

M1 Biotechnologies
TP Détermination d'empreintes génomiques
Février mars 2006

- **Analyse du locus HUMTH01 –**
- **Détermination du sexe –**
- **Analyse du promoteur de RhoB -**

A/ Microsatellites et le Locus HUMTH01

Les microsatellites ou STR (short tandem repeats) sont des séquences d'ADN hautement répétées en tandem, présentes dans les parties non codante du génome, dont le nombre de répétition s'avère être très variable selon les individus. Ce sont des séquences de 2 à 5 bases, présentes par dizaines de milliers dans tout le génome.

L'analyse des microsatellites par PCR est une technique très sensible qui permet de travailler sur des échantillons comprenant des petites quantités d'ADN (soit obtenu à partir de quelques cellules, bulbe pileux, ou trace de sang) ou dont l'ADN est dégradé.

Le nombre de répétitions et donc par conséquent la taille du segment d'ADN correspondant variera d'un individu à un autre non apparenté. L'utilisation de différents systèmes, amplifiant plusieurs STR ou microsatellites grâce à des amorces de PCR marquées par des molécules fluorescentes différentes, permettra de différencier des individus. (FBI utilise 13 STR) La probabilité de coïncidence entre deux profils d'ADN devient négligeable et est de l'ordre de 10^{-9} .

Le locus HUMTH01 est un motif de 4 bases (TCAT) $_n$ localisé à l'intérieur de l'intron 1 du gène codant pour la tyrosine hydroxylase, localisé au niveau du chromosome 11 (11p15.5-p15). Il est généralement répété de 5 à 10 fois, donnant 6 allèles différents. (cf annexe)

B/ Détermination du sexe

La détermination du sexe par PCR, comme pour l'analyse des microsatellites peut se faire à partir d'échantillon contenant des petites quantités d'ADN. Les cellules diploïdes provenant d'individus femelles contiennent deux copies du chromosome X (XX), tandis que celles provenant d'individus males contiennent normalement un chromosome X et un chromosome Y (XY).

Afin de déterminer le sexe par PCR, les primers ont été choisis de manière à amplifier des produits différents par la taille à partir du chromosome X et du chromosome Y. Le premier oligonucléotide amorce (primer XY) a été choisi de façon à s'hybrider avec la partie commune aux deux chromosomes X ou Y. Le deuxième primer (oligoX) a été choisi de manière à être spécifique du chromosome X (ref genbank HUMZFX). Le troisième oligonucléotide est lui choisi de manière à être spécifique du chromosome Y (ref genbank HUMZFY). La réaction PCR sera réalisée en mélangeant les

trois nucléotides. L'amplification de l'ADN correspondant au chromosome X donnera un fragment de 488 paires de bases, et celle de l'ADN correspondant au chromosome Y donnera un fragment de 340 paires de bases.

C/ Analyse du polymorphisme du promoteur de RhoB

Nous avons cloné au laboratoire le promoteur de la GTPase RhoB, et nous avons mis en évidence la présence de séquences répétées en tandem ou VNTR qui influencent l'activité transcriptionnelle de ce promoteur. Ce VNTR consiste en la répétition de 34bp à la position -1124 par rapport au site d'initiation de la transcription (d'après Tovar et coll., Genomics 2003).

(5'-**TTCTATTGTACA**ATAGTGTATATT**CTATTGTACA**-3')

Des expériences de PCR avec des oligos correspondant aux séquences d'ADN encadrant la région du VNTR utilisant de l'ADN génomique extrait de lymphocytes ou de cellules en culture donnent 4 tailles de fragments correspondant aux allèles portant de 8 à 11 répétitions.

C/ Organisation de la séance de TP

matin

- Extraction d'ADN génomique à partir de cellules bucales
- Préparation des gels d'électrophorèse 0,8% agarose
- Vérification du taux d'ADN génomique obtenu sur gel d'agarose
- Estimation de la quantité d'ADN extrait
- PCR

après midi

- Préparation des gels d'électrophorèse acrylamide et agarose
- Migration
- Analyse sur gel d'électrophorèse des amplifications

D/ Manipulation

Extraction d'ADN génomique à partir de cellules bucales (kit Qiagen)

Suivre les indications données dans le protocole donné en annexe.

