(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 678 639**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **91 08294**

(51) Int Cl[5] : C 12 Q 1/68

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt** : 03.07.91.

(30) **Priorité** :

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** 08.01.93 Bulletin 93/01.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :** *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *RHONE-POULENC RORER (S.A.)* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** Dumas Milne Edwards Jean-Baptiste et Mallet Jacques.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire :** Rhône-Poulenc Rorer S.A. Direction Brevets.

(54) Procédé de clonage d'acides nucléiques.

(57) L'invention concerne un procédé de clonage d'acides nucléiques comprenant une étape de ligature, à l'extrémité 3' d'un produit d'extension d'amorce, d'un oligonucléotide simple brin, non complémentaire dudit produit d'extension d'amorce, et une étape de synthèse du deuxième brin en utilisant une amorce complémentaire dudit oligonucléotide, éventuellement suivie de réactions d'amplification.

FR 2 678 639 - A1

La présente invention concerne le domaine de la biologie moléculaire. Plus particulièrement, elle concerne un procédé de clonage d'acides nucléiques, une trousse pour sa mise en oeuvre, et ses applications.

L'un des enjeux de la biologie moléculaire réside dans l'étude et la caractérisation des acides nucléiques constituant le patrimoine génétique de chaque cellule (ADN) ou des intermédiaires obligés de la synthèse protéique (ARN). L'isolement et l'immortalisation de ces molécules au sein d'hôtes procaryotes ou eucaryotes (autrement appelé le clonage) constitue donc une étape clé dans l'approche moléculaire de la physiologie cellulaire.

Les techniques de clonage connues font généralement appel à une succession d'étapes classiques. Il s'agit en premier lieu d'extraire les ARN d'une cellule (ARN totaux ou ARN messagers). Ensuite, compte tenu du fait que ces molécules sont rapidement dégradées, il est nécéssaire de réaliser leur rétrotranscription en ADN complémentaires simple brin (ADNc-sb) plus stables. Les molécules simple brin ainsi obtenues sont appelées produits d'extension d'amorce. Enfin, l'ADN *in vivo* étant une molécule bicaténaire, il est nécéssaire, pour incorporer l'ADNc-sb à un vecteur de clonage (plasmide, cosmide, phage ..), de transformer la molécule monocaténaire en une molécule bicaténaire : ADN complémentaire double brin (ADNc-db). Cette dernière étape consiste à synthétiser un brin complémentaire d'ADN en se basant sur le brin matrice que constitue l'ADNc-sb. Elle est réalisée au moyen d'enzymes (ADN polymérases), qui sont capables de recopier un brin matrice, en allant de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Toutefois, ces enzymes ont besoin d'une amorce pour débuter la synthèse du nouveau brin. Selon les techniques de l'art antérieur, cet amorçage peut être obtenu de plusieurs façons :

Tout d'abord, par auto-amorçage. En effet, pour des raisons qui ne sont pas encore élucidées, une structure en épingle à cheveux se forme fréquemment à l'extrémité 3' de la molécule d'ADNc-sb. Cette structure peut être utilisée pour amorcer la néosynthèse du brin complémentaire de l'ADNc-db.

L'amorçage peut également être réalisé grace à des fragments de l'ARN initial. En effet, l'étape de rétrotranscription de l'ARN extrait génère des hétéroduplex ADNc-sb/ARN, qui sont normalement convertis en ADNc-sb par digestion par l'ARNase H. Cependant, selon les conditions choisies, cette digestion peut n'être que partielle, et la néosynthèse du deuxième brin peut alors être amorcée au niveau des fragments d'ARN persistants.

L'amorçage peut enfin être obtenu après addition d'une queue homopolymérique à l'extrémité 3' de l'ADNc-sb. Dans ce cas, la synthèse du deuxième brin est amorcée avec un oligonucléotide consistant en un homopolymère complémentaire de celui ajouté à l'ADNc-sb.

Toutefois, les techniques décrites ci-dessus présentent certains inconvénients, qui limitent leurs applications. Notamment, les étapes d'amorçage ne peuvent pas toujours être correctement contrôlées, et la spécificité de l'appariement de l'amorce, spécialement dans le cas d'une amorce homopolymérique, est limitée, générant un bruit de fond non négligeable. Par ailleurs, les clones obtenus avec des ADNc-db amorcés à l'aide d'épingles à cheveux ou de fragments d'ARN sont, par construction, incomplets dans la partie correspondant à l'extrémité 5' des ARN (ou 3' du produit d'extension d'amorce).

Enfin, l'utilisation de ces techniques ne permet pas la réalisation de banques d'ADNc de populations cellulaires à effectif restreint. En effet, l'expérience montre qu'il est pratiquement impossible de réaliser des banques d'ADNc si la quantité d'ARNm ayant servi de matrice à la rétrotranscription est inférieure à quelques centaines de nanogrammes. De telles quantités sont obtenues à partir de quelques dizaines de milligrammes de tissu frais, ou encore, de 10^7 et plus cellules en culture. Ainsi les noyaux de cerveau humain, les embryons, les cultures primaires de cellules, les biopsies d'organes ou de tissus malades, les formes non libres de parasites, etc, ne peuvent être facilement utilisés comme matériel de départ pour construire des banques d'ADNc. L'utilisation des techniques d'amplification d'ADN *in vitro* pourrait permettre d'atteindre la masse critique d'ADNc nécéssaire au clonage. Toutefois, ces techniques ne peuvent s'appliquer qu'à des fragments d'ADN dont les extrémités sont connues.

