

Génotypage de rats et souris transgéniques

- Le génotypage sert à déterminer la constitution génétique d'un animal modifié génétiquement et surveiller la dérive génétique d'un élevage.
- Le choix de la méthode doit dépendre de la possibilité de réduire au minimum la douleur et la détresse de l'animal, de la quantité de tissus nécessaire et de la possibilité de combiner la manipulation à l'identification de l'animal.
- Le succès du génotypage dépend d'un échantillon adéquat, des mesures empêchant toute contamination entre les échantillons et des mesures qui évitent la dégradation des échantillons. (Lignes directrices du CCPA sur les souris et sur les rats)
- Un génotypage par PCR (Polymerase Chain Reaction) requiert moins d'ADN qu'un Southern Blot.

1.Échantillon de fèces

- Méthode non invasive et simple, utile si peu d'animaux doivent être génotypés et qu'une identification n'est pas nécessaire.
- Cette méthode comporte des risques de contamination croisée et n'est pas fiable pour toutes les constructions génétiques.
- Les échantillons doivent être analysés dans les 24 h après la récolte et le génotypage requiert souvent plusieurs fèces par animal pour être efficace.
- Prendre des fèces qui sortent de l'animal à la suite de la manipulation ou mettre l'animal dans une cage propre pendant une à deux minutes et récolter les fèces ensuite.

1.Échantillon de salive et de cellules buccales

1. Méthode peu invasive et simple, utile si peu d'animaux doivent être génotypés et qu'une identification n'est pas nécessaire.
2. L'échantillon peut être récolté par pipette ou frottis buccal avec un coton-tige.
3. Les cellules buccales des animaux non sevrés pourraient être contaminées par
4. l'ADN de la mère après l'allaitement ou par du sang en cas de blessure buccale.

1.Échantillon de follicules pileux

- Méthode peu invasive et simple, utile si peu d'animaux doivent être génotypés et qu'une identification n'est pas nécessaire.
- Prélever des poils à l'aide d'une pince désinfectée/stérilisée sur l'abdomen de l'animal.
- Cette méthode comporte des risques importants de contamination croisée.

1.Échantillon de sang

1. Voir les PNF [P-1 Prélèvements sanguins chez le rat](#), [P-2 Prélèvements sanguins chez la souris](#) et [P-16 Procédure générale pour les prélèvements sanguins](#).
2. Ne pas faire chez des animaux de moins de 14 jours.
3. Une formation spécialisée sur les techniques de prélèvements sanguins doit
4. préalablement être suivie et à jour au dossier de formation du manipulateur.

Biopsie de l'oreille

- Nettoyer et désinfecter/stériliser un poinçon d'oreille et une paire de pinces.
- Contentionner l'animal afin de limiter les mouvements de la tête.
- Appliquer le poinçon à l'endroit voulu sur l'oreille et récupérer la biopsie. Il est possible de s'aider avec les pinces au besoin.
- Replacer l'animal dans sa cage et noter sur le carton et/ou dans la base de données les informations relatives à son identification, au besoin.
- Nettoyer et désinfecter/stériliser les outils entre chaque animal.

1. Biopsie de la queue

- Lors d'une biopsie de la queue, si un anesthésique local est utilisé, toujours vérifier le temps d'action requis avant de commencer la biopsie.
- Un maximum de 5 mm peut être prélevé lors d'une biopsie de la queue.
- Si de l'ADN supplémentaire est requis à la suite d'une biopsie de queue, des alternatives à une seconde biopsie de queue doivent être priorisées (poinçon d'oreille, prélèvement de poil, etc.).
- Des biopsies de queue répétées nécessitent une anesthésie générale et de l'analgésie.
- Anesthésie/analgésie :
 - o Animaux de 10 à 21 jours : l'anesthésie locale est fortement recommandée.
 - o Animaux de 22 à 31 jours : l'anesthésie locale est obligatoire.
 - o Animaux de 31 jours et plus : l'anesthésie générale et l'administration d'un analgésique pour un niveau de douleur attendu de 2 sont obligatoires.

