

IMMUNOGENETIQUE 1988

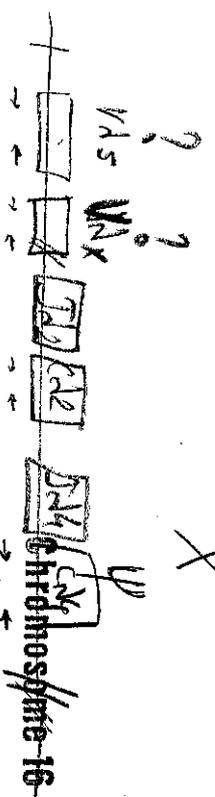
TRAVAUX PRATIQUES

Caractérisation et expression des chaînes lambda chez la souris.

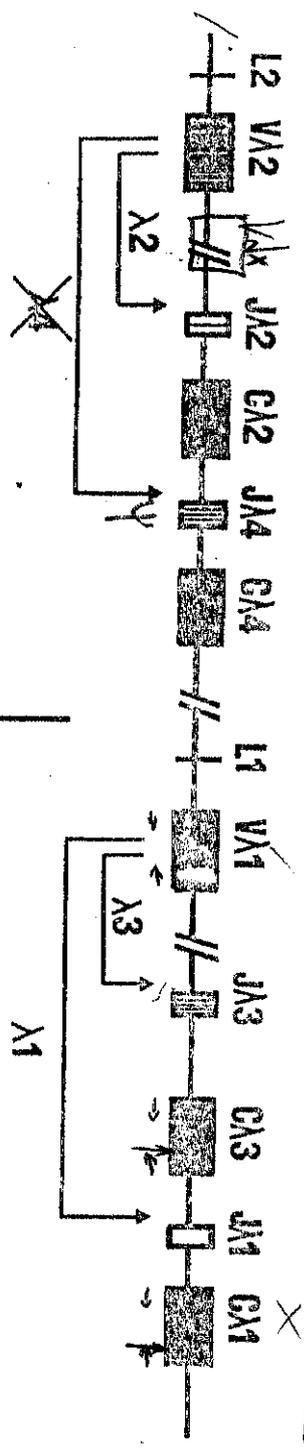
Les immunoglobulines murines utilisent deux types de chaînes légères kappa et lambda. Au contraire des chaînes kappa, les chaînes lambda ^{95%} ^{5%} présentent une diversité restreinte. Deux segments de gène V ($V\lambda 1$ et $V\lambda 2$) peuvent s'associer à trois paires de segments J-C, ce qui permet d'obtenir la synthèse de trois types de chaîne lambda ($\lambda 1$, $\lambda 2$ et $\lambda 3$). Une forte homologie de séquence en acides aminés existe entre ces différents segments (cf. planches annexes). Un troisième segment de gène V ($V\lambda x$) a été récemment décrit, permettant l'obtention d'une quatrième chaîne lambda (dénommée λx). Nous avons préparé des anticorps anti-isotypiques à partir de lapins immunisés contre les différents isotypes lambda. Nous vous proposons: (1) de rechercher les structures antigéniques reconnues par ces anticorps, (2) de déterminer l'isotypie de la chaîne légère d'une immunoglobuline monoclonale issue d'un hybridome obtenu chez la souris BALB/c, (3) ~~de doser le taux d'immunoglobulines de type lambda dans le sérum des souris des lignées consanguines BALB/c et SJL.~~

D'autre part, nous avons isolé l'ADN des cellules hybridomales. A l'aide des sondes radioactives ~~$V\lambda 1$~~ et $V\lambda x$, vous mettrez en évidence les événements de réarrangements génomiques permettant l'expression de la chaîne légère lambda et ainsi confirmerez la nature des segments de gène utilisés.

