



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

Hybridation moléculaire et sondes

[www.facebook.com/DomaineSNV/](http://www.facebook.com/DomaineSNV/)

*Responsable de module M: HAMDOUCHE*



# 1- Définitions

## ❖ hybridation moléculaire

**Association de 2 simples brins d'ADN  
par formation de liaisons H entre ces  
deux brins.**

**ADN-ADN**

**ADN-ARN**





## 1- Définitions

### ❖ Sondes nucléiques

**Séquence d'acides nucléiques (au moins 15 nucléotides) marquée que l'on utilise pour détecter des séquences homologues (complémentaires)**

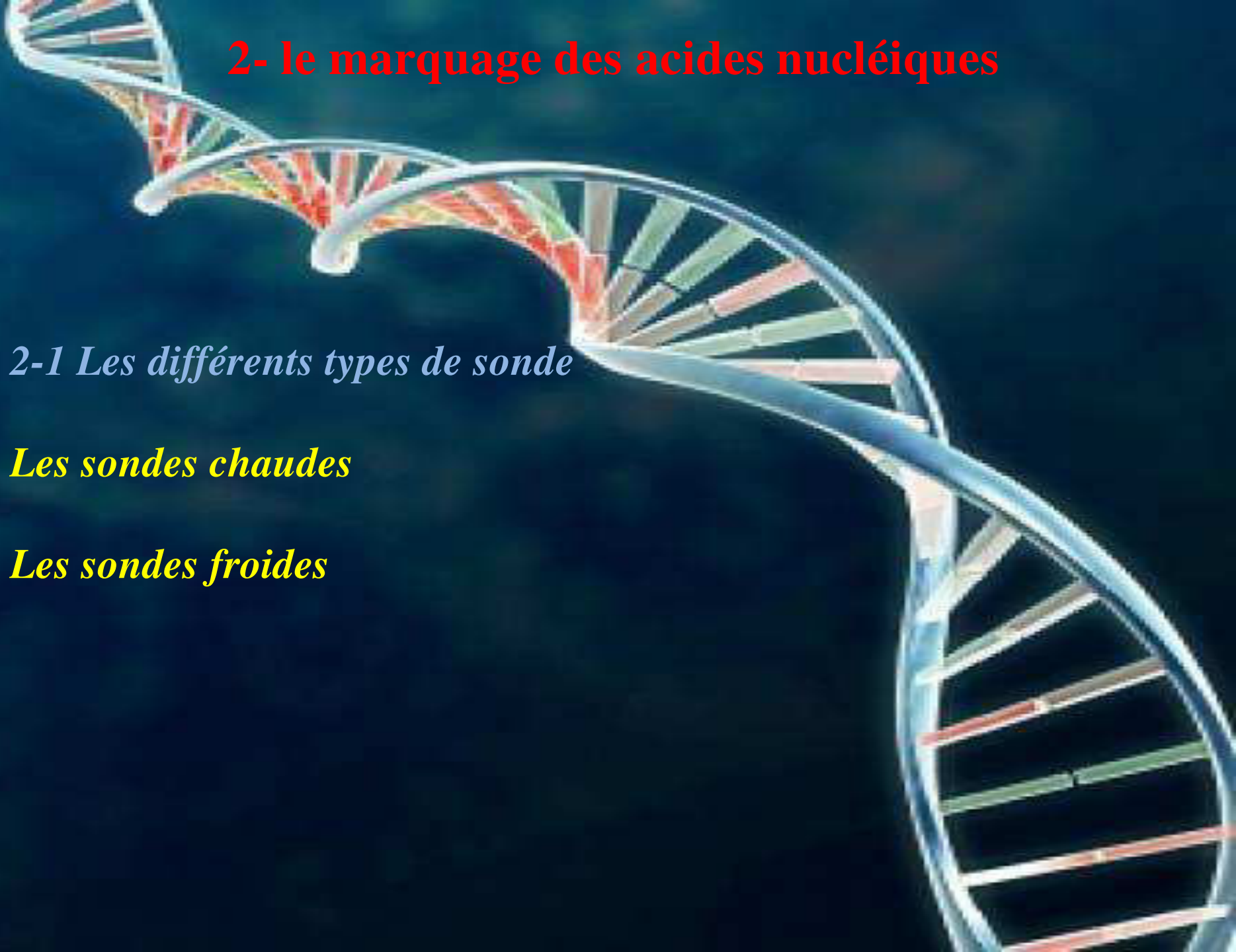


## 2- le marquage des acides nucléiques

### *2-1 Les différents types de sonde*

*Les sondes chaudes*

*Les sondes froides*







## Les sondes chaudes

*Marquage radioactif*

Marquées par les isotopes radioactifs