Faire deux éluions dans deux tubes différents avec de l'eau stérile(100µl), pour récupérer une quantité maximale d'ADN. Déposer 5µl de chaque élution (ajustée avec le tampon de dépôt à la dilution adéquate) sur un gel d'agarose 0,8% dans du TAE 0,5x, afin de choisir l'élution utilisée pour la PCR

PCR

Pour chaque échantillon d'ADN 3 réactions de PCR sont effectuées (1 pour amplification du locus HUMTH01, 1 pour la détermination du sexe, 1 pour l'analyse du promoteur de RhoB). La Taq polymérase utilisée, est commercialisée dans son Tampon 5x «prêt à

l'emploi qui contient tous les composants nécessaires pour réaliser une PCR. Les amorces spécifiques sont ajoutées au moment de l'utilisation.

Préparation des tubes de PCR

	HUMTHO1	SEXE	RHOB
Mix Oligo	5	5	5
H2O qsp 50µl			
Taq and go	10	10	10
ADN	2 ou 5	2ou 5	2 ou 5

Préparer le mix, Vortexer, Centrifuger (pulse)

Mettre dans le thermocycler

Lancer le programme MICRO 5min 94°C puis 30 cycles de 1min à 94°C, 1min à 53°C, 1 min à 72°C suivi de 10 min à 72°C et stockage à 4°C

Analyse des fragments amplifiés par PCR

Préparer les échantillons à déposer en mélangeant dans de nouveaux tubes 10µl des produits de la PCR, et 2 µl de tampon de dépôt

1- Pour SEXE et RHOB sur gel d'agarose

2- Pour le locus HUMTHO1 sur gel de polyacrylamide

Monter les plaques de verre soigneusement nettoyées à l'alcool, avec les espaceurs, le joint jaune et les pinces. Mettre des gants (l'acrylamide est un neurotoxique)

Mélanger 4ml de TBE 5X, 4ml d'acrylamide 40%, 12 ml d'eau

Ajouter les catalyseurs de polymérisation 100µl de persulfate, et 20µl de TEMED

Couler immédiatement entre les plaques sans faire de bulles et mettre le peigne

Laisser polymériser

Ajouter dans les réservoirs supérieurs et inférieur du TBE 1X. Après dépôt des échantillons, la migration est faite pendant 30 min à 110 Volts

Dans les trois cas les gels sont colorés par un bain de bromure d'éthidium

Quelques questions à se poser....

Extraction de l'ADN

- Concernant le kit que vous avez utilisé, d'après vous que contiennent les différentes solutions utilisées lors des différentes étapes, sachant que la première étape est une lyse cellulaire, et la deuxième une purification par affinité de l'ADN ?
- Après migration sur gel, vous pouvez visualiser l'ADN que vous avez extrait, la bande obtenue correspond-elle à la taille attendue ? Est ce gênant pour la suite de la manipulation ?

Analyse des PCR

- Retrouver sur la séquence disponible sur GenBank, le fragment PCR qui sera amplifié, et les répétitions du locus HUMTHO1. Calculez la taille des différentes possibilités d'amplification.
- De même calculez les tailles que l'on pourra obtenir pour RhoB.
- Lors des réactions PCR il serait nécessaire de réaliser des témoins négatifs, lesquels sont ils ?

Analyse des résultats

- Quel est le profil de l'ADN que vous avez extrait par rapport à HUMThO1, par rapport à RhoB et par rapport au sexe? Comparer vos pistes par rapport à celles de vos collègues. Peut on réellement conclure sur le polymorphisme de l'ADN dans les conditions utilisées en TP.