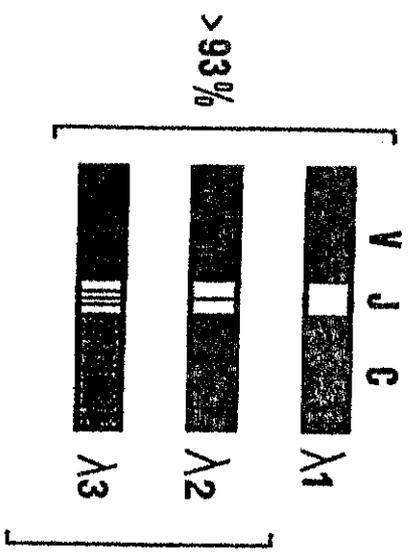
Sprentos



BALB/c



homologie
entre les
régions V



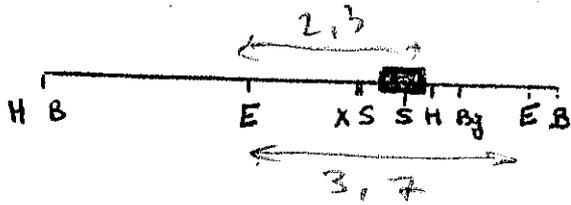
62%
homologie entre
les régions C

Chaines légères lambda

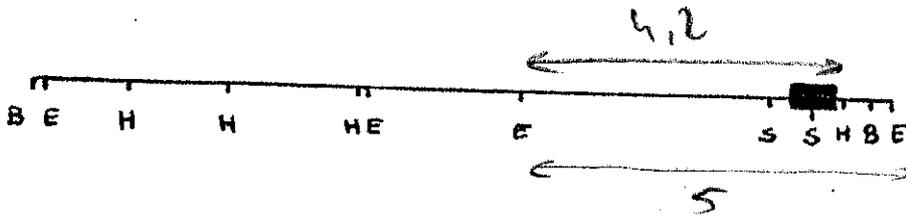
Sonde Vλ₁

1kb

Vλ₁

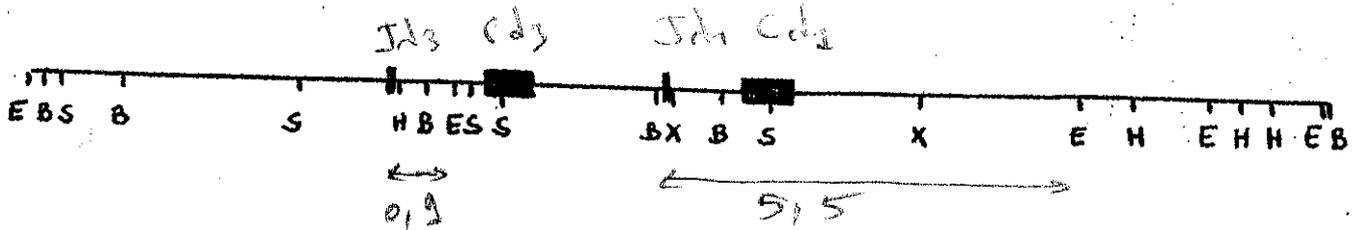


Vλ₂



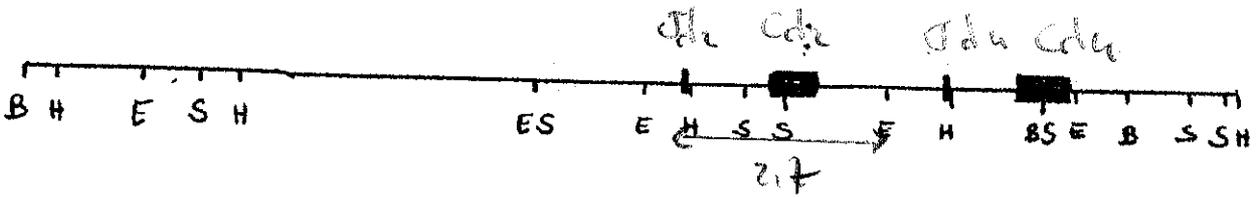
Sonde Cλ₁

Cλ₃ Cλ₁



Cλ₂ Cλ₄

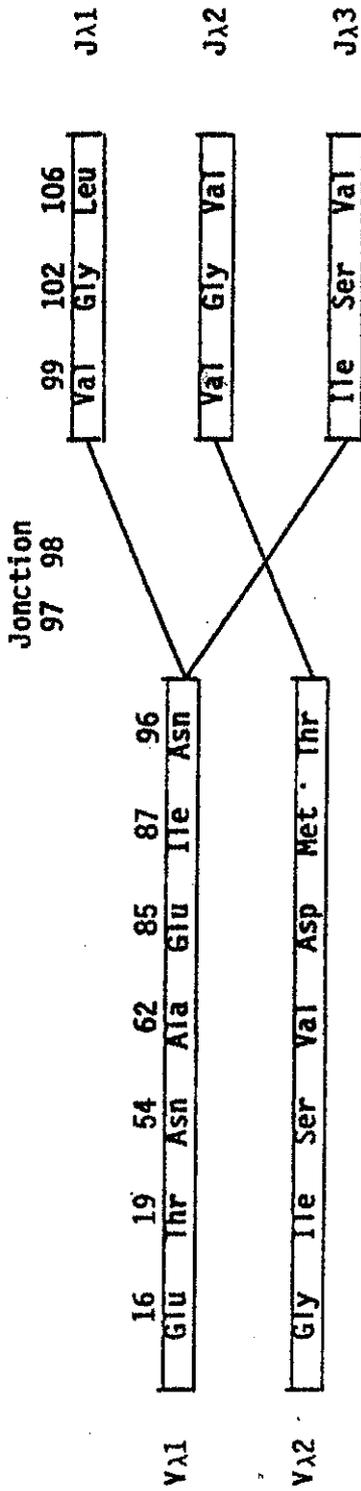
Sonde Cλ₂



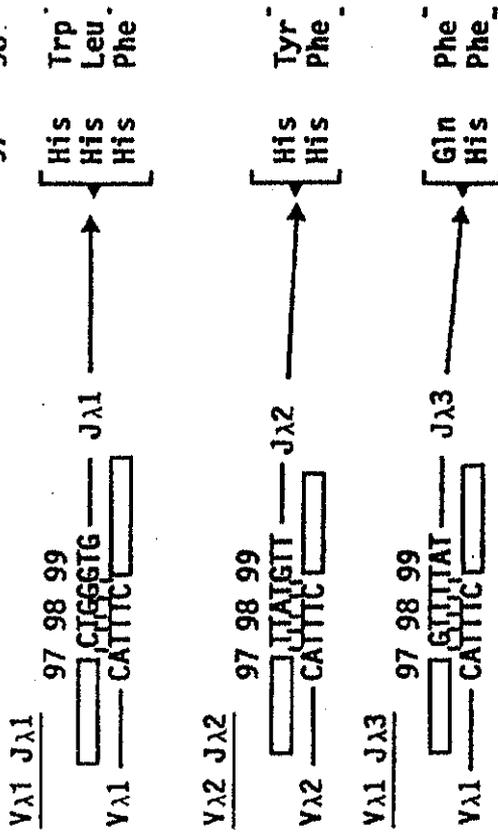
- B = Bam HI
- E = Eco RI
- H = Hind III
- S = Saa I
- X = Xba I
- Bg = Bgl II

Ref	Cell	15	1133
	PNAS	<u>79</u>	4681

SEQUENCE DES REGIONS V_λ DES IMMUNOGLOBULINES



Jonctions possibles



TECHNIQUE DE SOUTHERN

Jour 1:

Hydrolyse de l'ADN et électrophorèse.

Il est nécessaire d'hydrolyser au moins 12 µg de l'ADN total d'un mammifère (génomme haploïde environ $3 \cdot 10^9$ p.b) pour pouvoir détecter une séquence unique.

- Hydrolyser 12 µg d'ADN avec deux unités de l'enzyme de restriction choisie par µg d'ADN en présence de tampon "medium salt" dix fois concentré (1/10 du volume final) pendant 1 h.30 à 37°C. Ajouter 2U/µg supplémentaire et laisser continuer l'hydrolyse pendant 2 h.
- Arrêter la réaction en ajoutant du tampon contenant du bleu de juice, EDTA 0.2M pH 8 et 10% SDS (1/10 du volume final).
- Chauffer 10 minutes à 65°C.
- Faire migrer sur gel d'agarose de 0,8% dans 1xTAE + 1 µg/ml de bromure d'éthidium pendant la nuit (25 volts).
- Ne pas oublier de faire migrer en même temps les marqueurs de poids moléculaire (ADN du phage λ digéré par HindIII).

Jour 2:

- Photographier le gel en mettant un décimètre sur le côté.

