2 541 774

#### INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

**PARIS** 

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(11) N° de publication:

21) N° d'enregistrement national :

84 03009

(51) Int Cl3: G 01 N 33/48; C 12 Q 1/00 // A 61 B 5/10.

# DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

Α1

(22) Date de dépôt : 28 février 1984.

(30) Priorité: US, 28 février 1983, nº 468,113.

Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 35 du 31 août 1984.

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s): Société dite: ACTAGEN, INC. - US.

(72) Inventeur(s): Jeffrey Glassberg.

(73) Titulaire(s):

(74) Mandataire(s): Brot et Jolly.

Essai pour la détermination de la paternité et pour l'établissement de l'identité génétique individuelle.

67) La présente invention concerne un procédé d'identification d'éléments individuels d'une espèce d'organisme. L'identification est basée sur une analyse des polymorphismes de longueur de l'ADN produits par l'action d'endonucléases de restriction. ESSAI POUR LA DETERMINATION DE LA PATERNITE ET POUR L'ETABLISSEMENT DE L'IDENTITE GENETIQUE INDIVIDUELLE

La présente invention concerne un essai diagnostique nouveau et amélioré appliqué à la détermination de la paternité et pour l'établissement de l'identité génétique individuelle. Il est à noter que bien que dans la pratique de la technique, l'essai soit désigné sous le nom d'essai de paternité, rien ne s'oppose à son utilisation dans des cas de maternité controversée.

Il existe de nombreux cas où le fait de pouvoir déterminer l'identité d'un individu est important ; par exemple, l'assignation d'indices physiques laissés sur les lieux d'un crime à un suspect particulier, l'établissement de l'identité d'un individu en relation avec sa mère ou son père comme dans la détermination de la paternité ou plus généralement lorsqu'on établit l'identité génétique d'une souche d'un virus, d'une bactérie, d'une algue, d'un champignon, d'une plante ou d'un animal. Certains des essais utilisés pour ces déterminations reposent sur l'identification de protéines polymorphes dans le plasma provenant de la surface ou extraites de l'intérieur des cellules des individus en question.

10

20

25

30

35

Les substances du groupe sanguin ABO bien connu peuvent être utilisées à titre d'explication. Les substances du groupe sanguin ABO sont des hydrates de carbone et elles sont synthétisées par des enzymes qui sont les produits d'un gène humain unique. Une forme du gène (l'allèle A) produit une enzyme utilisée dans la synthèse d'un sang du type A, tandis qu'une autre forme du gène (l'allèle B) produit une enzyme utilisée dans la synthèse de sang du type B. L'absence des deux allèles conduit à la production d'un sang du type O, tandis que la présence des deux allèles conduit à la production d'un sang du type AB. Les substances ABO possèdent des propriétés antigéniques et peuvent être détectées immunologiquement par réaction avec les anti-sérums appropriés. C'est la réactivité différentielle de ces substances avec

ces anti-sérums qui constitue la base des groupes des types sanguins A, B, O et AB.

Si tout le monde possédait le même type de sang, la substance serait inutile pour distinguer parmi les individus. Le fait que les substances des groupes sanguins existent sous plusieurs formes (c'est-à-dire sont polymorphes) permet la discrimination. Cependant, en ce qui concerne son pouvoir d'exclure, comme dans les cas de paternité discutée, le nombre d'allèles différents est important, mais la fréquence avec laquelle ces allèles apparaissent l'est également. Comme ces fréquences des allèles varient parmi les populations, l'efficacité de l'exclusion varie également. Le pouvoir que possède un essai d'exclure est représenté par sa capacité d'exclusion, une valeur numérique allant de 0 à 1,0. La capacité d'exclusion du système ABO parmi les noirs américains est de 0,1774, tandis que parmi les Américains de race blanche, elle est de 0,1342. La capacité d'exclusion s'élève à 0,1830 pour les Suédois, et à 0,1917 pour les Japonais.

10

20

25

30

35

Un moyen d'augmenter la capacité d'exclusion est d'étendre l'analyse à d'autres substances polymorphes. En Suède, douze substances polymorphes sont analysées. La capacité d'exclusion globale de cette batterie d'essais se rapproche de 0,870. L'addition de systèmes supplémentaires à la série, même si elle est hautement informative, n'augmente pas fortement la probabilité cumulative, dès que le nombre des systèmes déjà mis en jeu est important. Une étude de 25 systèmes basés sur des essais immunologiques (réactions antigène-anticorps) révèle une probabilité cumulative de non paternité de 0,7694, tandis qu'une analyse similaire de 32 systèmes basés sur des essais biochimiques (réactions enzymatiques ou mobilité électrophorétique) donne une valeur de 0,9512. Les 57 systèmes combinés ne donnent toujours

qu'une valeur d'exclusion de 0,9887. Des études poussées ne sont pas praticables en termes de programme d'essai de la paternité, car un grand nombre des systèmes, du fait de leur coût, de la rareté des réactifs, de leur complexité technique, de leur faible fiabilité et/ou d'une expérience insuffisante ne sont pas considérées comme convenant pour un travail de routine.

il est bien connu que les sciences légales utilisent des systèmes d'essais multiples pour la détermination de l'identité. Par exemple, en plus des antigènes des 10 groupes sanguins ABO, on analyse également les antigènes MN et Rh. Si l'échantillon d'essai est liquide, on peut aussi inclure des antigenes Le et Se. Trois enzymes des erythrocytes, la phosphatase acide, la phosphoglucomutase et l'esterase D sont soumises à un examen de la 15 présence de variantes électrophorétiques. Enfin, on utilise également des essais pour rechercher des protéines sériques telles que des haptoglobines. Comme c'était le cas pour la détermination de la paternité, l'étendue de ces recherches légales est également limitée par 20 leur coût, leur complexité technique et leur faible fiabilité.

En dépit des considérations pratiques ci-dessus, un problème théorique plus grave affecte tous les essais existants. Comme les essais sont basés sur l'analyse d'une protéine ou de son activité, c'est le produit du gène et non le gène lui-même qui fait l'objet de l'étude. Conformément aux présentes inventions décrites ci-après, il est préférable d'analyser le gène directement plutôt que le produit de son expression, dans les cas où la paternité est intéressante, en raison de la dégénérescence qui est inhérente au procédé par lequel l'information génétique est exprimée.

25

30

35

L'écoulement de l'information génétique dans les cellules est bien connu. L'information dirigeant la

biosynthèse de toute protéine est codée dans les séquences de nucléotides de l'ADN connu sous le nom de gène. L'ADN de la cellule peut être considéré comme la forme de stockage de l'information génétique. Les molécules d'ADN sont grandes, chimiquement stables, aisément répliquées et elles contiennent de nombreuses séquences de gène. Par exemple, le répertoire génétique entier de la bactérie <u>E. coli</u> est contenu dans une molécule d'ADN unique composée d'environ 4,2 x 10 paires de base de nucléotide.

La transcription est l'opération par laquelle commence la récupération de l'information. La transcription met en jeu la synthèse de l'information sous la forme d'un acide nucléique appelé ARN. Un type d'ARN, l'ARN messager (mARN), transporte l'information vers le site de la synthèse des protéines appelé ribosome.

20

25

30

35

Dès que le mARN est synthétisé à partir du gène, le processus de synthèse des protéines peut commencer. Ce processus est essentiellement un processus de décodage moléculaire, dans lequel la séquence de nucléotide du mARN fournit un modèle pour la synthèse d'une protéine particulière. Comme il se produit un passage d'un langage d'acide nucléique dans un langage de protéine, ce processus de synthèse des protéines est désigné de manière appropriée comme une traduction. En poursuivant l'analogie un peu plus avant, il serait approprié de considérer les constituants des acides nucléiques, les nucléotides, comme représentant l'alphabet du langage de l'acide nucléique et les aminoacides, qui sont les éléments de construction des protéines, comme représentant l'alphabet du langage des protéines. Au cours du processus de traduction, non seulement les langages changent, mais encore les alphabets changent également. Il s'agit d'un processus particulièrement complexe qui est connu pour mettre en jeu plus de 100 types de molécules. Lorsque

le mARN traverse le ribosome (tout à fait comme la bande magnétique traverse un enregistreur sur bande) des groupes de trois nucléotides (codons) sont positionnés de façon à orienter des molécules d'ARN accessoires, connues sous le nom de ARN de transfert (tARN), transportant un aminoacide unique dans l'alignement approprié pour l'addition de l'aminoacide à la chaîne protéinique en cours d'accroissement.

Le rapport de codage des nucléotides aux aminoacides présente un intérêt particulier en ce qui concerne la présente invention. Comme il a été indiqué ci-dessus, ce rapport est de trois nucléotides codants pour un aminoacide. Comme il est nécessaire de coder pour vingt aminoacides différents avec seulement les quatre types de nucléotides disponibles (A, U, G, C), trois représentent 15 le rapport minimum acceptable. Un rapport de codage d'un nucléotide pour un aminoacide ne permettrait d'obtenir que quatre des vingt aminoacides nécessaires pour la synthèse des protéines. Un rapport de codage de deux donnant 16 (42) combinaisons n'atteint pas lui non plus la complexité nécessaire. Cependant, avec un rapport de codage de trois, 64 (44) combinaisons différentes sont possibles. Cet excès de vingt mots de code confère au code génétique un état connu sous le nom de dégénérescence. 25 Un code dégénéré contient plusieurs mots de code différents pour le même aminoacide. Il n'existe cependant pas de cas où un mot de code spécifierait deux aminoacides différents. Le code peut être dégénéré, mais il n'est pas ambigu. 30

Connaissant la séquence des nucléotides d'un ARN messager, il est possible d'écrire explicitement la séquence des aminoacides qui y sont codés, mais l'inverse n'est pas vrai. En raison de la dégénérescence du code génétique, un certain nombre de séquences de nucléotides seraient compatibles avec une séquence d'aminoacide

donnée. Considérons par exemple les fragments de mARN provenant du même gène chez deux individus différents "A" et "B".

#### INDIVIDU "A"

30

#### INDIVIDU "B"

5 mARN (UUC CCC CGA GUU CUA AAG) (UUU CCG AGG GUC CUU AAG)
protéine (phe-pro-arg-val-leu- (phe-pro-arg-val-leu-lys)
lys)

L'analyse de la protéine indiquerait que les deux individus sont identiques, tandis que l'analyse de la séquence de mARN indiquerait de nettes différences. Tout essai de paternité basé sur une analyse des protéines qu'elle soit immunologique ou biochimique, ne parviendrait pas à distinguer entre les deux individus. Un essai basé sur l'analyse de la matière génétique, soit l'ARN, soit de préférence l'ADN, permettrait de faire une telle distinction.

Bien que la discussion ci-dessus se soit concentrée sur la détermination de la paternité chez l'homme, il doit être maintenu présent à l'esprit que ces essais,

20 moyennant les réactifs appropriés, peuvent être étendus pour inclure certaines autres espèces animales (par exemple, des chevaux, des vaches, des chiens, etc.).

En ce qui concerne la présente invention, en raison de la démarche originale qui est adoptée, le mode opératoire d'essai est applicable à la détermination d'une filiation dans tout groupe d'organismes à reproduction sexuée y compris des plantes ainsi que des animaux.

Dans une application supplémentaire de la présente invention, l'identité génétique des individus peut être établie. Cette application est particulièrement utile dans le domaine de la science légale ou pour l'identification de souches de microorganismes, de plantes ou d'animaux.

Le but de la présente invention est de fournir un essai nouveau et amélioré pour la détermination de la

paternité dans des organismes à reproduction sexuée et d'établir l'identité génétique individuelle. Ces objectifs sont atteints en analysant l'ADN de cet organisme en ce qui concerne une ou plusieurs régions génétiques polymorphes, en différenciant les polymorphismes par la taille relative des régions génétiques, et en caractérisant ainsi un membre individuel de l'espèce.

Dans un mode de réalisation, les ADN dérivant du descendant, de la mère et par exemple du père putatif, sont digérés séparément avec une ou plusieurs enzymes de restriction et les fragments obtenus sont séparés par taille en les faisant migrer à travers une matrice de gel sous l'influence d'un courant électrique. Les polymorphismes sont détectés en hybridant les ADN traités ci-dessus avec des ADN "sondes" marqués (par exemple radioactifs).

