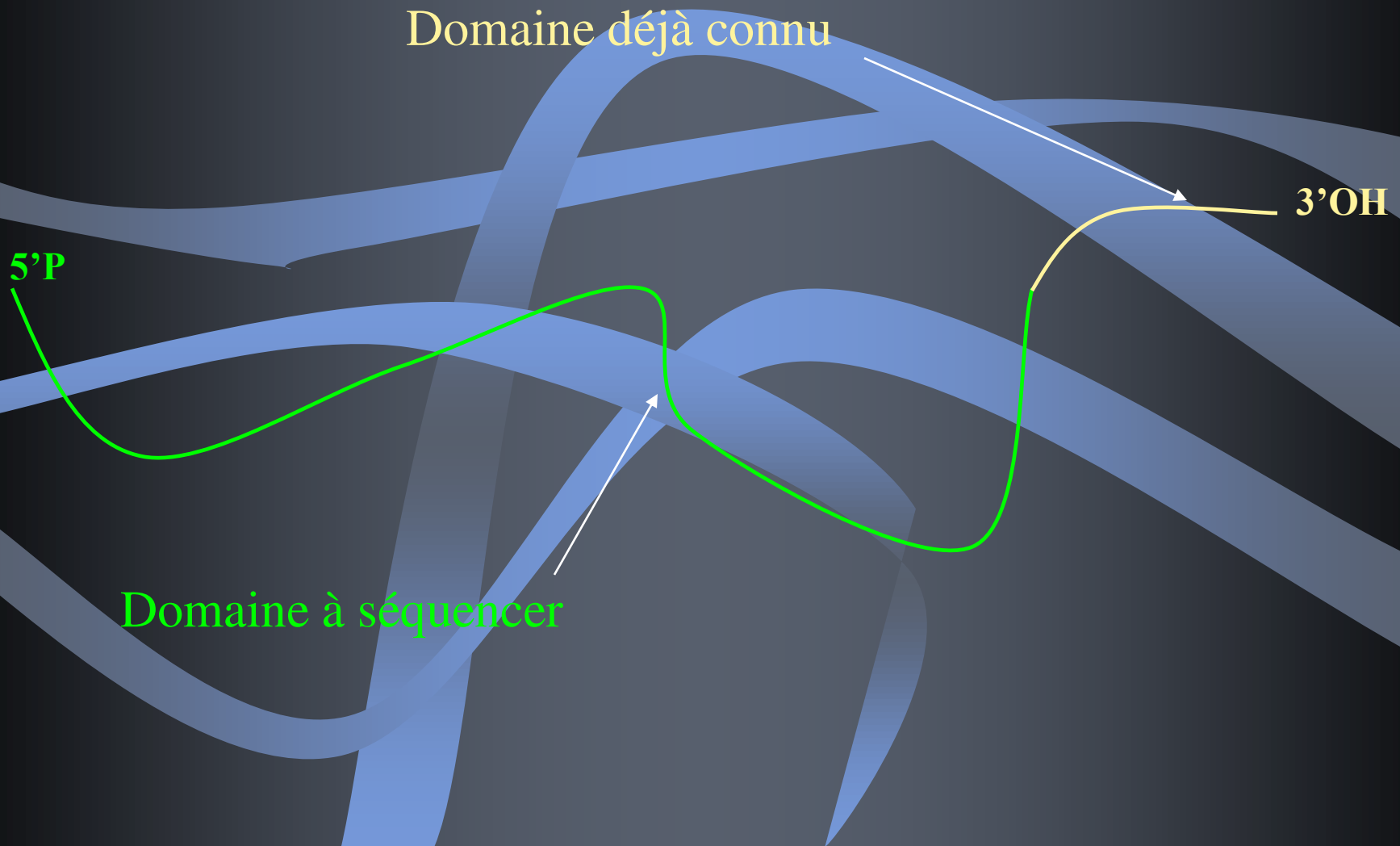


méthode de Sanger (enzymatique)

Séparation des brins par thermodénaturation



Séquence d'ADN à déterminer



Hybridation par une amorce marquée (fluorescence, radioactivité)