Optimizing PCR for Mouse Genotyping: Recommendations for Reliable, Rapid, Cost Effective, Robust and Adaptable to High-Throughput Genotyping Protocol for Any Type of Mutation

Sylvie Jacquot,^{1,4} Nathalie Chartoire,¹ Françoise Piguet,² Yann Hérault,^{1,3}
and Guillaume Pavlovic¹

Table 3 Average Yields and Percentages of PCR Failure Using Direct PCR Lysis Extraction

Sampling method ^a	Extraction method	Average quantity of DNA obtained ^b	Percentage of failed genotyping ^c	Easily adaptable to high throughput
Tail biopsies	Direct PCR lysis	26 ± 4 ng/μl	2.6	Yes
Ear punching	Direct PCR lysis	34 ± 5 ng/μl	2.8	Yes
Toe clipping	Direct PCR lysis	20 ± 2 ng/μl	3.3	Yes

^aThese three kind of tissue biopsies give enough DNA for PCR genotyping. Their performance in PCR is quite similar as the percentage of failed genotyping is very similar, indicating that similar levels of inhibitors are present in the crude extracts. Data were collected from 27,070 tail, 8470 ear, and 2900 toe biopsies to estimate genotyping failure.

^bAmount of isolated DNA was determined by spectrophotometry with a NanoDrop ND-1000 system ($N = 5$).

^cPercentage of biopsies that could not be genotyped (2018 data) because results were not interpretable. Causes are multifactorial and include uncalibrated biopsy, inefficient lysis, and presence of inhibitors in the crude extract.

Prepare buffers

3. Prepare a premix lysis buffer: Add 200 μ l DirectPCR Lysis Reagent (Mouse Tail) and 6 μ l 10 mg/ml proteinase K solution (10 mg/ml) per reaction.

Such a premix is stable for at least 24 hr at 4°C.

Incubate and lyse sample

4. To each sample, add 200 μ l premix lysis buffer for a 0.5-cm tail biopsy or 100 μ l for a 0.2-cm ear punch or toe biopsy.

For uncalibrated biopsy, reduce or increase the premix lysis buffer volume proportionally.

6. Centrifuge tubes 2 min at $4000 \times g$, room temperature.
7. Check that the biopsies are at the bottom of the tube and covered by the solution.
8. Incubate overnight at 55°C in a heating oven.
9. Remove tubes and check that they are still hermetically sealed.
10. Shake vigorously by turning over.

The biopsy must dissociate in the tube, indicating that the lysis worked. If the biopsy does not dissociate (indicative of inefficient lysis), remove the lysis buffer and repeat steps 4-10 (i.e., perform sample incubation with a fresh premix buffer).

Deactivate proteinase K

11. Incubate tubes at 85°C in a heated water bath for 45 min to 1 hr to inactivate the proteinase K.
12. Centrifuge tubes 2 min at 4000 × g, room temperature.
13. Store tubes at 4°C.

These crude extracts are stable for 2 weeks at 4°C.

