

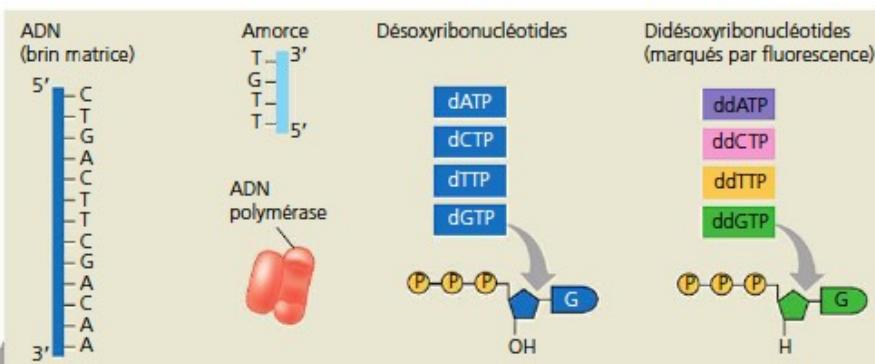
▼ Figure 20.12 MÉTHODE DE RECHERCHE

Le séquençage de l'ADN par la méthode de terminaison de chaîne par un didésoxyribonucléotide

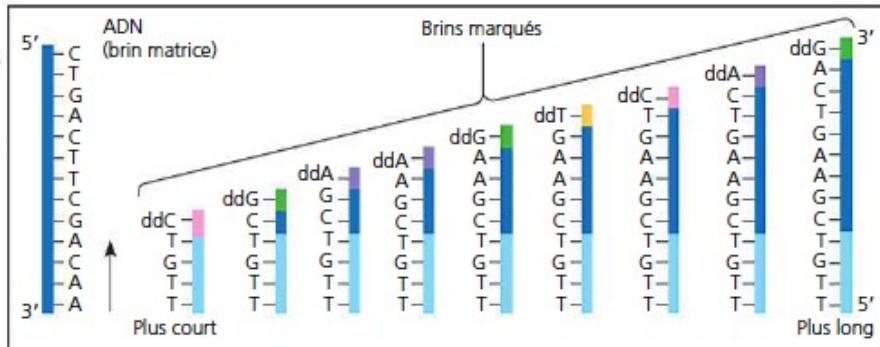
APPLICATION Grâce à des appareils spécialisés qui effectuent les réactions de séquençage et séparent les produits marqués selon la longueur, on peut déterminer rapidement la séquence des nucléotides dans un fragment d'ADN cloné pouvant comporter entre 800 et 1 000 paires de bases.

TECHNIQUE Cette méthode consiste à synthétiser un ensemble de brins d'ADN complémentaires au fragment d'ADN original. Chaque brin débute par la même amorce et se termine avec un didésoxyribonucléotide (ddNTP), c'est-à-dire un nucléotide modifié. L'incorporation d'un ddNTP met fin à un brin d'ADN en croissance, parce qu'il lui manque le groupement 3' —OH qui rendrait possible l'insertion du nucléotide suivant (voir la figure 16.14, p. 364). Dans l'ensemble de brins synthétisés, la position de chaque nucléotide sur la séquence initiale est représentée par des brins qui se terminent à ce point par le ddNTP complémentaire. Comme chaque type de ddNTP porte un marqueur fluorescent distinct, on peut déterminer l'identité des nucléotides de terminaison des nouveaux brins et, finalement, la séquence originale entière.

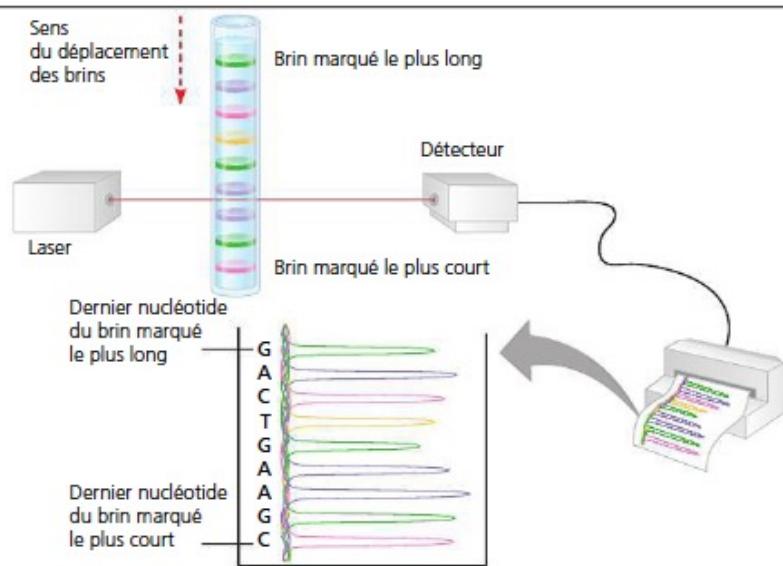
1 Le fragment d'ADN à séquencer est dénaturé en brins simples et incubé dans une éprouvette avec les ingrédients nécessaires pour la synthèse de l'ADN : une amorce conçue pour se lier par des liaisons hydrogène à l'extrémité 3' connue du brin matrice, l'ADN polymérase, les quatre désoxyribonucléotides et les quatre didésoxyribonucléotides, chacun étant marqué avec une molécule fluorescente différente.



2 La synthèse des nouveaux brins commence à l'extrémité 3' de l'amorce et se poursuit jusqu'à l'insertion du didésoxyribonucléotide, de façon aléatoire, à la place du nucléotide normal équivalent. L'insertion du didésoxyribonucléotide empêche la poursuite de l'élongation du brin, alors que celle du nucléotide normal la permet. Finalement, on obtient un ensemble de brins marqués, de longueurs différentes. La couleur du marqueur représente le dernier nucléotide dans la séquence.



3 Les brins d'ADN marqués dans le mélange sont séparés par passage sur un gel de polyacrylamide ; les brins plus courts se déplacent plus vite. Pour le séquençage de l'ADN, le gel est placé dans un tube capillaire plutôt que sur une plaque comme celle illustrée à la figure 20.9. La petite taille du tube permet à un détecteur de fluorescence de reconnaître la couleur de chaque marqueur fluorescent à mesure que les brins traversent le gel. On peut distinguer l'un de l'autre des brins dont la longueur ne diffère que d'un seul nucléotide.



RÉSULTATS La couleur du marqueur fluorescent sur chaque brin indique la nature du nucléotide à son extrémité. Il est possible d'imprimer les résultats sous forme de spectrogramme ; la séquence, qui est complémentaire au brin matrice, peut être lue de bas en haut (du brin le plus court vers le brin le plus long). (Remarquez que la séquence commence après l'amorce.)