La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. En effet, la demanderesse a maintenant mis au point un procédé de clonage d'acides nucléiques permettant de générer des clones entiers, notamment au niveau des régions 5' des messagers, avec une grande spécificité. Le procédé de l'invention permet également la synthèse, et par la suite l'amplification, de molécules d'ADNc-sb dont les extrémités sont inconnues, à partir de peu de matériel (cellules, ADN, ARN).

Un objet de l'invention réside donc dans un procédé de clonage d'acides nucléiques caractérisé en ce que l'on éffectue les étapes suivantes :

- dans une première étape, la ligature à l'extrémité 3' d'un produit d'extension d'amorce, d'un oligonucléotide simple brin, non complémentaire dudit produit d'extension d'amorce,

- dans une deuxième étape, la synthèse du deuxième brin au moyen d'une ADN polymérase, en utilisant une amorce complémentaire dudit oligonucléotide, et,

- dans une troisième étape facultative, l'amplification de l'ADNc-db ainsi obtenu.

Dans ce qui suit, l'oligonucléotide simple brin et non complémentaire est désigné par le terme oligonucléotide.

Dans un mode préféré de l'invention, le procédé met en oeuvre un produit d'extension d'amorce obtenu à partir d'une matrice ARN. Il peut s'agir d'ARN totaux, comme d'ARN messagers (ARNm) ou d'ARN ribosomaux (ARNr). La préparation des ARN totaux peut être réalisée selon différents protocoles connus de l'homme du métier. Notamment, la technique décrite par Belyavsky et al (Nucleic Acids Res. 17 (1989) 2919-2932) ou des techniques dérivées de celle-ci peuvent être utilisées. Dans le cas où la matrice initiale est constituée par un ARNm polyadénylé en 3', celui-ci peut être extrait par chromatographie d'affinité vis-à-vis de l'extrémité polyA.

La rétrotranscription des ARN extraits peut être effectuée par des procédés connus de l'homme du métier, directement à partir de préparations d'ARN totaux, ou à partir d'ARN du type recherché (ARNm, ARNr). L'amorce utilisée pour cette réaction est préférentiellement bloquée en 5', pour éviter la formation de concatémères des ADNc-sb lors de l'étape de ligation. A titre d'exemple, les conditions de rétrotranscription décrites par Rhyner et al (J. Neurosci. Res. 16 (1986) 167-181), éventuellement adaptées en fonction de la quantité d'ARN de départ, peuvent être utilisées pour préparer le produit d'extension d'amorce mis en oeuvre dans la présente invention.

Dans un autre mode particulier de l'invention, le procédé met en oeuvre un produit d'extension d'amorce obtenu à partir d'une matrice ADN. Il peut s'agir préférentiellement d'ADN génomique. En effet, l'une des applications particulièrement avantageuses du procédé de l'invention concerne la caractérisation moléculaire de séquences génomiques, et plus spécifiquement, de séquences génomiques impliquées dans le contrôle de l'expression de gènes connus.

Dans ce cas, la matrice ADN simple brin peut être obtenue à partir d'ADN génomique total, éventuellement coupé au moyen d'enzymes de restriction, après dénaturation des molécules bicaténaires. Le produit d'extension d'amorce est ensuite

synthétisé en utilisant une amorce correspondant à une région du gène étudié, puis purifié. En particulier, il peut être particulièrement avantageux d'utiliser pour la synthèse du produit d'extension une amorce biotinylée, qui permet une purification simple par chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine.

Lorsque le produit d'extension d'amorce est synthétisé, les hétéroduplex sont convertis en ADNc-sb par traitement à l'ARNase H, et/ou par hydrolyse alcaline. Par ailleurs, il est également préférable d'éliminer l'amorce libre résiduelle, pour éviter les réactions secondaires de ligation entre l'oligonucléotide et l'amorce. Ceci peut être fait par exemple par chromatographie d'exclusion.

Au cours de la première étape du procédé de l'invention, on utilise préférentiellement pour la ligation un oligonucléotide synthétisé par voie chimique. La synthèse de cet oligonucléotide est réalisée en tenant compte du fait qu'il est essentiel d'utiliser un oligonucléotide non complémentaire du produit d'extension d'amorce, pour éviter l'amplification d'ADN allochtone.

Avantageusement, l'oligonucléotide utilisé est préalablement fonctionnalisé, pour éviter la formation de concatémères à la suite de son auto-ligation. La ligation s'effectuant entre l'extrémité 5'-phosphate de l'oligonucléotide et l'extrémité 3'-OH du produit d'extension d'amorce, il est toutefois indispensable de conserver l'extrémité 5' de l'oligonucléotide réactive. Dans ces conditions, la fonctionnalisation de l'oligonucléotide consiste à bloquer l'extrémité 3'. Préférentiellement, cette fonctionnalisation est faite de telle sorte que l'extrémité 5' comporte un phosphate et l'extrémité 3' ne comporte pas de radical hydroxyle. Ceci peut être réalisé en ajoutant à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide un 2'-3' didéoxyribonucléotide de formule ddXTP dans laquelle X peut être choisi parmi les bases connues entrant dans la compositions des acides nucléiques, telles que notamment l'adénosine, la guanine, la thymidine, etc. La fonction 3'-OH peut également être bloquée par amination, suivie ou non de l'addition d'une biotine.

Encore plus préférentiellement, on utilise un oligonucléotide ne formant pas de structure secondaire. De telles structures seraient en effet de nature à perturber, sinon la ligation, du moins l'étape de sytnhèse du brin complémentaire.

Par ailleurs, pour augmenter la spécificité de l'amplification in vitro, il est particulièrement interessant d'utiliser des oligonucléotides ayant une température d'hybridation relativement élevée. Pour cette raison, un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention est obtenu avec un oligonucléotide ayant un GC% au moins égal à 60 %.

Dans une variante particulière de l'invention, on utilise un oligonucléotide dont les base situées en 5' forment un ou plusieurs sites de coupure reconnus par des enzymes de restriction. Ceci permet la formation, par digestion enzymatique, de sites compatibles avec ceux d'un vecteur de clonage.

La longueur de l'oligonucléotide utilisé dans l'invention doit être suffisante pour permettre l'hybridation d'une amorce d'ADN polymérase. Préférentiellement, on utilise un oligonucléotide d'une longueur au moins égale à 20 mer. Pour une meilleure mise en oeuvre de l'invention, il peut être préférable d'utiliser un oligonucléotide ayant une longueur suffisante pour permettre la réalisation d'étapes supplémentaires d'amplification. Dans ces conditions, la longueur de l'oligonucléotide est avantageusement comprise entre 20 et 60 mer.

La ligation de l'oligonucléotide au produit d'extension d'amorce est effectuée préférentiellement au moyen d'une enzyme capable de lier des molécules simple brin. Préférentiellement, on utilise la T4 RNA ligase. Cette enzyme est connue pour sa capacité à lier des molécules d'ARN. La Demanderesse a maintenant montré que cette enzyme pouvait également être utilisée pour ligaturer des ADN sb, ou des oligonucléotides synthétiques à des produits d'extension d'amorce. La réaction de ligation est généralement effectuée à 20°C environ pendant une période de 24 à 96 heures. Il est entendu que la durée de la réaction peut être optimisée selon l'efficacité recherchée et la quantité de matériel disponible.

Les molécules simple brin hybrides ainsi formées contenant l'oligonucléotide lié en 3' du produit d'extension d'amorce peuvent ensuite être soumises à la seconde étape du procédé conduisant à la synthèse du deuxième brin. Cette étape met en oeuvre une ADN polymérase, dont l'activité est initiée par une amorce complémentaire de l'oligonucléotide. L'amorce complémentaire peut être synthétisée aisément par vois chimique, comme cela est décrit dans les exemples. Cette étape de synthèse du brin complémentaire peut être réalisée selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, il est possible d'utiliser différentes enzymes disponibles dans la technique, telles que le fragment Klenow de l'ADN polymérase de E.coli, ou des ADN polymérases thermostables, telles que l'enzyme TaqPol (Cetus), la Replinase (Beckman) ou l'Amplifiase (Appligène). Des protocoles détaillés sont décrits dans les références mentionnées ci-après dans les techniques générales de clonage.

Les molécules double brin ainsi formées peuvent ensuite être soumises à une réaction d'amplification. Ceci peut être fait en utilisant, en plus de l'amorce ayant

servi dans la seconde étape du procédé, une deuxième amorce choisie dans la partie 5' du produit d'extension d'amorce. Cette réaction d'amplification peut notamment être réalisée selon des techniques connues de l'homme de l'art, telles que la "PCR" (Saïki et al., Science 239 (1988) 487-491). Par ailleurs, dans un mode particulièrement avantageux de mise en oeuvre de l'invention, la réaction d'amplification est réalisée simultanément à l'étape de synthèse du brin complémentaire (seconde étape du procédé). Dans ce cas, les deux amorces sont introduites ensemble, en présence de l'ADN polymérase.

De plus, plusieurs réactions d'amplification peuvent être effectuées successivement, en choisissant pour chaque nouvelle réaction des amorces définissant une région plus petite permettant ainsi des amplifications emboitées ("nested amplification").

Selon cette variante du procédé, il est possible de cloner spécifiquement des acides nucléiques, en partant de très peu de matériel, et en l'absence de toute information concernant leur séquence.

Un autre objet de l'invention réside dans une trousse pour la mise en oeuvre du procédé de clonage d'acides nucléiques décrit ci-avant, comprenant l'oligonucléotide de ligation et éventuellement l'enzyme permettant sa ligation au produit d'extension d'amorce.

Selon une variante particulière de l'invention, la trousse comprend également les amorces et enzymes permettant la rétrotranscription de la matrice initiale ARN en ADNc-sb.

Selon une autre variante particulière de l'invention, la trousse comprend également les amorces et enzymes permettant l'amplification de l'acide nucléique cloné.

Ces trousses peuvent être utilisées de manière particulièrement simple et avantageuse pour réaliser des banques d'ADNc, ou pour cloner les régions 5' d'ARN messagers, ou encore pour l'étude et la caractérisation moléculaire de séquences génomiques.

D'autres avantages de la présente invention apparaitront à la lecture des exemples suivants, donnés à titre illustratif et non limitatif.

Légende des figures

Figure 1 : Séquence et position respective des oligonucléotides BM 5', BM 1-5', BM 2-5', BM 3-5', BM 3', BM 1-3', BM 2-3' et BM 3-3'.

Figure 2 : Séquence et position des oligonucléotides spécifiques de la TPH utilisés lors du clonage du messager de la TPH-ß. Les oligonucléotides de la série BM 5' décrits dans la figure 1 ont également été utilisés lors du clonage.

Figure 3 : Schéma représentant les différentes étapes du procédé de l'invention, appliqué au clonage de l'extrêmité 5' d'ARN messagers. Dans le cas de la TPH-ß (exemple 2), il n'a pas été nécessaire de réaliser la troisième étape d'amplification.

Techniques générales de clonage

Les méthodes classiques de biologie moléculaire comme l'électrophorèse en gel d'agarose, la révélation des acides nucléiques au bromure d'éthidium, le transfert des acides nucléiques sur des membranes (de nylon) et la détection de séquences à l'aide de sondes sont décrites dans la littérature (Maniatis et al., Molecular cloning, A Laboratoty manual, Second edition, 1989, Cold Spring Harbor, Laboratory press; Berger et Kimmel, Guide to molecular cloning techniques, Methods in enzymology 152, 1987, Academic press). De même les techniques comme la réparation d'ADN grace à l'activité exonucléase 3'-5' de la T4 DNA polymerase, la ligature de "linkers", l'introduction de fragments d'ADN dans des vecteurs de clonage comme les bactériophages M13 ou lambda ZAP (Stratagène) sont bien documentées dans Maniatis et al. précité.

Exemple 1 : Synthèse et fonctionnalisation d'oligonucléotides et amorces pour la mise en oeuvre de l'invention.

Différents oligonucléotides ont été synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites. La séquence de ces oligonucléotides est donnée sur la figure 1, ainsi que leurs positions respectives.

Les séquences BM 1-5', BM 2-5', BM 3-5', BM 1-3', BM 2-3' et BM 3-3', ont été utilisées comme amorces pour les amplifications successives ("nested amplifications").

La séquence BM 5' a été utilisée comme oligonucléotide de ligation.

La séquence BM 3' a été utilisée comme amorce pour la rétrotranscription des ARN totaux extraits des cellules PC12 (exemple 3).

La fonctionnalisation de l'oligonucléotide de ligation a été réalisée en présence de la transférase terminale, par ajout d'un 2'-3' didéoxyribonucléotide à l'extrémité 3'. Pratiquement, cette réaction se déroule avec : 500 ng d'oligonucléotide dans 25 µl de milieu (Cacodylate de sodium 100 mM, $CoCl_2$ 1 mM, Tris-HCl pH=7.5 30 mM, albumine sérique de boeuf (ASB) 12.5 µg, DDT 0.1 mM, dideoxy-adenosine-triphosphate (ddATP) 100 mM, [α-P^{32}] 2',3'-ddATP 2,5 µCi de la solution Amersham d'activité spécifique 3000 Ci mM^{-1}) en présence de 25 unités de transférase terminale (Boehringer Manheim) 1 heure à 37°C. Puis, l'enzyme est désactivée par la chaleur (10 minutes à 75°C). Les 25µl sont chargés sur un gel de polyacrylamide et la bande correspondant à l'oligonucléotide modifié est excisée et transférée dans une cartouche SPIN-X (Costar). 200 µl d'eau sont ajoutés à l'acrylamide et l'ensemble est congelé dans de la carboglace puis décongelé plusieurs fois. La cartouche est ensuite centrifugée (12000 rpm, 5 minutes), l'éluat est précipité [Dextran T 40 (Pharmacia) 0.5 µg, 0.5 M LiCl, 75 % éthanol] puis dissous dans 50 µl d'eau et stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation.

Exemple 2 : Clonage des messagers entiers de la Tryptophane Hydroxylase de la glande pinéale de rat (TPH-ß).

L'ARNm codant pour la Tryptophane Hydroxylase de la glande pinéale de rat présente un polymorphisme au niveau de l'extrémité 5'. Deux formes sont actuellement caractérisées : TPH-α et TPH-ß. Comme indiqué sur la figure 2, TPH-α est comprise dans TPH-ß. Par ailleurs, TPH-α est relativement abondante (0,5 % des méssagers totaux), et est à peu près 100 fois plus représentée que TPH-ß. La capacité à cloner TPH-ß constitue un bon test d'efficacité d'un procédé de clonage.

Les ARN totaux d'une glande pinéale de rat sont extraits selon la méthode de Belyavsky (précité). 25 % des ARN ainsi obtenus, soit 200 ng environ, sont utilisés pour réaliser le clonage des extrémités 5' du messager de la TPH selon le schéma général décrit dans la figure 3.

2.1. Synthèse des ADNc-sb

La rétrotranscription est réalisée au moyen de l'amorce PEX, dont la position sur l'ARN matrice et la séquence sont données sur la figure 2. Six picomoles d'amorce ont été utilisées, et, pour obtenir un marquage détectable du produit d'extension d'amorce, une première extension de 40 min. est réalisée à 42°C en

présence de 0,05 mM de dCTP et 0,5 mCi/ml de [a-32P] dCTP. Après avoir ramené la concentration en dCTP à 0,5 mM, la synthèse est prolongée de 40 minutes.

L'excès de PEX est ensuite éliminé par chromatographie d'exclusion. Pour cela, le produit de la rétrotranscription auquel est ajouté 4 µl d'EDTA 0,5M est déposé sur une colonne chromatographique de 2 ml de résine Ultrogel AcA 34 (IBF/LKB) équilibrée en Tris-HCl (pH 8,0, 10 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,05 %). Des fractions de 100 µl sont recueillies, et les fractions contenant les hétéroduplex ADNc-sb/ARN sont réunies. Les ARN restants sont ensuite éliminés par hydrolyse alcaline (fractions incubées 30 minutes en présence de 0,3M NaOH, puis neutralisées en présence d'acide acétique). Enfin, les ADNc-sb sont précipités dans une solution Dextran T40 0,5 µg (Pharmacia), 0,5 M ClLi, 75 % éthanol, les culots lavés une fois à l'éthanol 75 % puis séchés sous vide et resuspendus dans un faible volume d'eau (4 à 10 µl).

2.2. Ligature de l'oligonucléotide et de l'ADNc-sb

La ligature est effectuée par la T4 RNA ligase. Pour cela, 1 µl d'ADNc-sb et 0,5 µl de l'oligonucléotide BM 5' fonctionalisé selon l'exemple 1 sont incubés avec 10 Ude T4 RNA ligase (Biolab's) à 22°C pendant 48 heures, dans 10 µl finaux de tampon Tris-HCl pH 8,0 50 mM, MgCl2 10 mM, ASB 10 mg/ml, PEG 8000 25 %, Chlorure de cobalt hexamine 1 mM, ATP 20 µM.

2.3. Synthèse du second brin et amplification

Vingt % du produit de la ligation a été utilisé dans des réactions d'amplification in vitro dans un volume final de 100 µl d'un tampon Tris pH 8,9 10 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 5 mM, dXTP 200 µM, gélatine 0,1 v/v, en présence de 2 U, d'AmpliTaq et des oligonucléotides BM 1-5' (Fig. 1) et Ba (Fig. 2) à la concentration de 0,1 µM. Après 40 cycles (93°C, 30 secondes ; 51°C, 30 secondes ; 72°C, 1 minute), 1 µl des amplifiats est prélevé et soumis à une deuxième série d'amplification (30 cycles) dans un volume final de 50 µl, 1 U AmpliTaq et les amorces BM 2-5' et Ca (Fig. 2) ou bien BM 2-5' et Da (Fig. 2).

L'analyse des différents produits d'amplification par la technique de Southern a montré que TPH-α était présente dans les produits d'amplification [BM 1-5'/Ba] et [BM 2-5'/Ca]. D'autre part la forme la moins abondante TPH-β, est amplifiée à un niveau détectable dans les produits d'amplification [BM 2-5'/Ca] et [BM 2-5'/Da]. Notons que le signal obtenu dans cette dernière amplification est visible en coloration au bromure d'éthidium.

Pour économiser le matériel, un aliquote de chacun de ces produits d'amplification a été prélevé et amplifié une trentaine de cycles avec les mêmes amorces auxquelles avaient été préalablement ajouté un phosphate en 5'. Après avoir éliminer les amorces par une chromatographie sur gel AcA 34, nous avons poli les fragments d'ADN avec de T4 DNA polymérase. Ces fragments sont ensuite clonés dans le bactériophage M13mp8 coupé SmaI et déphosphorylé (Amersham).

Le criblage des clones obtenus avec des sondes oligonucléotidiques a montré que plus de 50 % des clones obtenus contenaient des séquences hybridant avec une sonde prise dans la partie commune de la TPH (67 % des clones [BM 1-5'/Ba], 55 % des clones [BM 2-5'/Ca] et 74 % des clones [BM 2-5'/Da]. Un criblage plus fin de ces clones (avec une sonde spécifique de la forme -β) montre que parmi ces clones, 1,5 % des clones TPH [BM 1-5'/Ba], 0,5 % des clones TPH [BM 2-5'/Ca] et 100 % des clones TPH [BM 2-5'/Da] sont des clones TPH-β.

La séquence de quelques-uns des clones obtenus montre que tous les clones TPH-α sont des clones complets correspondant aux séquences déjà publiées. Le seul artefact rencontré est une variation dans la base terminale en 5' (G,A ou T ont été rencontrés). Les clones -β séquencés présentent tous en 5' 5 nouvelles bases TGCCC montrant que le procédé de l'invention permet d'obtenir des régions 5' plus complètes.

Exemple 3 : Construction d'une banque ADNc en partant de peu de cellules : réalisation et criblage d'une banque à partir des ARN extraits de 10^4 cellules PC12

Les cellules PC12 sont des cellules de phéochromocytome de rat. La moitié (environ 10 ng) des ARN totaux extraits de 10^4 cellules est utilisée pour une rétrotranscription amorcée par BM-3' (figure 1). A la fin de la synthèse, cette amorce est éliminée par chromatographie sur gel d'AcA 34 comme décrit précédemment.

La ligature de l'ADNc-sb avec BM-5' (préparé et fonctionnalisé comme dans l'exemple 1) est réalisée en 24 heures, dans les mêmes conditions que pour l'exemple 2.2.

La totalité de la ligature est utilisée pour une amplification in vitro dans un volume final de 100 µl d'un tampon Tris pH 8,9 10 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 5 mM, dXTP 200 µM, gélatine 0,1 v/v, en présence de 2 U d'AmpliTaq et des oligonucléotides BM 1-5' et BM 1-3' (figure 1) à la concentration de 0,1 µM. Après 25 cycles (93°C, 30 secondes/55°C, 30 secondes/72°C, 1 minute), les petits fragments d'ADN sont éliminés par chromatographie sur une colonne de Séphacryl S 400 (Pharmacia) équilibrée en Tris-HCl pH=8.5 0,1 M. 1 µl des éluats est prélevé et

soumis à une deuxième série d'amplification (25 cycles) dans un volume final de 50 µl, 1U AmpliTaq et les amorces BM 2-5' et BM 2-3' (figure 1). Enfin 1 µl des éluats est prélevé et soumis à une troisième série d'amplification (25 cycles) dans un volume final de 50 µl, 1U AmpliTaq et les amorces BM 3-5' et BM 3-3' (figure 1) et les produits de cette amplification sont purifiés sur une colonne de Séphacryl S 400.

Par souci de conserver du matériel, un aliquote des éluats de colonne est repris et soumis à 20 cycles d'amplification [BM 3-3'/BM 3-5'] avec des amorces dont l'extrémité 5' est phosphatée. Après polissage à la T4 DNA polymérase, des "linkers" Eco RI sont ligaturés aux fragments d'ADN. Puis ceux-ci sont clonés au site Eco RI du bactériophage Lambda ZAP (Stratagène). Le criblage de la banque obtenue avec une sonde ADNc spécifique de la tyrosine hydroxylase (TH) révèle la présence de clones à une fréquence (3/10000) qui est compatible avec l'abondance de ce messager dans ces cellules (2/10000).

Exemple 4 : Comparaison de l'efficacité du procédé de l'invention par rapport à la technique utilisant le "tailing"

Pour réaliser cette expérience nous avons utilisé un mélange d'ARN messagers constitué de 50 fg (fentogramme = 10^{-15} g) d'un ARNm de tryptophane hydroxylase (TPH) de rat synthétique et de 500 pg (picogramme = 10^{-12} g) d'une échelle de poids moléculaire d'ARN constituée de 6 espèces moléculaires couvrant une masse de 0,24 à 9,5 kb (kilobase). Les ARN messagers ont été rétrotranscripts en utilisant l'amorce BM-3' précédemment décrite.

Une queue homopolymérique de dG a été ajoutée à l'extrémité 3' d'une partie des ADNc-sb en utilisant l'activité de la terminale transférase ("tailing"). Par la suite les molécules "tailées" et "non tailées" résultant de cette réaction ont subi un cycle d'amplification in vitro avec une amorce de séquence anticomplémentaire à BM-5' et contenant en 3' une queue homopolymérique de 6 résidus dC. Afin de limiter les phénomènes d'amplification aspécifique observés au cours des expériences précédentes, cette amorce a été utilisée pour un seul cycle et en très faible quantité. Pour les autres amplifications, nous avons suivi la stratégie d'amplification emboîtée (nested PCR) déjà décrite pour l'amplification des messagers des cellules PC12.

En parallèle, une autre partie des ADNc-sb a été utilisée dans des expériences de ligation identiques à celles décrites pour l'amplification des ADNc de la lignée de cellules PC12 (exemple 3).

Des "Southerns blots" des produits de la troisième amplification emboitée (amorces BM 3-5' et BM 3-3') hybridés avec un oligonucléotide spécifique de la TPH mettent clairement en évidence la présence de séquences nucléotidiques complémentaires de la sonde dans les tubes résultant du "tailing" et du clonage selon l'invention. Cependant, un signal non spécifique important apparaît également dans les tubes témoins contenant tous les produits utilisés pour le "tailing" à l'exception de l'enzyme, alors qu'aucune amplification aspécifique n'apparaît dans les témoins de l'invention. Ceci montre clairement que le procédé de l'invention est beaucoup plus sélectif que ceux disponibles dans l'art antérieur.

REVENDICATIONS

1. Procédé de clonage d'acides nucléiques caractérisé en ce que l'on effectue les étapes suivantes :

- dans une première étape, la ligature à l'extrémité 3' d'un produit d'extension d'amorce, d'un oligonucléotide simple brin, non complémentaire dudit produit d'extension d'amorce,

- dans une deuxième étape, la synthèse du deuxième brin au moyen d'une ADN polymérase, en utilisant une amorce complémentaire dudit oligonucléotide, et,

- dans une troisième étape facultative, l'amplification de l'ADNc-db ainsi obtenu.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le produit d'extension d'amorce est obtenu à partir d'une matrice ARN.

3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le produit d'extension d'amorce est obtenu à partir d'une matrice ADN.

4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que, lors de la première étape, on utilise un oligonucléotide fonctionalisé en 3' de manière à empêcher son auto-ligation.

