

Optimisation de la réaction en chaîne polymérase des microsatellites par un vecteur de bactérie M13



IABC
International
TUNISIA
2015

R. BACCOUCHE^{1*}, B.JEMMALI², H. OULED AHMED³, M. BEN HAMOUDA⁴

¹Institut National Agronomique de Tunis (INAT)

²Ecole Supérieure d'Agriculture de Mateur

³Institut de Recherche Vétérinaires de Tunisie

⁴Institut National de Recherche Agronomique de Tunisie

* Auteur correspondant: baccouche.rania@gmail.com

Abstract - The purpose of this study is the adaptation of the fluorescence technique for optimizing chain reaction polymerase (PCR), 5 among 30 microsatellite markers recommended by FAO for the characterization of genetic resources of the bovine species. In this study, the specific temperatures of the primers have been already determined (57 to 64 ° C). The hybridization temperature of the primer M13 is 53 ° C, 8 final cycles were added at the end of the PCR cycle. These tests were carried out on the basis of tests of two cycles of amplifications and two different concentrations of M13 and SSR primer. It shows in the last analysis, that the adoption of the second cycle of amplification as well as the second concentration of test is most suitable for the optimization of primers. For this reason, these amplifications conditions were adopted for the 220 cattle heads belonging to the Tunisian locals.

Keywords - Indigenous Cattle, PCR, microsatellites, M13.

Résumé - Le but de cette étude est l'adaptation de la technique de fluorescence pour l'optimisation de la réaction en chaîne polymérase (PCR). 5 parmi les 30 marqueurs microsatellites recommandées par la FAO pour la caractérisation des ressources génétiques de l'espèce bovine ont été utilisés. Dans cette étude, les températures des amorces spécifiques ont déjà été déterminées (57 à 64 ° C). La température d'hybridation de l'amorce M13 est de 53°C, 8 cycles finaux ont été ajoutés à la fin du cycle de PCR. Ces essais ont été réalisés sur la base de tests de deux cycles d'amplifications et deux concentrations différentes de M13 et amorce SSR. Les analyses montrent que l'adoption du deuxième cycle d'amplification ainsi que la deuxième concentration est l'essai le plus approprié pour l'optimisation des amorces. Pour cette raison, ces conditions d'amplification ont été adoptées pour les 220 têtes de bovine locales au Nord-Ouest de la Tunisie.

Mots clés - Bovin autochtones, PCR, microsatellites, M13.

1. Introduction

Les marqueurs microsatellites sont des motifs de répétition en tandem avec une longueur de 1 à 6 bases distribués d'une manière non aléatoire dans l'ensemble du génome eucaryote (Zane et al., 2002 ; Li et al., 2002). Ces marqueurs peuvent être utilisés dans la caractérisation des populations d'espèces, la diversité génétique (Esmailkhaniani et Banabazi, 2006), et des études de populations (Amirinia et al., 2007), car ils sont hypervariables et largement dispersés dans le génome. En outre, ils ont une application dans l'identification des individus et des tests de filiation (Seyedabadi et al., 2006).

La technique la plus utilisée pour le génotypage des SSR est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide 6% coloré avec le nitrate d'argent (Creste et al., 2001). Cependant, ce procédé est coûteux et prend beaucoup de temps pour sa réalisation. C'est pour cette raison que les microsatellites basés sur la fluorescence ont été utilisés. L'utilisation du M13 est l'une des alternatives les moins chères. L'amorce universelle M13 est dérivée d'un vecteur bactérien (David et al., 2003). Cette amorce est marquée avec un fluorochrome lui conférant un rendement élevé pour la procédure du génotypage et du séquençage. La première étape du génotypage est l'optimisation de la réaction de PCR. Le but de



cette étude est l'adaptation de la technique de fluorescence pour l'optimisation de la réaction en chaîne polymérase (PCR) de 5 marqueurs microsatellites parmi ceux recommandés par la FAO pour la caractérisation des ressources génétiques de l'espèce bovine. Ce travail de recherche a été effectué au sein du laboratoire de biotechnologie animale de la Banque Nationale de gènes en collaboration avec le laboratoire des analyses génétiques de l'Institut de Recherches Vétérinaire de Tunisie.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel animal et extraction d'ADN génomique

Lors de cette étude, cinq échantillons de sang de la population bovine locale ont été choisis au hasard parmi 220 collectés dans les trois gouvernorats du nord de la Tunisie à savoir Bizerte, Béja et Manouba. L'extraction d'ADN génomique a été réalisée moyennant la machine Invitrogen iPrep et ses Kits.