10

15

20

25

30

35

Les ADN sondes sont des fragments d'ADN variables qui ont été réunis à un ADN vecteur qui est capable de se répliquer dans une cellule hôte (par exemple, le plasmide pBR322, le bactériophage lambda ou M13 dans <u>Escherichia coli</u>, ou SV40 dans les cellules du singe), puis débarrassés des cellules hôtes.

Les ADN sondes ayant réagi permettent de visualiser la position, et par conséquent les tailles, des fragments d'ADN du descendant, de la mère, et du père putatif, dont les séquences sont homologues à celles des ADN sondes. Comme les ADN sondes ont été choisis parce qu'ils sont un allèle provenant d'un locus polymorphe, les tailles des fragments d'ADN homologues à ceux des sondes varieront entre les individus.

Tous les fragments d'ADN que possède le descendant dériveront soit de la mère soit du père du descendant, sauf mutation et certains autres événements rares. Une comparaison des tailles des fragments d'ADN détectés par les ADN sondes permet ainsi de déterminer si oui ou

non le père putatif peut être le père biologique. Par exemple, l'ADN du descendant donne un fragment de paire de base 8600 homologue à un fragment de l'ADN sonde, et si l'ADN de la mère est dépourvu de ce fragment, l'ADN du père biologique doit alors le contenir. Si l'ADN du père putatif est dépourvu de ce fragment, il peut être exclu en tant que père biologique.

Dans un autre mode de réalisation, on peut comparer des échantillons d'ADN provenant d'un suspect et

d'indices physiques (sang, peau, sperme, etc.) sur les lieux d'un crime, en utilisant les sondes décrites cidessus, pour établir l'identité entre les échantillons et le suspect. Ainsi, le polymorphisme de l'ADN en ce qui concerne l'essai d'hybridation fournit au scientifique légal une "empreinte moléculaire" à faire figurer avec le reste de l'analyse des indices physiques.

Dans un autre mode de réalisation, on compare un échantillon d'ADN provenant d'un individu avec l'ADN provenant d'autres membres d'une souche d'organisme sur la base de la taille relative en vue d'établir l'identité de la souche de cet individu.

La figure 1 représente l'autoradiographie décrite dans l'exemple VII,

la figure 2 représente l'autoradiographie décrite dans l'exemple VIII ; et

la figure 3 représente l'autoradiographie décrite dans l'exemple IX.

Dans un de ces modes de réalisation, la présente invention se compose de quatre stades reliés entre eux : isolement et restriction de l'ADN; électrophorèse sur gel et séchage de l'ADN; hybridation et lavage; et finalement autoradiographie.

## Isolement et restriction de l'ADN

25

30

L'isolement de l'ADN des échantillons de cellules est effectué par les modes opératoires reconnus dans la

5

10

15

20

25

30

35

technique. La préparation de l'ADN met en jeu une lyse des cellules, des extractions par le dodécyl sulfate de sodium et le perchlorate de sodium, par le chloroforme/alcool isoamylique, et une précipitation par l'éthanol.

Après sa préparation, chaque échantillon d'ADN est soumis à une analyse avec une ou ou plusieurs endonucléases de restriction. Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent des séquences spécifiques courtes d'environ 4 à 7 paires de bases nucléotides et qui clivent l'ADN ou ces emplacements ou à proximité de ces emplacements. Bien qu'il existe plus de deux cents enzymes de restriction entre lesquelles on peut choisir, le choix d'une enzyme particulière à utiliser dans l'essai dépendra du type d'ADN échantillon, du nombre de fragments nécessaires et de la disponibilité et du coût des réactifs.

Le genome humain, qui se compose d'environ 6x109 paires de bases d'ADN, sera clivé en  $10^6$  à  $10^7$  fragments discontinus dont la taille va de  $10^2$  à  $10^5$  paires de bases par une endonucléase de restriction unique. La complexité d'un tel produit de digestion reflète le nombre et l'emplacement des points de clivage spécifiques de l'endonucléase dans l'échantillon d'ADN. Une identification exhaustive de chaque fragment à partir de traitements parallèles mettant en jeu un certain nombre d'endonucléases différentes conduirait en théorie à une "empreinte moléculaire" qui serait unique pour chaque être humain. Bien que théoriquement possible, une telle analyse détaillée est impraticable. La présente invention surmonte ce problème en permettant l'analyse d'une sous-série des produits de clivage existants. Pour utiliser le jargon de la technique de l'ingénierie génétique, on dit que l'on "sonde" les produits de clivage existants pour y chercher l'existence d'une séquence de nucléotide unique présentant de

l'intérêt. Un procédé bien connu pour effectuer cette analyse est la technique de séchage de Southern.

## Electrophorèse sur gel et séchage

Conformément au procédé de Southern (J. Mol. Biol. 98:503-17) (1975)), les fragments d'ADN à deux brins obtenus par le traitement par l'endonucléase de restriction sont séparés par taille par électrophorèse dans un gel d'agarose, et l'ADN est tranformé en ADN à brin unique en plongeant le gel dans un alcali. Le gel est placé à plat sur une "mèche" de papier filtre reliée à une cuvette allongée contenant une solution de sel concentrée.

Une feuille unique de nitrate de cellulose est alors placée sur les gels et une pile importante de serviettes de papier absorbant sèches sont placées à 15 plat au-dessus du nitrate de cellulose. La solution de sel est aspirée par les serviettes de papier absorbant, traversant le gel et la feuille de nitrate de cellulose. Au fur et à mesure que la solution traverse le gel, l'ADN à brin unique est extrait du gel et passe sur le 20 filtre de nitrate de cellulose. Le nitrate de cellulose a la propriété de lier l'ADN à brin unique, de sorte que l'ADN est extrait du gel et passe sur le filtre de nitrate de cellulose. Le nitrate de cellulose a la propriété de lier l'ADN à brin unique, de sorte que 25. tout l'ADN adhère à ce support. Le résultat final de cette opération est une réplique parfaite de l'ADN provenant du gel d'agarose initial, mais l'ADN est à présent à brin unique et il est immobilisé sur la feuille filtrante de nitrate de cellulose. La répartition 30 des tailles de l'ADN provenant du gel d'agarose initial est cependant fidèlement conservée. Les tailles de fragments peuvent être calibrées en comparaison avec des ADN marqueurs de tailles connues.

## Hybridation et lavage

10

15

20

25

30

35

On dit qu'une réaction d'hybridation se produit lorsque deux ADN à brin unique provenant de sources différentes se réassocient pour former un ADN à double brin grâce à l'appariement des bases complémentaires entre les deux brins inter-agissant. Des hybrides ADN/ARN peuvent aussi se former par des associations analogues.

En ce qui concerne la présente invention, on effectue une hybridation ADN/ADN. Une source de matière contribuante pour la réaction d'hybridation est l'ADN à brin unique présent dans les séchages de Southern des fragments de restriction. Les autres sources de brins d'hybridation sont les ADN "sondes". Ces ADN représentent des fragments d'ADN variables choisis parce qu'ils représentent des séquences correspondant à un allèle d'un locus de gène polymorphe. Une description complète de l'isolement et de la caractérisation des "sondes" est présentée dans une section ultérieure de ce mémoire.

On utilise dans la technique diverses conditions d'hybridation, parmi lesquelles le formamide à 50 pour cent à 40-50°C ou un sel modéré à 65-68°C. Du sulfate de dextranne peut être utilisé pour augmenter la vitesse de réassociation. Après hybridation, les filtres sont lavés de manière poussée pour éliminer les sondes de fond (non hybrides). L'opération de lavage est effectuée à chaud et avec des concentrations en sel réduites pour éliminer également les hybrides ADN/ADN non spécifiques.

## préparation des ADN sondes

Comme il a été indiqué précédemment, les ADN sondes représentent des fragments d'ADN variables choisis parce qu'ils constituent un allèle d'une région génétique polymorphe. Dans ce contexte, le polymorphisme est un polymorphisme de longueur. La variabilité de longueur des fragments résulte d'une différence dans le nombre et/ou

la situation des emplacements de restriction de l'endonucléase qui ont été attaqués pendant la formation des fragments. Ainsi, si tous les individus possédaient un fragment d'ADN de taille similaire qui s'hybride avec 1'ADN sonde, la région serait considérée comme monomorphe et de peu d'utilité en ce qui concerne la présente invention. Au contraire, les individus possèdent des fragments d'ADN de tailles différentes qui s'hybrident avec les fragments d'ADN sonde ; par conséquent ce fragment peut être considéré comme représentant un allèle d'une région génétique qui présente un polymorphisme de taille. L'évaluation des sondes est alors d'une importance déterminante et peut être considérée comme consistant en deux opérations reliées entre elles de génération de la sonde et d'identification de la sonde. 15

## Génération de la sonde

20

25

35

La génération des sondes peut s'effectuer par des modes opératoires admis dans la technique pour la construction d'une collection de fragments d'ADN clonés. Les opérations comprennent normalement : la digestion d'un échantillon d'ADN avec une endonucléase spécifique, la récupération de fractions d'ADN de taille appropriée à partir du produit de la digestion, la précipitation des fragments, l'introduction des fragments dans un vecteur de clonage approprié, la transformation d'un organisme hôte compétent avec le vecteur, et la récupération de colonies contenant l'ADN sonde cloné. Il existe des endonucléases et des vecteurs très divers qui peuvent être utilisés dans la génération des sondes. Les procédés pour effectuer le clonage sont bien connus dans la technique (voir par exemple, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, T. Maniatis, et coll., Cold Spring Harbor lab 1982). Deux sondes d'ADN humain générées de cette manière sont les pAW 101 et pLM 0,8. Des échantillons de E. coli abritant pAW 101 et pLM 0,8 ont été déposés

à l'American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland le 8 fvrier 1984 où elles ont reçu les numéros ATCC 39605 et ATCC 39604 respectivement, et les droits nécessaires ont été payés. L'accès aux cultures sera possible pendant que la demande de brevet est en cours d'examen aux personnes autorisées par le Commissaire en vertu de 27.C.F.R. §1.14 et 35 U.S.C. §122. Toutes les restrictions sur la disponibilité de cette culture au public seront irrévocablement levées lors de la délivrance de la présente demande et cette 10 culture restera en permanence disponible pendant la durée de ce brevet. Si la culture devenait non viable ou était détruite par inadvertance, elle serait remplacée par une ou plusieurs cultures viables ayant la même description taxonomique. 15

On peut aussi utiliser des sondes de cADN. Ces sondes sont initialement générées à partir de l'ARN par une opération de copiage inverse détaillée dans l'exemple II ci-après ou dans la publication EPO No. 0 084 796.

Quel que soit le procédé utilisé pour générer les sondes, dès qu'elles sont obtenues, chaque sonde doit être soumise à un examen de son utilité dans le mode opératoire d'essai.

## Identification des sondes utiles

20

25

30

35

Pour évaluer l'efficacité d'une sonde particulière provenant d'une collection de sondes générées cidessus, de l'ADN est isolé de quatre individus différents et mis à digéré séparément avec une endonucléase de restriction. Ces ADN sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, en faisant passer un mélange de trois des ADN des individus dans un chemin et un échantillon du quatrième individu dans un chemin adjacent.

Les ADN soumis à l'électrophorèse sont séchés comme il a été décrit précédemment. Un ADN à brin unique est

isolé d'un clone individuel choisi dans le groupe de sondes potentielles contenant des clones générés ci-dessus. L'ADN sonde est marqué et utilisé pour l'hybridation avec l'ADN soumis à l'électrophorèse des quatre individus. Si la sonde essayée donne davantage de bandes dans le chemin avec les trois ADN des individus que dans le chemin avec l'ADN d'un individu, elle devient un candidat pour la détection des polymorphismes. Des sondes identifiées par le mode opératoire précédent sont en outre essayées par hybridation contre une population suffisamment importante d'individus d'essai pour déterminer effectivement le degré de polymorphisme. Des sondes correspondant à des régions comportant au moins quatre allèles différents présentes dans la population avec des fréquences supérieures à 10 % chacune sont incorporées dans l'essai.