Dénaturation et transfert de l'ADN.

a) Dépuration:

- transférer le gel dans un plat en Pyrex et l'immerger dans une solution d'HCl (0.25N) pendant 7 minutes très précisément.
- laver le gel avec de l'eau distillée

b) Dénaturation:

- immerger le gel dans une solution de 1M NaCl, 0.5M NaOH pendant 2 fois 30 minutes à température ambiante

c) Neutralisation:

- neutraliser le gel dans une solution de neutralisation de 0.5M Tris, pH 7,5, NaCl 3M, 2 fois 30 minutes à température ambiante

d) Transfert:

- installer le gel pour le transfert comme indiqué dans la figure A c'est à dire, poser sur un plat en Pyrex rempli de 20x SSC (3M NaCl, 0,3 citrate trisodique) une plaque de verre ou de plexi-glas. Placer sur cette plaque une feuille de papier Whatman 3MM dont les bords trempent dans le 20x SSC. Imbiber la feuille de

20x SSC, éliminer les bulles d'air et y déposer le gel. Vérifier qu'il n'y a pas de bulles entre le papier 3MM et le gel. Découper une feuille de nitrocellulose aux mêmes dimensions que le gel. N.B.: Il faut porter des gants et manipuler la nitrocellulose avec des pinces Millipore. Faire imbiber la nitrocellulose dans de l'eau, puis dans le tampon de neutralisation, ensuite la déposer sur le gel. Mettre par-dessus deux feuilles de papier 3MM. Placer 10 cm de papier absorbant sur les feuilles 3MM. Poser par-dessus une plaque de verre et un poids d'environ 500 gr. N.B.: Éliminer toutes les bulles d'air entre gel-nitrocellulose 3MM à l'aide d'une pipette de 10 ml. Le flux de tampon 20x SSC ainsi créé à travers le gel permet le transfert de l'ADN sur le filtre de nitrate de cellulose. (La vitesse du transfert de l'ADN varie avec la taille des fragments: Pour des fragments 1 kb, le transfert d'un gel de 0,8% agarose est d'environ 2 heures alors que plus de 15 heures sont nécessaires pour le transfert de 15 kb).

- faire le transfert sur la nuit.

Jour 3:

- Retirer les papiers absorbants et le papier 3MM. Marquer la position des puits
- Enlever le nitrate de cellulose, rincer 10 minutes dans 4x SSC
- Laisser sécher sur du papier 3MM à l'air puis incuber 2 heures à 80°C
- Ce filtre peut être gardé plusieurs mois, sous vide, à température ambiante

Hybridation.

- Une préhybridation est effectuée avec un mélange de produits hydrophobes (solution de Denhardt) afin de diminuer la fixation non spécifique de la sonde radioactive
- Mettre le filtre dans un sac plastique
- Ajouter 0,2 ml/cm² d'une solution contenant:
 - . 3x SSC
 - . 10x Solution de Denhardt
 - . 0.1% SDS
 - . 50 µg/ml ADN de sperme de hareng dénaturé

} Tampon préhybridation

- Eliminer autant d'air que possible du sac puis le sceler
- Incuber pendant 4 heures à 65°C avec agitation
- Enlever le mélange de préhybridation et le remplacer par la solution suivante:

- . 10% de dextran sulfate
- . 3x SSC
- . 0.1% SDS
- . 5mM EDTA
- . 10x Solution de Denhardt
- . 50 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé
+ sonde radioactive $10 \cdot 10^6$ cpm dénaturé

} tampon
hybridation

- La sonde est dénaturée avec l'ADN de sperme de hareng pendant 5 minutes à 100°C avant d'être ajoutée au mélange d'hybridation
- Fermer le sac et l'incuber environ 16 heures à 65°C

Jour 4:

Lavage et exposition des filtres:

- Laver le filtre une fois avec une solution de 3x SSC, 0,5% SDS EDTA 5 mM pendant 10 minutes à température ambiante, puis 10 minutes avec 1x SSC, 0,1% SDS, 5 mM EDTA à 65°C. Le dernier lavage se fait à 65°C avec une solution de 0,1x SSC, 0,5% SDS pendant 30 minutes.
- Sécher le filtre sur du papier 3MM
- Déposer dans une cassette avec un film Kodak et un écran intensificateur
- Mettre la cassette à -70°C. Révéler le film au bout de 1 à 3 jours