Afin d'avoir des concentrations d'ADN égales, un aliquotage a été réalisé puis une vérification de la qualité ainsi que la quantité d'ADN a été faite sur gel d'agarose 0.8%. La concentration d'ADN est de 20ng/ μ l.

2.2. Préparation des amorces

Cinq paires d'amorces (tableau 1) ont été sélectionnées pour l'amplification des marqueurs SSR chez les bovins locaux. Les amorces ont été diluées au dixième de la solution stock.

Chaque amorce avait une queue de 18 pb ajouté complémentaire à l'amorce M13 (5'-TGT AAA ACG GCC AGT-3'). Quatre différentes fluorescences ont été employées pour étiqueter l'amorce M13 ; le bleu (FAM), le vert (VIC), le rouge (PET), et le jaune (NED). Toutes les amorces ont été dissoutes dans du TE 10/10 afin de produire une solution stock de 10 μ M pour l'amorce universelle anti sens spécifique marquée par fluorescence, et une solution stock de 5 μ M du locus amorce sens spécifique avec queue universelle (moles d'amorce sens marquée: amorce anti sens: amorce universelle marquée = 1: 4: 4) (Schuelke, 2000).

Tableau 1. Liste des microsatellites utilisés dans ce travail

Nom	Chromosome	Température d'hybridation	Plage de l'allèle	Fluorescence
CSSM66	14	64	171-209	NED
ETH225	9	61	131-159	FAM
MM12	9	58	101-145	PET
INRA023	3	58	195-225	VIC
HAUT 27	26	57	120-158	NED

2.3. Conditions d'amplification

Lors de cette étude, la première étape était la détermination de la température d'hybridation de chaque amorce SSR (Tableau 1). Étant donné que l'amorce M13 a besoin d'une température d'hybridation de l'ordre de 53°C, 8 cycles finaux ont été ajoutés à la fin du cycle PCR afin de permettre l'hybridation de la M13 marquée. Les conditions d'amplification testés sont au nombre de 3, les facteurs de variations sont les conditions lors du cycle d'amplification ainsi que les concentrations en amorces SSR et en amorce M13.

Au total 2 cycles d'amplification (figure 1 et figure 2), et 2 concentrations pour chaque type d'amorce (tableau 2) ont été testés. Le volume final du mélange réactionnel est de 25 μ l contenant une quantité d'ADN égale à 40ng/ μ l ; 1 U de Taq polymérase ; 1x tampon ; 1,5 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM de dNTP, tout en tenant compte des changements de concentrations en amorces.