Conformément à un mode de réalisation préféré de l'invention, une collection de sondes polymorphes sont utilisées plutôt que de se baser sur une sonde polymorphe unique. Cette utilisation de sondes multiples augmente la sensibilité de l'essai d'une manière spectaculaire. Par exemple, si l'on utilise dix sondes différentes, et que chaque sonde identifie une région polymorphe constituée de huit allèles apparaissant avec des fréquences égales, environ un million d'individus pourraient être identifiés d'une manière unique.

20

25

Les paramètres à évaluer lorsqu'on choisit une sonde particulière pour l'inclusion dans la collection comprennent le degré de polymorphisme, c'est-à-dire le nombre d'allèles et les fréquences avec lesquelles les allèles sont présents dans la population à essayer. La simple existence d'un grand nombre d'allèles, par exemple 60 en un locus de sonde particulier ne garantirait pas en soi qu'une sonde est utile si, par exemple, 99,9 pour cent de la population à essayer possédaient un allèle et les 0,1 % restants étaient répartis parmi les

59 autres allèles. Ainsi, la fréquence d'apparition des divers allèles est une considération importante.

Le nombre de sondes individuelles dans une série de sondes peut être très important, 100 ou davantage, des limitations pratiques restreindraient le nombre à une valeur de 1 à environ 40, et de préférence de 1 à environ 20.

Le nombre d'allèles par locus génétique polymorphe peut être important, de 2 à environ 60 ou davantage, mais de préférence de 2 à environ 40. On préfère que les allèles apparaissent avec une fréquence approximativement égale.

#### Autoradiographie

10

35

L'hybride est visualisé par autoradiographie. Avant l'hybridation, les ADN sondes sont marqués avec un isotope 15 radioactif, habituellement <sup>32</sup>P. L'activité spécifique d'environ 10<sup>8</sup> comptages par minute par μg d'ADN est nécessaire et met normalement en jeu le marquage avec au moins deux nucléotides marqués (TTP et dCTP, 400 Ci/mmole). La sonde hybridée radioactive est localisée en utilisant 20 des modes opératoires reconnus dans la technique consistant à exposer une pellicule aux émissions radioactives. Les hybrides radioactifs prennent essentiellement leur image, d'où le terme d'autoradiographie. Bien que l'autoradiographie soit un mode opératoire reconnu dans la 25 technique pour la localisation des molécules hybrides, l'invention n'est pas limitée à ce mode d'analyse particulier. Les hybrides intéressants peuvent être détectés par n'importe quel réactif analytiquement détectable approprié. Par exemple, la détection par 30 fluorescence, des réactions colorimétriques, des réactions immunologiques ou des enzymes ou d'autres réactifs marqués par les protéines sont également utilisables dans la détection des sondes hybridées.

#### EXEMPLE I

Cet exemple illustre l'isolement de l'ADN de sang périphérique humain. L'ADN ainsi isolé est utile pour l'évaluation de l'ADN sonde.

10 à 20 ml de sang périphérique sont recueillis en utilisant de l'EDTA (acide éthylène-diamino-tétra acétique disodique) comme anti-coagulant (le sang peut être traité immédiatement ou congelé à 70°C).

On fait passer le sang dans un tube de 50 ml et

10 on ajoute un volume égal de tampon à lyse (MgCl<sub>2</sub> lmM;

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, pH 6,5; Nonidet P-40 0,8 %; acide

désoxycholique, sel de sodium 0,4 %). On retourne le tube

25 à 50 fois pour mélanger soigneusement.

On fait passer le mélange dans un tube en matière plastique Sorvall de 50 ml et on le fait tourner dans 15 un rotor SW 34 à 10 000 t/mn (12.000 g) pendant 30 minutes. On jette le liquide surnageant et on met le culot de centrifugation en suspension dans 10 ml de TNE ( Tris 10 mM, pH 8,3; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM). Le culot est 20 désagrégé en agitant violemment le tube. On ajoute 1,5 ml de SDS à 10 % (concentration finale 1,0 %) et on retourne plusieurs fois. On ajoute 3 ml de NaClO $_{\rm A}$  5M (concentration finale 1,0 M) et on mélange. On ajoute ensuite un égal volume de chloroforme:alcool isoamylique 25 (24:1) et on place le tube dans un agitateur "gyrotory" New Brunswick à 3500 t/mn pendant 15 minutes. Les phases sont séparées par rotation pendant 10 minutes à 3000 t/ mn dans une centrifugeuse Damon.

La phase aqueuse (supérieure) est éliminée avec une 30 pipette de 10 ml retournée, sans coton (une pipette de Pasteur siliconée peut également être utilisée) et transférée dans un tube de 50 ml frais. La phase organique (inférieure) est jetée, un volume égal de Chl:IAA (24:1) est ajouté et extrait et séparé comme précédemment.

35 L'extraction est répétée jusqu'à ce que l'interphase

après séparation des phases soit limpide. Ceci exige habituellement 3 à 5 extractions.

La phase aqueuse provenant de l'extraction finale est transférée dans un bécher en matière plastique. On ajoute 2 à 2,5 volumes d'EtOH à 95 % à -20°C en le versant lentement le long du bord, ce qui produit deux phases; une phase d'ADN aqueux au fond et une phase de EtOH au-dessus. On fait tourner un agitateur de verre propre et sec dans cette solution jusqu'à ce que les deux phases se mélangent. L'ADN précipite à l'interface aqueux -EtOH et il est recueilli sur l'agitateur. Lorsque les deux phases se sont mélangées, l'agitateur est retiré et séché à l'air pendant 10 minutes.

L'agitateur est placé dans un tube de 15 ml et recouvert de parafilm. Trois trous sont percés dans le parafilm avec une aiguille de calibre 18 et l'échantillon est desséché pendant 20 minutes. Le parafilm est retiré et l'on ajoute 0,5 à 1,0 ml de SSE 0,01X (NaCl 1,5 mM; EDTA 0,15 mM; pH 7,0). L'échantillon est bouché et mis en suspension une nuit à 4°C sur un agitateur Ames.

La quantité d'ADN en suspension est déterminée en enregistrant la densité optique d'une dilution à 1/20 de l'échantillon. On ajoute 25  $\mu$ l de la suspension d'ADN à 475  $\mu$ l d'eau distillée, on les fait passer dans une cuvette et on enregistre la densité optique à 260, 270 et 280 en utilisant une cuvette remplie de SSE 0,01% pour la mise à zéro de chaque lecture. La concentration en ADN dans la suspension en mg/ml ( $\mu$ g/ $\mu$ l) est égale à la lecture d'une dilution à 1/20 à la densité optique 260, car la densité optique 260 de 1.000 = 50  $\mu$ g/ml. On effectue une dilution pour maintenir la densité optique 260 entre 0,100 et 1000, région où la corrélation entre la concentration d'ADN et la densité optique est linéaire. Les lectures de densité optique au-dessus de 1500 ne sont pas précises. La densité optique 260/280

doit être de 1,8 ou davantage et mesure la quantité de contamination par les protéines. Par exemple les densités optiques suivantes ont été enregistrées à partir de 0,5 ml d'une dilution à 1/20 de suspension de 1'ADN à partir de sang périphérique:

260	270	280	260	260	concentration
			270	280	
0,350	0,280	0,190	1,25	1,84	0,35 μg/μl
0,350 x 5	0 μg/ml x	<b>20 = 350</b> μς	g/ml = 0.3	5 μg/μl	•

10

#### EXEMPLE II

Cet exemple illustre un procédé de génération de sondes d'ADN humain.

- A. Isolement de l'ARN messager
- 1. On met en suspension entre 10 et 10 cellules humaines dans 2 ml de Ringer refroidi à la glace et on les centrifuge à 2000X g pendant 5 minutes à 4°C.
  - 2. Après aspiration du liquide surnageant, on met les cellules en suspension dans du tampon à lyse refroidi à la glace. Le tampon étant constitué de :

20 NaCl 0,14 M

MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM

Tris-Cl 10 mM, pH 8,6

Np-40 0,5 %

1000 unités/ml de RNasin (Biotec)

- 3. On soumet la suspension à un vortex pendant 10 secondes puis on fait passer par en dessous une couche d'un volume égal de tampon à lyse contenant du sucrose (24 % p/V) et NP-40 1 % et on la stocke sur de la glace pendant 5 minutes.
- 4. On centrifuge la suspension à 10000X g pendant 20 minutes à 4°C dans un rotor à godet basculant.
  - 5. On récupère la couche supérieure (cytoplasmique) trouble et on ajoute un volume égal de tampon 2X PK.

Tampon 2X PK: Tris-Cl 0,2 M, pH 7,5

35

EDTA 25 mM

## NaCl 0,3 M S.D.S 2 %

Après quoi on ajoute de la protéinase K à une concentration finale de 200  $\mu g/ml$  et on fait incuber à 37°C pendant 30 minutes.

- 6. On extrait ensuite la couche une fois avec du phénol/chloroforme et on récupère la couche aqueuse, à laquelle on ajoute 2,5 volumes d'éthanol et on la conserve à -20°C pendant au moins deux heures.
- 7. On centrifuge la fraction pendant 10 minutes à 5000X g à 0°C et on lave le culot de centrifugation obtenu avec de l'éthanol à 75 % contenant de l'acétate de sodium 0,1 M.
- 8. On redissout les acides nucléiques dans un faible volume (environ 50  $\mu$ l) de :

Tris-C1 50 mM, pH 7,5

#### EDTA 1 mM

5

- 9. A la fraction remise en suspension, on ajoute MgCl<sub>2</sub> jusqu'à une concentration finale de 10 mM et du RNasin (Biotec) jusqu'à 2000 unités/ml. On fait ensuite incuber la suspension pendant 30 minutes à 37°C.
- 10. Après incubation, on ajoute de l'EDTA et du SDS jusqu'à une concentration finale de 10 mM et de 0,2 %, respectivement.
- 25 11. On extrait la suspension avec du phénol/chloroforme et on ajoute de l'acétate de Na pH 5,2 jusqu'à 0,3 M et on fait précipiter les acides nucléiques avec 2 volumes d'éthanol.
- 12. On conserve l'ARN dans de l'éthanol à 70 % 30 à 70°C.
  - B. Choix de l'ARN poly A
  - 1. On met en équilibre de l'oligo (dT)-cellulose dans un tampon de charge 2x stérile. Le tampon est composé de Tris-Cl 40 mM, pH 7,6.
- 35 NaCl 1,0 M

EDTA 2 mM

SDS 0,2 %

5

15

20

25

- 2. On utilise l'oligo-(dT)-cellulose pour former une colonne de 1 ml et on la lave avec 3 volumes de colonne constitués chacun de :
  - a) eau stérile
  - b) NaOH 0,1 M/EDTA 5mM
  - c) éau stérile
  - 3. Le pH de l'effluent doit être inférieur à 8,0.
- 4. La colonne est ensuite lavée avec 5 volumes de tampon de charge.
  - 5. L'ARN isolé au stade A est dissous dans de l'eau stérile et chauffé à 65°C pendant 5 minutes. On ajoute ensuite un volume égal de tampon de charge 2x et on refroidit l'échantillon à la température ambiante. (environ 25°C).
  - 6. On applique ensuite l'échantillon à la colonne et on recueille le liquide traversant. Le liquide traversant est ensuite chauffé à 65°C, refroidi et réappliqué sur la colonne.
  - 7. On lave ensuite la colonne avec 5 à 10 volumes de tampon de charge puis avec 4 volumes de tampon de charge contenant NaCl 0,1 M.
  - 8. On recueille les fractions et on lit la D.O. 260° La fraction initiale contiendra du poly(A) ARN à concentration élevée tandis que les dernières fractions ne contiendront que peu ou pas du tout de matière absorbante à la D.O. 260°
- 9. On élue le poly(A) <sup>†</sup>ARN de la colonne avec 2 à 30 3 volumes de mélange stérile :

Tris-C1 10 mM, pH 7,5

EDTA 1 mM

s.D.S. 0,05 %

10. On ajoute de l'acétate de Na (3 M, pH 5,2) 35 à l'éluant jusqu'à une concentration finale de 0,3 M et on ajoute ensuite 2,2 volumes d'éthanol.