Search for targeted and wild-type sequence maps

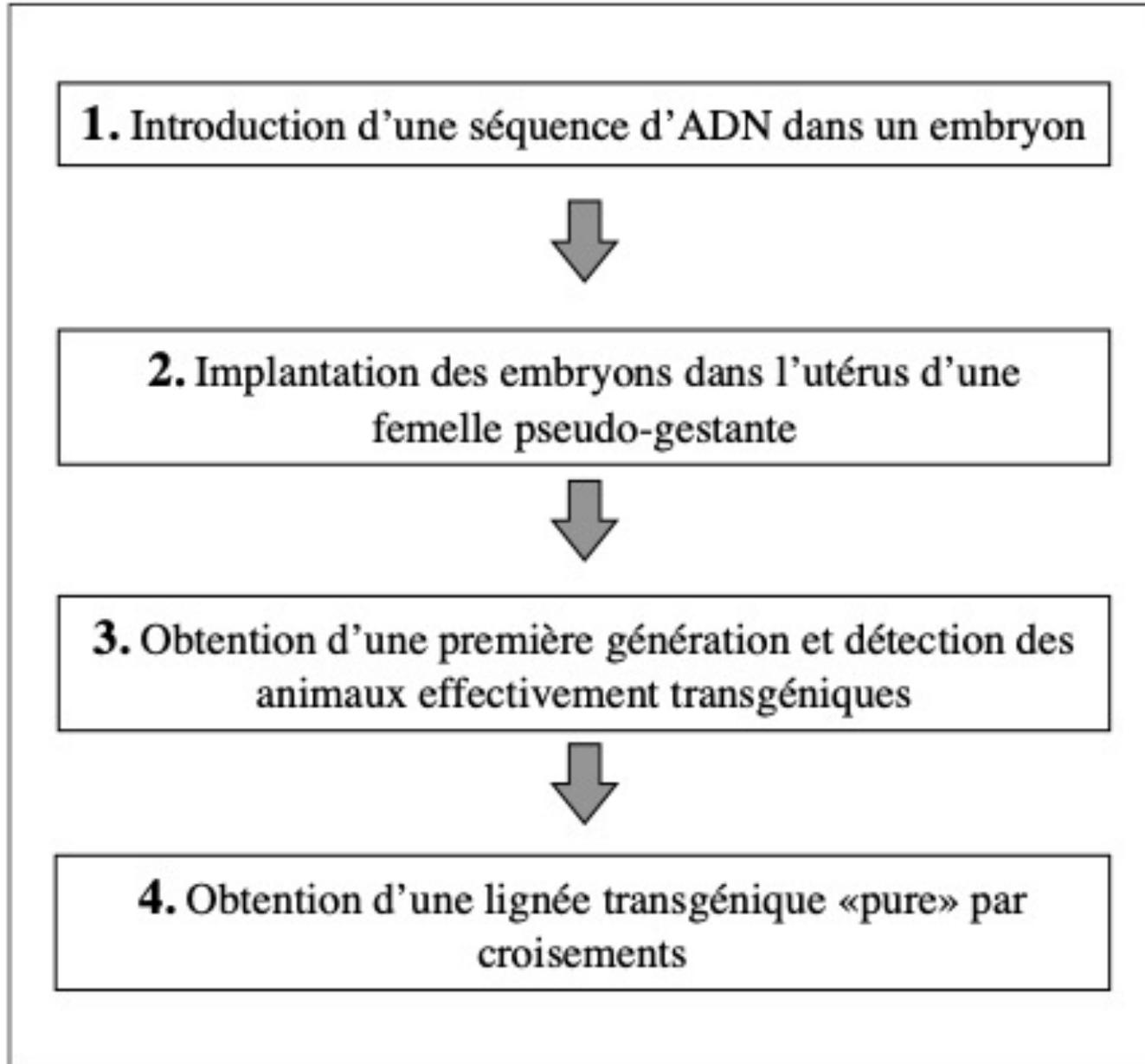
1. Obtain from mouse provider the sequences of the wild-type and mutant alleles.

To establish an efficient PCR genotyping strategy, it is essential to have access at least to the DNA sequence of the mutant allele. Without this information, no specific design can be done. Thus, if you are unable to get the recombinant sequence from the provider, we strongly advise generating the theoretical sequence yourself using information available in the corresponding published paper. If the recombinant sequence cannot be generated from a published paper, see the additional recommendations provided in Critical Parameters.

