HAL
open science

# SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE ET EXPRESSION DANS E COLI DU GÈNE QUI CODE POUR LA PROTÉINE NON STRUCTURALE NCVP2 DU ROTAVIRUS BOVIN

M Brémont, A Charpilienne, D Chabanne, J Cohen

**To cite this version:**

M Brémont, A Charpilienne, D Chabanne, J Cohen. SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE ET EXPRESSION DANS E COLI DU GÈNE QUI CODE POUR LA PROTÉINE NON STRUCTURALE NCVP2 DU ROTAVIRUS BOVIN. Annales de Recherches Vétérinaires, 1988, 19 (1), pp.83-84. hal-00901805

**HAL Id: hal-00901805**

**https://hal.science/hal-00901805**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## 3'-OH LABELLING OF SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES WITH NUCLEOTIDE ANALOGS TO USE THEM AS NON-RADIOACTIVE PROBES

Abhay KUMAR[1,2], P TCHEN[2], Françoise ROULLET[2] and J COHEN[1]

*1 : Station de Virologie et d'Immunologie, INRA, route de Thiverval, 78850 Thiverval-Grignon, France*

*2 : INSERM, U 155, Château de Longchamp, Bois de Boulogne, 75016 Paris, France*

Nucleic acid hybridization is becoming a powerful tool in diagnostic microbiology. The cloned genes are widely used as « probes » usually after radioactive labelling. However, inherent drawbacks in handling radio-activity limit their use. As a result, non-radioactive labelling is becoming an attractive alternative. Of late, oligonucleotides are gaining attention as hybridization probes. They can detect single base pair mismatch (for review, see Itakura *et al* 1984). Synthetic oligonucleotide probes are anticipated to be increasingly used in future with the easy accessibility to the automated DNA synthetizers. We synthetized two oligonucleotide probes, one corresponding to 5' end of gene 6 of bovine rotavirus (strain RF) cloned as pBRF6 (Cohen *et al* 1984) and another to heat-stable toxin (ST1a) gene (So and Mc Carthy 1980). Using Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT), the oligonucleotides were labelled with three ribonucleotide phosphate analogs having a free primary amine *viz* 8 (6-aminohexyl)-amino ATP (in short : ATP-C8-NH2), $N^6$ [(6-aminohexyl)-carbomoylmethyl-ATP (in short : ATP-N6-NH2) and allylamine UTP. Bio-11-dUTP (BRL) was used as reference. After determining their optimal conditions of tailing, they were tagged with either biotin or fluoresceine. The probes were detected either with strepavidin-alkaline phosphatase complex or with anti-fluoresceine antiserum and alkaline phosphatase conjugated second antibodies. We employed these probes to detect rotaviral RNA and *E coli* ST1a toxin DNA. Biotinylated ATP-C8-NH2 and ATP-N6-NH2 probes were found to be as sensitive as Bio-11-dUTP probes in detecting ST1a toxin gene in plasmid (PRIT 10036). However, fluoresceinated probes were 5-10 times less sensitive probably as a result of a less sensitive detection procedure. Biotinylated probes were also tested to detect ST1a toxin gene in the minipreps dots and colony hybridization assays. On the other hand, biotinylated ATP-N6-NH2 and Bio-11-dUTP probes exhibited equal sensitivity in detecting rotaviral RNA in dot-blot assay. Our results indicate that ATP-N6-NH2 could also be a candidate for non-radioactive labelling of oligonucleotides, to which a reporter molecule of interest can be tagged. The labelling of primary amines with two different markers can potentially be used in sandwich hybridization. The use of ATP analogs which are added as a single nuleotide by TdT tailing and cannot interfere with renaturation properties is especially interesting for the labelling of short probes.