- 11. On centrifuge l'ARN à 0°C à 5000X g pendant 10 minutes.
- 12. On redissout le culot de centrifugation dans de 5 l'eau (10 cellules donnent 1-5 µg de poly(A) ARN)
  - C. Synthèse du premier brin d'ADN
  - 1. Les conditions de réaction ci-dessous supposent une quantité de départ de 50  $_{\mu}g$  de polyA mARN. Pour des quantités supérieures ou inférieures à 50  $_{\mu}g$ , le mélange réactionnel peut être dimensionné proportionnellement.
    - 2. Mélange de réaction comprenant :

	Réactif	Quantité à	Concentration		
		ajouter	<u>finale</u>		
	dATP 10 mM	25 μ1	500 μM		
15	dGTP 10 mM	25 <sub>µ</sub> 1	500 μM		
	dTTP 10 mM	25 μ1	500 μM		
	dCTP 2 mM	25 μ1	100 µM		
	Tampon transcriptase		-		
	inverse 5X		. •		
20	Tris 250 mM pH 8,2		tris 50 mM		
	KCl 250 mM, 30 mM		KC1 50 mM		
			MgCl <sub>2</sub> 6 mM		
	MgCl <sub>2</sub>	. 100 $\mu$ l			
	DTT 200 mM	25 <sub>µ</sub> 1	10 mM		
25	Poly(A) mARN	(50 µg)			
	RNasin (Biotec)	•			
	Inhibiteur de la RNase	5 μ1			
	placentaire				
	Transcriptase inverse				
30	du virus de la myléo-	•			
	blastose aviaire	20 <sub>µ</sub> 1	300 $\mu/ml$		
	Oligo(dT) 12-18		•		
	600 µg/ml	37,5 µ1	45 $\mu$ g/ml		
	32 <sub>P-dCTP</sub>	$1-10  \mu \text{Ci}/500$	μl		
35		de mélange ré	actionnel		
	Eau distallée H <sub>2</sub> O	jusqu'au volume final : 500 $\mu$ l			

- 3. La réaction est effectuée dans un tube d'Eppendorf siliconé de 1,5 ml et amorcée par l'addition du mARN.
- 4. Le mélange réactionnel est mis à incuber à 42°C pendant 60 minutes, puis on ajoute 10  $\mu l$  de EDTA 500 mM pour arrêter la réaction.
- 5. On précipite 1  $\mu$ l du mélange réactionnel avec du T.C.A. et on le compte pour déterminer le rendement de la synthèse du premier brin. En général, on obtient un rendement de 17 à 25 %, atteignant rarement 40 %.
- 6. 10  $\mu$ Ci de  $^{32}$ P-dCTP/500  $\mu$ l donnera une activité spécifique de 2,2 x 10 cpm/ $\mu$ g de l'ADN à un seul brin. L'activité spécifique permet de maintenir le produit au stade ultérieur sans perdre trop du cADN.

10

15

20

25

- 7. L'échantillon est extrait deux fois avec un égal volume de phénol saturé de Tris 50 mM, pH 8,0.
- 8. Le phénol est extrait deux fois avec des volumes d'éther. Après quoi on ajoute de l'acétate de Na 3 M pour faire 0,3 M.
- 9. On ajoute trois volumes d'éthanol à 95 % et on place le mélange sur de la glace sèche-éthanol pendant 5 à 10 minutes puis on le réchauffe à la température ambiante.
- 10. On fait tourner le mélange dans une microcentrifugeuse pendant 15 minutes, après quoi on jette le liquide surnageant et on lave le culot de centrifugation avec de l'éthanol à 75 %.
- 11. On redissout l'ADN dans 0,5 ml d'acétate de Na  $300~\mathrm{mM}$  et on répète les stades 9 et 10.
- 12. On remet 1'ADN en suspension dans 200 ml d'eau distillée, on l'étale en couche sur un gradient de sucrose alcalin à 5-20 % (NaOH 30 mM, EDTA 2 mM) et on le fait tourner pendant 40 minutes dans un rotor SW-40 à 37.000 t/mn à 4°C.
- 13. On recueille des fractions de 0,5 ml du haut du gradient et on les place dans 25  $\mu l$  de Tris 1M, pH 6,8

et on compte chaque fraction.

20

25

30

35

14. On élimine 5.000 à 10000 comptages par minute de chacune des autres fractions et on les fait passer sur un gel d'agarose alcalin. Ceci permet d'effectuer une estimation de la répartition des tailles. En général, on jette les fractions qui ont du cADN de moins de 500 nucléotides. Des fractions particulièrement utiles (c'est-à-dire d'au moins 500 nucléotides de long) apparaissent habituellement à la fraction 12 à partir du bas du tube. Par conséquent, pendant que le gel 10 chemine et se développe, les fractions 1 à 10 (y compris le culot de centrifugation) sont réunies et dialysées contre 2 litres d'eau, les fractions 11, 12, 13 et 14 sont également dialysées, mais individuellement. Le diagramme de gel indique si une réunion de fractions 15 supplémentaires est nécessaire ou non. En général, la matière supérieure à 500 nucléotides représentera 60 % des comptages précipitables par le TCA.

15. Le ss cADN est alors concentré avec du butanol secondaire jusqu'à un volume d'environ 400  $\mu$ l, puis on extrait le butanol par de l'éther.

16. On ajoute à l'extrait 40 µl d'acétate de Na 3 M et on remplit le reste du tube avec de l'éthanol à 95 %. On précipite sur de l'éthanol - glace sèche pendant 5 minutes puis on place le tube dans un godet rempli d'eau d'un rotor SW-27 et on centrifuge à 25.000 tours/minute pendant 60 minutes.

17. On décante l'éthanol et on le compte. L'éthanol doit contenir moins de 1 % des comptages. On lave le culot de centrifugation à l'éthanol et on compte à nouveau la solution de lavage. Moins de 1 % des comptages doivent être éliminés. Tous les comptages doivent rester dans le culot de centrifugation qui est liophylisé pendant 10 à 20 minutes, puis remis en suspension dans 100 µl d'eau.

#### D. Synthèse du second brin avec du klenow

1. Le mélange réactionnel ci-dessous est destiné à un mélange réactionnel de 1 ml à une concentration de ss cADN de 2 à 5  $\mu g/ml$ .

5	Réactif	Quantité	Concentration finale		
-		à ajouter			
	dATP, 10 mM, TTP, CTP,				
10	GTP	50 μ1	500 μM		
	KC1 700 mM	100 µl	70 mM		
	mercaptoéthanol 5 mM	100 µl	0,5 mM		
	(ajouter 1,8 $\mu$ l de solu-				
	tion de réserve Eastman		•		
15	(14 M) à 5 ml de H <sub>2</sub> O pour				
	donner 5 mM)				
	Tampon Klenow 10 x ·	100 μ1	Tns 30 mM		
	Tris 300 mM , pH 7,5	-	MgCl <sub>2</sub> 4 mM		
	MgCl <sub>2</sub> 40 mM				
20	Polymérase de Klenow				
	Boehringer-Mannheim		150-200 unités/ml		
	SS c ADN	2,5 μg			
	eau distillée	pour un volume	final		
		de 1000 $\mu l$	100		

- 2. On fait incuber le mélange réactionnel à 18-20°C
  pendant 5 à 6 heures.
- 3. On extrait le mélange deux fois avec du phénol-Tris pH 8 et de l'éther.
  - 4. On met de côté une partie aliquote (2-10.000 cpm) pour l'analyse sur gel.
- 5. Le reste de l'extrait est dialysé une nuit contre de l'eau dans un sac de collodion.

## E. Réaction S1

- 1. Le volume du mélange réactionnel de Klenow du stade D augmentera à 5-6 ml au cours de la dialyse. Le volume est ajusté jusqu'au ml supérieur suivant avec
- $^{35}$  d  $^{1}$ H $_{2}$ O et on ajoute un dixième de volume de tampon 10 x S1

NaCl 3 M Acétate de Na 0,3 M, pH 4,5 ZnCl<sub>2</sub> 100 mM

- 2. On ajoute de la S1 nucléase (Sigma) à une concentration finale de 10unités/ml et on la fait incuber à 37°C pendant 30 minutes, et on arrête la réaction par addition de EDTA 500 mM jusqu'à une concentration finale de 100 mM. On met de côté une partie aliquote pour l'analyse sur gel.
- 3. On extrait le mélange réactionnel deux fois avec du phénol et deux fois avec de l'éther. L'extrait est ensuite dialysé pendant 5 à 6 heures à température ambiante contre de l'eau avec au moins un changement d'eau, et concentré avec du butanol secondaire jusqu'à 400 ul environ.
  - 4. L'échantillon est chargé sur un gradient de sucrose à 5-20 % neutre (NaCl 0,1 M, Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) et centrifugé à 37.000 tours/minute dans un rotor SW-40 pendant 20 heures à 4°C.
- 5. On recueille des fractions de 0,5 ml du haut du tube. Les fractions 1-14 contiendront environ 500 bps de ds cADN. On effectue des essais sur gel pour vérifier la répartition des tailles.
  - 6. Les fractions sont dialysées de manière poussée pendant une nuit contre de l'eau distillée.
  - 7. L'échantillon est concentré à 400 µl environ avec du butanol secondaire et précipité avec de l'acétate de Na et de l'éthanol, deux fois. Le culot de centrifugation est lavé à chaque fois avec de l'éthanol à 75 %. L'ADN doit être exempt de contaminant.
    - 8. Le ds cADN est alors lyophilisé.
    - . F. Réaction de traînée

25

30

1. Les conditions de réaction ci-dessous sont prévues pour 1 µg de ds cADN et peuvent être dimensionnées en conséquence.

Solutions de réserve : dCTP 50 µM CoCl, 10 mM Cacodylate de Na 1,2 M Tampon cacodylate 2X : 250 µ1 pH 7,19 avec HCl 250 µ1 DDT 1 mM 750 ul H20 5 Quantité à ajouter Réactif 200 µ1 Tampon de cacodylate 2X 20 μl (1 μg) cADN (50 ng/ µ1 40 uldCTP 50 µM CoCl<sub>2</sub> 20 μM<sup>\*</sup> 20 ul 10 25 mg/ml de BSA exempt de 8 µ1 BRL nucléase 68 µ1 dH20  $44~\mu^{1}$  (concentration TdT (Bethesda Res. Lab.) finale  $760 \,\mu/ml$ ) 15  $\star$  Ajouter CoCl<sub>2</sub>juste avant le BSA sinon il précipitera. 2. On met à incuber le mélange réactionnel (-TdT) à 20°C pendant 20 minutes. 3. On ajoute ensuite le TdT et on poursuit l'incubation pendant 20 minutes supplémentaires. 20 4. On arrête la réaction par addition de 8  $\mu$ l d'EDTA 500 mM puis on extrait deux fois au phénol et deux fois à l'éther. 5. On précipite l'échantillon comme ci-dessus avec de l'acétate de sodium, de l'éthanol dans le rotor SW-27. 25 6. On lave le culot de centrifugation avec de l'éthanol à 7,5 %, on le lyophilise et on le remet en suspension dans 50 µl d'eau distillée. G. Accolement du cADN à queue au plasmide -dG 1. La réaction d'accolement est effectuée dans 30 des tubes capillaires scellés de 10 µI. 2. Le mélange réactionnel comprend : 1 μl (15 ng) ds cADN 1 ul (20 ng) plasmide 35 Tampon d'accolement 10X

NaCl 1 M Tris 100 Mm, pH 7,5 EDTA 10 mM

eau distillée 7 μl

5

25

30

3. On fait incuber le mélange à 68° pendant 8 minutes puis à 42°C pendant 2 heures après quoi on arrête le bain-marie et on laisse le mélange réactionnel venir en équilibre avec la température ambiante. (5 heures - une nuit).

10 EXEMPLE III

Cet exemple illustre les procédés d'identification de sondes qui sont utiles pour la détection de polymorphismes chez l'homme.

