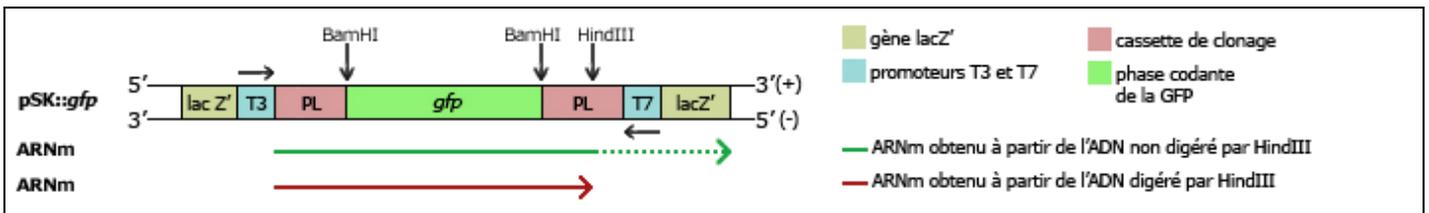


Préparation et analyse de la transcription *in vitro* de pSK::*gfp***Introduction**

L'ARN est une molécule très polyvalente qui possède comme première fonction de supporter temporairement l'information génétique correspondant à un gène donné pour finalement synthétiser des protéines. Mais elle est également très utilisée en biochimie, dans différentes techniques de détection et parfois de quantification de l'ARN ou de l'ADN dans une cellule ou un tissu spécifique : en tant que sonde dans les Southern et Northern Blot ou en tant que matrice d'amplification en RT-PCR. Dans tous les cas, il est préférable, voire nécessaire, d'utiliser des ARNm de taille déterminée et homogène.

Nous allons donc essayer de produire l'ARNm de la GFP, dont la phase codante de 700 pb aura été clonée précédemment dans le site de restriction BamHI du vecteur phagemidique pSK+ de 3 kpb, contenant les promoteurs bactériophages T3 et T7 (fig. 1). Nous analyserons les produits de la transcription obtenus après la digestion par l'enzyme de restriction HindIII, présente dans la cassette de clonage de pSK+, qui devrait nous permettre d'obtenir des ARNm de taille homogène.

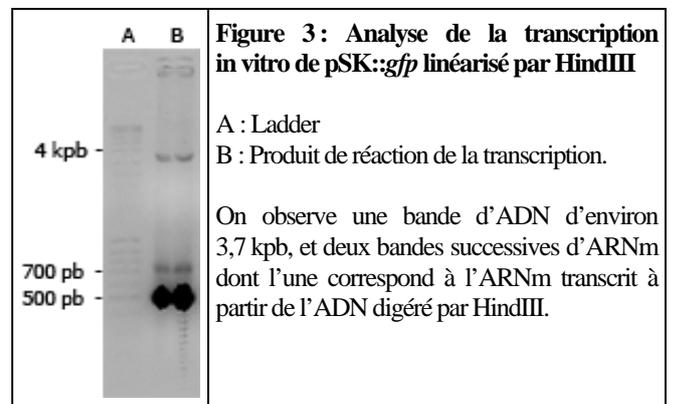
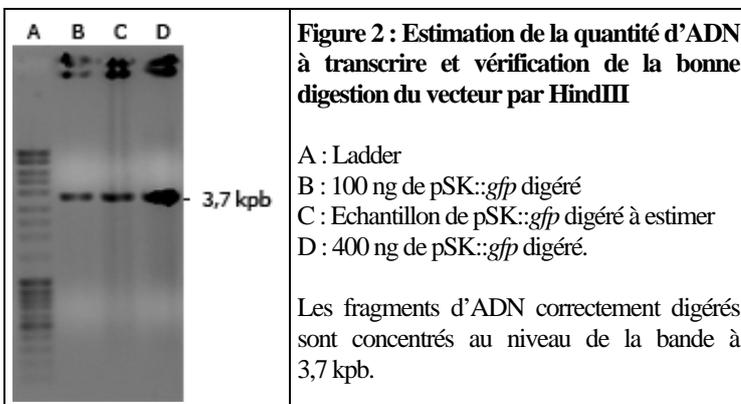
**Figure 1 : Construction de pSK::*gfp***

Le fragment d'ADN de 700 pb correspondant à la phase codante de la GFP digéré par l'enzyme de restriction BamHI a été introduit dans le site BamHI du vecteur pSK+. La transcription de l'ADN préalablement linéarisé par HindIII permet d'obtenir un ARNm d'environ 780 nucléotides.

Résultats

La préparation de l'ADN pour la transcription est réalisée par digestion de 5 µg de pSK::*gfp* par 20U d'enzyme de restriction HindIII pendant 1h à 37°C. L'ADN linéaire obtenu est alors traité au phénol/chloroforme avant d'être concentré par une précipitation à l'éthanol absolu et lavé à l'éthanol 80% pour éliminer toutes les traces d'acétate de sodium. Après avoir été repris dans 10 µl d'eau, 2 µl de pSK::*gfp* digéré sont analysés sur un gel d'agarose 1% afin de vérifier la bonne digestion de celui-ci et d'estimer la quantité d'ADN récupéré pour la transcription *in vitro* (fig. 2).

Seulement 700 ng de pSK::*gfp* récupérés sont transcrits pendant 1h à 37°C dans 20 µl de volume réactionnel contenant 40U de T3 ARN polymérase. La moitié est visualisée sur un gel d'agarose 1,5% afin d'analyser l'efficacité de la transcription (fig. 3).



L'analyse de la digestion sur gel nous permet d'observer une seule bande à 3,7 kpb. L'analyse du produit de la transcription nous permet de visualiser trois bandes distinctes correspondant à l'ADN déposé et aux ARNm transcrits.

Conclusion

Dans un premier temps, nous supposons que la digestion a été correctement réalisée puisque nous observons une bande unique à 3,7 kpb qui correspond à la taille du vecteur pSK::*gfp* linéarisé. Les 800 ng d'ADN que nous avons récupérés nous ont alors permis de réaliser la transcription *in vitro* par la T3 ARN polymérase. L'analyse sur gel de cette transcription nous montre que nous obtenons deux ARNm différents : la population de transcrits synthétisés est donc hétérogène. Le transcrit le plus présent correspond à l'ARNm synthétisé à partir de pSK::*gfp* digéré par HindIII ; alors que la faible bande d'ARNm, observable vers 700 pb, pourrait être expliquée par l'amplification due à la transcription d'ADN non linéarisé, dont la quantité est trop faible pour être détectée lors de la vérification de la digestion. En effet, dans le cas où pSK::*gfp* n'est pas coupé, l'ARNm sera synthétisé jusqu'à ce que la T3 polymérase reconnaisse un codon stop. La digestion du vecteur par HindIII ne suffisant pas pour arrêter la transcription à un moment bien défini, il peut donc s'avérer nécessaire de rajouter une étape de purification (sur colonne d'exclusion-diffusion par exemple) ou d'améliorer l'étape de digestion pour ne garder que les ARNm de même taille afin de les utiliser en tant que sonde, ou en RT-PCR où la taille des transcrits doit être homogène.