Tableau 2. Les deux conditions de concentrations testées

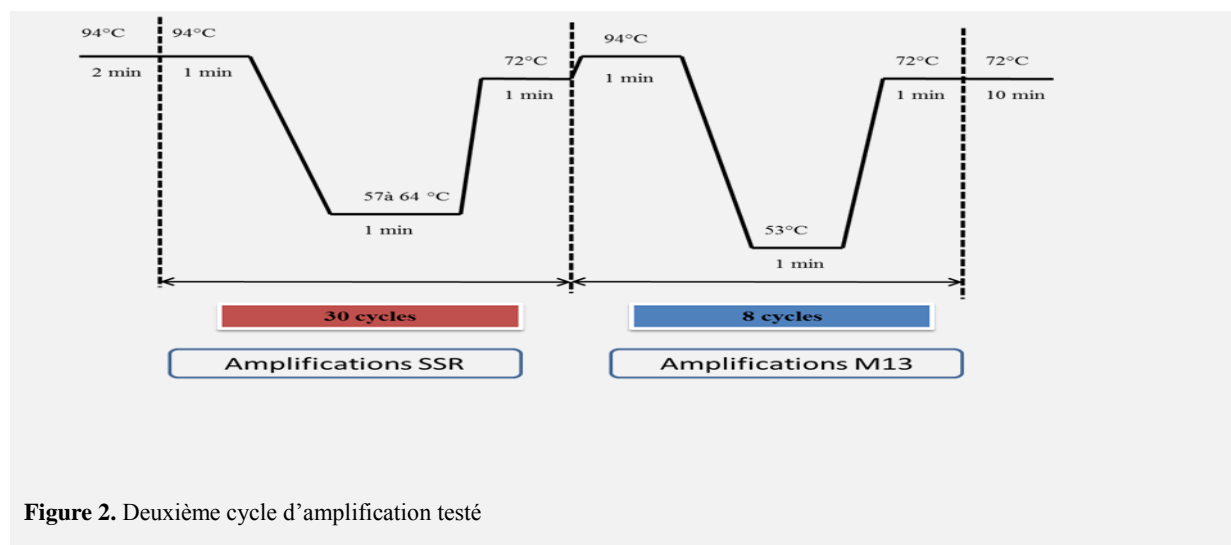
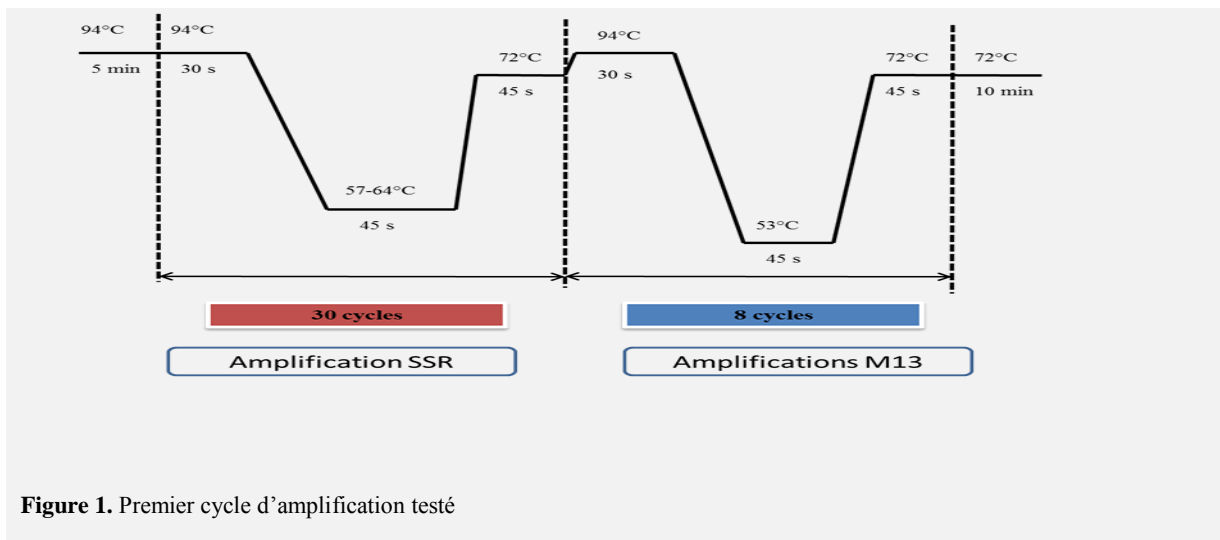
Amorce	Condition 1	Condition 2
Amorce M13	0.8 pmol μ L ⁻¹	0.4 pmol μ L ⁻¹
Amorce anti sens	0.8 pmol μ L ⁻¹	0.4 pmol μ L ⁻¹
Amorce sens	0.2 pmol μ L ⁻¹	0.1 pmol μ L ⁻¹

Il se trouve que les essais réalisés lors de ce travail de recherche sont au nombre de 3 qui sont les suivants :

- Le premier essai : Durant cet essai nous avons adoptés le premier cycle d'amplification et la première condition de concentration.
- Le deuxième essai : Le deuxième cycle d'amplification ainsi que la première condition de concentration ont été faites.
- Le troisième essai : Cet essai repose sur l'adoption du deuxième cycle d'amplification ainsi que la deuxième condition de concentration.

Les premières réactions d'amplification ont été réalisées dans les conditions suivantes: 94 ° C (5 min), puis 30 cycles à 94 ° C (30 s) / température spécifique d'hybridation (57 ou 64 ° C) pour chaque SPR (45 s) / 72 ° C (45 s), suivi de 8 cycles à 94 ° C (30 s) / 53 ° C (45 s) / 72 ° C (45 s), et une extension finale à 72 ° C pendant 10 min.