- 1. L'ADN est isolé du sang périphérique de quatre 15 sujets humains différents comme il est décrit dans l'exemple I.
  - 2. Les quatre échantillons d'ADN sont restreints séparément avec l'enzyme de restriction EcoRI conformément au mode opératoire suivant.
- a) On ajoute les constituants suivants dans un tube d'Eppendorf de 1,5 ml :
  - 1) Suffisamment de la solution d'ADN pour 10  $\mu g$  (habituellement entre 10  $\mu l$  et 50  $\mu l$ ).
  - 2) Eau distillée, si nécessaire pour ajuster le volume réactionnel final
  - 3) La quantité appropriée du tampon de digestion de l'endonucléase 5X spécifique préparé selon les recommandations du fabricant.
  - 4) Endonucléase de restriction dans un excès de 1,5 à 2,5 fois, c'est-à-dire 15 unités à 25 unités pour une digestion de 10 µg.
  - b) On soumet le mélange à un vortex pendant 1 à 2 secondes ou on donne quelques chiquenaudes au tube pour effectuer le mélange.
- 35 c) On fait tourner le mélange dans une micro-

5

10

15

20

25

30

centrifugeuse Eppendorf pendant 10 à 15 secondes pour transformer les réactifs en culot de centrifugation.

- d) On fait incuber le culot pendant 2 à 16 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ .
- e) On arrête la réaction pour la stocker en vue d'une électrophorèse future en ajoutant :
  - 1) 1/10 volume de EDTA 0,1 M, pH 7,0, concentration finale 10 mM
  - 2) 1/10 volume de SLS 5 % , concentration finale 0.5 %
  - 3) 1/10 volume de NaCl 3 M ou d'acétate de Na 3 M, concentration finale 0,3 M
  - 4) 2 à 2,5 volumes de EtOH froid à 95 %, concentration finale environ 70 %

L'échantillon peut être stocké à -20°C pour une durée pouvant atteindre plusieurs mois.

Les échantillons peuvent être précipités rapidement en plaçant un tube d'Eppendorf contenant l'ADN digéré, les réactifs d'arrêt et EtOH dans un bain de glace sèche-EtOH pendant 2 à 5 minutes suivant le volume jusqu'à ce que le EtOH soit visqueux. Les échantillons ne doivent pas être congelés. On fait tourner l'échantillon dans une microcentrifugeuse pour le transformer en culot de centrifugation.

- f) Pour arrêter la réaction, qui doit être chargée sur le gel aussitôt après digestion, ajouter une solution de colorant marqueur Ficoll 5X à une concentration finale de 1X. Ceci est effectué avec des échantillons dans lesquels les volumes finaux sont inférieurs à 75 µl.
  - g) Un mélange réactionnel typique est préparé comme suit :

95% Tampon 5X EcoRI 0,1 M .5% 3M10mgADN  $H_{2}O$ SDS · NaCl EtOH EDTA 5 / 1 6,25 µl 6,25 µl 7,0µl 14,0 川 35  $4 \mu l$ 20 µl 10 µl 16 µl

et mis à incuber à 37°C pendant 2 heures. L'EDTA, le SDS, le NaCl et l'EtOH sont ajoutés comme il est indiqué et on stocke à -20°C ou on ajoute 12,5 µl de colorant marqueur Ficoll 5X et on charge sur gel.

- 3. On soumet les ADN à une électrophorèse comme il est décrit dans l'exemple II, en faisant passer 5  $\mu g$  de chacun des trois ADN individuels suivant un chemin et 5  $\mu g$  d'ADN du quatrième individu dans un chemin adjacent.
- 10 4. Les ADN soumis à l'électrophorèse sont ensuite séchés conformément au procédé suivant :
- a) L'ADN est dénaturé dans le gel en faisant passer le gel dans une capsule de séchage (pyrex ronde, 190 x 100 mm) contenant 250 ml de KOH 1M, NaCl 0,5 M et il est agité à 200 tours/minute à la température ambiante sur un agitateur "gyrotory" New Brunswick pendant 25 minutes pour un gel à 0,8 % à 30 minutes pour un gel à 1,2 %.
- b) Des feuilles de nitrocellulose prédécoupées 20 (9,5 x 15 cm) sont placées dans 200-300 ml d'eau distillée pour les mouiller complètement.

- c) La solution est décantée et est mise de côté (la solution KOH-NaCl peut être utilisée pour dénaturer jusqu'à 10 gels). Le gel est rincé à l'eau distillée (200-300 ml). Toute l'eau de rinçage est éliminée avec une pipette de Pasteur. On ajoute 250 à 300 ml de Tris 1 M, pH 7,0, et on poursuit l'agitation à la température ambiante à 50 tours/minute pendant 35 minutes.
- d) On neutralise le gel par décantation et on
  30 ajoute 250 à 300 ml de Tris 1M, pH 7,0 et on continue
  à agiter pendant 30 minutes. On met de côté les solutions
  de Tris et on les réajuste à pH 7,0 avec HCl concentré
  jusqu'à 10 fois.
- e) Si on le désire on décante le gel, on ajoute 35 250-300 ml de Tris lM, pH 7,0 et on poursuit l'agitation

pendant 25 minutes.

10

15

20

25

30

- f) On décante tout le Tris et on l'élimine avec une pipette de Pasteur. On met le gel en équilibre en ajoutant 250-300 ml de 6SSC (1X = NaCl 0,15 M, Citrate de Na 0,015 M) et on agite pendant 20 minutes.
- g) On décante l'eau distillée de la nitrocellulose et on ajoute 100-200 ml de SSC 6X.
- h) En utilisant un plateau de pyrex de 28 x 18 x 4 cm ajouter 600 à 700 ml de SSC 6X. On mouille une mèche de deux bandes de Whatman 3M (15,5 x 38 cm) dans la solution de SSC 6X. On place une plate-forme de séchage en matière plastique (18,5 x 19, x 1 cm) au milieu du plateau et on centre la mèche de Whatman 3 M sur la plate-forme de telle sorte que chaque extrémité soit immergée dans la solution de SSC 6X.
- i) En portant des gants, on fait passer le gel de la capsule sur la mèche. On frotte le gel avec les doigts gantés pour assurer le contact entre le gel et la mèche.
- j) La nitrocellulose pré-imprégnée (Schleicher et Schuell, Keene, N.H.) est placée sur le gel et disposée sur les chemins à sécher. En frottant avec les doigts gantés, on assure le contact du gel et de la nitrocellulose et on évite l'apparition de bulles d'air. Le gel qui ne doit pas être séché est découpé et jeté. Trois morceaux d'une pipette d'un ml sont placés le long de chaque côté du gel pour éviter les courts-circuits. Un morceau de Whatman 3M (15,5 x 9,5) est mouillé et placé sur la nitrocellulose. Un autre morceau sec de taille similaire de Whatman 3 M est ajouté. Environ 10 cm de serviettes brunes de 10,5 x 12 cm (Singlefold Garland Sof-knit Towel No. 237; Fort Howard Paper Company, Green Bay, Wis. 54305) sont empilés sur le gel. On recouvre au moyen d'un enroulement en matière plastique serré autour du plateau. L'appareil est laissé pendant 10 à 20 heures à la température ambiante. La plate-forme

de séchage est placée au-dessus pour former poids.

k) Les serviettes sont retirées (certaines de celles du dessus peuvent être encore sèches) en même temps que deux morceaux de papier Whatman 3M laissant à nu le papier de nitrocellulose. Une lame de rasoir neuvé est utilisée pour découper la feuille de nitrocellulose en trois bandes contenant 2 ou 3 chemins d'ADN (2 chemins chacune avec le formeur de puits à 8 chemins et 3 chemins chacune avec le formeur de puits à 10 chemins). Le coin inférieur gauche de chaque bande est entaillé pour permettre l'orientation et un, deux ou trois trous sont percés au bas des bandes appropriées pour l'identification. Lorsque les bandes sont sèches, elles peuvent être marquées avec un crayon marqueur.

10

15

20

25

30

- 1) Les bandes sont placées dans 250 ml de SSC 2X dans un plateau de séchage. Chacun des côtés des bandes est frotté avec des doigts gantés pour éliminer des morceaux d'agarose. Les bandes sont placées sur un papier filtre Whatman No. 1 pour sécher à l'air pendant 10 à 20 minutes. Les bandes sont ensuite placées entre deux morceaux de papier Whatman 3M et enroulées dans une feuille d'aluminium. L'extérieur est marqué avec un crayon marqueur et peut être placé sous vide dans un dessicateur pendant une durée pouvant atteindre 6 mois.
  - 5. Des <u>E. coli</u> MC1061 portant des plasmides recombinants sont cultivés dans 100 ml de bouillon L à partir d'une colonie individuelle de la collection produite dans l'exemple II et de l'ADN de plasmide est isolé par le mode opératoire suivant :
  - a) les cellules sont centrifugées à 5000 tours/minute pendant 5 minutes à 0°C.
  - b) Les cellules sont lavées avec 1/4 de volume de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA l m, pH 8) à 0°C.
- c) Les cellules sont remises en suspension dans 3 ml de sucrose à 25 %, du Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 à

0°C, et on ajoute 0,3 ml de lysozyme (10 mg/ml dans du Tris-HCl 0,25 M, pH 7,5); après quoi on incube sur de la glace pendant 5 minutes en brassant doucement de temps à autre.

- d) On ajoute 1,2 ml de EDTA 250 mM, pH 8 et on poursuit l'incubation sur de la glace pendant 5 minutes.
  - e) On ajoute 48 ml de solution de Triton :
    2 ml de Triton X100 (Sigma) à 10 %
    50 ml d'EDTA 250 mM pH :

135 ml d'H<sub>2</sub>O. et on fait incuber sur de la glace pendant 10 minutes

5

10

15

20

25

30

35

supplémentaires.

- f) On fait tourner le mélange pendant 30 minutes à 25.000 tours/minute à 0°C.
- g) On élimine le liquide surnageant et on ajuste le volume à 8,7 ml, après quoi on ajoute 8,3 g de CsCl et 0,9 ml de bromure d'éthidium à 10 mg/ml (sigma No. E-8151). L'indice de réfraction doit être entre 1,390 et 1,396.
- h) On centrifuge l'échantillon à 35-38 K à 20°C pendant 48-72 heures et on visualise les bandes en éclairant le tube avec une lumière ultraviolette de grande longueur d'onde.
  - i)La bande inférieure qui contient l'ADN superenroulé est recueillie en ponctionnant latéralement le tube avec une aiguille no. 21.
  - 6. Les recombinants pAT 153 -ADN humains sont marqués avec du <sup>32</sup>P par translation d'encoche comme il est bien connu dans la technique ("A Manual for Genetic Engineering. Advanced Bacterial Genetics" par Davis, R.W., Botstein, D et Roth, J.R. 1980 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. p. 168 -170).
  - a) On place dans un tube de microcentrifugeuse 20  $\mu$ l d'eau moins le volume de solution d'ADN qui doit être ajouté.

- b) On ajoute ensuite 2,5  $\mu$ l du Tris 0,5 M pH 7,5, MgSO,0,1 M, pTT 10 mM, 500  $\mu$ g/ml de BSA.
- c) 2,5  $\mu l$  d'une solution contenant chaque dNTP 0,2 mM après quoi on ajoute 100 mg d'ADN recombinant humain pAT 153 provenant du stade 5 ci-dessus.
- d) On prépare au préalable et stocke à -20°C une solution de réserve de DNase :

l mg/ml de DNase dans
du Tris 50 mM , pH 7,5

MgSO<sub>4</sub> 10 mM

5

20

25

30

DTT 1 mM

et 50 % de glycérol.

