

LES SONDES

I - Définition

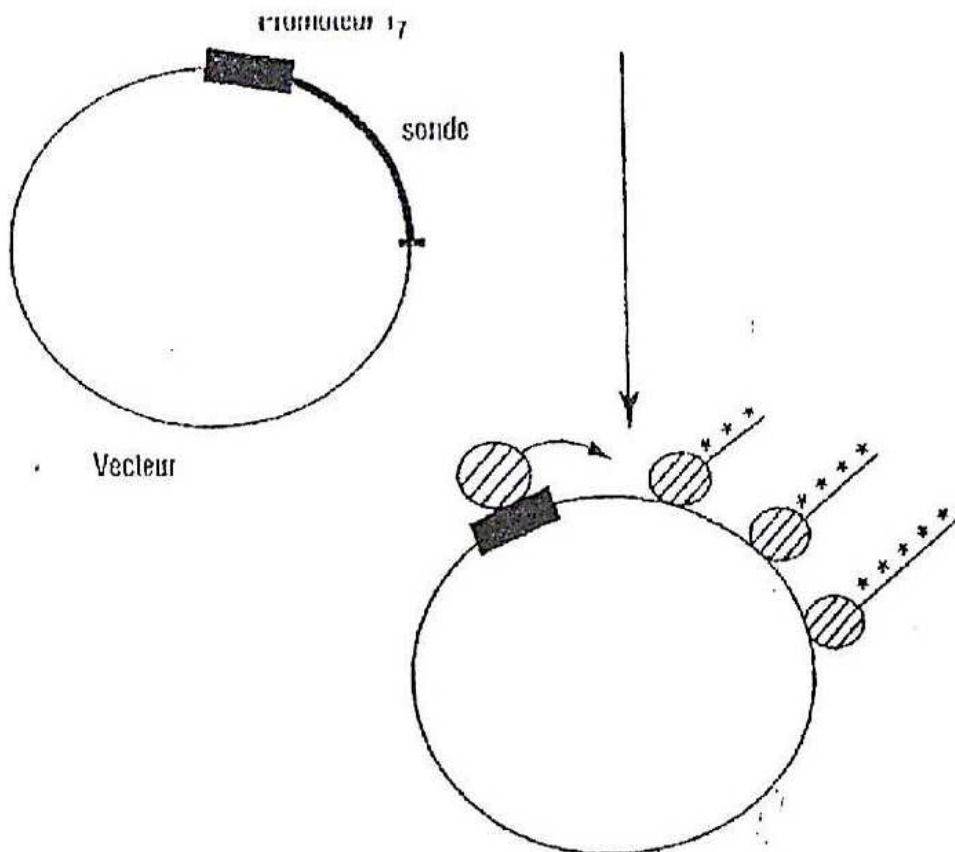
- * **Sonde** : Séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence d'ADN ou d'ARN avec laquelle elle va s'hybrider.
- * **Sondes directes** : exploration d'un gène ou d'une région génique dont on a déjà quelques informations.
- * **Sondes indirectes ou sondes anonymes** : exploration de gènes peu ou pas connus

II - Les différents types de sondes

- les sondes ADN génomique
- les sondes cDNA
- les oligosondes
- les ribosondes

III- Obtention des sondes

- clonage
- PCR



IV – Marquage des sondes

1 - l'agent de marquage :

- marquage radioactif
- marquage froid
- direct – nucléotide modifié par un fluorophore
- indirect – nucléotide marqué par un reporter qui sera repéré par une molécule affine

2 – stratégies de marquage

- nick translation
- multi-amorçage au hasard
- marquage des oligonucléotides

❖ Les sondes radioactives

^{32}P , ^{35}S , ^3H

Attention : les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

1. nécessité de se protéger contre le rayonnement émis, maniement des sondes inconfortable
2. décroissance rapide du ^{32}P , d'où besoin de marquer les sondes fréquemment

Avantage : grande sensibilité

❖ Les sondes froides

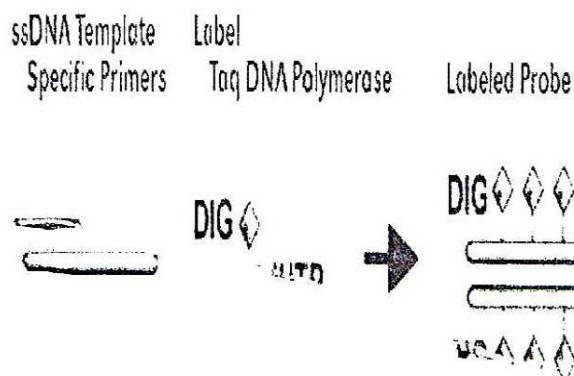
Marquage direct avec un fluorophore

Le nucléotide portant le marqueur est incorporé directement.