Isotope

$^{32}\text{P}$   $\beta$ -

$^{35}\text{S}$ ,  $\beta$ -

$^{14}\text{C}$ ,  $\beta$ -

$^3\text{H}$ ,  $\beta$ -





## Sondes froides

*Marquage non radioactif*

*Marquage à la Biotine*

*Marquage à la digoxigénine*





### 3- Les différentes techniques de marquage :

*Marquage interne*

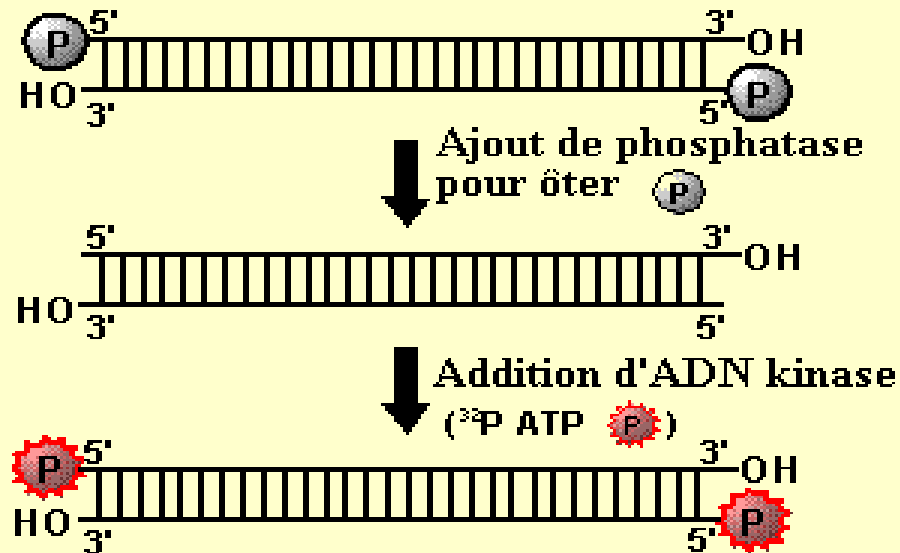
*Marquage externe*