Domaine déjà connu

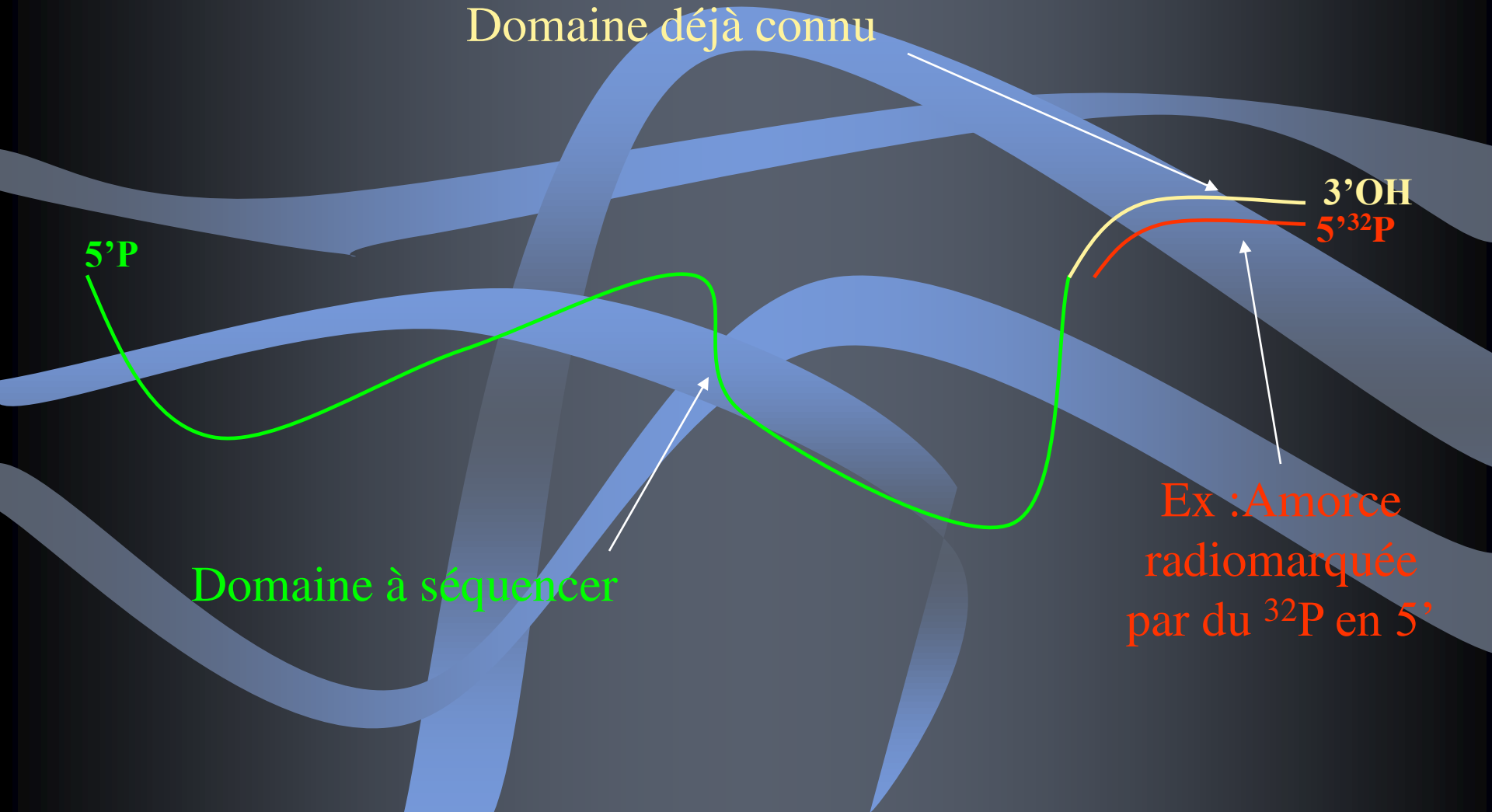
5'P

Domaine à séquencer

3'OH

5'³²P

Ex : Amorce
radiomarquée
par du ³²P en 5'



Néosynthèse du brin complémentaire au brin à séquencer

Par le jeu de la complémentarité stérique et chimique, le **brin à séquencer** sera complété par un **brin néosynthétisé**