Annexes

A/ locus HUMTHO1

1) Séquences des oligonucléotides utilisés pour la PCR

sens = 5' attcaaagggtatctgggctctgg 3'

antisens = 5' gtgggctgaaaagctcccgattat 3'

2) Données disponibles sur GenBank, concernant le locus HUMTHO1

```
LOCUS          HUMTH01          2838 bp      DNA          PRI          05-OCT-2000
DEFINITION     Homo sapiens gene for tyrosine hydroxylase, partial cds.
ACCESSION      D00269
VERSION        D00269.1  GI:220099
KEYWORDS       TH; tyrosine hydroxylase; alternative splicing.
SOURCE         Homo sapiens placenta DNA, clone:gHTH-E20.
  ORGANISM     Homo sapiens
                Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
                Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE      1 (sites)
  AUTHORS      O'Malley,K.L., Anhalt,M.J., Martin,B.M., Kelsoe,J.R., Winfield,S.L.
                and Ginns,E.I.
  TITLE        Isolation and characterization of the human tyrosine hydroxylase
                gene: identification of 5' alternative splice sites responsible for
                multiple mRNAs
  JOURNAL      Biochemistry 26, 6910-6914 (1987)
```

(.../...)

```
intron          591..1523
                /number=1
intron          603..1523
                /number=1
exon            1524..1604
                /note="alternative use (inclusion/exclusion)"
                /number=2
                /product="tyrosine hydroxylase"
intron          1605..2420
                /number=2
conflict        1614
                /citation=[1]
                /replace="t"
exon            2421..2642
                /number=3
```

```

conflict      /product="tyrosine hydroxylase"
              2426
              /citation=[1]
              /replace="c"
intron       2643..>2838
              /number=3

```

```

BASE COUNT   486 a    911 c    889 g    552 t
ORIGIN

```

```

 1 gtctacgaga cacacggcct ggaatcttct ggagaagcaa acaaattgcc tcctgacatc
61 tgaggctgga ggctggattc cccgtcttgg ggctttctgg gtcgggtctgc cagcaggttc
121 tgggtttcat taaaagtgtg cccctgggct gccagaaagc ccctccctgt gtgctctctt
181 gagggtgtg gggccaaggg gaccctggct gtctcagccc cccgcagagc acgagccctt
241 ggtccccgca agcccgcggg ctgaggatga ttcagacagg gctggggagt gaaggcaatt
301 agattccacg gacgagccct ttctcctgcg cctccctcct tcctcaccca ccccgcctc
361 catcaggcac agcaggcagg ggtgggggat gtaaggaggg gaagggtggg gaccagagg
421 gggctttgac gtcagctcag cttataagag gctgctgggc cagggctgtg gagacggagc
481 cggacctcc aactgagcc atgcccacc cgcagccac cagccacag gccaagggtt
541 tccgcagggc cgtgtctgag ctggacgcca agcaggcaga ggccatcatg gtaagagggc
601 aggtaggtgc ccggcgccg cagtggaccg gagcccaggg ctggtgccag ctgcctctgc
661 tactccccag cctggctggc agccccaggc tcagggcca tgcaaaccct tgggacgagg
721 cgtggatgtg gaggcctggg cacagcggca tcccctgtgc ctggtgtttg agtctctgtg
781 ggggaggtg aggtgatgcc tgtccctgtg tgtgcccctc ttaggccgac ctctctcggg
841 ggtcgtgtgg gtctctgtgt cttgtttcat cttgaatctt aacgatcggg atgtggaaac
901 aatccatcc aaaaaatcca agatggccag aggtccccgg ctgctgcacc cagccccac
961 cctactcca cctgcccctg cctccctctg ccccagctgc cctagtcagc accccaacca
1021 gctgctctgc ttggggaggg agcccccaagg cccttcccag gctctagcag cagctcatgg
1081 tgggggggtcc tgggcaataa gggggcaaaa ttaaaagggg atctgggctc tgggggtgatt
1141 cccattggcc tgttcctccc ttatctccct cattcattca ttcattcatt cattcattca
1201 ttcattcacc atggagtctg tgttccctgt gacctgcact cgggaagccct gtgtacaggg
1261 gactgtgtgg gccaggctgg ataatcggga gcttttcagc ccacaggagg ggtcttcggg
1321 gcctccttgg gcactcagaa ccttgggctc cctggcacat ttaaaatggg tttttattta
1381 tggaccttga ttgaaatgtg gtgtgagttg tagcagtgtc atttccaggt accttctcag
1441 ggacacaggg cgccctcccc cgtcctcccc cgcctcccc taccctcccc caccaggctc
1501 cccatcaggc atccccctcc cagggcgccc cggggcccag cctcacaggc tctccgtggc
1561 ctggaactgc agccccagct gcatcctaca cccccacccc aagggttaagt aagaggggac
1621 tctgggaggg gcttctgctg ctccccctca tgttccacaa ccctggaagc tcaggatgaa
1681 gctgattctt ctcttacaag gggcccagag ccttcttggg agttcagctc caagggatga
1741 gccccagggt tctgccaagt cccctctgt ccaggcctgg gacggctctg ggatcgaggg
1801 gtcagagggc ctgagcccag ggagagacac ctgcccag agctatgaca aagggtggag
1861 ggatgacaag gcagccagga gcgggcgctt gcgggggtgg acagaggggc agggcccag
1921 gacaggtgtc ctgatgggag tgtgagaaag ggtcccctgt gcggcagcca ggagggtagg
1981 ggggtgttca ctggggccct gtgggggcag ctccttctct agctgccgtt ccctccccgg
2041 cagccgatgc cactgtccat caagacatcg cctcttccc atcactaatc cagttagcgc
2101 ctggcctggg gatgagtgac acagcgtctc tgtctgtctg ctcgccacag agtgggagca