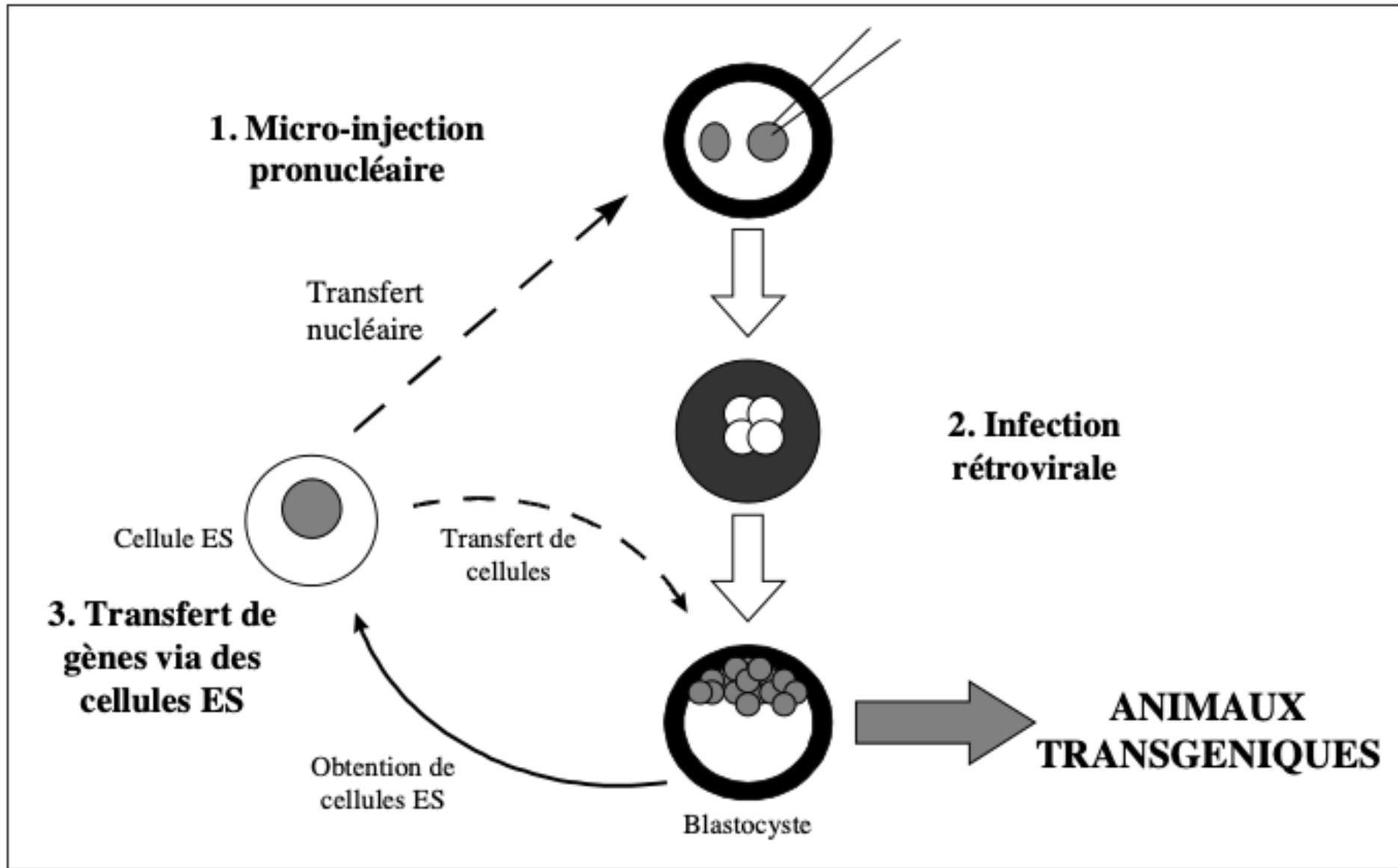
2. Verify that the wild-type sequence you have matches the latest release of the *Mus musculus* C57BL/6J reference genome assembly in NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=mus%20musculus>) or Ensembl (https://www.ensembl.org/Mus_musculus/). If it does not, you will need to carefully check the wild-type sequence provided.

Gene reannotation may change your gene structure. Other backgrounds than C57BL/6J are also available as wild-type references at <https://www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project>.