## Marquage externe : Aux extrémités

### 1. en 5' par substitution du phosphate

#### Marquage terminal à la kinase

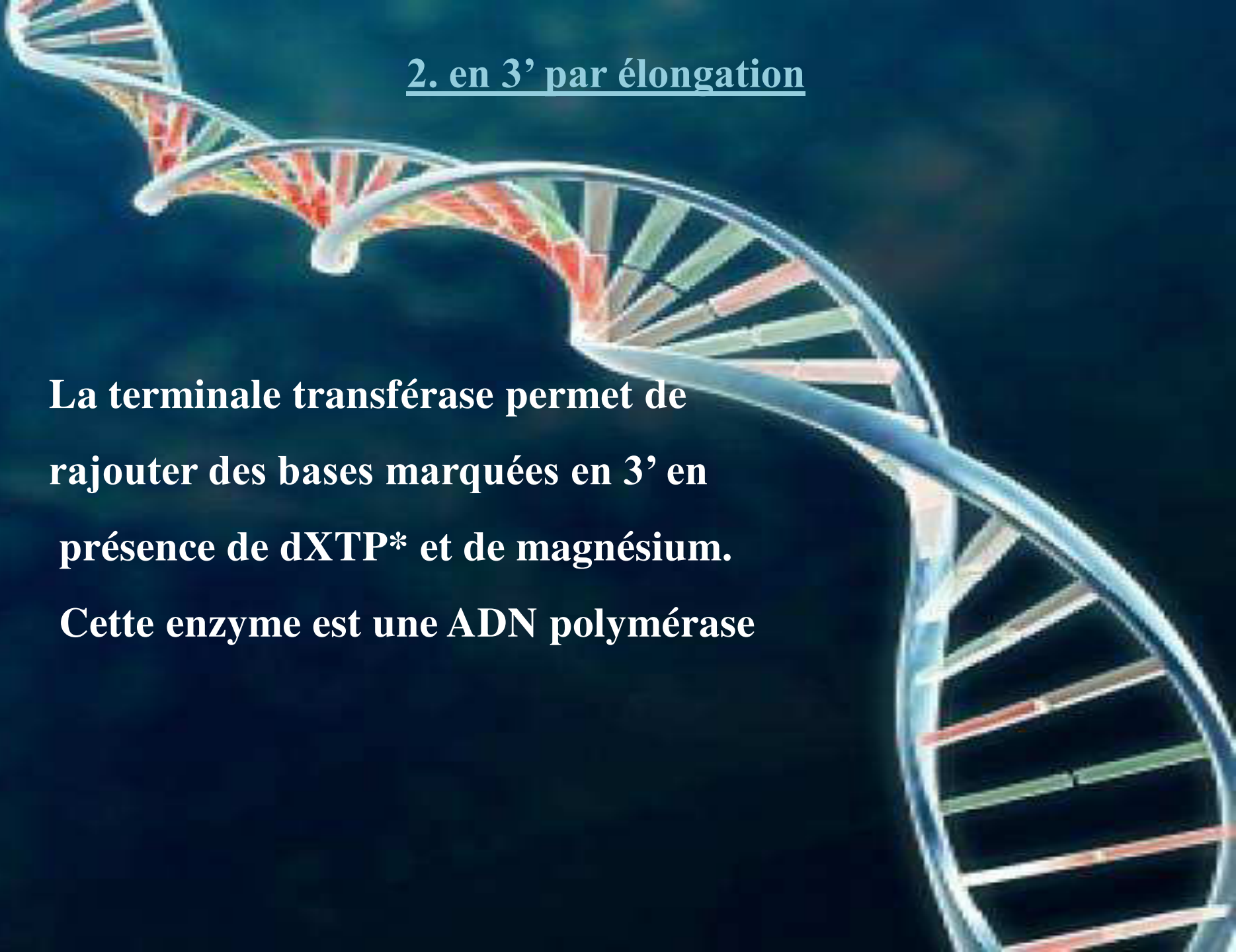


La subst  
un P32 s  
enzymes  
de magn  
en 5 ' d  
permet  
Radioac



## 2. en 3' par élongation

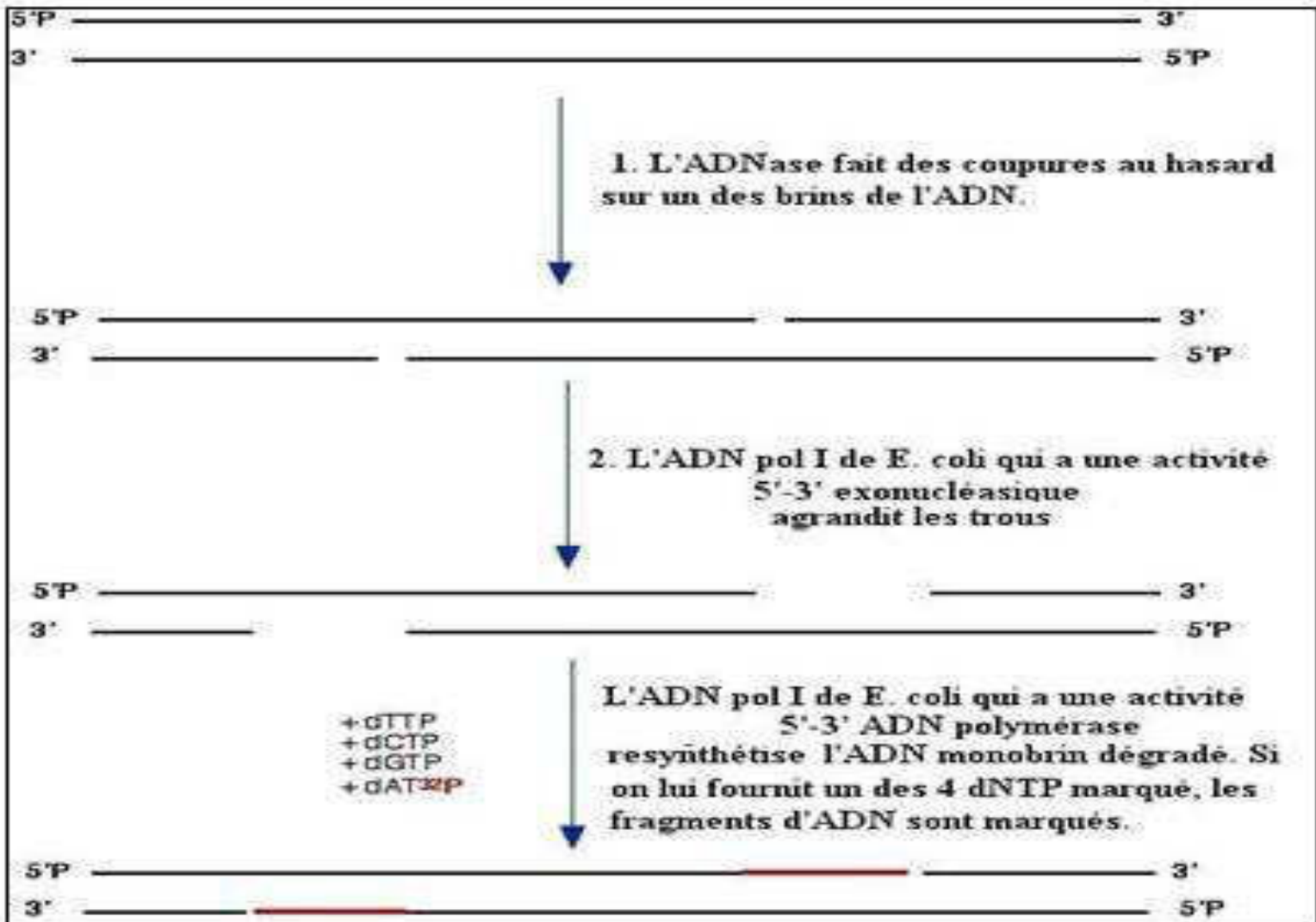
**La terminale transférase permet de  
rajouter des bases marquées en 3' en  
présence de dXTP\* et de magnésium.  
Cette enzyme est une ADN polymérase**