5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide ne comportant pas de radical hydroxyle en 3'.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide comportant en 3' un 2'-3' didéoxyribonucléotide de formule ddXTP dans laquelle X est choisi parmi les bases connues entrant dans la composition des acides nucléiques.

7. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide comportant en 3' une fonction amine.

8. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide ne formant pas de structures secondaires.

9. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide dont les bases situées en 5' forment un ou plusieurs sites de coupure reconnus par des enzymes de restriction.

10. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide d'une longueur au moins égale à 20 mer.

11. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la ligation est effectuée en présence d'une enzyme capable de lier des acides nucléiques simple brin.

12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'enzyme est la T4 RNA ligase.

13. Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que la ligation est réalisée à une température de 20°C environ, pendant une période de 24 à 96 heures.

14. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que pour la troisième étape, on utilise en plus une deuxième amorce, correspondant à une région de la partie 5' du produit d'extension d'amorce.

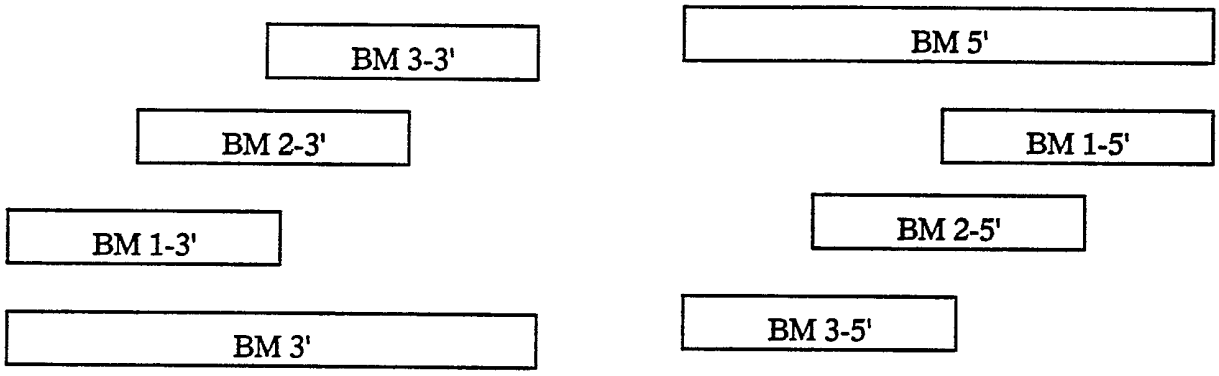
15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que l'on effectue plusieurs cycles d'amplification.

16. Trousse pour la mise en oeuvre du procédé de clonage d'acides nucléiques selon les revendications 1 à 15 comprenant l'oligonucléotide de ligation et éventuellement l'enzyme permettant sa ligation au produit d'extension d'amorce.

17. Trousse selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle comprend également les amorces et enzymes permettant la rétrotranscription d'une matrice initiale ARN en ADNc-sb.

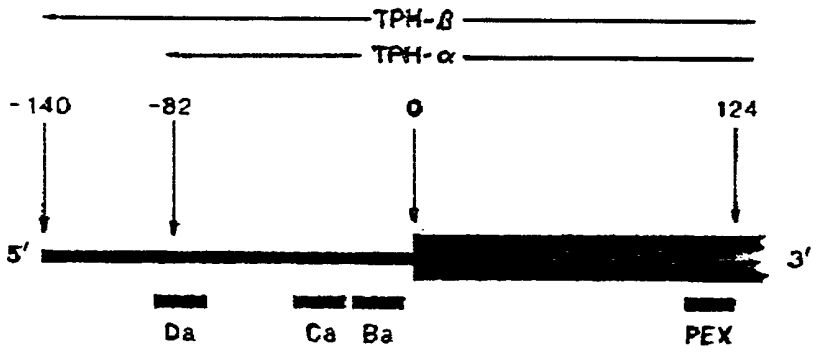
18. Trousse selon l'une des revendications 16 ou 17 caractérisée en ce qu'elle comprend également les amorces et enzymes permettant l'amplification de l'acide nucléique cloné.

19. Utilisation d'une trousse selon l'une quelconque des revendications 16 à 18 pour réaliser des banques d'ADNc, ou pour cloner les régions 5' d'ARN messagers, ou encore pour l'étude et la caractérisation moléculaire de séquences génomiques.



Nom	5' Séquence 3'
BM 5'	GCATTGCATCATGATCGATCGAATTCTTTAGTGAGGGTTAATTGCC
BM 1-5'	GGCAATTAACCCTCACTAAAG
BM 2-5'	TCACTAAAGAATTCGATCGATC
BM 3-5'	CGATCGATCATGATGCAATGC
BM 3'	CGAATACGACTCACTATAGGAAGCTGCGGCCGCTGCAGTAC[T] $_{14}$
BM 1-3'	CGAATACGACTCACTATAGG
BM 2-3'	ACTCACTATAGGAAGCTGCG
BM 3-3'	AGGAAGCTGCGGCCGCT