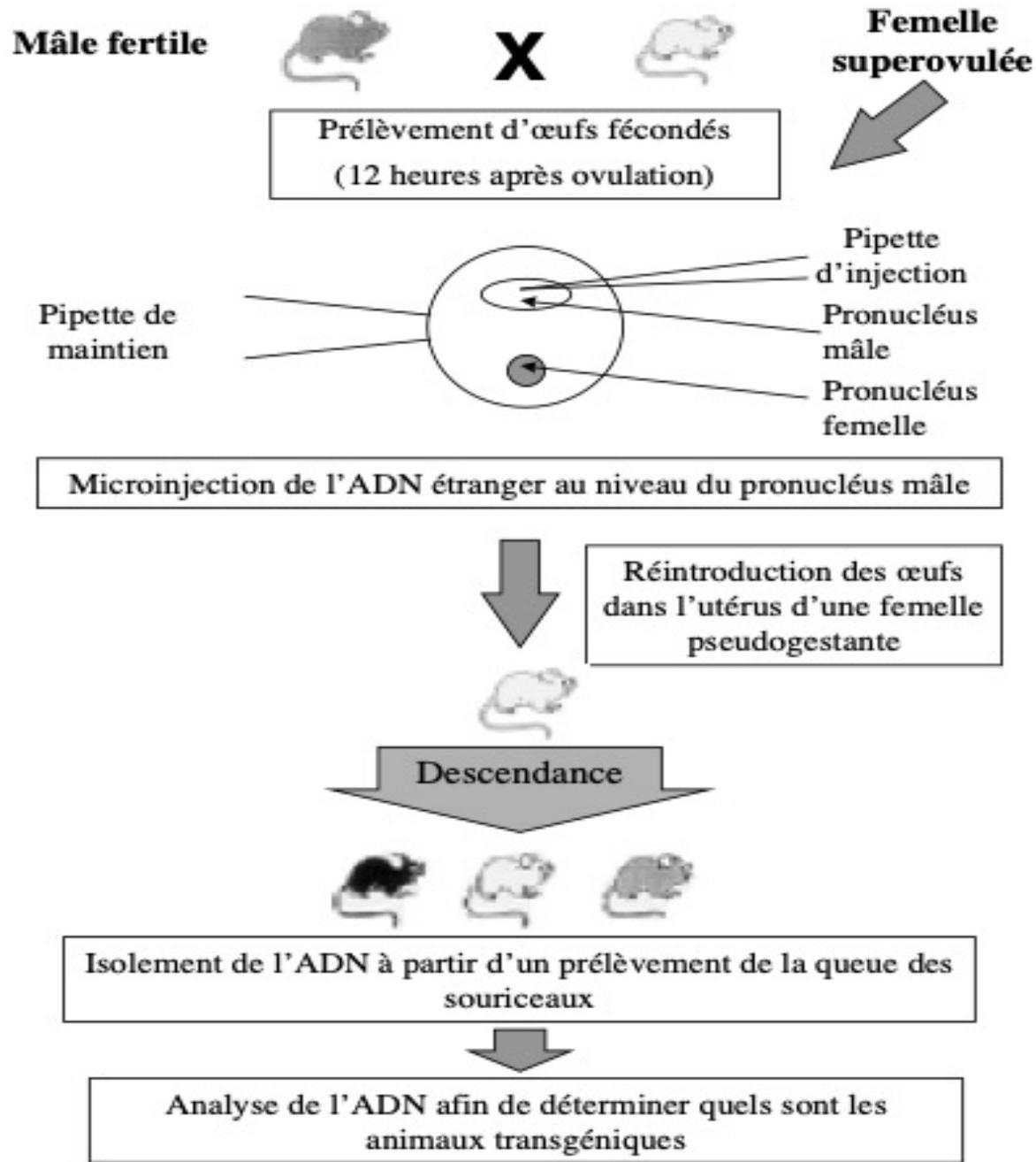
Les principales étapes de l'obtention d'animaux transgéniques