- e) La solution de réserve de DNase provenant de (d) ci-dessus est diluée à 0°C à 1/40.000 dans du Tris
  50 mM, pH 7,5, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, DTT 1 mM et 50 μg/ml de BSA, et on ajoute au mélange réactionnel 0,5 μl de la DNase diluée.
  - f) On ajoute 10  $\mbox{$\mu$Ci}$  de chaque  $^{32}\mbox{$P$}$  dNTP en solution aqueuse.
  - g) On amorce la réaction entière par addition de  $0,1~\mu 1$  de polymérase I d'ADN <u>E. coli</u> à 2 mg/ml et on fait incuber à 14°C pendant 3 heures.
  - h) On ajoute 25  $\mu l$  de Na  $_3$  EDTA 0,02 M d'ADN support 2 mg/ml et du SDS 0,2 % pour arrêter la réaction.
  - i) On introduit le mélange réactionnel dans une colonne de Sephadex G-50 (medium) de 0,7 x 20 cm prééquilibré avec du Tris Na $_3$  EDTA 10 mM à pH 7,5 (TE) et lavé avec le même réactif.
  - j) On recueille des échantillons d'effluent de 0,5 ml dans des tubes de polypropylène. L'ADN apparaît après 2 ml de lavage. L'emplacement de l'ADN marqué au <sup>32</sup>p est suivi avec un détecteur manuel et on recueille le premier pic en négligeant la traînée.
- 7. La sonde marquée provenant du stade 6 est35 hybridée aux ADN génomiques séchés provenant du stade 4

conformément au mode opératoire suivant :

- a) On prépare 300 ml de solution de pré-hybridation de la manière suivante :
- 1) 100 ml de  $PO_4$  3X ( $Na_2PO_4$  0,75 M,  $NaH_2PO_4$  0,75 M, Syrophosphate de Na 0,01 M)
  - 2) 90 ml de SSC 20 X (NaCl 3M, Citrate de Na 0,3 M)
  - 3) 92 ml d'eau distillée
  - 4) 15 ml de BFP 0,5 % ( 0,5 g pour 100 ml de chacun des produits suivants : sérum albumine de boeuf, Ficoll, et polyvinylpyrolydone-360)
  - 5) 3 ml de ssADN à 5  $\mu$ g/ $\mu$ l (ADN de sperme de saumon dénaturé). On fait passer la solution dans un bac en matière plastique avec un couvercle (20x14,5x10,5 cm) et on la chauffe à 68°C au bain-marie. On ajoute les filtres à hybrider et on les fait incuber de 4 à 6 heures à 68°C.
- b) Pour les bandes d'hybridation, 3 à 4 bandes sont enroulées autour d'un flacon de verre siliconé et inserrées dans un flacon à scintillation en matière plastique contenant 2 ml de solution d'hybridation. Pour l'hybridation des feuilles de nitrocellulose dans des sacs, on ajoute la quantité appropriée de la solution d'hybridation et on scelle le sac à la chaleur au moyen d'un dispositif de scellement Sears.
  - La solution d'hybridation est préparée comme suit pour l'hybridation dans un flacon :
    - 1) 80  $\mu$ l de BFP à 0,5 %
    - 2) 20 µ1 d'EDTA 0,1 M, pH 7,0
    - 3) 20 ul de SDS à 10 %
    - 4) 20 ul de ssADN à 5  $\mu$ g/ $\mu$ l
  - 5) sonde translatée à encoche <sup>32</sup>P variable pour donner 2-4x10<sup>6</sup> comptages/ml.
  - 6) Eau distillée variable pour faire 1900  $\mu$ l, faire bouillir 10 minutes ; mettre à la glace 7 minutes.

35

30

- 7)  $100\mu$ 1 SSC 20X 2000  $\mu$ 1
- c) En portant des gants, on retire les bandes directement de la solution de pré-hybridation et on enroule les 3 ou 4 bandes appropriées autour d'un flacon de verre siliconé (19 x 48 mm avec capuchon) et on les insère dans un flacon à scintillation en matière plastique (28 mm de diamère) contenant la solution d'hybridation préparée.

Du parafilm est enroulé autour du couvercle. En tapotant plusieurs fois, on assure que les filtres sont tous au fond du flacon. Les filtres sont mis à incuber 20 à 24 heures à 68°C dans un bain-marie "gyratory" New Brunswick avec une lente agitation (réglage numéro 3).

Note: S'il y a moins de trois bandes à enrouler autour du flacon, on peut ajouter une ou deux bandes témoins qui ont été pré-hybridées.

- d) Les filtres sont lavés dans SSC 2X, SDS 0,5 % comme suit : On prépare 6 à 9 litres de solution de lavage selon le nombre de filtres à laver. Dans une bonbonne de verre avec robinet d'arrêt à la partie inférieure, on ajoute :
  - 1) 600 à 900 ml de SSC 20X

20

30

- 2) 300 à 450 ml de SDS à 10 %
- 25 3) 5100 à 7650 ml d'eau distillée
  On place un barreau d'agitateur au fond et on suspend
  un thermomètre à partir du dessus. On chauffe la solution
  à 68°C sur une plaque chauffante, en agitant.

On recueille 1 à 1,5 litre de solution de lavage dans un bac en matière plastique. Les filtres sont retirés après l'hybridation (en portant des gants) et plongés aussitôt dans une solution de lavage. Les pinces Millipore sont utilisées pour dérouler et transférer les filtres.

e) Les filtres sont transférés dans 1 à 1,5 litre

- es solution de lavage fraîche et mis à incuber 7 à 11 minutes à 68°C dans un bain-marie. La première lution de lavage est soigneusement jetée dans le tuyau d'évacuation avec beaucoup d'eau pour la balay
- f) Les filtres sont à nouveau transférés dans 1 à 1,5 litre de solution de lavage fraîche. On pour le transfert toutes les 7 à 12 minutes et on fait incuber à 68°C jusqu'à ce que toute la solution de lavage soit utilisée (4 à 7 lavages).
- g) Le transfert final s'effectue dans un litre solution de lavage contenant du SSC 0,1 X, du SDS à 0,5 % (945 ml d'eau distillée, 50 ml de SDS à 10 %, 5 ml de SSC 20 X) chauffée à 68°C. L'incubation s'effectue à 68°C pendant 10 minutes.
- h) Les filtres sont retirés et rincés dans 500 : SSC 2X à la température ambiante. Les filtres sont p sur une feuille de papier Whatman numéro 1 pour séche à l'air pendant 15 à 30 minutes.
- tapotées sur un papier jaune d'un emballage de pellis pour radiographie, marquées, recouvertes d'un enroule en matière plastique et placées dans une cassette ave des écrans d'intensification incorporés. En chambre noire, la cassette est chargée avec une pellicule por radiographie X-Omat AR de 20,3 x 25,4 cm en plaçant la pellicule entre les bandes de nitrocellulose et l'écran. La cassette est fermée et placée dans un congélateur à 70°C.
- j) La pellicule radiographique est développée en 24 à 48 heures. La pellicule est retirée de la casses et développée en chambre noire avec seulement la lumière jaune de sécurité. La cassette peut être rechargée si une autre exposition est nécessaire.
- 8. Si la sonde testée donne davantage de bandes

  dans le chemin avec trois ADN individuels que dans la

bande avec seulement un ADN individuel, elle devient un candidat pour la détection des polymorphismes.

9. Les sondes identifiées dans le stade 8 sont à nouveau essayées en les hybridant contre une grande série d'ADN humains pour déterminer le degré auquel la région clonée est polymorphe. Les sondes correspondant aux régions ayant au moins quatre allèles différents présents dans la population avec des fréquences supérieures à 10 % chacun sont insorporées dans l'essai de paternité ou dans l'essai d'identité individuelle.

#### EXEMPLE IV

10

30

35

Cet exemple illustre les performances et l'évaluation d'un essai de paternité utilisant la présente invention.

- 1. Des échantillons de sang sont prélevés sur la mère, l'enfant et le père putatif et l'ADN est purifié comme il est décrit dans l'exemple I.
  - 2. Ces ADN ont réagi séparément avec l'enzyme de restriction EcoR1 comme il est décrit dans l'exemple III.
- 3. Ces ADN sont soumis à une électrophorèse comme il est décrit dans l'exemple II, en faisant passer 5  $\mu g$  de chacun des ADN de la mère et du père putatif et 5  $\mu g$  d'ADN de chacun des trois individus dans un chemin adjacent.
- 4. Les ADN soumis à l'électrophorèse sont séchés comme il est décrit dans l'exemple III.
  - 5. La série d'ADN de "sonde de paternité" est marquée au  $^{32}$ P comme il est décrit dans l'exemple III.
  - 6. Les ADN sondes marqués du stade 5 sont hybridés avec les ADN génomiques séchés du stade 4 comme il est décrit dans l'exemple III.

Tous les gènes de l'enfant proviendront soit de la mère, soit du père. Par conséquent, si le père putatif est le père biologique, toutes les bandes présentes dans le chemin avec l'ADN de l'enfant seront également présentes dans le chemin sans l'ADN de l'enfant. Inversement,

si le père putatif n'est pas le père biologique, de nouvelles bandes apparaîtront dans le chemin avec l'ADN de l'enfant.

# EXEMPLE V

Cet exemple fournit des techniques spécifiques pour l'évaluation d'un essai de paternité.

# A. PURIFICATION DE L'ADN DU SANG

10

15.

20

- 1. Des échantillons de sang (5 à 10 ml) doivent être recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA ou du citrate comme anticoagulant et stockés à 4°C jusqu'à leur traitement.
- 2. Remettre en suspension les cellules par inversion et les centrifuger à 2.000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C. Enlever le sérum (au-dessus) sans déranger la couche leucocytaire.
- 3. Ajouter un volume égal de tampon de lyse sanguine (sucrose 0,32 mM, Tris 10 mM, pH 7,6, Triton X-100 à 1%) à 4 °C et mélanger soigneusement par retournement. Faire passer dans un tube conique de polypropylène de 50 ml (par exemple Corning, Falcon), rincer le tube de sang et ajuster le volume final à 4 fois le volume initial de sang. Mélanger soigneusement et centrifuger à 2000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C.
- 4. Décanter le liquide surnageant. Si le culot de centrifugation n'est pas propre (c'est-à-dire s'il est trop contaminé par les erythrocytes) remettre en suspension le culot de centrifugation dans 3 ml de tampon de lyse et centrifuger à nouveau.
- 5. Remettre en suspension le culot rose blanchâtre

  dans 2,5 à 5 ml de tampon de lyse d'ADN (Tris 10 mM,

  pH 7,4, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, 100 µg/ml de protéinase K).

  Mélanger soigneusement et faire tourbillonner si nécessaire.

  Ajouter du SDS (solution de réserve : 20 %) jusqu'à

  une concentration finale de 1 %. Mélanger en retournant

  doucement le tube. L'échantillon deviendra très visqueux.

Flacer sur le plateau d'un agitateur à balancement à 37°C pendant une nuit en mélangeant doucement ou à 50°C pendant trois heures en mélangeant de temps à autre.

