printemps des sciences
Avec le soutien de la Ministre de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique

Évolution(s) Révolution(s) 23 - 29 mars 2009

ULB

Méthode de Sanger

Mayuri Sadoine, Maxime Steisel, Laurène Viviani
Département de Biologie moléculaire

La méthode de Sanger sert à séquencer l'ADN.

L'acide désoxyribonucléique ou ADN est une molécule, retrouvée dans toutes les cellules vivantes Il porte l'information génétique, et constitue le génome des êtres vivants.
Il est constitué de 4 nucléotides différentes (A= adénine, G=guanine, C = cytosine, T=thymines)

Séquencer signifie déterminer l'ordre des nucléotides.

Le séquençage a permis d'accélérer de manière spectaculaire les recherches en génétique humaine, et, d'une manière générale, tous les travaux sur la physiologie et la pathologie humaine.

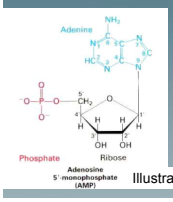
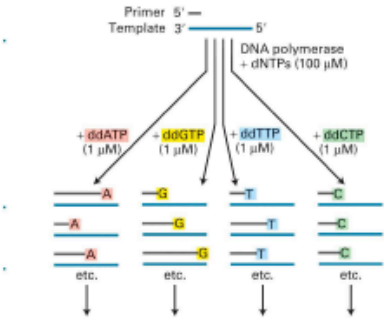


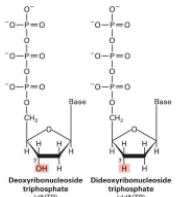
Illustration d'un nucléotide.

Comment se déroule la méthode de Sanger ?



1. L'ADN polymérase est un complexe enzymatique intervenant dans la réplication de l'ADN.
La réaction de synthèse d'ADN utilise des nucléotides tri phosphate(= dNTP)
Elle ne fonctionne qu'en présence d'une amorce (=primer).
L'amorce est un oligonucléotide c'est-à-dire une séquence de quelques nucléotides.
Lors du séquençage, l'amorce est connue.
Ce que l'on veut connaître c'est l'ordre dans lequel sont rajoutées les nucléotides, c'est-à-dire connaître la séquence de l'ADN.
Pour cela on se base sur la loi de la complémentarité des bases azotées.

2. Nous cherchons à avoir des fragments d'ADN de tailles différentes (Dont on connaitrait le dernier nucléotide ajouté).
Utilisations de chaque ddNTP lors de 4 réactions différentes.



3.

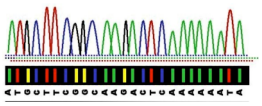
Les fragments sont ensuite séparés par électrophorèse.

4. Lecture des fragments obtenues

Avez-vous bien compris?
Devinez la séquence

A,t,a,a,a,a,a,c,t…

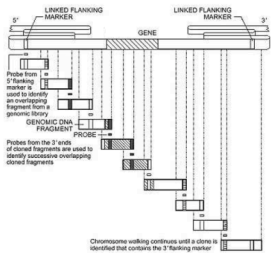
5. Cette technique est encore améliorée par l'utilisation de ddNTP associés à des groupements chimiques fluorescents
Chaque ddNTP est représenté par une couleur et peut être automatiquement détecté par lecture optique. .



Le séquençage du génome humain :

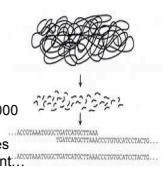
Deux approches :

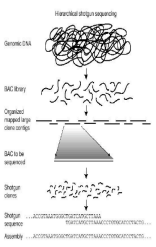
1. Chromosome walking :



À partir d'une première amorce on séquence 1000 paires de base.
La 2ème amorce synthétisée provient de la fin des 1000 paires de base synthétisées précédemment…
On a donc des fragments qui se superposent.

2. shot gun sequencing :





La fragmentation du génome se fait aléatoirement
Puis on séquence les différents fragments.
Des endroits se chevaucheront ce qui permet de Reconstituer le génome.
Cependant cette méthode entraine plein d'erreurs, car le génome humain est constitué de séquences répétées.
Elle sera plutôt utilisée chez des procaryotes.

© Toute reproduction, même partielle, doit indiquer clairement le nom de tous les auteurs, le nom du Service/Département, ainsi que la mention « printemps des sciences 2009 - Bruxelles» Références: cours de M. Cyril Gueydans
Lodish et al. Molecular Cell Biology

FACULTE DES SCIENCES
UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES