

Vecteurs et Clonage moléculaire

www.facebook.com/DomaineSNV/

Définition:

Cloner un fragment d'ADN consiste a:

- **isoler physiquement ce fragment et l'insérer dans un vecteur pour augmenter leur nombre de copie**

Un clone est un ensemble de cellules qui ont toutes le même génome et qui ont une origine commune

Principe: Le clonage consiste à:

- 1) insérer un fragment d'ADN étranger à cloner (insert) dans un vecteur de manière à obtenir un vecteur recombinant.
- 2) introduire le vecteur recombinant dans une cellule hôte.
- 3) amplifier le vecteur recombinant par division de la cellule hôte, afin d'obtenir un clone recombinant.

Principes

ORGANISME DONNEUR

Extraction et coupure de l'ADN en fragment contenant de un à plusieurs fragments d'intérêt.

VECTEUR

Ou transporteur d'ADN. C'est un fragment d'ADN capable de réplication autonome.

insertion individuelle de chaque **fragment d'ADN** dans une molécule de **vecteur**.

Obtention de l'**ADN recombinant**

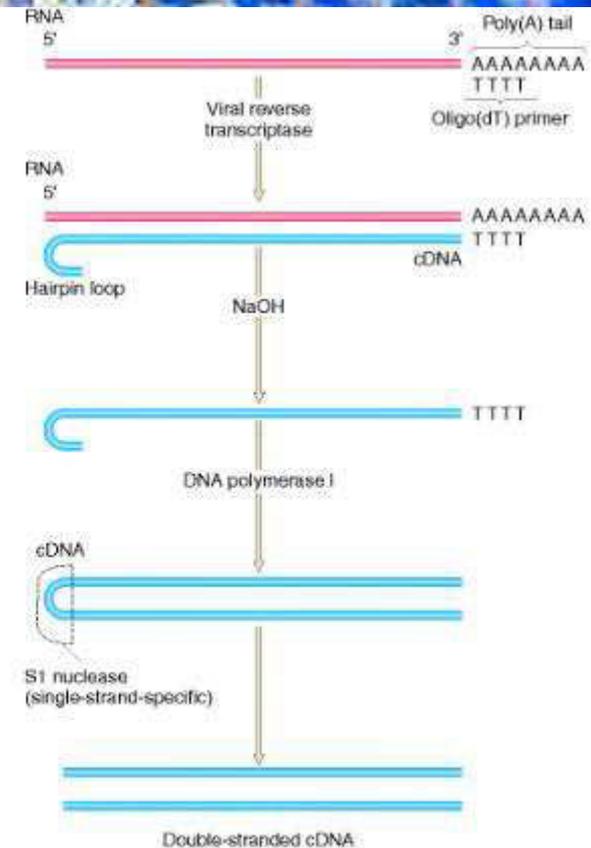
Nouvelle combinaison de **l'ADN d'un génome donneur** (qui peut être de n'importe quel organisme) avec **l'ADN d'un vecteur** qui peut être d'origine complètement différente.

- comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur?
- Qu'est ce qu'une enzyme de restriction?
- Quels sont les vecteurs de clonage?
- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont-ils liés?
- Les cellules hôtes?
- Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellule hôtes?
- Les intérêts du clonage?

➤ comment obtenir l'ADN de l'organisme donneur?

A partir de l'ARN:

Principe de la reverse transcription:



Homo sapiens

Mammifère

23

3400 Mb

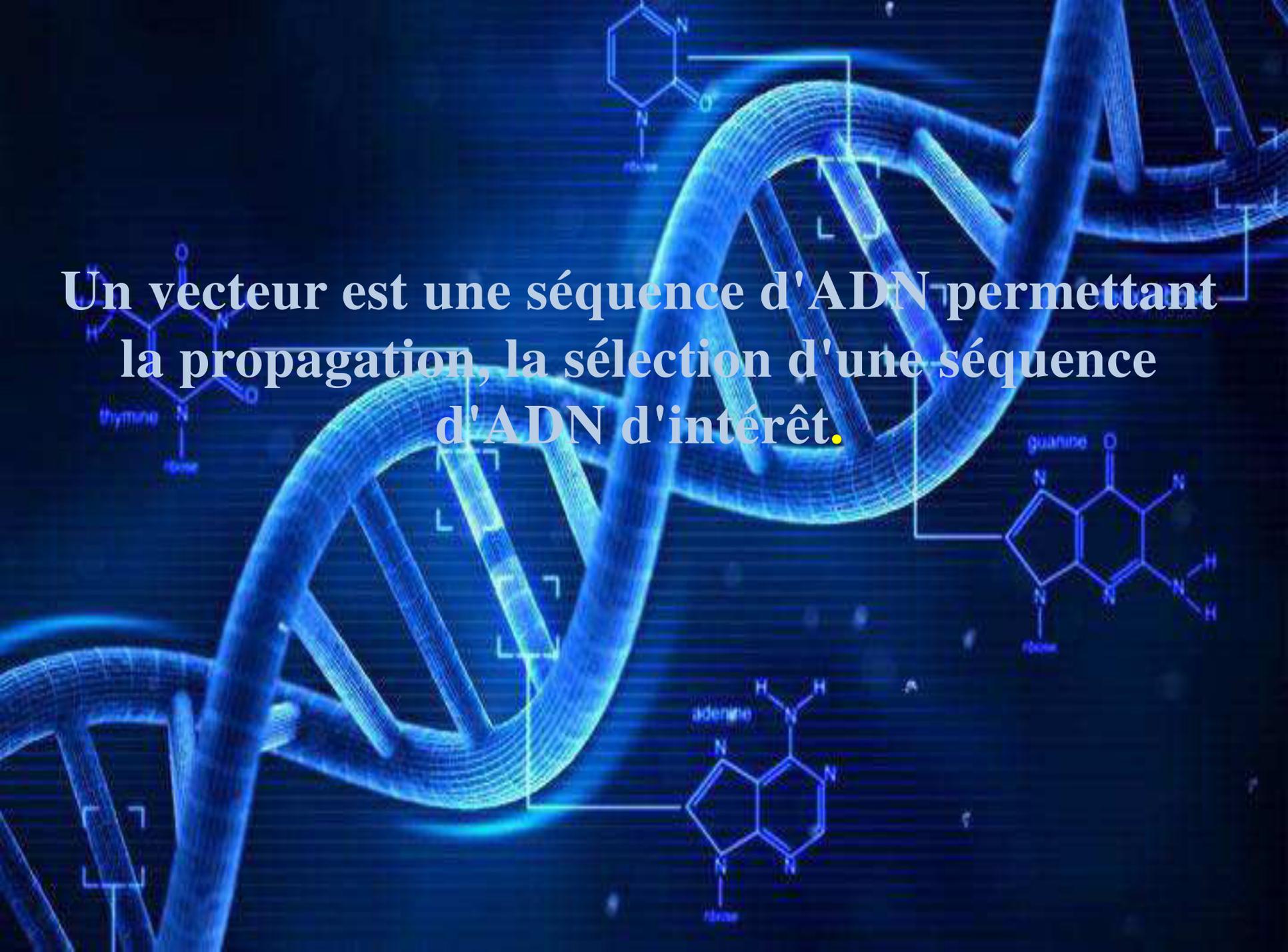
25000-30000

Qu'est ce qu'une enzyme de restriction?

Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' -->3'
Ava I	Anabaena variabilis	C* C/T C G A/G G
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens	G* G A T C C
Bgl II	Bacillus globigii	A* G A T C T
Eco RI	Escherichia coli RY 13	G* A A T T C
Eco RII	Escherichia coli R245	* C C A/T G G
Hae III	Haemophilus aegyptius	G G * C C
Hha I	Haemophilus haemolyticus	G C G * C
Hind III	Haemophilus influenzae Rd	A* A G C T T
Hpa I	Haemophilus parainflenzae	G T T * A A C
Kpn I	Klebsiella pneumoniae	G G T A C * C
Mbo I	Moraxella bovis	*G A T C
Mbo I	Moraxella bovis	*G A T C
Pst I	Providencia stuartii	C T G C A * G
Sma I	Serratia marcescens	C C C * G G G
SstI	Streptomyces stanford	G A G C T * C
Sal I	Streptomyces albus G	G * T C G A C
Taq I	Thermophilus aquaticus	T * C G A
Xma I	Xanthamonas malvacearum	C * C C G G G

➤ Quels sont les vecteurs de clonage?