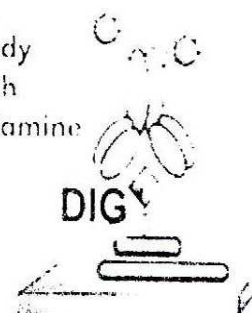
Groupe chimique qui fluoresce quand il est exposé à une longueur d'onde donnée: Fluoresceine, Cy5, Cy3, Rhodamine, Texas red, TAMRA, TET.

❖ Marquage indirect

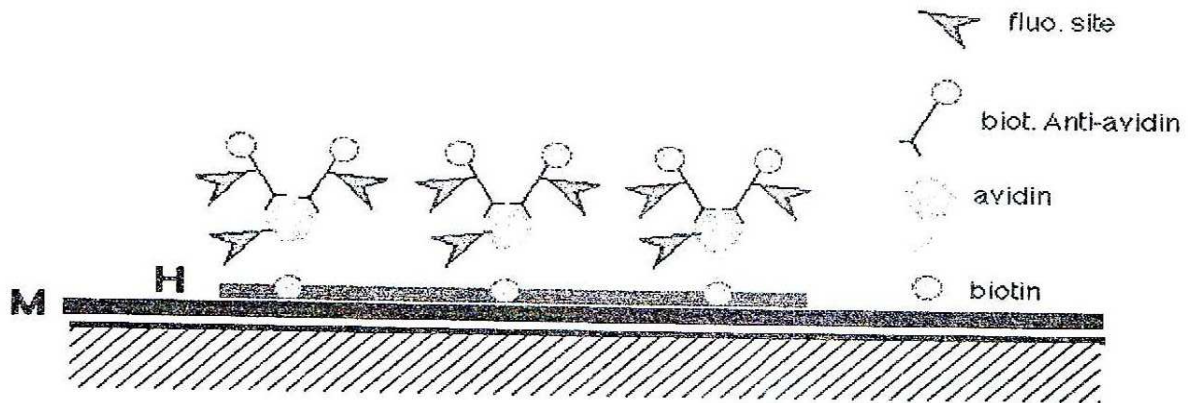
- digoxigénine



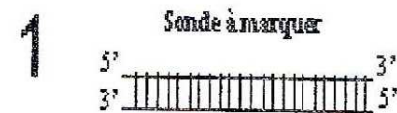
DIG specific antibody conjugated e.g. with fluorescein or rhodamine



- marquage par la biotine-streptavidine.



Marquage par Nick-translation

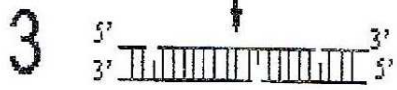


+ DNase



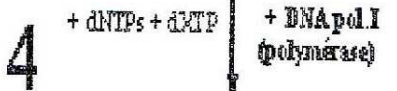
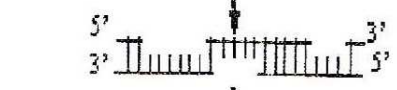
Cette endonucléase est employée dans des conditions ménagées

DNase génère quelques cassures (nicks) aléatoires simple brin



+ DNAPol. I

Au niveau des cassures la DNA polymérase I détruit l'ADN par son activité exonucléasique (5'-3')...