- i. Ajouter du NaCl jusqu'à une concentration finale de l'A à partir d'une solution de réserve 6 M (c'est-à-alle diluer à 1:5). Mélanger doucement à la main ou sur le plateau d'un appareil d'agitation par balancement. A ca moment, l'échantillon peut être stocké au froid indéfiniment.
- 7. Ajouter un volume égal de mélange phénolchloroforme (une partie de phénol à 90 %, du Tris 1M à 10 % pH 8,0 : une partie de CHCl<sub>3</sub>) et agiter doucement pendant 15 à 30 minutes à la température ambiante.
- 8. Faire passer dans un tube Corex de verre de 15 ml et centrifuger à 4.000 tours/minute pendant 15 minutes (beckman) ou 10.000 tours/minute pendant 5 minutes (Sorvall) pour séparer les phases.
- 9. Eliminer la phase aqueuse supérieure avec une pipette à large embouchure et la renvoyer dans le tube en matière plastique initial. Répéter ce mode opératoire d'extraction deux fois supplémentaires.
  - 10. Placer l'échantillon d'ADN dans un sac à dialyse marqué approprié et dialyser sur un excès de 100 fois de tampon TE (Tris 10 mM pH 7,4, 1 mM).
  - 11. Lire la densité optique d'une dilution de l'échantillon approprié (par exemple 1/20) contre le même type de solution témoin à 240 nm (pour l'EDTA); 250 nm (maximum pour l'ADN); 270 nm (maximum pour le phénol); 280 nm (maximum pour les protéines); 340 nm (turbidité). 260/270: environ 1,2; 260/280: environ 1,8.
    - B. <u>DIGESTION DE L'ADN GENOMIQUE PAR L'ENDONUCLEASE</u>

      <u>DE RESTRICTION</u>
  - 1. Ajouter les constituants suivants dans un tube d'Eppendorf de 1,5 ml :

15

10

20

25

30

- a) Prendre environ 10  $\mu g$  d'ADN/essai (habituellement entre 10  $\mu l$  et 50  $\mu l$  ).
- b) La quantité appropriée du tampon de digestion de l'endonucléase spécifique 10% préparée suivant les recommandations du fabricant.
- c) L'endonucléase de restriction dans un excès de 3 fois.
- 2. Faire tourbillonner une à deux secondes ou tapoter le tube avec le doigt plusieurs fois pour mélanger.
- 3. Faire tourner dans la microcentrifugeuse Eppendorf 10 à 15 secondes pour transformer les réactifs en granulés.
- 4. Faire incuber 2 heures à 37°C pour <u>Eco</u> R1 ou à 65°C pour <u>Taq</u> I.
  - 5. a) Ajouter 1/10 volume d'acétate de  $\mathrm{NH_4}$  3M
  - b) 2 à 2,5 volumes de EtOH froid à 95 %
  - c) Stocker à -20°C pendant une nuit. Faire tourner dans la microcentrifugeuse pour transformer en granulés (15 minutes à 4°C)
  - 6. a) Dissoudre le granulé dans 15 ml de  ${\rm H_2O}$
  - b) Ajouter les 10X appropriés de tampon d'enzyme de restriction et un excès de 3 fois d'endonucléase de restriction et répéter les opérations 2, 3 et 4.
  - 7. Pour arrêter la réaction qui doit être chargée sur le gel aussitôt après digestion, ajouter une solution de colorant marqueur Ficoll 5X à une concentration finale de 1X. Ceci peut être effectué avec des échantillons dans lesquels le volume final est inférieur à 20 µl.

# C. ELECTROPHORESE

10

20

25

30

35

1. Préparer un gel d'agarose en faisant bouillir de l'agarose dans du TAN 1X (Tris 40 mM, pH 7,9 ; acétate de Na 4 mM, EDTA 1 mM). La concentration finale d'agarose doit être entre 0,4 % et 1,2 % suivant la taille du

fragment à fractionner. Les échantillons qui doivent être hybridés au pAW-101 sont soumis à une électrophorèse dans de l'agarose à 0,4 % tandis que pour l'hybridation au pLM 0,8, on utilise de l'agarose à 1,2 %.

- 2. Lorsque la solution d'agarose atteint environ 75°C, ajouter de l'EtBr (bromure de 2,7-diamino-10, éthyl-9-phényl-phénanthridinium) jusqu'à une concentration finale de 500 ng/ml à 12,5 ng/ml.
- 3. Verser immédiatement dans un moule pour électrophorèse sur gel horizontal pour produire un gel d'environ 4 mm d'épaisseur. Placer un formateur de puits à chaque extrémité du moule. Laisser refroidir à la température ambiante jusqu'à solidification. Enlever le formateur de puits et couvrir le gel avec du TAN 1X.
- D. Placer les échantillons en couche dans les puits du gel. Relier la boîte à gel à la source de courant. Allumer l'alimentation en courant et amener le courant à la valeur appropriée. Par exemple, pour séparer des 20 fragments de plus de 10 kb, on effectuera l'électrophorèse sous 20 V pendant 3 jours. Pour des fragments de 1,5 kb, on effectue l'électrophorèse sous 40 V pendant une nuit (16 à 20 heures) et après l'électrophorèse, on débranche le récipient. En portant des gants, on 25 retire le gel avec une cuillère à gel. On place le gel sur une boîte à lumière ultraviolette et on applique une règle transparente le long du chemin avec l'ADN marqueur. On prend une photographie du gel avec une pellicule photographique appropriée pour conserver 30 un enregistrement de l'électrophorèse.
  - D. PREPARATION RAPIDE DU PLASMIDE
  - 1. 15 ml de  $\underline{E}$ .  $\underline{coli}$  HB101 portant soit pAW101, soit pLM 0.8.
    - 2. Centrifuger 10 minutes à 8000 tours/minute.
- 3. Faire tourbillonner le culot de centrifugation.

- 4. Ajouter 300 ml de sucrose à 25 %; du Tris 50 mM pH 8,0; de l'EDTA 0,1; 0,2 mg/ml de RNase; 1 mg/ml de lysozyme.
  - 5. Laisser dans la glace pendant 15 minutes.
- 6. Ajouter 250 ml de Triton X-100 à 0,5 %; de l'EDTA 50 mM; du Tris 50 mM, pH 8,0.
  - 7. Laisser sur la glace pendant 5 minutes.
- 8. Faire tourner à 4°C pendant 30 minutes sous 25 K dans SW-25, 27 ou 41.
- 9. Séparer le culot de centrifugation du liquide surnageant (le culot est un gel d'ADN bactérien).
  - 10. Au liquide surnageant, ajouter 10 ml de protéinase K (5 mg/ml).
    - 11. Laisser 5 minutes à la température ambiante.
- 12. Extraire une fois avec du phénol : CHCl<sub>3</sub> 1:1; deux fois avec CHCl<sub>3</sub>;
  - 13. Ajouter à la phase aqueuse de l'acétate  $\mathrm{NH}_4$  à une concentration finale de 0,3 M
    - 14. Ajouter 2,5 X volume d'éthanol
- 20 15. Laisser au congélateur (-20°C) pendant une nuit.
  - 16. Centrifuger, dissoudre le précipité dans du Tris 20 mM à pH 7,4 , EDTA 10 mM.
    - 17. Ajouter du CsCl pour la formation des bandes.
    - E. TRANSLATION DE L'ENCOCHE

- 25 1. Pour chaque mélange réactionnel d'hybridation :
  - a) 50 nanogrammes de l'ADN sonde naturel
  - b) 0,7  $\mu$ l de tampon de translation d'encoche 10 X (1x = Tris. HCl 25 mM, pH 7,9, MgCl 2,5 mM, DTT 5 mM, 100  $\mu$ g/ml de sérum albumine de boeuf).
  - c) 2,5 µl d'alfa P-32 désoxynucléotides triphosphate (25 µCi).
  - d) 0,5 μl de DNase I à 20 picogrammes/μl
  - e) 0,5  $\mu$ l d'ADN polymérase I (3 unités). Le volume final est ajusté à 5  $\mu$ l/

- 2. Faire incuber à 16°C pendant 2 heures
- 3. Arrêter la réaction en ajoutant de l'EDTA à une concentration finale de 10 mM et du SDS à une concentration finale de 0,5 %. Volume final 100  $\mu$ l.
- 4. Séparer l'ADN marqué des triphosphates n'ayant pas réagi par centrifugation du mélange réactionnel à travers 0,6 ml de SEpharose 6B-Cl dans un tube de microcentrifugeuse percé à 1500 tours/minute pendant 2 minutes.
- 5. Prendre 1 µl de l'écoulement à travers la matière (c'est-à-dire contenant l'ADN marqué) et compter dans un spectromètre à scintillation beta.

# F. MODE OPERATOIRE DE TRANSFERT SOUTHERN POUR LE ZETABIND

- 1. Faire l'ADN sur un gel d'agarose. Colorer au bromure d'éthidium (10  $\mu$ g/ml) pendant 15 à 30 minutes, éliminer le colorant en excès en plongeant dans un tampon pendant 15 à 30 minutes et photographier.
  - 2. Plonger le gel dans NaOH 0,5 M, NaCl 1,0 M pendant 30 minutes avec agitation modérée.

20

25

30

- 3. Rincer le gel à l'eau et répéter l'opération 2 avec du Tris. HCl à 0,5 M, pH 7,5, NaCl 0,3 M.
- 4. Mouiller le Zetabind avec de l'eau. Puis plonger pendant 30 minutes dans un tampon phosphate de Na (0,025 M pH 6,5).
- 5. Plonger le gel pendant 15 minutes dans le même tampon phosphate que dans le stade 4 pendant 20 minutes.
- 6. Placer deux bandes de Whatman 3 mm mouillées dans du tampon phosphate, de la dimension du gel. S'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air emprisonnées entre les deux.Placer le gel (les filtres en bas) sur un plateau avec la mèche de papier 3 mm immergée dans un tampon phosphate. Placer le Zetabind sur le gel, puis 2 bandes de papier 3 mm et finalement une serviette en papier (d'une hauteur de 7,5 à 10 cm). Placer un plateau plat

sur le dessus et un certain poids (par exemple un flacon de 100 ml) pour assurer un contact uniforme entre le gel et les papiers.

- 7. Transférer pendant une nuit en utilisant un tampon phosphate (0,025 mM pH 6,5).
- 8. Laver la membrane avec du tampon phosphate pendant 15 minutes (frotter gentiment le côté de la membrane qui était en contact avec le gel).
  - 9. Cuire en étude à vide pendant 2 heures à 80°C.
- 10. Placer dans un sac "Seal-a-meal" et laver pendant 30 à 60 minutes à 60°C dans du SCC 0,1 X, SLS 0,5 % (environ 15 ml).
- 11. Evacuer le tampon du stade 10 et le remplacer par un tampon de préhybridation (SSC 4X, phosphate de Na 50 mM, pH 6,7, 5 X Denhardt, 200 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé et du formamide à 50 %). Faire incuber 3 à 16 heures à 37°C.
  - 12. Dénaturer l'échantillon en le chauffant dans 1 ml de tampon d'hybridation pendant 10 minutes à 70°C. Hybrider avec l'ADN radioactif dénaturé pendant 40 à 72 heures à 37°C (2 x 10 dpm/sac).
  - 13. Laver avec du SSCP 2X, SLS 0,1 % à 65°C en agitant pendant 20 minutes jusqu'à ce qu'une partie aliquote de 10 ml de l'eau de lavage contienne moins de 100 cpm Cherenkov (environ 6 fois). Laver deux fois avec du SSCP 0,4 X, du SLS 0,02 % à 65°C et deux fois avec du SSCP 0,1 X. Ajouter à chaque fois suffisamment de tampon pour recouvrir les filtres.
- 14. Sécher le Zetabind et le laisser sécher à l'air avant de le recouvrir de cellophane et le placer dans la cassette pour l'autoradiographie.

Avant la réutilisation enlever la sonde en la chauffant à 70°C pendant 10 minutes dans du tampon de préhybridation.

35

30

5

10

15

20

PREHYBRIDATION (pour un volume total de 15 ml)

1,5 ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé (5mg/ml)

3,0 ml de SCC 20X

1,5 ml de Denhardt 50 X

1,5 ml de phosphate 0,5 M

7,5 ml de formamide à 100 %

0,15 ml de SLS à 20 %

10

15

20

25

30

35

5

ADN dénaturé marqué au  $^{32}$ P.

encore 1,5 ml de SSC 20 X.

HYBRIDATION (pour un volume total de 15 ml)

15. On tapote les six bandes des deux gels sur un papier jaune d'un emballage de pellicule radiographique, on les marque, on les recouvre d'un enroulement en matière plastique et on les place dans une casette avec des écrans d'intensification incorporés. En chambre noire, on charge la cassette avec une pellicule radiographique X-omat AR de 20 x 25 cm en plaçant la pellicule entre les bandes de nitrocellulose et l'écran. On ferme la cassette et on la place dans un congélateur à -70°C.

16. On développe la pellicule radiographique en 24 à 48 heures. On retire la pellicule de la cassette et on la développe en chambre noire sous la lumière jaune de sécurité. On peut recharger la cassette si une autre exposition est nécessaire.

## EXEMPLE VI

Cet exemple illustre les performances spécifiques et l'évaluation d'un essai de paternité utilisant la présente invention.

1. Des échantillons de sang sont prélevés sur la mère, l'enfant et le père putatif et l'ADN est purifié comme il est décrit dans l'exemple VA.