Figure 1



Nom	5' Séquence 3'
Ba	GGTGAATCTGAATGAAGATGACCC
Ca	AGTGGGCAGGATCCGGCACT
Da	ACGGGAGCTGCCGCCTC
PEX	GCGCTGAAAATCTTCCAGGAAACC

Figure 2

PL. III/3

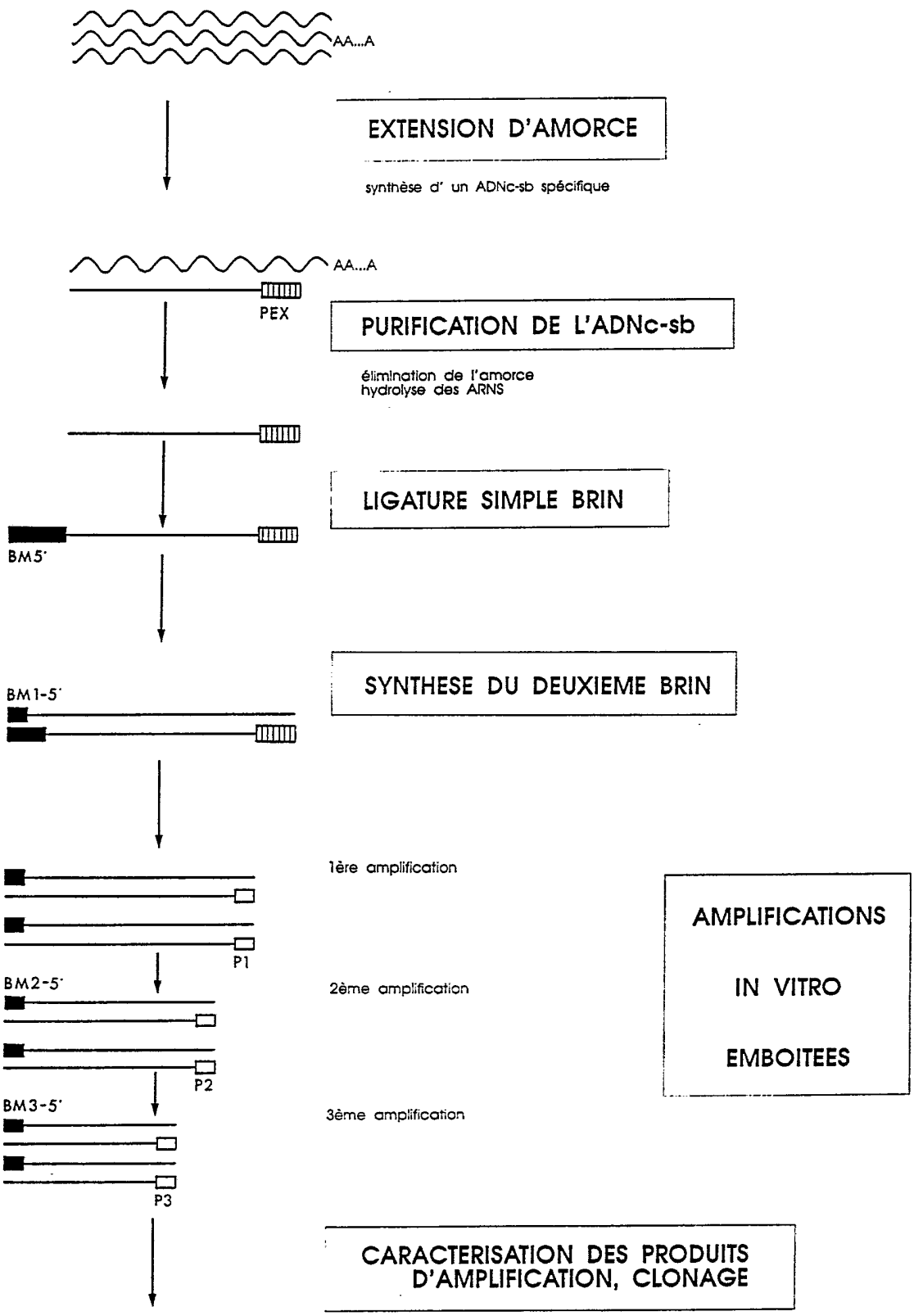


Figure 3

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

2678639

N° d'enregistrement national

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FR 9108294
FA 459652
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée
A	WO-A-9 009 457 (BIOGEN,INC.) * le document en entier * ---	1
A	WO-A-9 001 065 (GENELABS INCORPORATED) * page 1, ligne 30 - page 6, ligne 12; revendications; figures * ---	1
A	GENE. vol. 81, 1989, AMSTERDAM NL pages 295 - 306; AKOWITZ A. ET AL.: 'A novel cDNA/PCR strategy for efficient cloning of small amounts of undefined RNA' * le document en entier * ---	1
A	GENE. vol. 34, 1985, AMSTERDAM NL pages 305 - 314; COLECLOUGH C. ET AL.: 'Use of primer-restriction-end adapters in a novel cDNA cloning strategy' * abrégé; figures 1,2 * ---	1
T	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 19, no. 19, 11 Octobre 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 5227 - 5232; DUMAS MILNE EDWARDS J.B. ET AL.: 'Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification' ---	
T	METHODS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 2, no. 6, 1991, NEW YORK, USA pages 273 - 279; WEXLER A. ET AL.: 'A procedure to amplify cDNA from dsRNA templates using the polymerase chain reaction'	

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)

C12N
C12Q

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
31 MARS 1992	LUZZATTO E.R.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

1

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)