Un vecteur est une séquence d'ADN permettant la propagation, la sélection d'une séquence d'ADN d'intérêt.

I - Propriétés des vecteurs de clonage

➤ capables de répllication autonome dans une cellule hôte donnée
(origine de répllication de type procaryotique et/ou eucarvotique)

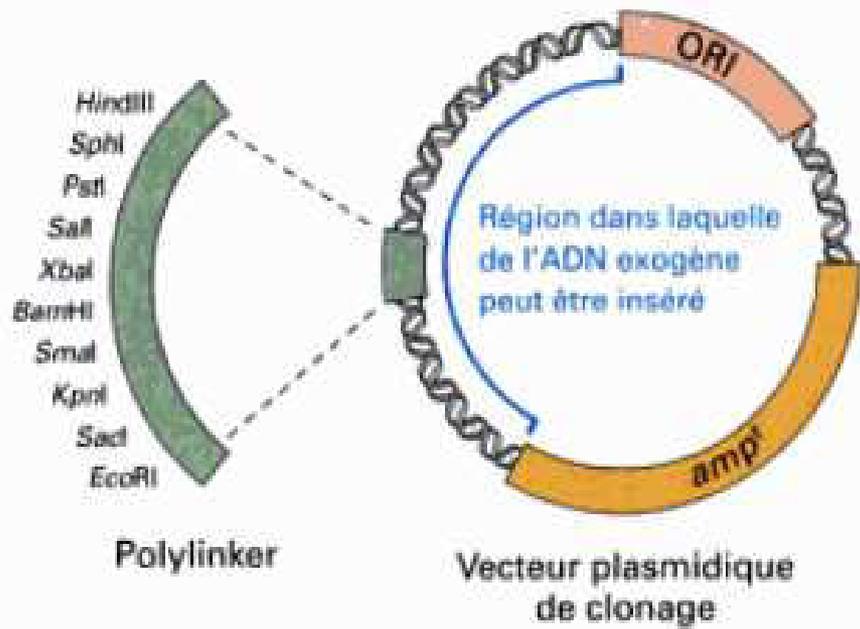
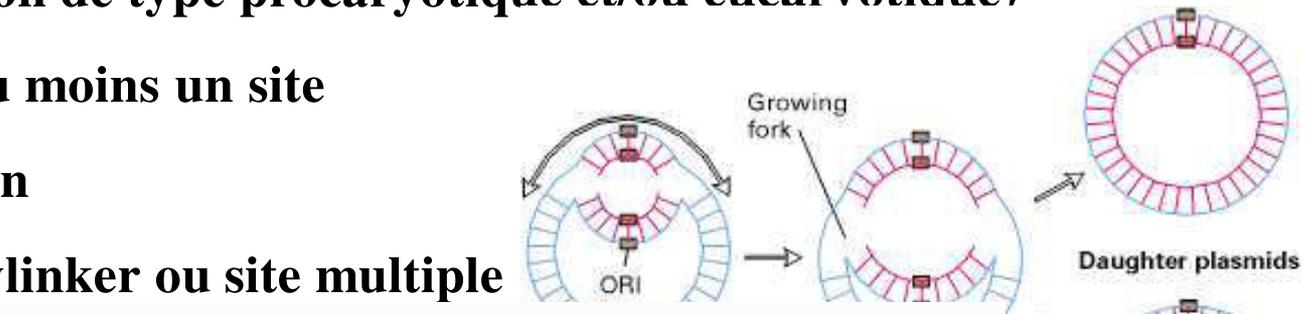
➤ il doit posséder au moins un site unique de restriction

➤ possèdent un polylinker ou site multiple de clonage

➤ Possèdent des sites de sélection de la cellule

➤ supportent l'insertion d'un fragment d'ADN

(a) Sequence of polylinker



and.