- 2. Ces ADN sont mis à réagir séparément avec soit l'enzyme de restriction EcoRl soit le Taq l comme il est décrit à l'exemple V B.
- 3. Ces ADN sont soumis à une électrophorèse comme il est décrit dans l'exemple V C en utilisant 5 µg d'un des trois ADN de chacun des trois chemins adjacents dans l'ordre ( de gauche à droite) mère, enfant, père putatif.
- 4. On prépare des ADN "sonde de paternité" et on les marque comme il est décrit dans les exemples V B et 5 E.
  - 5. Les ADN soumis à l'électrophorèse sont séchés comme il est décrit dans l'exemple VF.
- 6. Les ADN sondes marqués provenant du stade 4

  sont hybridés avec les ADN génomiques séchés du

  stade 5 comme il est décrit dans l'exemple V E.

  L'ADN pAW 101 est hybridé avec l'ADN génomique coupé

  de l'Eco Rl tandis que le pLM 0,8 est hybridé à l'ADN
  génomique coupé du Taq 1.
  - 7. On effectue des autoradiogrammes comme il est décrit à l'exemple V F.

20

25

30

35

8. Après l'autoradiographie, on détermine la taille des bandes correspondant au fragment d'ADN polymorphe. Ceci est réalisé en mesurant la distance de migration de ces bandes, par rapport à celle d'une collection de standards de masse moléculaire d'ADN (Southern, E.M., (1984) Anal. Biochem. 100, 319-323).

La taille des fragments d'ADN dans chacun des individus d'une même famille est comparée et utilisée pour déterminer si le diagramme observé chez l'enfant est compatible avec ceux mesurés chez le père putatif. Si la taille des fragments d'ADN chez l'enfant est différente de celle observée pour le père putatif, on en conclut que ce n'est pas le père biologique (c'est-à-dire cas de non-paternité). Si l'enfant ne

partage qu'un seul allèle avec la mère, on peut alors conclure que l'autre allèle est une forme héritée du père. Si le père putatif ne possède pas cet allèle, on peut en conclure qu'il n'est pas le père. D'autre part, si tous deux partagent au moins une paire de fragments d'ADN, non apportée par la mère, on peut déterminer si oui ou non l'individu peut être le père en se basant sur la probabilité qu'un individu pris au hasard dans une population puisse avoir la même taille de fragments d'ADN (c'est-à-dire indice de paternité; dans Inclusion Probabilities in Parentage Testing (1983), ed. R.H. Walker, American Association of Blood Banks). Dans ce dernier cas, il est nécessaire de connaître la fréquence des allèles détectés avec la sonde d'ADN particulière. Les fréquences observées pour les sondes pAW-101 et pLM-0,8 sont données dans les tableaux 1 et 2.

5

10

15

# EXEMPLE VII

# Cas d'essai l

En utilisant le mode opératoire de l'exemple VI, 20 une mère, un enfant et un père putatif ont été essayés en utilisant la présente invention. La figure 1 montre un autoradiogramme obtenu en utilisant le pAW-101 comme sonde contre de l'ADN coupé dans de l'EcoR1 pour la mère, l'enfant et le père.La mesure des distances 25 de migration et la comparaison avec des étalons connus indiquent que la mère porte des allèles pAW-101 Nos 2 et 5, 1 enfant porte des allèles pAW-101 Nos 5 et 10, tandis que le père putatif porte des allèles pAW-101 Nos 10 et 11. La mère peut avoir apporté l'allèle 30 pAW-101 no. 5 à l'enfant, le père peut avoir apporté l'allèle No. 10. On peut à présent comparer la chance pour que le père putatif apporte l'allèle PaW-101 no. 10 à un enfant par rapport à la chance qu'un homme pris au hasard apporte l'allèle no. 10. Dans ce cas 35

le rapport de probabilité est de 16,67, ce qui correspond à une chance de paternité de 94 %.

# EXEMPLE VIII

10

15

20

25

30

35

# cas d'essai 2

En utilisant les modes opératoires de l'exemple VI, on soumet une mère, un enfant et un père putatif à un essai en utilisant la présente invention. La figure l'montre l'autoradiogramme obtenu en utilisant le pAW-101 comme sonde contre un ADN coupé dans de l'EcoRl obtenu pour la mère, l'enfant et le père. La mesure des distances de migration et la comparaison avec des étalons connus indiquent que la mère porte des allèles pAW-101 nos 5 et 9, l'enfant porte des allèles pAW-101 nos 5 et 7 tandis que le père putatif porte les allèles pAW-101 nos 4 et 6. Comme le père de cet enfant doit avoir apporté l'allèle 7 à l'enfant et que le père putatif ne porte pas cet allèle, il est exclu comme père possible.

#### EXEMPLE IX

# cas d'essai 3

En utilisant les modes opératoires de l'exemple VI, on soumet une mère, un enfant et un père putatif à un essai en utilisant la présente invention. La figure 3 représente un autoradiogramme obtenu en utilisant le pLM-0,8 comme sonde contre un ADN coupé dans du Taq 1 obtenu de la mère, de l'enfant, et du père. La mesure des distances de migration et la comparaison avec des étalons connus indiquent que la mère porte des allèles pLM 0,8 Nos 7 et 8, l'enfant porte des allèles pLM 0,8 nos 7 et 8 tandis que le père putatif porte des allèles pLM 0,8 no. 2 et 8. Comme la mère pourrait avoir apporté soit l'allèle pLM 0,8 nos 7 ou 8 à l'enfant, on peut seulement conclure que le père doit avoir apporté soit l'allèle 7, soit l'allèle 8. On peut comparer la chance que le père putatif ait apporté soit l'allèle pLM 0,8 n°7, soit l'allèle pLM 0,8 No. 8 à un enfant à la chance qu'un

homme pris au hasard apporte l'un ou l'autre de ces allèles. Dans ce cas, le rapport de probabilité est de 3,55 ce qui correspond à une chance de paternité de 71,8 %.

Tableau 1

Fréquence des allèles visualisés en utilisant pAW101 comme sonde un ADN génomique humain coupé dans de l'EcoR1 dans une population de 298 individus pris au hasard

	1100-00-00			•		
10	Allèle no.	Taille	(en k	g paire	de base)	Fréquence
	1	14,0				0,013
	2	14,5				0,052
	3	14,9				0,077
	4	15,4				0,117
15	5	16,0				0,146
	6	16,6				0,117
	7	17,2				0,064
	8	17,7				0,040
	9	18,3				0,035
20	10	19,0				0,030
	11	19,6				0,035
-	12	20,2				0,040
	13	20,8	•			0,064
	14	21,6		-		0,069
25	15	22,2	•			0,023
	16	22,7				0,018
	17	23,6				0,020
	18	24,3				0,003
	19	24,6				0,008
30	20	25,3				0,013
	21	26,1				0,008
	22	27,1	-	-	-	0,002
	23	28,1				0,002

Tableau 2

Fréquence des allèles visualisés en utilisant le pLM 0,8 comme sonde et un ADN génomique humain coupé dans de l'EcoRl dans une population de 268 individus pris au

	sa:	

	Allèle no.	Taille	Fréquence
		(en kg paire de base)	
	1	2,35	0,089
10	2	2,65	0,580
	3	2,75	0,041
	4	2,95	0,009
	5	3,08	0,123
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	3,40	0,007
	7	3,70	0,123
	8	4,09	0,018
	9	4,30	0,007

#### REVENDICATIONS

10

15

20

25

30

- 1. Procédé d'identification d'un membre individuel d'une espèce d'organisme consistant à analyser l'ADN de cet organisme par rapport à une ou plusieurs régions génétiques polymorphes, à différencier chaque polymorphisme en termes de taille relative de la région génétique, et à caractériser ainsi un membre individuel de l'espèce.
- 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ces régions sont détectées par les opérations consistant à : a) isoler l'ADN de l'individu à analyser; b) soumettre cet ADN à l'action d'endonucléases de restriction; classer par taille et transformer les fragments d'ADN produits dans l'opération b) ci-dessus en molécules à un seul brin; c) hybrider ces molécules à un seul brin classées par taille, avec des molécules d'ADN sonde; et d) identifier le nombre et l'emplacement de ces fragments hybridés, étant entendu que cette sonde n'est pas un cADN du locus génétique HLA humain.
- 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'individu analysé est membre d'une espèce choisie parmi le groupe comprenant : les virus, les bactéries, les algues, les champignons, les plantes et les animaux.
- 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon d'ADN est obtenu à partir de cellules de tissusembryonnaires adultes, jeunes ou foetaux.
- 5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les sondes comprennent une série de sondes dans lesquelles chaque sonde individuelle de cette série est choisie comme représentant un allèle unique d'une région génétique polymorphe différente.
- 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite série de sondes comprend de 1 à environ 20 sondes individuelles.

- 7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le nombre d'allèles contenus dans ladite région génétique polymorphe est d'environ 2 à environ 40.
- 8. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les sondes sont le pAW-101 (ATCC 39605) et le pLM 0,8 (ATCC 39604).
- 9. Procédé selon la revendication 1, qui comprend le stade supplémentaire de comparer les tailles relatives desdites régions génétiques polymorphes de ces individus avec celles d'une mère et d'un père putatif pour la détermination de la filiation.

10

20

25

- 10. Procédé d'analyse légale conformé à la revendication 1, qui comprend un stade supplémentaire consistant à comparer les tailles relatives desdites régions polymorphes d'un premier échantillon de cet individu avec les régions polymorphes provenant d'un second échantillon d'une autre source en vue d'établir l'identité entre les deux échantillons.
  - 11. Procédé selon la revendication 1, qui comprend le stade supplémentaire consistant à comparer la taille relative de ladite région polymorphe de cet individu avec celle dérivant d'un autre membre d'une souche ou organisme en vue d'établir l'identité de la souche de cet individu.
    - 12. Procédé d'identification d'un membre individuel d'une espèce ou d'un organisme consistant à analyser l'ADN de cet organisme par rapport à une ou plusieurs régions génétiques polymorphes, à différencier chaque polymorphisme en termes de taille relative de la région génétique, et à caractériser ainsi un membre individuel de l'espèce, dans lequel ces régions sont détectées par des opérations consistant : a) à isoler l'ADN d'un individu à analyser ; b) à soumettre cet ADN à l'action d'endonucléases de restriction ; à classer par tailles

et à transformer les fragments d'ADN produits dans l'opération b) ci-dessus en molécules à brin unique; c) à hybrider ces molécules classées par tailles, à brin unique, avec des molécules d'ADN sonde, ces molécules sondes étant en outre caractérisées en ce qu'elles ont été produites par digestion par l'endonucléase d'ADN génomique; et d) à identifier le nombre et l'emplacement de ces fractions hybridées.

13. Procédé d'identification d'un élément individuel d'une espèce d'organisme consistant à analyser l'ADN de cet organisme par rapport à deux régions génétiques polymorphes ou davantage, à différencier chaque polymorphisme en termes de taille relative de la région génétique et à caractériser ainsi un élément individuel de l'espèce.

14. Procédé d'identification d'un élément individuel d'une espèce d'organisme consistant à analyser l'ADN de cet organisme par rapport à une ou plusieurs régions génétiques polymorphes, à différencier chaque polymorphisme en termes de taille relative de la région génétique et à caractériser ainsi un élément individuel de l'espèce,

caractérisé en ce que les dites régions sont détectées par les opérations consistant : a) à isoler l'ADN de l'individu à analyser ; b) à soumettre cet ADN à l'action d'endonucléases de restriction ; à classer par taille et à transformer des fragments d'ADN produits dans l'opération b) ci-dessus en molécules à brin unique ; c) à hybrider ces molécules classées par taille, à brin unique avec des molécules d'ADN sonde, et d) à identifier le nombre et l'emplacement de ces fragments hybridés, étant entendu que cette sonde n'hybride pas le locus génétique HLA humain.

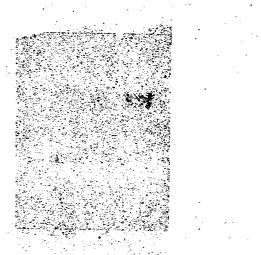




FIG. I





FIG 3