Domaine déjà connu

5'P
3'OH

Domaine à séquencer

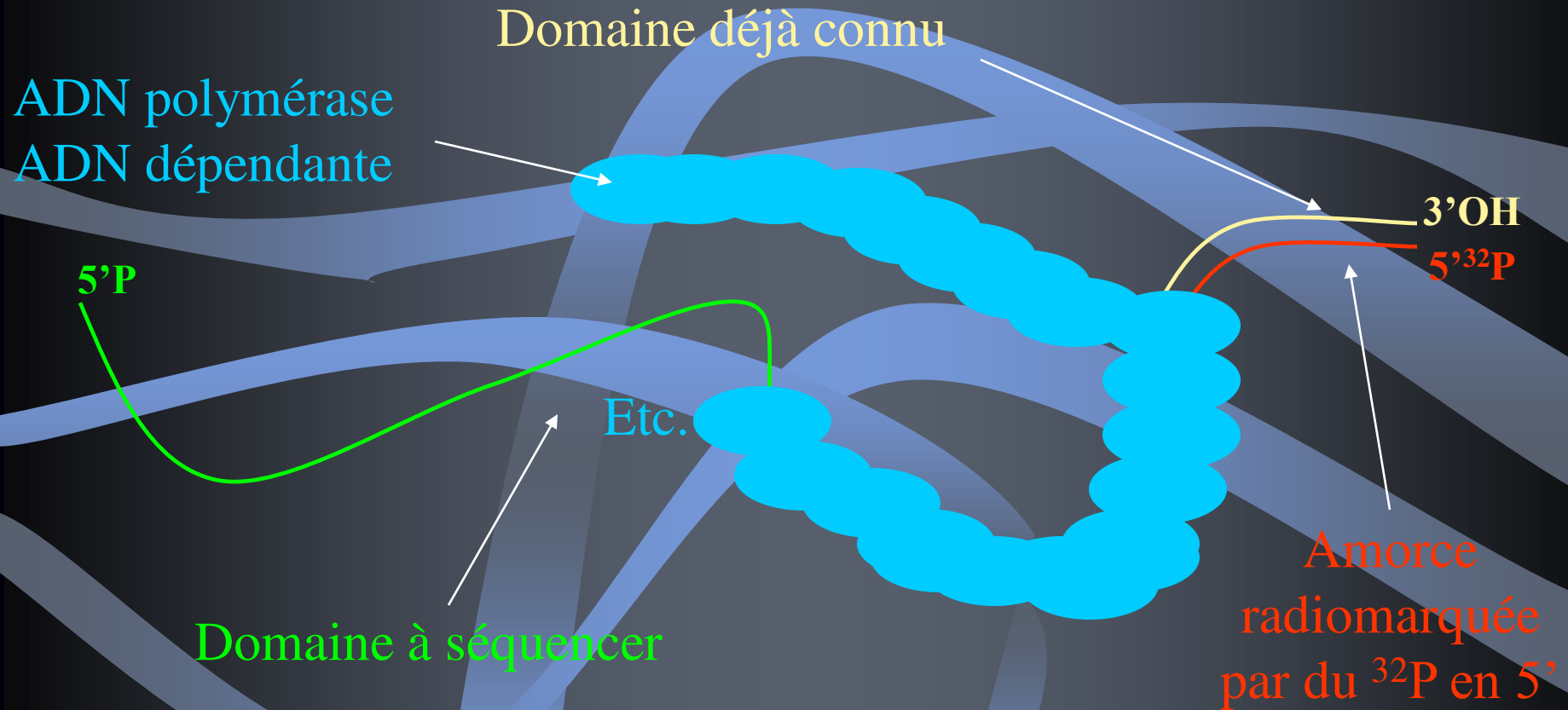
3'OH

5'³²P

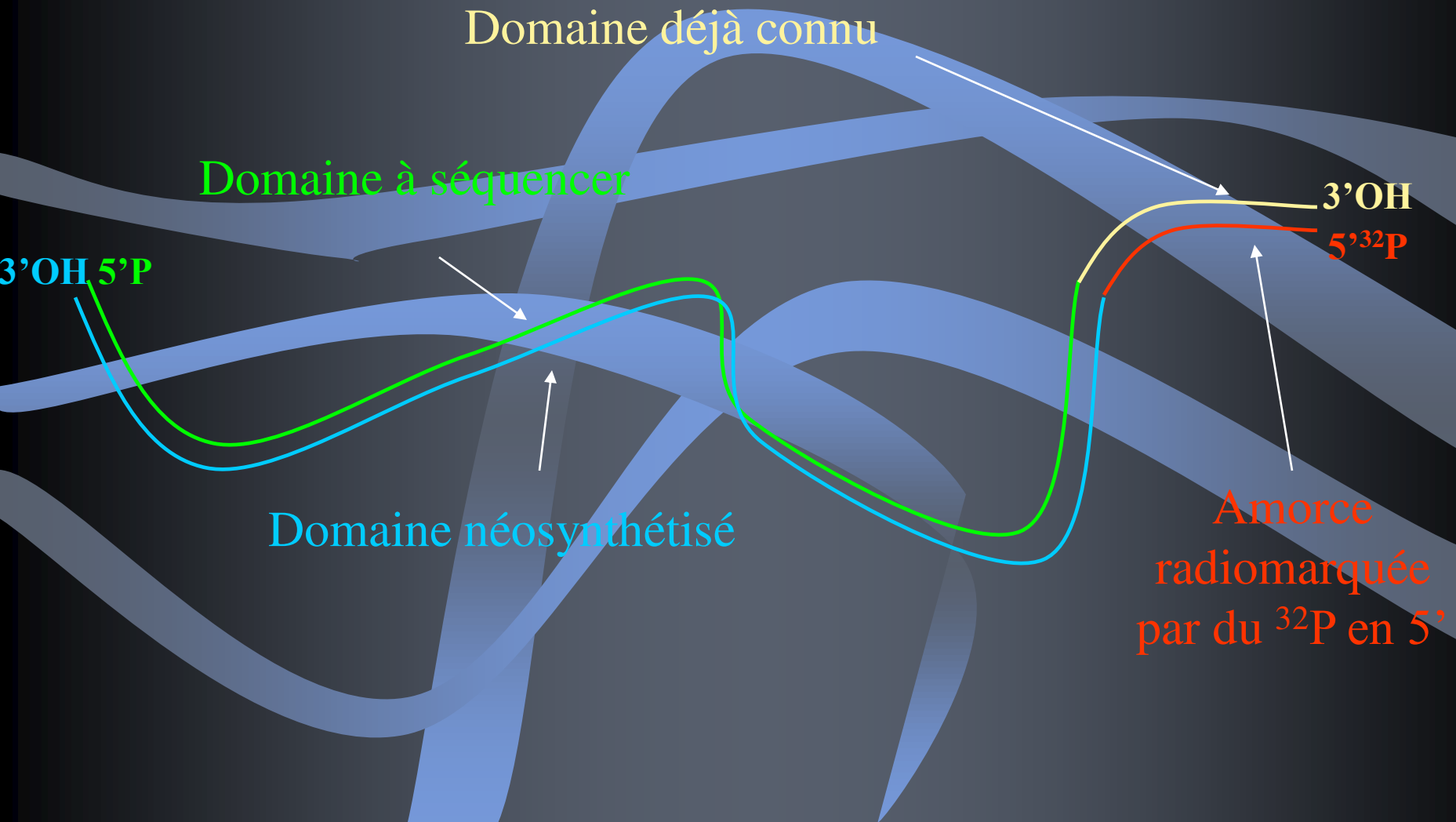
Amorce
radiomarquée
par du ³²P en 5'



Étapes de la synthèse



Bilan de la synthèse



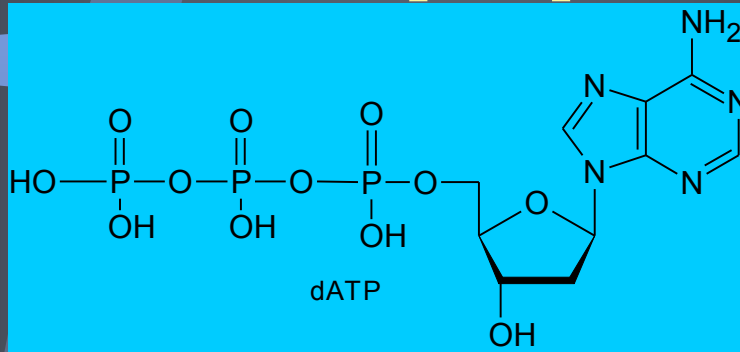
Substrats nécessaires

L'enzyme (*l'ADN polymérase ADN dépendante*) polymérise le **brin complémentaire** à partir du **brin à séquencer**.