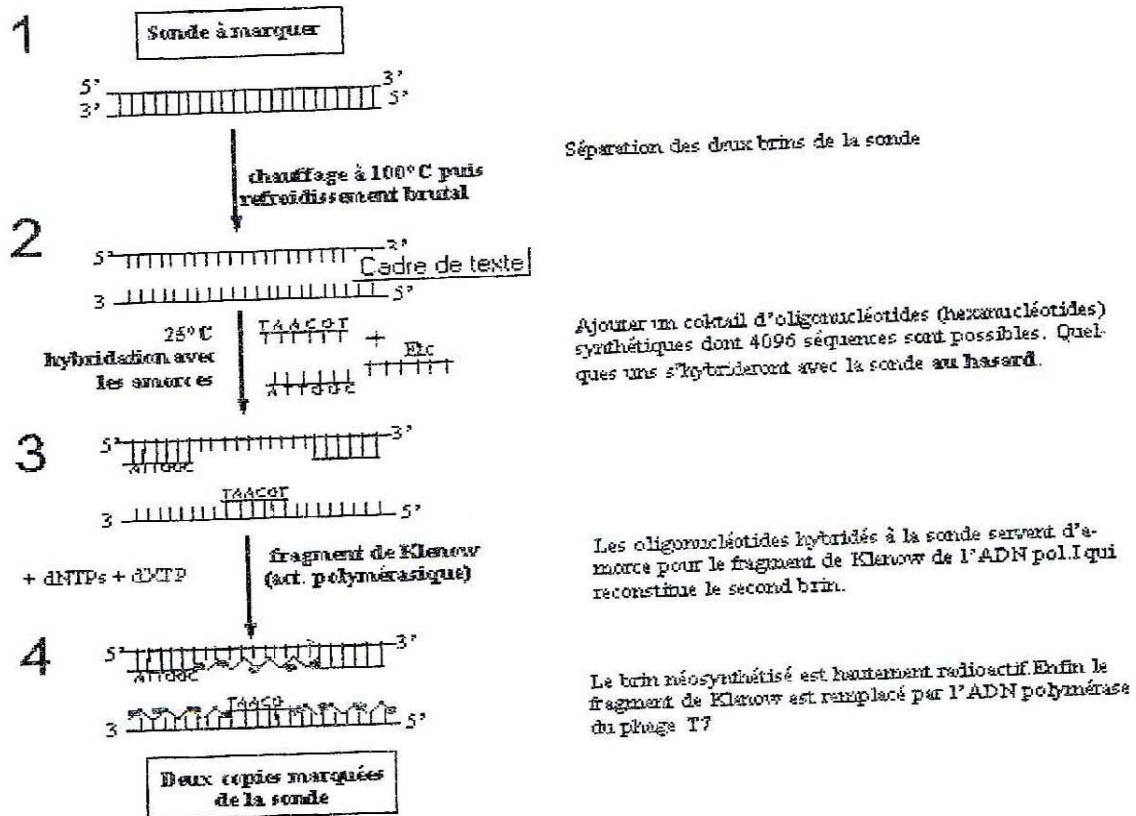


...et le resynthétise par son activité polymérase en présence d'un nucléotide chaud entre autres.

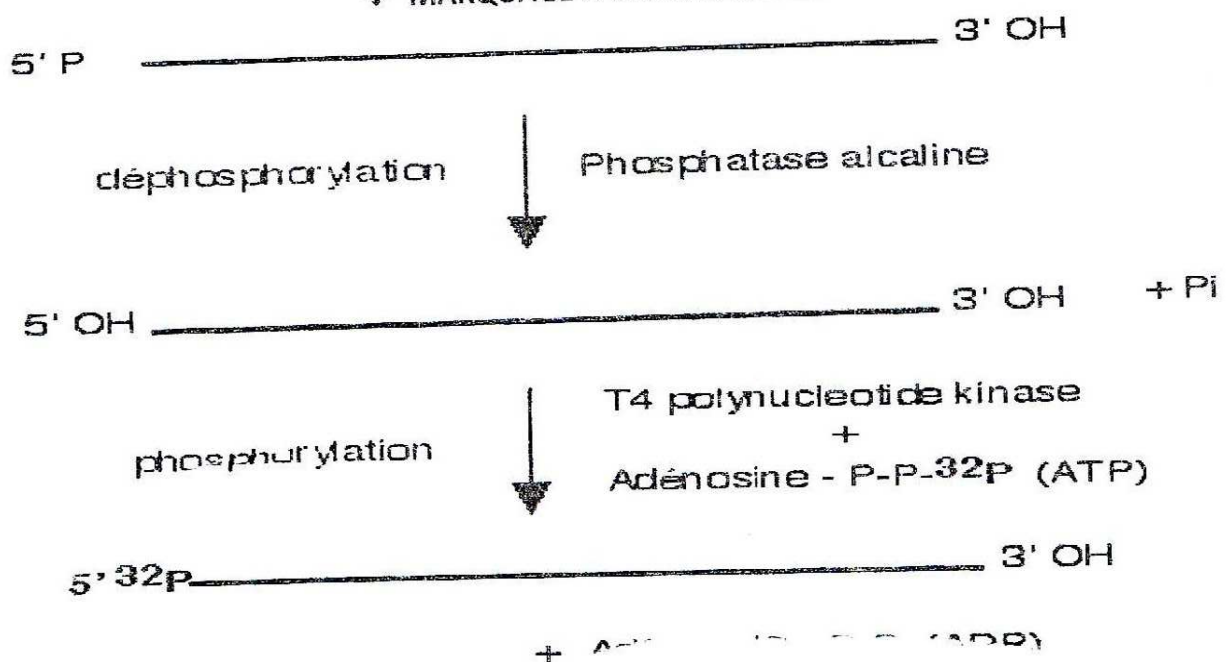


Sonde radioactive

Marquage par random priming



❖ MARQUAGE D'UN OLIGONUCLEOTIDE



Différentes Applications

- Hybridation ADN/ADN ou ARN/ADN sur membrane
- Sondes oligonucléotides
- Séquençage
- Hybridation in situ

❖ **Hybridation après électrophorèse**

SOUTHERN BLOT : cible ADN et sonde ADN

NORTHERN BLOT: cible ARN et sonde ADN

**WESTERN BLOT : cible protéine (antigène) et sonde protéine
(anticorps)**