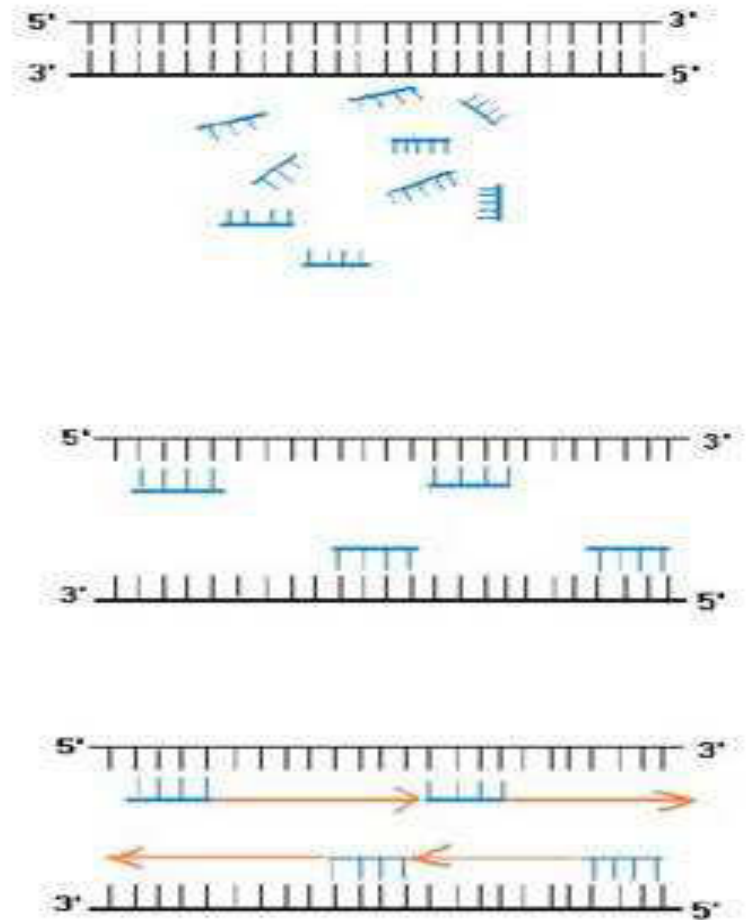
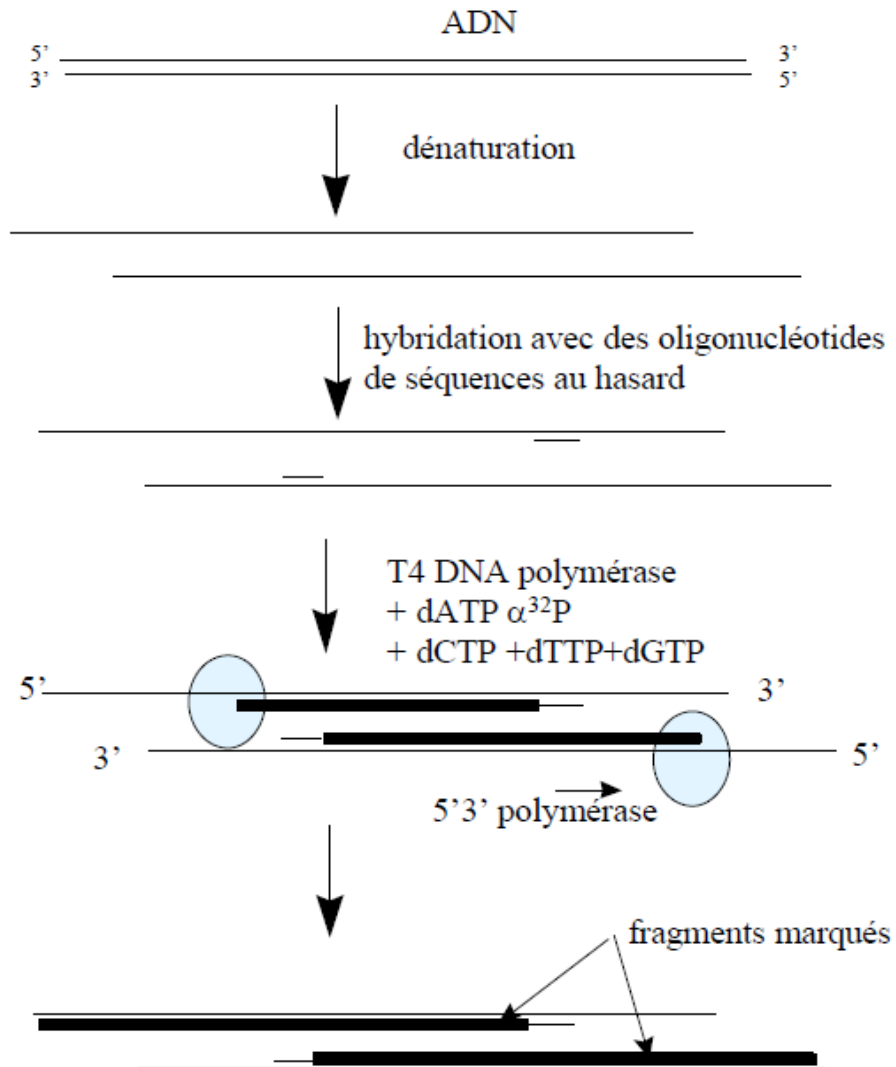
# Marquage interne