```

B/ Analyse du promoteur de RhoB (d'après Tovar et coll., Genomics 2003)

FIGURE 1A

```

-1765 agcattcggggttaattccccacagtcatttactgatccttgtaaagcca
-1715 ggcatttgctgggtcttcaagatgctggagataagacagaatcctggccc
-1665 tccaacaactgcagagaccgagacagagacggagacaggaggcaaccac
-1615 ctccccggtcatgtgggtgggtccctccttctgtgaaaaaacagtttgaga
-1565 catttcccatgcaatggatagacagagcccagcccagcctgtgtaataactt
-1515 tagcactcatgagccccagcatatgcagctcctagagtttgccccgctcc
-1465 ttcccaccttctgtctgtgttcaggctgtttctcctgcccgggagccct
-1415 ccccgactcccctttcccctatccccttcttctcttttatccgtagaa
-1365 atcgggtgacttgggtctttccggatcaccggtactgtcatttcatgcag
-1315 gatctacaggataaatgagttcagtcctgggtgtgcatcaggaggctacgc
-1265 cccaatagagggggacaccccctaaccgctgtgccccatttgcagcccc
                                     NheI
-1215 ttactcctcccctcttctccagcctcaagccttttcgtctgctcaggggt
-1165 ctgggggtgggtggattctattgaaccgggaatattgtaca
-1124 ttctattgtacaatagtgatattctattgtaca Repeat 1
-1090 ttctattgtacaatagtgatattctattgtaca Repeat 2
-1056 ttctattgtacaatagtgatattctattgtaca Repeat 3
-1022 ttctattgtacaatagtgatattctattgtaca Repeat 4
-988 ttctattgtacaatagtgatattctattgtaca Repeat 5
-954 ttctattgtacaatagtgatattctattgtaca Repeat 6
-922 ttctattgtacaa--gtgtatattctattgtaca Repeat 7
-888 ttctattgtacaatagtgatattctattgtaca Repeat 8
-854 ttctattgtacaatagtgatattctattgtaca Repeat 9
-820 attta
-815 tctcagacagttctctgttttaagaacgggatcagagttcatagtaaa
-765 agaggggcccgaaggggcttcttctctgtccggttaacttctccaagtgttc
-715 tcgagcctcgaccttcccctttccggtgtcaagctgggcccactccgcacc
                                     HindIII
-665 tcttcccctaatcttcacctagagacctaaagctgggggttgggaaggta
-615 gggggcggcgggacttgggaagagccagtttgcagccagccggtcgctctc
-565 ggggtccaaaccgagggctggcccacggcgagtaccgggtggggccctaa
-515 accacaggaggggcccactccaaaagaaaagagaaaactctgtgttgg
-465 gaacaaaagtgtgtgtgtgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtt
-415 tttaaaaacaaaaccacgttaaagagctgccctccccacagggccga
-365 ccaccgcccggagtttggcaggaagaggggcaattctggatgggagtcg
-315 ccaacgcccactgagtgaaagcctgtctcggaaccgctcgccagaccct
-265 ggaggtccagacagccagctcccggaccccgcggcgaacagctgcggcg
-215 aagggagggaccggtaccgcccagagccccgagcggcagcagcagcgc
                                     Asp718
-165 agactccccggctcgtgcctctcccagcccggcggcctgggcccgtcaatc
-115 aagctggccctgccccgcccctcgggctgcagggggcgccaatcagagct
-65 aagctcccgcagcagatgagctcagcccggctggttcccattggacggctat
                                     SacI
                                     ; +1
-15 attagaaagtggccggactctttaaatagcgggctagggccgagcc
+36 ctcatctgccaccgcagctcgttggagctgtgtcttgtatgctcagcg
+86 aggcccggagagaccgggagagagctaggcccagctccaccgcccagctc
+136 tgtctcccagcccggcttacgcacaagccgcccagatccccggcctgggg
+186 tgagcagagcgaaccacggcccgggagcagcggcgagacgcacggtgcg
+236 ccctatgcccccgcccacccgcccccgcccggcagccgaagcgcag
+286 cgagagaacgcgccaccgcccgggcccgggtgcagctagcgaacctctcgc
+336 cacctgcgcgagcccaggtgagcagtgagcggcagcgggagggcagc
+386 gaggcgttcgcgggcccctcctgctgcccgggcccggcccgcctc ATG
                                     M
+434 GCG GCC ATC CGC AAG AAG CTG GTG GTG GTG GGC GAC...
      A A I R K K L V V V G D