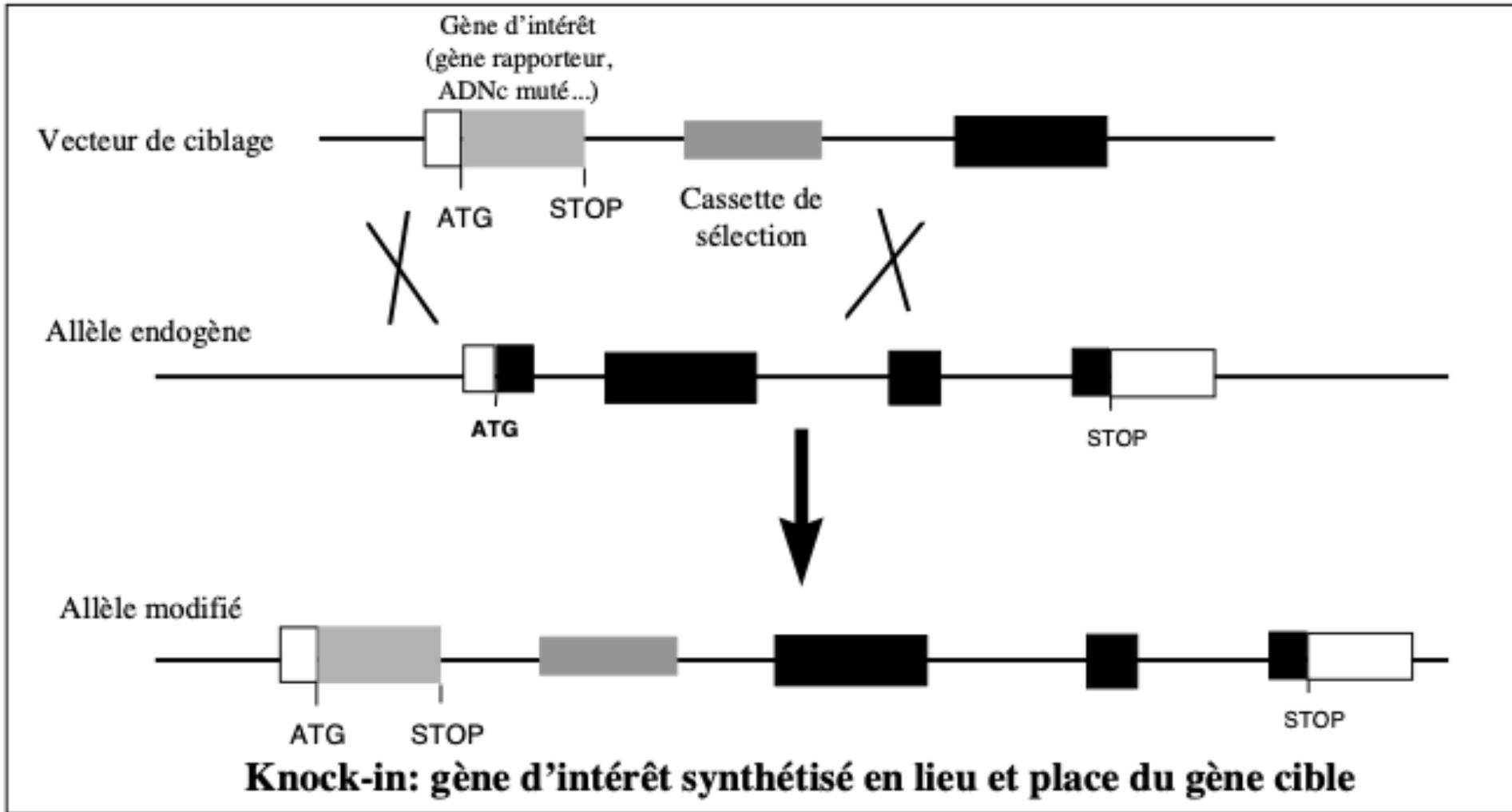
L'obtention d'animaux transgéniques repose, quelque soit la technique utilisée, sur les quatre mêmes principales étapes



Les 3 principales méthodes de transgénèse



Les principales étapes principales de l'obtention de souris transgéniques par micro-injection pronucléaire



Dans ce cas, en plus de l'invalidation du gène cible, il y a introduction d'un gène d'intérêt (par exemple un gène codant pour une protéine particulière). Suite à la recombinaison homologue, ce gène, placé sous le contrôle du promoteur et des autres séquences régulatrices du gène cible, s'exprimera à la place de ce dernier. De façon simpliste, on peut dire qu'il y a eu remplacement d'un gène par un autre.

étape : Préparation de la solution d'ADN injectée

Une séquence d'ADN déterminée est clonée (c'est-à-dire reproduite à l'identique un grand nombre de fois) ce qui permet l'obtention d'une solution d'ADN. Cette solution sera ensuite microinjectée au niveau d'un des pronucléi. L'efficacité de la micro-injection dépend des propriétés et de la qualité (e.g. pureté) de la solution injectée.

Il a été montré que plus le nombre de copies d'ADN est grand, plus le taux d'intégration de l'ADN est important. Cependant, une préparation trop concentrée donc trop visqueuse peut augmenter le risque de mort de l'embryon au moment de l'injection. De plus, l'ADN linéaire s'intègre plus efficacement que l'ADN circulaire.