Pour se faire, elle utilise comme substrats les quatre nucléotides triphosphates :

dATP

dGTP



dTTP

dCTP

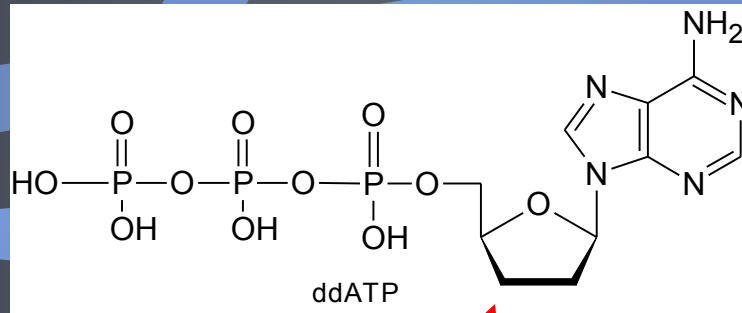
Ils assurent également l'apport d'énergie nécessaire à la synthèse

Conditions opératoires supplémentaires

On ajoute un pseudo-substrat qui bloquera l'élongation de cette polymérisation :

ddATP

ddTTP



ddGTP

ddCTP

Le 3'OH n'existe plus. Il est donc impossible de créer une liaison nucléotidique.

Les didésoxyribonucléotides s'insèrent à la place de leur homologue naturel ce qui bloque la synthèse du brin néoformé.

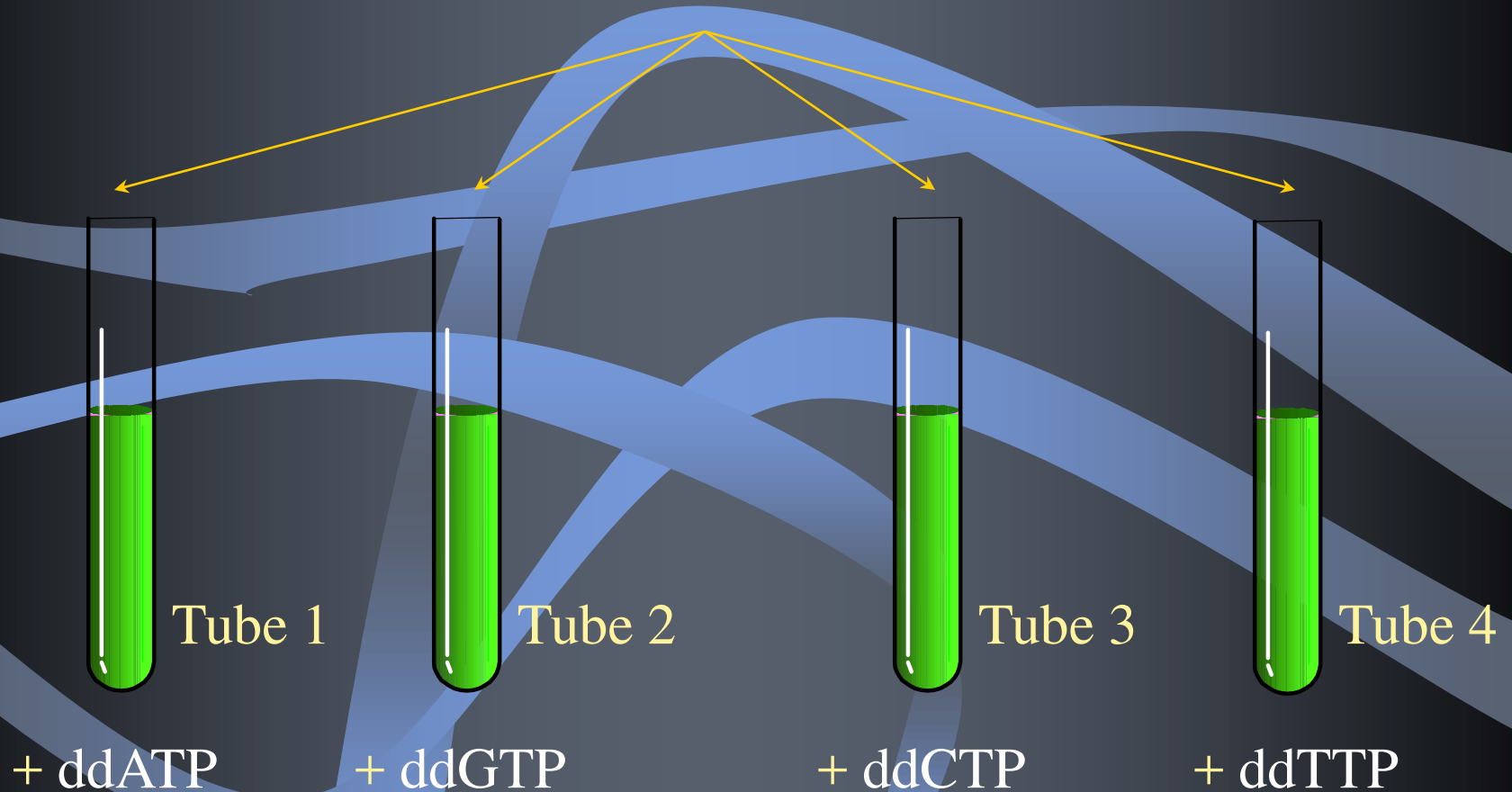
Justification des conditions opératoires supplémentaires

Pour séquencer,
on place le système de synthèse en présence
de l'un des quatre pseudo-substrats inhibiteurs.

On confronte les résultats dans ces quatre conditions
opératoires.

Fractionnement de l'échantillon

ADN + Amorce + Enzyme
+ dATP + dGTP + dCTP + dTTP



ATTENTION :

Le pseudo-substrat est ajouté en très faible quantité pour inhiber la synthèse d'une façon aléatoire.