```

La position des amorces PCR est indiquée par les cadres clairs dans les régions -1215 et – 815. Les Cadres grisés correspondent aux amorces qui ont été utilisés pour amplifier cette partie du promoteur de RhoB

QIAGEN Supplementary Protocol: Isolation of genomic DNA from saliva and mouthwash using the QIAamp® DNA Blood Mini Kit; spin procedure

Please refer to the *QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook* carefully before beginning this procedure.

Important notes before starting

- Ensure that Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN® Protease have been prepared according to the *QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 70°C.
- All centrifugations are carried out at room temperature.

Procedure

1. Collect 1 ml saliva by spitting in a 50 ml Falcon® tube. Or collect mouthwash in a 50 ml Falcon tube.

Note: Ensure that the person providing the sample has not consumed any food or drink in the 30 min prior to sample collection.

2. Add 4 ml PBS (not provided) to the sample and centrifuge at 1800 x g for 5 min.

3. Carefully decant the supernatant. Resuspend the pellet in 180 µl PBS. QIAamp Spin Columns copurify RNA and DNA in parallel when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not the PCR itself. If RNA-free genomic DNA is required, 20 µl of an RNase A stock solution (20 mg/ml) should be added to the sample prior to the addition of QIAGEN Protease and Buffer AL.

4. Add 20 µl QIAGEN Protease and 200 µl Buffer AL to the sample. Mix immediately by vortexing for 15 s. In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed immediately and thoroughly.

Note: Do not add QIAGEN Protease directly to Buffer AL.

5. Incubate at 56°C for 10 min.

6. Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by vortexing.

7. Place a QIAamp Spin Column in a 2 ml collection tube (provided). Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Spin Column without moistening the rim, close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Spin Column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate. Do not wet the rim of the QIAamp Spin Column, and seal each spin column in order to avoid

8. Carefully open the QIAamp Spin Column and add 500 µl of Buffer AW1. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Spin Column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

9. Carefully open the QIAamp Spin Column and add 500 µl of Buffer AW2. Centrifuge at full speed for 3 min.

The full-speed spin removes all traces of Buffer AW2 from the QIAamp Spin Column before elution. Note: Residual ethanol in the eluate may inhibit PCR and can cause false-negative results.

10. Place the QIAamp Spin Column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

11. Carefully open the QIAamp Spin Column. Elute the DNA with 150 µl of Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

For higher final DNA concentrations (e.g., for RFLP applications), first elute the DNA with 100 µl Buffer AE and then use this 100 µl eluate for a second elution step. For long term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at –20°C is recommended.

This procedure typically yields samples of 5–15 µg DNA with A_{260}/A_{280} ratios of 1.7–1.9.