Le deuxième cycle d'amplification a été réalisé dans les conditions suivantes: 94 ° C pendant 2 min puis 30 cycles: 94 ° C (1 min), la température de recuit spécifique pour chaque SPR ((57 ou 64 ° C (1 min)), 72 ° C (1 min) et 8 cycles de M13: 94 ° C (1 min), 53 ° C (1 min), 72 ° C (1 min) et une extension finale à 72 ° C pendant 10 min Il est à noter que ce travail a été réalisé dans le laboratoire de biotechnologie animale à la Banque Nationale de Gènes (BNG) avec la collaboration du laboratoire de l'analyse génomique des animaux à l'Institut de recherche vétérinaire de la Tunisie (IRVT).



3. Résultats et discussions

3.1. Résultats du premier test

Au cours de ce premier test nous avons adopté le premier cycle ainsi que la première condition de concentration. Les produits d'amplifications ont été visualisé sur un gel d'agarose 2%, aucun amplimère n'a été détecté (figure 3), l'amplification n'a pas été faite. C'est résultats sont en désaccord avec les résultats trouvé par Schuelke, (2000) où il a trouvé des produits d'amplifications en utilisant ces conditions. Partant de ce constat un autre essai a été réalisé.

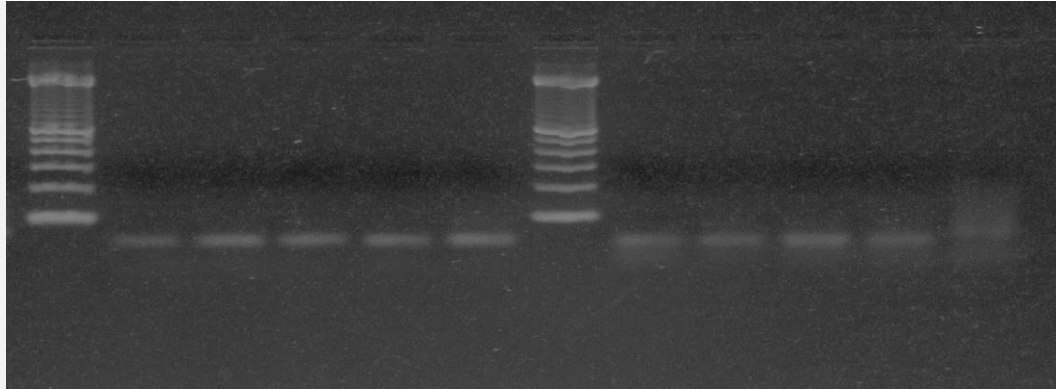


Figure 3. Aucune amplification

3.2. Résultats du second test

Au cours de ce test, le deuxième cycle d'amplification a été utilisé (Figure 2) ainsi que la première condition de concentration des amorces. Les produits ont été amplifiés (figure 4), mais un excès d'amorce a été retrouvé, ce qui peut altérer par la suite la procédure de génotypage ou bien du séquençage. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux retrouvés en 2009 par O et al., travaillant sur le haricot vert au Brésil. C'est pour cette raison qu'un autre essai a été effectué.