Ainsi, statistiquement, on obtiendra toutes les fragments de brins complémentaires possibles.

ATTENTION :

Pour simplifier la notation, nous noterons :

A, G, C, T,

pour les désoxyribonucléotides (naturels)

et

dA, dG, dC, dT,

pour les didésoxyribonucléotides (inhibiteurs)

Exemple pour le tube 1 (ddATP) sans inhibition

P5'-A-A-G-T-C-T-C-A-C-C-T-G-A-C-domaine connu- 3'OH
H 3'-amorce radio marquée-5'³²P

Fragment synthétisé :

HO3'-T-T-C-A-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

Exemple pour le tube 1 (ddATP) avec inhibition

L'enzyme utilise de façon aléatoire le dATP ou le ddATP.

Ainsi la synthèse peut être bloquée ...

P5'-A-A-G-T-C-T-C-A-C-C-T-G-A-C-domaine connu- 3'OH
HO3'-T-T-C-A-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

↑
là

↑
là

↑
là

On obtient :

H3'-dA-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dA-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dA-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

Exemple pour le tube 1 (ddATP) bilan des synthèses possibles

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-dA-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G- dA-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G-A-G- dA-3'H

et

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T-3'OH (*synthèse normale*)

On réalise une PAGE suivie d'une autoradiographie.
Seuls les fragments radio marqués seront localisables
sur le gel. Ainsi on identifiera :

Les fragments les plus petits migreront les plus loin vers l'anode (+)

Pour ce cas on aura :

Néobrin complet $^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T}3'\text{OH}$

$^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-dA-}3'\text{H}$

$^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-A-G-G-T-G-dA-}3'\text{H}$

$^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-dA-}3'\text{H}$

ddATP
-
—
—
—
—
+



Exemple pour le tube 2 (ddGTP)

L'enzyme utilise de façon aléatoire le dGTP ou le ddGTP.

Ainsi la synthèse peut être bloquée ...

P5'-A-A-G-T-C-T-C-A-C-C-T-G-A-C-domaine connu- 3'OH
HO3'-T-T-C-A-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P



là



là



là



là



là

On obtient :

H3'-dG-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dG-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dG-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dG-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dG-amorce radio marquée-5'³²P

Exemple pour le tube 2 (ddGTP) bilan des synthèses possibles

$^{32}\text{P}5'$ -dG-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-dG-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-dG-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-dG-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G-A-dG-3'H

et

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T-3'OH (*synthèse normale*)

On réalise une PAGE suivie d'une autoradiographie.
Seuls les fragments radio marqués seront localisables
sur le gel. Ainsi on identifiera :

Les fragments les plus petits migreront les plus loin vers l'anode (+)

Pour ce cas on aura :

Néobrin complet

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T-3'OH

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G-A-dG-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-dG-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-dG-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-dG-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -dG-3'H

ddGTP
-
—
—
—
—
—
+



Bilan des deux co-migrations : tubes 1 (ddATP) et 2 (ddGTP)

Les deux électrophorèses sont
faites en parallèle

Néobrin complet ³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T-3'OH

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-dA-3'H

$$^{32}\text{P}5'\text{-G-T-C-A-G-G-T-G-A-dG-3'H}$$
$$^{32}\text{P}5'\text{-G-T-C-A-G-G-T-G-dA-3'H}$$
$$^{32}\text{P}5'\text{-G-T-C-A-G-G-T-dG-3'H}$$
$$^{32}\text{P}5'\text{-G-T-C-A-G-dG-3}'\text{H}$$
$$^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-A-dG}-3'\text{H}$$
$$^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-dA}-3'\text{H}$$
 $^{32}\text{P}5'-\text{dG}-3'\text{H}$

ddATP	ddGTP
-	-
+	+

Exemple pour le tube 3 (ddCTP)

L'enzyme utilise de façon aléatoire le dCTP ou le ddCTP.

Ainsi la synthèse peut être bloquée ...

P5'-A-A-G-T-C-T-C-A-C-C-T-G-A-C-domaine connu- 3'OH
HO3'-T-T-C-A-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

↑
là

↑
là

On obtient :

H3'-dC-A-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dC-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

Exemple pour le tube 3 (ddCTP) bilan des synthèses possibles

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-dC-3'H

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-dC-3'H

et

$^{32}\text{P}5'$ -G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T-3'OH (*synthèse normale*)

On réalise une PAGE suivie d'une autoradiographie.
Seuls les fragments radio marqués seront localisables
sur le gel. Ainsi on identifiera :

Les fragments les plus petits migreront les plus loin vers l'anode (+)

Pour ce cas on aura :

Néobrin complet

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T-3'(O)H

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-dC-3'H

³²P5'-G-T-dC-3'H

ddCTP
-
—
—
—
+



Bilan des trois co-migrations : tubes 1 (ddATP), 2 (ddGTP) et 3 (ddCTP)

Les trois électrophorèses sont
faites en parallèle

Néobrin
complet

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T-3'OH

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-dC-3'H

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-dA-3'H

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-dG-3'H

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-dA-3'H

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-dG-3'H

³²P5'-G-T-C-A-G-dG-3'H

³²P5'-G-T-C-A-dG-3'H

³²P5'-G-T-C-dA-3'H

³²P5'-G-T-dC-3'H

³²P5'-dG-3'□H

ddATP	ddGTP	ddCTP
-	-	-
_____	_____	_____

_____	_____	

	_____	_____

+	+	+

Exemple pour le tube 4 (ddTTP)

L'enzyme utilise de façon aléatoire le dTTP ou le ddTTP.

Ainsi la synthèse peut être bloquée ...