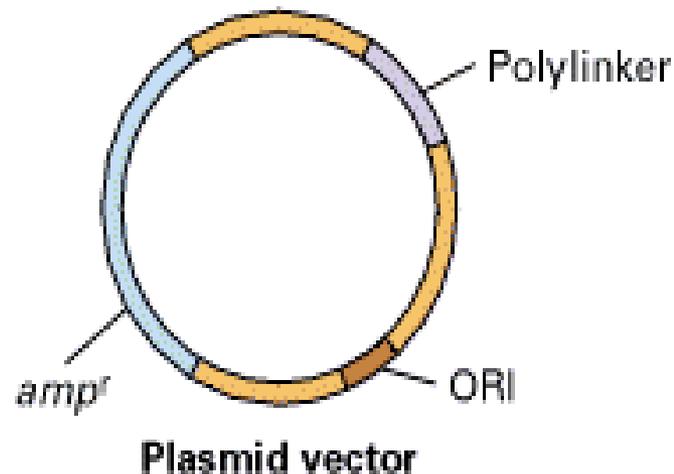
3. Différents vecteurs pour différentes utilisations

Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur

VECTEURS	HOTE	INSERT (Kb)
Plasmides	Bactérie	10
Phage lambda	Bactérie	25
Cosmide	Bactérie	45
Phage P1	Bactérie	100
BAC (bacterial artificial chromosome)	Bactérie	300
YAC (yeast artificial chromosome)	Levure	1000

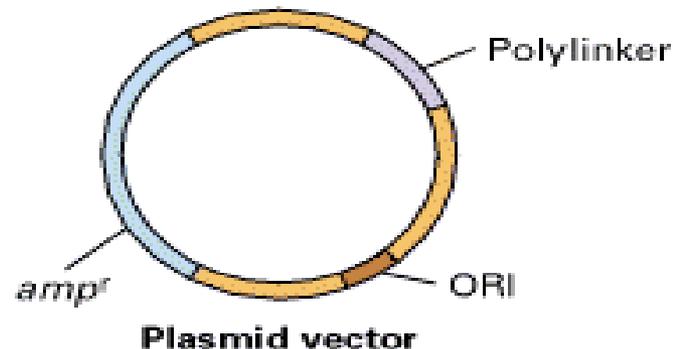
4. Les plasmides comme vecteurs de clonage

- Molécule d'ADN de taille réduite, d'origine bactérienne
- Molécule d'ADN circulaire – taille 2kb à 5kb
- Peut accepter jusqu'à 10kb d'ADN exogène
- Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome
- Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques = sélection



4. Les plasmides comme vecteurs de clonage

- Molécule d'ADN de taille réduite, d'origine bactérienne, extrachromosomique (épisode)
- Molécule d'ADN circulaire – taille 2kb à 5kb
- Peut accepter jusqu'à 10kb d'ADN exogène
- Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome
- Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques = sélection



Les plasmides de première génération:

(exp: ColE1, Psc101, RSF2124) C'est avec ces plasmides qu'ont été effectués les 1er clonages (clonage génique). Ce sont des plasmides à l'état naturel, non modifiés au laboratoire. Mais ils avaient besoin d'être améliorés.

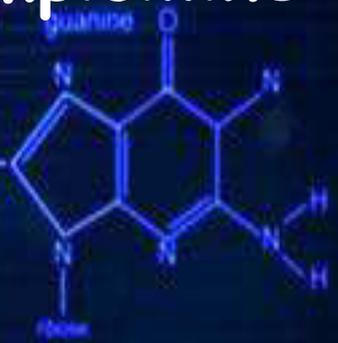
Plasmide de deuxième génération:

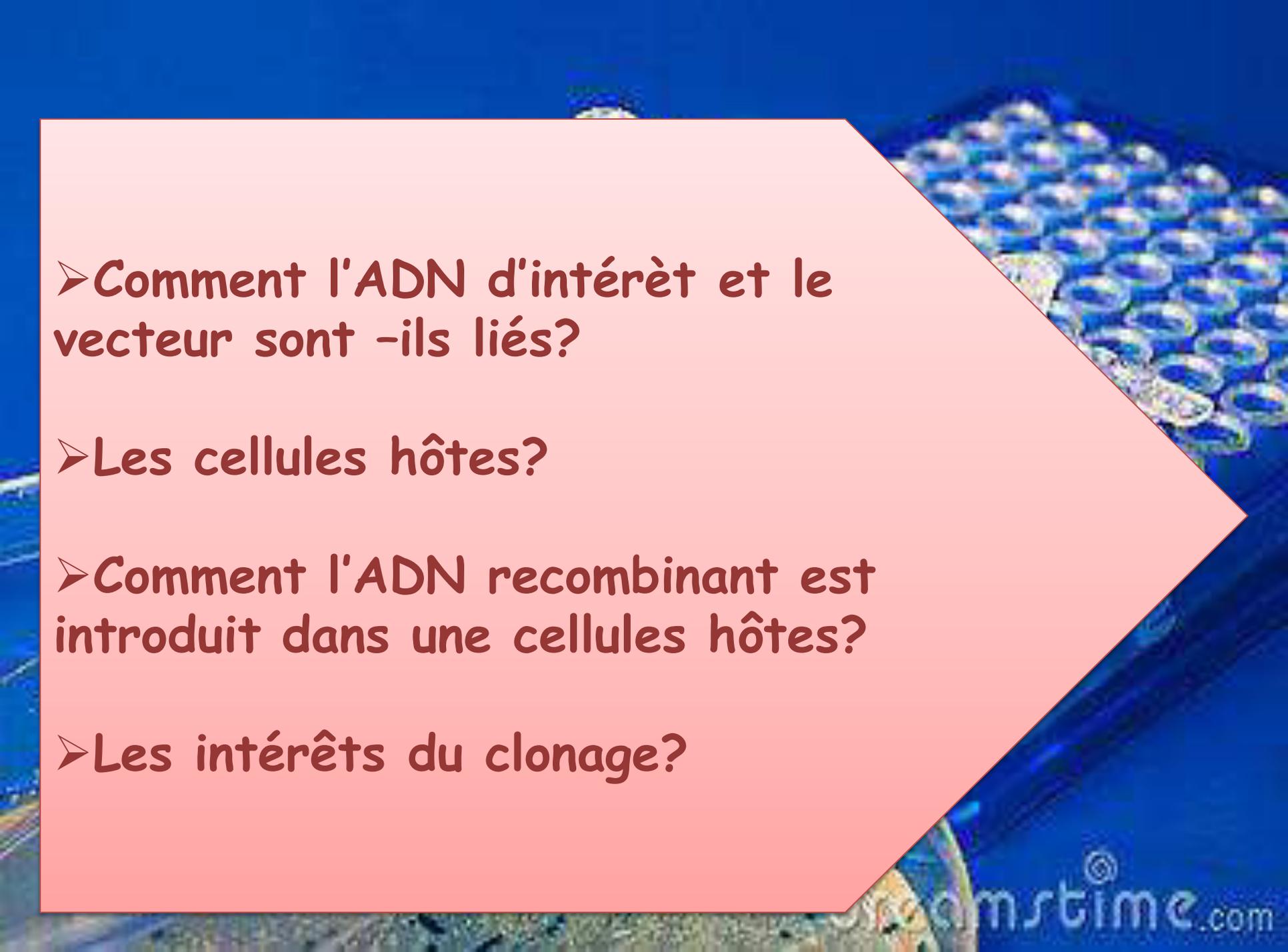
(exp: la serie pBR312 à pBR322) dérivé de plasmides naturels: plasmides artificiels
Le plasmide pBR 322 est constitué de 4,4 kb et possède deux gènes de résistance : un pour la tétracycline (TcR), l'autre pour l'ampicilline (ApR) il possède, 20 sites uniques pour les endonucléases de restriction dont 11 localisés sur deux gènes de résistance.