## 1- « nick translation » déplacement de coupure





# « random priming » amorçage au hasard.

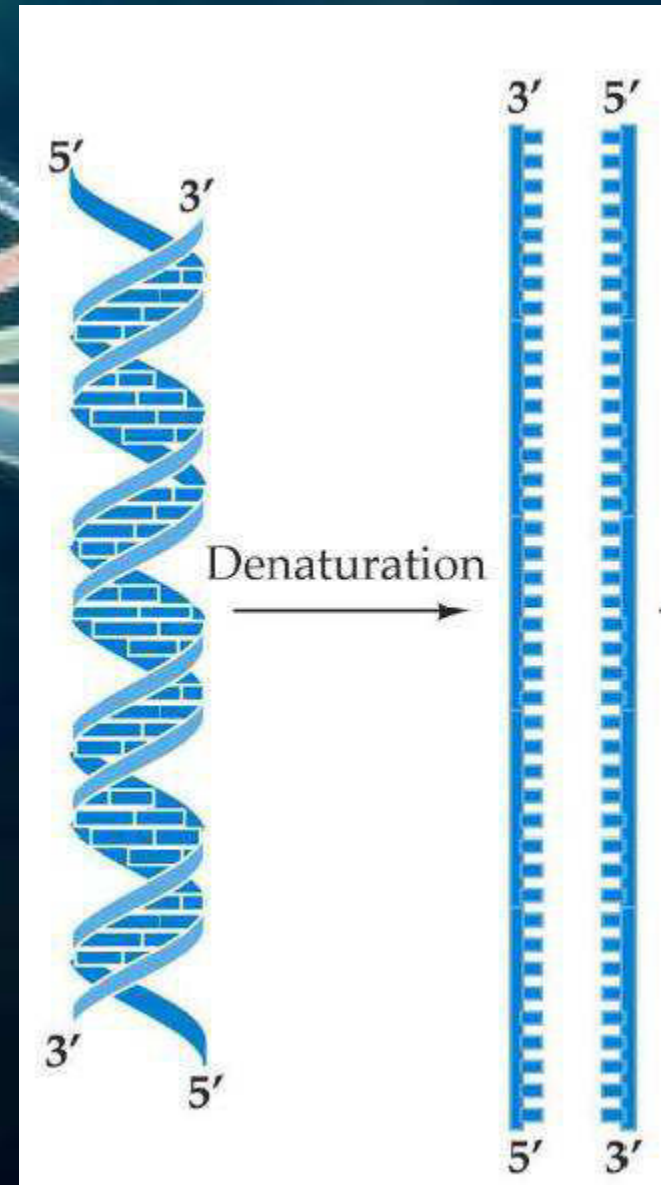




## hybridation

### Dénaturation:

*on peut rompre les liaisons hydrogènes entre bases appariées d'une molécules d'ADN bicaténaire en chauffant la molécule ou en manipulant les conditions de milieu , cette séparation est appelée dénaturation ou fusion de l'ADN*







## *Température de fusion*

T<sub>m</sub> défini comme la température où 50% des brins sont dénaturés

*Le T<sub>m</sub> dépend de deux facteurs principaux :*

- *du nombre de liaisons hydrogènes*
- *La composition du milieu.*





*Le nombre de liaisons hydrogène lui-même dépend :*

- ❑ la longueur du fragment : le  $T_m$  augmente avec la longueur
- ❑ de la composition en bases : l'augmentation de la proportion en GC augmente le  $T_m$ .
- ❑ de la présence de mésappariements : Les mésappariements abaissent le  $T_m$ , puisque au niveau du mésappariement, il n'y a pas de liaison hydrogène.





## *La composition du milieu.*

- ❑ la force ionique. L'augmentation de la concentration en cations monovalents tel que le NaCl joue sur le  $T_m$ .
- ❑ Certains composés tels que la formamide ou l'urée abaissent le  $T_m$ .
- ❑ le pH est aussi important. Aux pH extrêmes, l'ADN est dénaturé. A température ambiante, on utilise souvent le NaOH pour dénaturer l'ADN.





## *Calcul du $T_m$*

Pour les fragments de plus d'un kilobase (kb) on utilise

- Si on utilise un agent dénaturant, abaissant le  $T_m$  tel que la formamide. On utilise l'équation suivante

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 41 (G+C) - 500/L - 0,62 F$$

F représente la concentration molaire en formamide.





## *Hybridation*

L'hybridation correspond à l'association de deux brins d'acide nucléiques complémentaires.

La dénaturation est réversible.

Quand la température est abaissée progressivement jusqu'au point de fusion ( $T_m$ ) température inférieure au  $T_m$ , les molécules peuvent s'hybrider selon la règle de complémentarité des bases.





➤Hybridation en phase liquide

➤Hybridation sur support solide