P5'-A-A-G-T-C-T-C-A-C-C-T-G-A-C-domaine connu- 3'OH
HO3'-T-T-C-A-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P



là là



là



là

On obtient :

H3'-dT-T-C-A-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dT-C-A-G-A-G-T-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dT-G-G-A-C-T-G-amorce radio marquée-5'³²P

H3'-dT-G-amorce radio marquée-5'³²P

Exemple pour le tube 3 (ddTTP) bilan des synthèses possibles

³²P5'-G-dT-3'H

³²P5'-G-T-C-A-G-G-dT-3'H

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-dT-3'H

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-dT-3'H (*synthèse normale*)

et/ou

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-T-3'OH (*synthèse normale*)

On réalise une PAGE suivie d'une autoradiographie.
Seuls les fragments radio marqués seront localisables
sur le gel. Ainsi on identifiera :

Les fragments les plus petits migreront les plus loin vers l'anode (+)

Pour ce cas on aura :

Néobrin complet

$^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T}(\text{d})\text{T-3}'(\text{O})\text{H}$

$^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-dT-3}'\text{H}$

Ce nucléotide
n'est pas
déterminable

$^{32}\text{P}5'-\text{G-T-C-A-G-G-dT-3}'\text{H}$

$^{32}\text{P}5'-\text{G-dT-3}'\text{H}$

ddTTP
-
—
—
—
+



Autoradiographie des quatre pistes de la PAGE

³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-X-3'(O)H
³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-dT-3'H
³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-dC-3'H
³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-dA-3'H
³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-dG-3'H
³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-dA-3'H
³²P5'-G-T-C-A-G-G-T-dG-3'H
³²P5'-G-T-C-A-G-G-dT-3'H
³²P5'-G-T-C-A-G-dG-3'H
³²P5'-G-T-C-A-dG-3'H
³²P5'-G-T-C-dA-3'H
³²P5'-G-T-dC-3'H
³²P5'-G-dT-3'H
³²P5'-dG-3'H

ddATP	ddGTP	ddCTP	ddTTP
-	-	-	-
—	—	—	—
			—
—		—	
—	—		
—	—		
	—		—
	—		
—	—		
		—	
	—		—
+	+	+	+

Lecture de la PAGE

ddATP	ddGTP	ddCTP	ddTTP
-	-	-	-
+	+	+	+

La séquence du brin
néoformé d'ADN se lie
horizontalement :

- de l'anode (+)

(correspondant au côté 5'P)

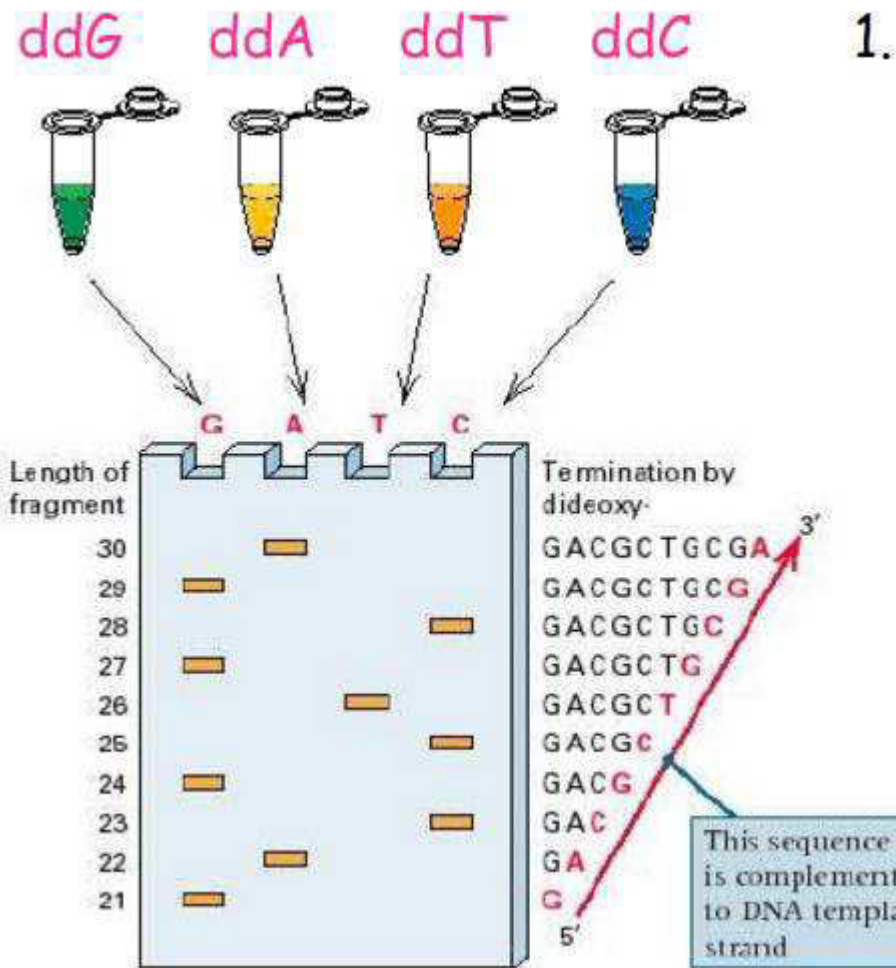
- vers la cathode (-)