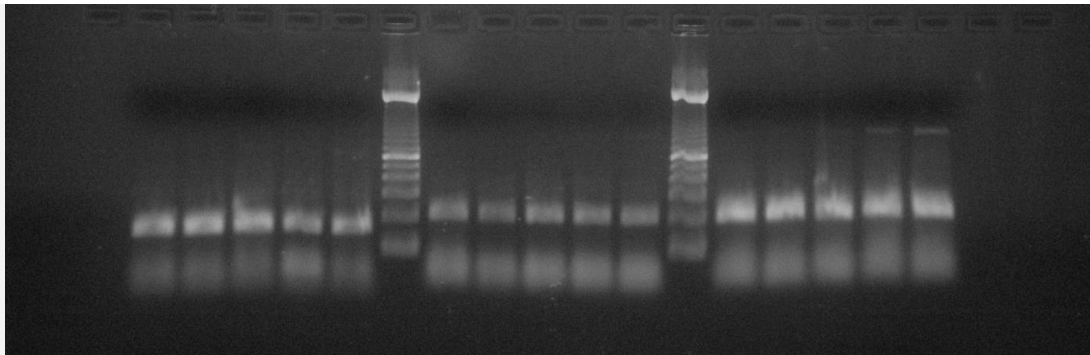


Figure 4. Amplification sélective et présence d'excès d'amorces

3.3. Résultat du troisième test

Ce test repose sur l'emploi du deuxième cycle d'amplification ainsi que la deuxième condition de concentration. En diminuant les concentrations, les amplimères ont été visualisés et aucun excès d'amorces n'a été détecté (figure 5). Cet essai a été alors adopté pour les 220 échantillons d'ADN bovine locale.

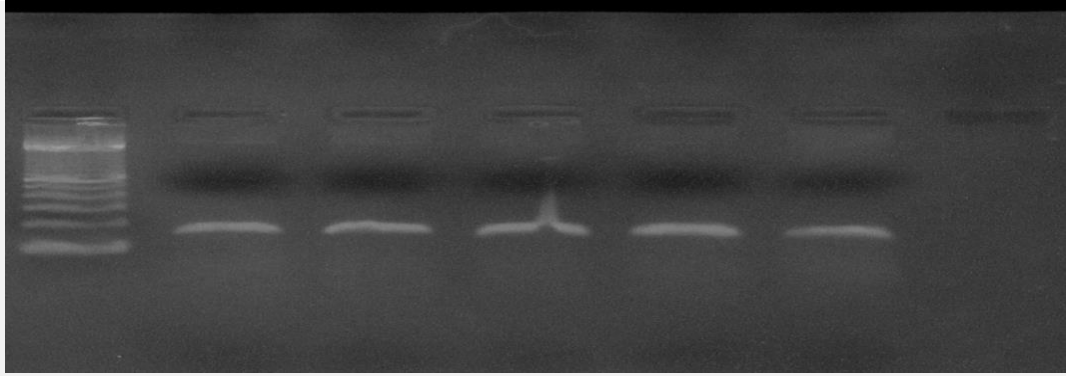


Figure 5. Amplification sélective et absence d'excès d'amorces.

4. Conclusion

L'utilisation de l'amorce M13 universelle offre une alternative peu coûteuse dans le marquage des amorces avec une fluorescence. En outre, il est beaucoup plus pratique d'utiliser des amorces universelles M13 que d'étiqueter chaque amorce microsatellite avec une fluorescence spécifique. Cette méthode a été utilisée pour la première fois pour ces microsatellites, et pour la population bovine locale en Tunisie.

Remerciements

RB exprime ses remerciements envers Maher MEDINI chercheur à la Banque Nationale de Gènes (BNG) de Tunisie.

5. Références bibliographique

- Amirinia, C., H. Emrani, M.A.R. Arbabe, R.V. Torshizi and A.N. Javaremi (2007).** Evaluation of eight microsatellite loci polymorphism in four Japanese quail (*Coturnix Japonica*) strain in Iran. *Pakistan J. Biol. Sci.* 8:1195-1199.
- Banabazi MH, Esmaeilkhanian S, Miraei Ashtiani SR, Moradi Shahrababak M (2007).** Genetic variation within and between five Iranian sheep populations using microsatellite markers. (B), Isf. Univ. Technol., Isf., Iran. *J. Sci. Technol. Agric. Nat. Res.* 10: p. 4.
- Creste S., Tulmann Neto A., Figueira A.** 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter.* **19**, 299-306.
- David L S., Scott L S., Stephen C R.** 1993. An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. *Bio Techniques.* **15**, 580-582.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, and E. Nevo.** 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11:2453-2465.
- Oblessuc P R., De Campos T., Kupper Cardoso J M., Sforça D A ., Baroni R M., De Souza A P., Benchimol L L.** 2009. Adaptation of fluorescent technique for genotyping with new microsatellite markers in common bean. *Pesq Agropec Bras Brasília.* **44**(6), 638-644.
- Schuelke M.** 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragment. *Nature Biotechnology.* **18**, 233-234.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi k., Eggen A., Ciampolini R., Lepingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio SL., Martin P., and al.** 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome.* 5,288-297
- Zane, L., Bargelloni, L., and Patarnello, T.** 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11: 1-16.