Plasmide de troisième génération:

(exp: famille pUC) dérivé de pBR322, plasmide de 2nd génération. Leur plus petite taille (2,6kb) permet d'insérer un fragment d'ADN étranger plus grand.

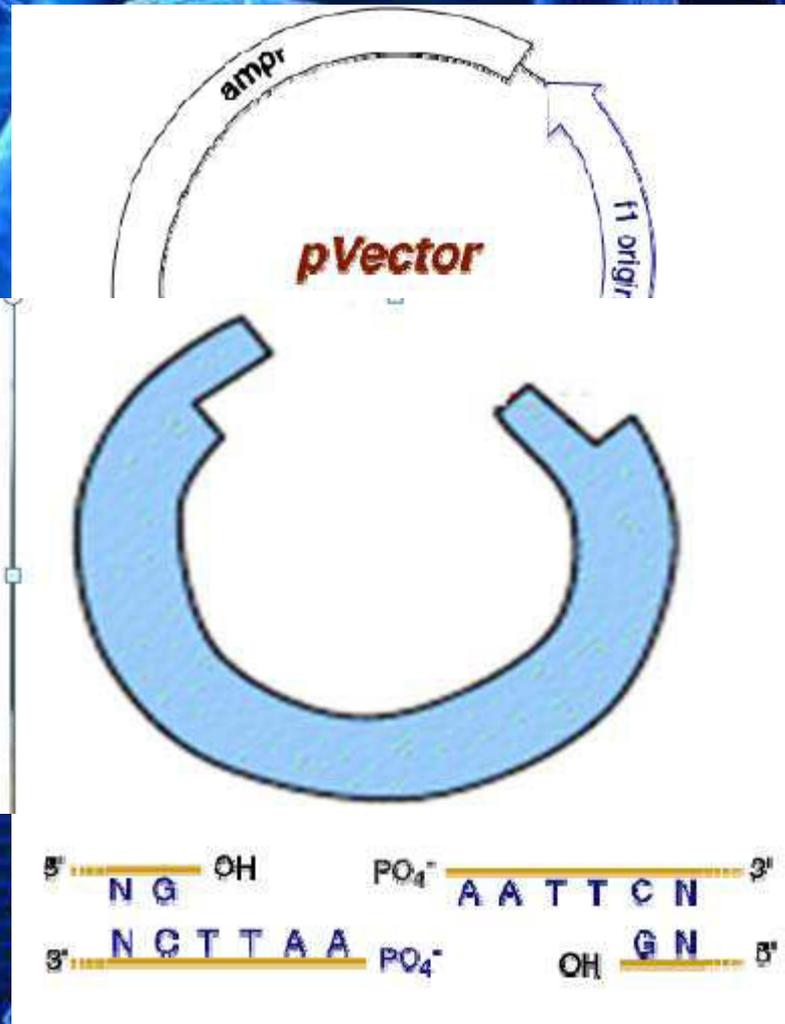
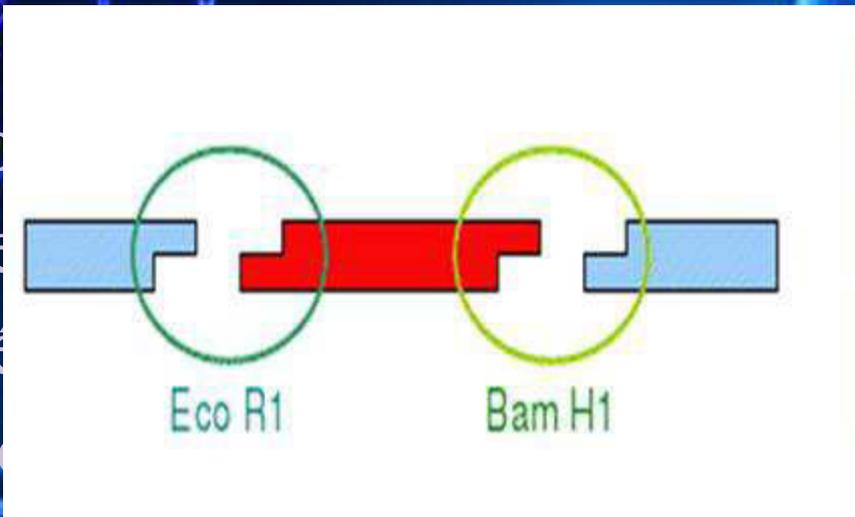
Possède les gènes de résistance à l'ampicilline et *LacZ*