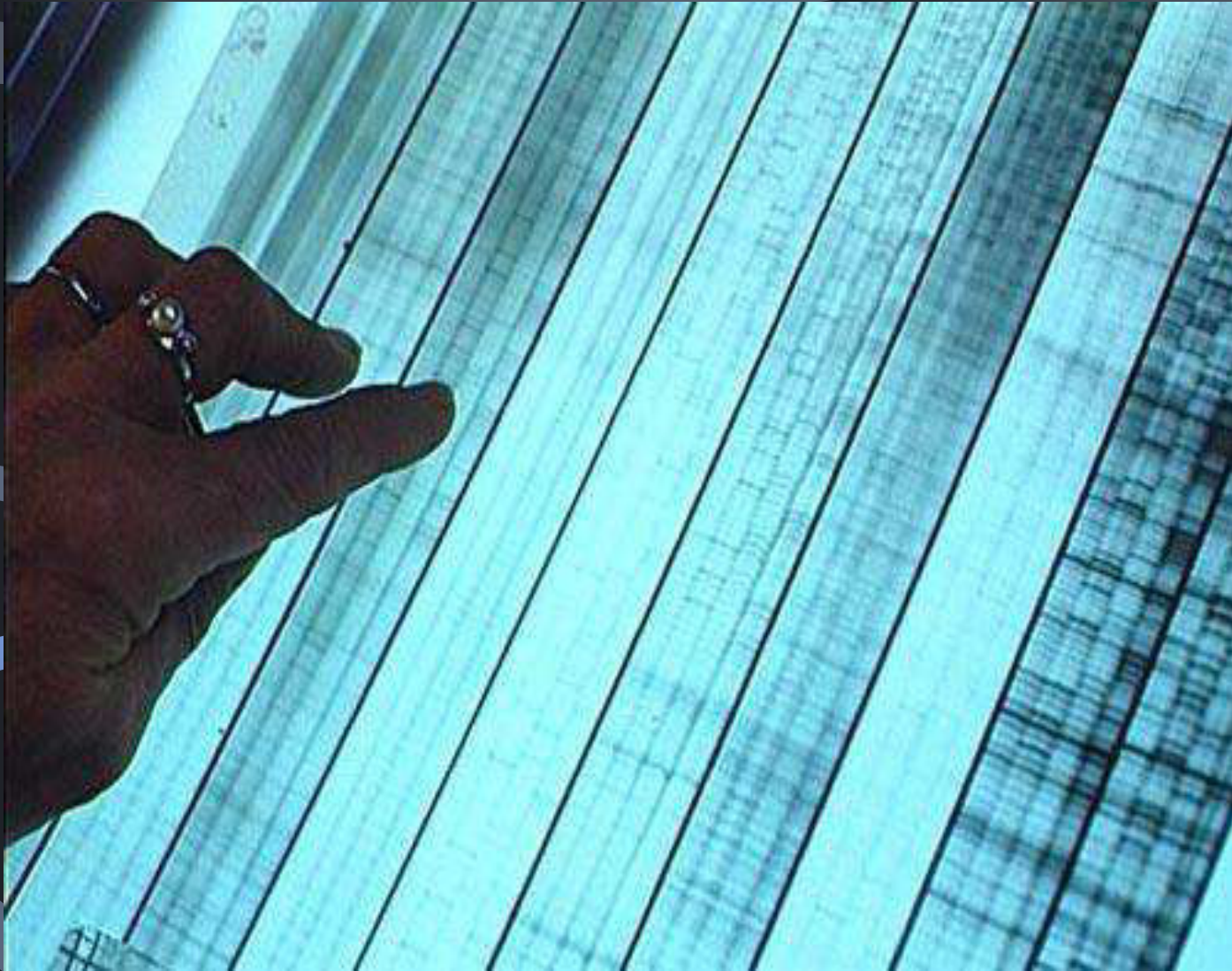
(correspondant au côté 3'OH)

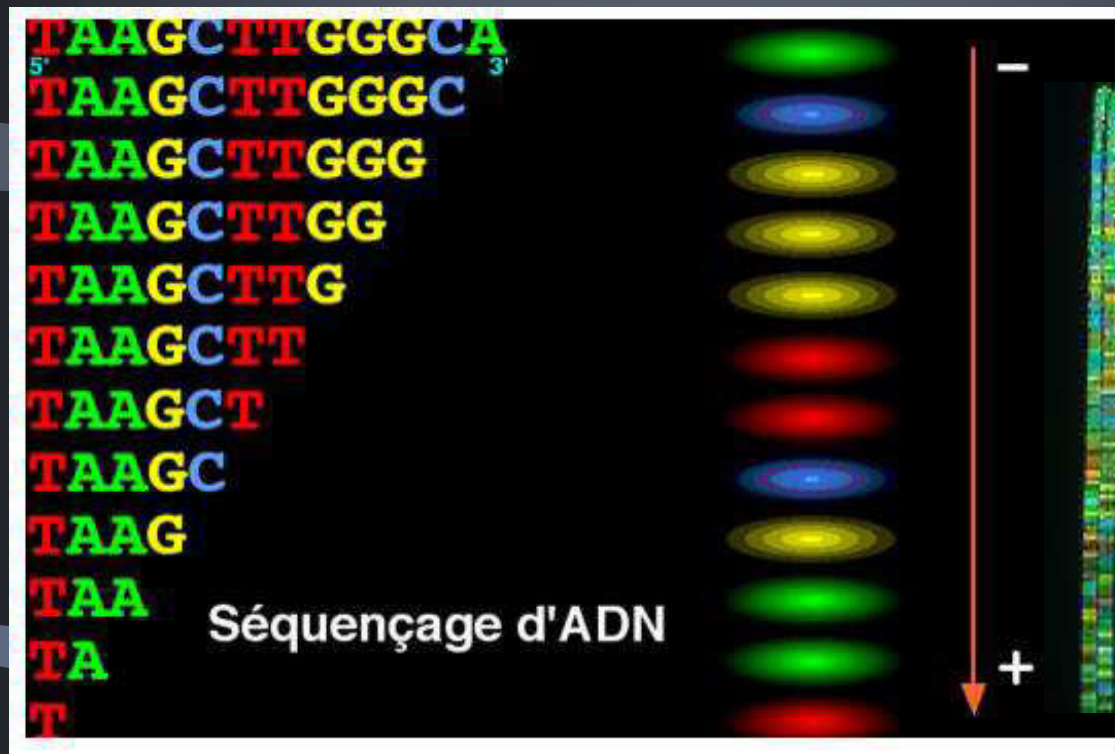
$$^{32}\text{P}5'\text{-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-T-X-3'OH}$$