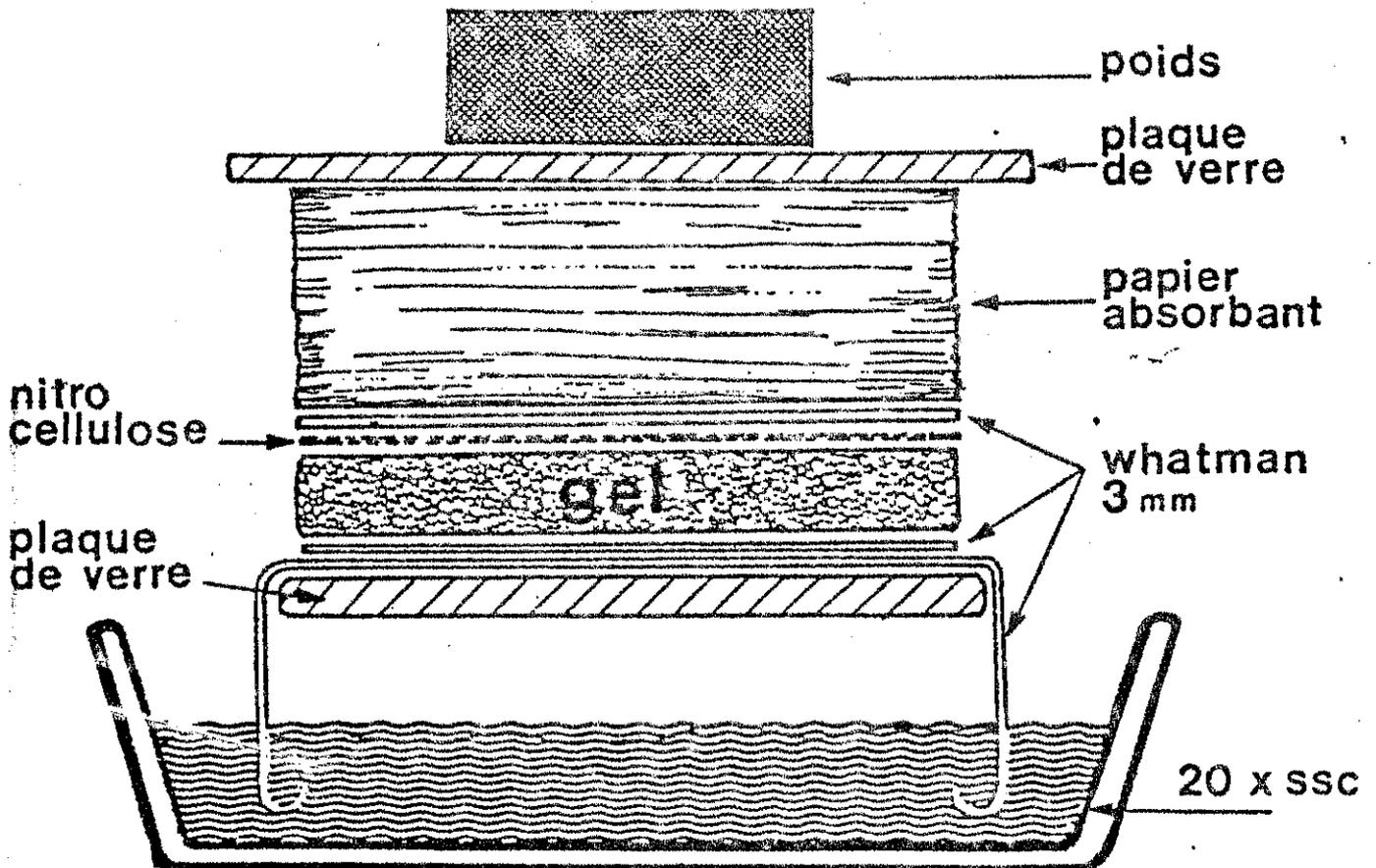


Figure A: Représentation schématique de la technique de transfert de l'ADN sur filtre de nitrocellulose.

**Purification partielle d'une immunoglobuline
monoclonale par précipitation**

- Centrifuger l'ascite dans un tube eppendorf
- Prélever 1 ml d'ascite dans un tube conique de 7 ml et ajouter lentement 1,5 ml de Na_2SO_4 30%
- Agitation douce pendant 1 heure à température du laboratoire
- Centrifugation 30 minutes à 2000 t/mn
- Redissoudre le culot dans 1 ml de NaCl 9‰
- Dialyser contre NaCl 9‰, changer la dialyse plusieurs fois dans la journée
- Dialyser la nuit contre $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 5mM pH 6
- Le lendemain, bien récupérer le précipité sur les parois du boyau et centrifuger dans un tube eppendorf pendant 15 minutes
- Reprendre le précipité dans 500 μl de PBS
- Prendre la densité optique à partir d'un aliquot dilué au 20ème dans du PBS
- Déterminer la concentration sachant qu'une concentration d'immunoglobulines de 1 mg/ml donne une densité optique de 1,5 à 280 nm