**References**

Cohen J, Lefèvre F, Estes MK, Brémont M, 1984. Cloning of bovine rotavirus (RF strain) : Nucleotide sequence of the gene coding for the major capsid protein. Virology 138:178-182

Itakura K, Rossi JJ, Wallace RB, 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. Annu Rev Biochem 53:323-356

So M, Mc Carthy BJ, 1980. Nucleotide sequence of bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable toxin (ST) and its identification in enterotoxigenic *E coli* strains. Proc Natl Acad Sci USA 77:4011-4015

## SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE ET EXPRESSION DANS *E COLI* DU GÈNE QUI CODE POUR LA PROTÉINE NON STRUCTURALE NCVP2 DU ROTAVIRUS BOVIN

M BRÉMONT, A CHARPILIENNE, D CHABANNE et J COHEN

*Station de Virologie et d'Immunologie, INRA, route de Thiverval, 78850 Thiverval-Grignon, France*

Une copie d'ADN complémentaire du segment génomique n° 5 des rotavirus bovins souche (RF) a été utilisée pour déterminer la séquence nucléotidique du gène qui code pour la protéine non structurale

NCVP2. Les données obtenues indiquent que le segment 5 à une longueur de 1 581 paires de base. Pour l'un des brins, on peut mettre en évidence un cadre ouvert de lecture unique qui s'étend sur 491 codons et est délimité par des régions non codantes longues de 32 et 73 bases en 5' et 3' respectivement. Le premier AUG de ce cadre de lecture est entouré des séquences consensus et une fois traduit devrait conduire à une protéine de masse moléculaire de 58 654, soit une valeur légèrement supérieure à celle déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide pour NCVP2. Bien que jusqu'à présent on n'ait pas mis en évidence de modifications post-traductionnelles de NCVP2, il existe quatre sites de glycosilation potentielle en position 50, 168, 403 et 438. NCVP2 a été exprimé dans *E coli* en utilisant le vecteur inductible pKK233-2. Après une induction par IPTG, on observe une accumulation de la protéine recombinante que représente alors près de 7 % de protéines bactériennes. Ces résultats permettent d'envisager l'étude des propriétés de cette protéine au cours du cycle infectieux.

## OBTENTION ET CARACTÉRISATION D'UN RECOMBINANT VACCINE EXPRIMANT UN GÈNE DE ROTAVIRUS

D PONCET

*Station de Virologie et d'Immunologie, INRA, route de Thiverval, 78850 Thiverval-Grignon, France*

La protéine structurale la plus abondante dans les particules de rotavirus est la protéine de la nucléocapside VP6. C'est aussi l'antigène de groupe commun à la majorité des souches de rotavirus humaines et animales. Il a été décrit (Bastardo *et al* 1981, Sabara *et al* 1987) que des anticorps dirigés contre cette protéine très immunogène ont une activité neutralisante *in vitro* vis-à-vis d'infection à rotavirus. Nous avons introduit le gène n°6 du rotavirus simien SA11 codant pour la protéine VP6 dans le gène TK du virus de la vaccine selon la technique décrite par Mackett *et al* (1984). Un virus vaccine recombinant porteur du gène 6 de rotavirus a été isolé et caractérisé par cartographie d'ADN. La protéine VP6 est détectée par immuno-blot dans les cellules infectées par ce recombinant vaccine, mais, contrairement à ce qui a été obtenu avec un vecteur baculovirus (Estes MK, communication personnelle), n'est pas excrétée dans le milieu de culture. L'étude de la production d'anticorps anti-VP6 après vaccination de souris à l'aide de ce recombinant vaccine et de leurs effets protecteurs ou neutralisants vis-à-vis d'infections à rotavirus est envisagée.

**Références**

Bastardo JM, Mc Kim-Breshkin JL, Sonza S, Mercer LD, Holmes IH, 1981. Preparation and characterization of antisera to electrophoretically purified SALL virus polypeptides. Infect Immun 34:641-647

Mackett M, Smith GL, Moss B, 1984. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinant expressing foreign genes. J Virol 49:857-864

Sabara M, Ready KFM, Frenchick PS, Babiuk LA, 1987. Biochemical evidence for the oligomeric arrangement of bovine rotavirus nucleocapsid protein and its possible significance in the immunogenicity of this protein. J Gen Virol 68:123-133

## ÉTUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DU PLASMIDE CRYPTIQUE DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* C5

C MARTIN[1] et MY POPOFF[2]

*1 : Laboratoire de Microbiologie, INRA, CRVZ de Theix, 63122 Ceyrat, France*

*2 : Institut Pasteur, Unité des Entérobactéries, INSERM U 199, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France*

*Salmonella enterica* sérotype *typhimurium* (*S typhimurium*) est une entérobactérie qui provoque une infection systématique mortelle chez la souris. Après franchissement de la barrière intestinale au niveau