Le brin à séquencer est donc:

P5'-X-A-G-T-C-T-C-A-C-C-T-
G-A-C-3'OH







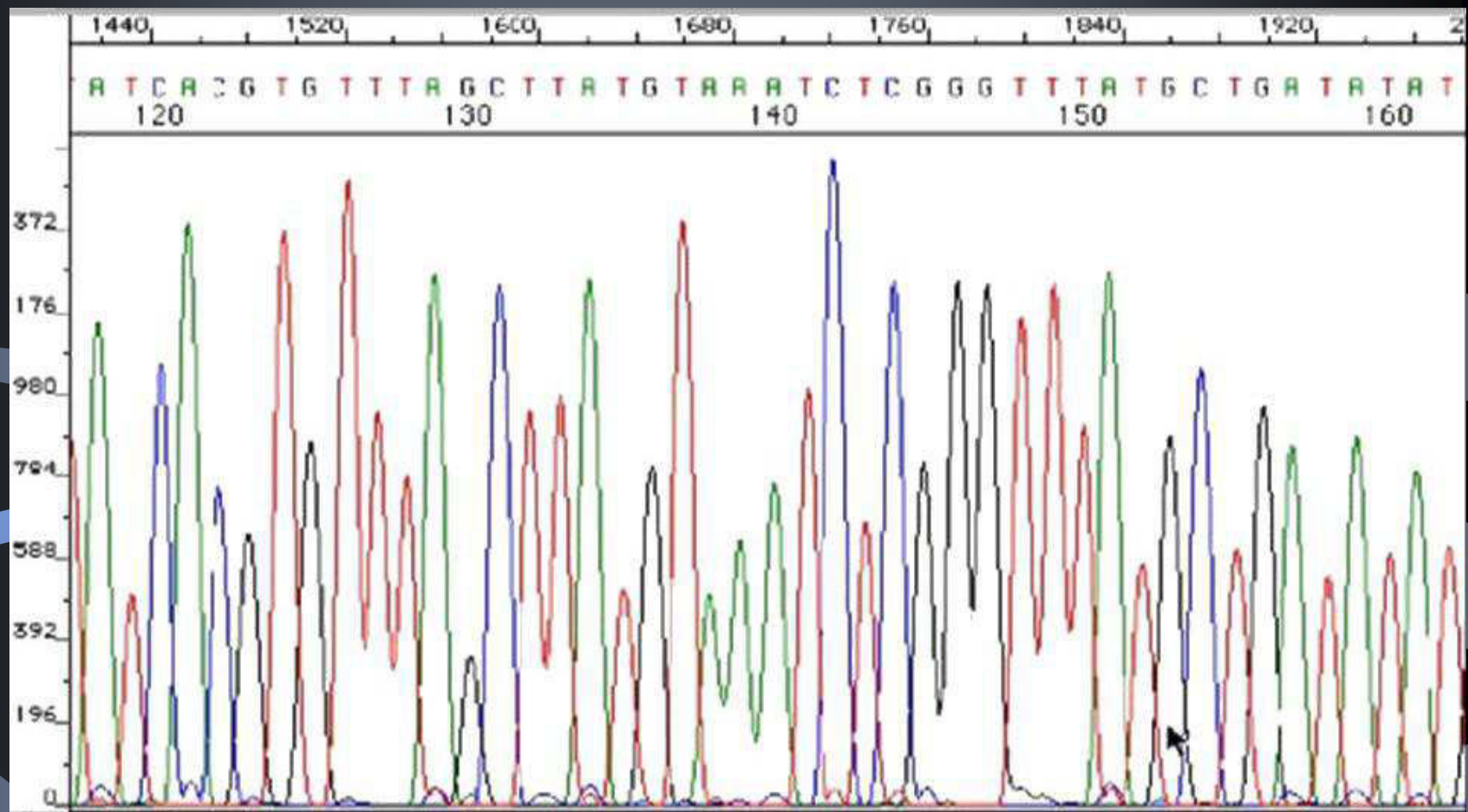
➤ Les didésoxynucléotides incorporés en dernier sont marqués spécifiquement par des molécules.

➤ On sépare ensuite les fragments synthétisés dans un champ électrique (électrophorèse : les ADN sont des anions, ils vont donc vers le pôle +), en fonction de leur longueur (les plus petits vont plus vite).

➤ On lit ensuite les taches successives, identifiées par leur couleur, ce qui révèle la séquence des fragments synthétisés.

Automatisation de la méthode :

- Ajout sur les ddNTP de fluorochrome de différentes couleurs.
- 1 seul tube regroupant les ddNTP.
- Lecture par un laser des fragments qui migrent sur le gel.
- Stockage des données dans la mémoire de l'ordinateur.



Technique chimique de Maxam et de Gilbert

La méthode chimique de Maxam et de Gilbert est moins utilisée actuellement que la méthode enzymatique de Sanger. L'ADN à séquencer est tout d'abord marqué en 5' avec phosphore 32 (dATP), puis clivé après A, G, C ou T par divers réactifs chimiques. Après clivage par ces réactifs, les fragments produits sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. L'examen de l'autoradiographie correspondante permet de connaître la séquence du brin analysé.