De plus, l'effet inhibiteur de séquences procaryotiques (provenant des vecteurs de clonage) a été démontré : ils n'ont pas d'effet sur l'intégration du transgène dans le génome hôte mais ils peuvent cependant inhiber l'expression de certains transgènes.

Il est donc recommandé d'éliminer toute séquence inutile, notamment les séquences provenant du vecteur de clonage au moyen d'enzymes de restriction.

Mais certaines séquences, au contraire, se sont révélées importantes dans la régulation de l'expression du transgène : c'est le cas des introns (qui sont de larges séquences non codantes) qui ont une influence importante sur le fonctionnement des gènes introduits par micro-injection. Les observations de Brinster suggèrent que les introns facilitent la transcription des gènes micro-injectés, notamment en aidant à maintenir une activité de transcription pendant le développement.

Il est donc recommandé d'injecter l'ADN sous sa forme génomique plutôt que sous sa forme d'ADNc (ADN complémentaire qui est obtenu par transcription reverse à partir de l'ARN messager et qui ne comprend pas les introns).

Primer structure:

- i. 20-24 nucleotides in length.
- ii. G or C at 3' end.

The bases G or C at the 3' end serve as the starting binding site for the DNA polymerase.

- iii. 40%-60% GC composition.
- iv. Comparable melting temperatures (T_m) for both primers.

Comparable T_m (within 5°C of each other) will determine the stability of the hybrids once the match between primers and matrix is achieved.

- v. Specific to the appropriate genomic DNA sequence.

*Check the specificity of each primer against genomic DNA with NCBI Nucleotide blastn on the *Mus musculus* genome only (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). You do not need to modify any algorithm parameters or program selection (i.e., use megablast).*

The specificity of a primer set is related to whether the primers will bind only to the sequence that we want to detect or also to additional sequences.

CAUTION: *It is not necessary that there be 100% homology between primers and a genomic sequence for nonspecific PCR amplification to occur. Primers with a few mismatches or with a nonspecific 5' end can give rise to nonspecific amplifications.*

Amplicon structure: 100-500 bp amplicon size.

An amplicon size of 100-500 bp is optimal for visualizing PCR fragments using 2% (w/v) agarose gel electrophoresis. Below 100 bp, PCR fragments are difficult to separate and visualize. Over 500 bp, PCR efficiency is lower as crude extract are usually more degraded than purified DNA. Moreover, classical Taq polymerase does not process amplicons >1 kb in size well.

If the sequence of the amplicon contains >60% GC, perform the PCR setup with and without adjuvants (as described in Troubleshooting) or even with a specific GC-rich polymerase (suppliers provide an array of specific DNA polymerase designed for specialized needs such as GC-rich amplification).

- . Verify that each PCR amplicon produces a size that can be readily separated on 2% agarose gel.

Some primer pairs can be used to detect different alleles (see Fig. 2B), but the size of the PCR amplicon needs to differ by a minimum of 50 bp to correctly discriminate each amplicon.

- . Order primers from any provider.

Standard PCR does not require high-quality primer synthesis. You can select any provider and use desalted purification.

- . Dilute primers to 100 μ M in PCR-grade H₂O and store at -20° C.

Setup of polymerase chain reaction

The PCR strategy described below should be tested on three to five samples. Ideally, a biopsy from mutant animals is used for the test PCR. If no biopsy is available, embryonic stem cell clone DNA diluted in crude extract, targeting vector diluted in crude extract, or chimera biopsy can be used. A tissue biopsy from a wild-type animal should always be included as a control. Likewise, PCR reactions with no template act as a negative (or water) control to confirm the absence of PCR contamination.

10. Centrifuge tubes containing biological samples for 2 min at $4000 \times g$, room temperature, to sediment debris.
11. Prepare the PCR reactions as described below, either in a sterile 1.5-ml tube for a few samples or in a 96-well plate for larger sample numbers.

As the enzyme used in this protocol is a hot-start polymerase, the PCR reaction mix can be prepared at room temperature (18°C-25°C). However, if any reagents have been frozen for later use (e.g., reaction mix or primers), the tubes should be thawed slowly on ice.

The amount of each reagent added to the master mix is equivalent to the total number of volume reactions plus 10% rounded up to the nearest whole reaction (to accommodate pipet transfer loss).