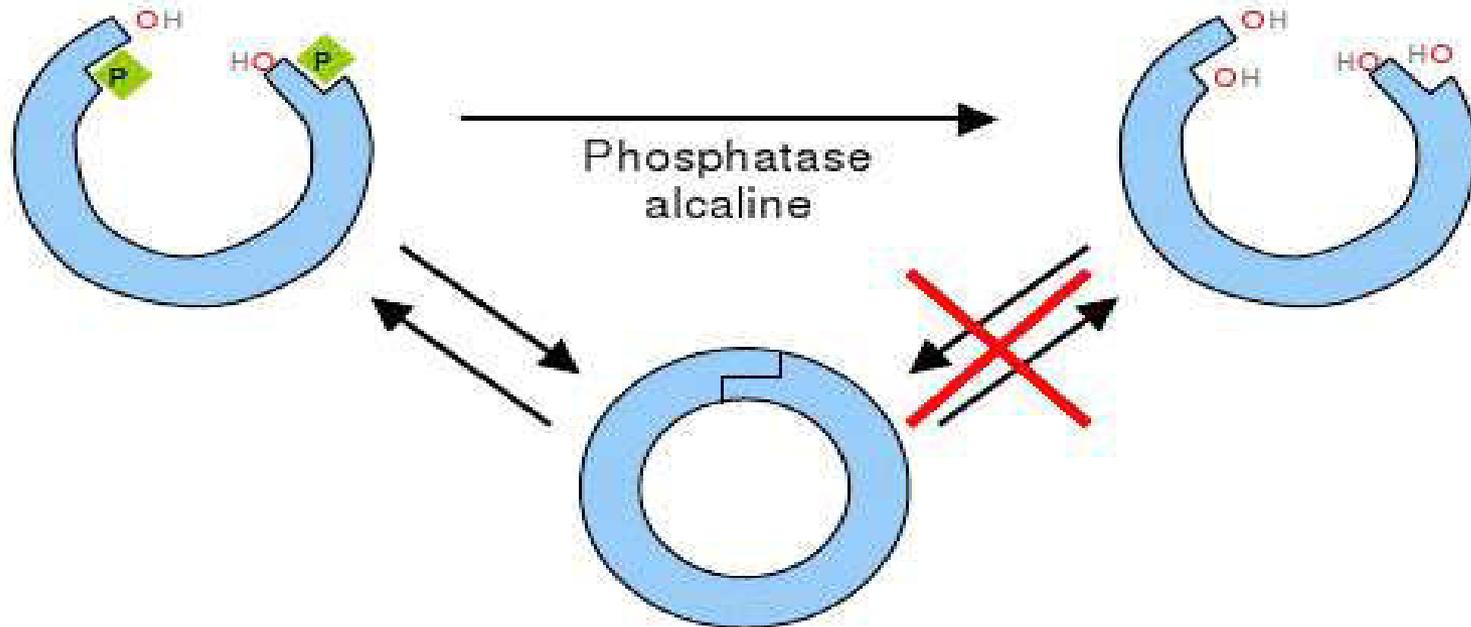
- 
- A microscopic view of a petri dish containing a dense culture of cells, likely fibroblasts, growing in a grid pattern. The cells are small, rounded, and have a distinct nucleus. The background is a deep blue color.
- Comment l'ADN d'intérêt et le vecteur sont -ils liés?
 - Les cellules hôtes?
 - Comment l'ADN recombinant est introduit dans une cellules hôtes?
 - Les intérêts du clonage?

Utilisation d'un vecteur

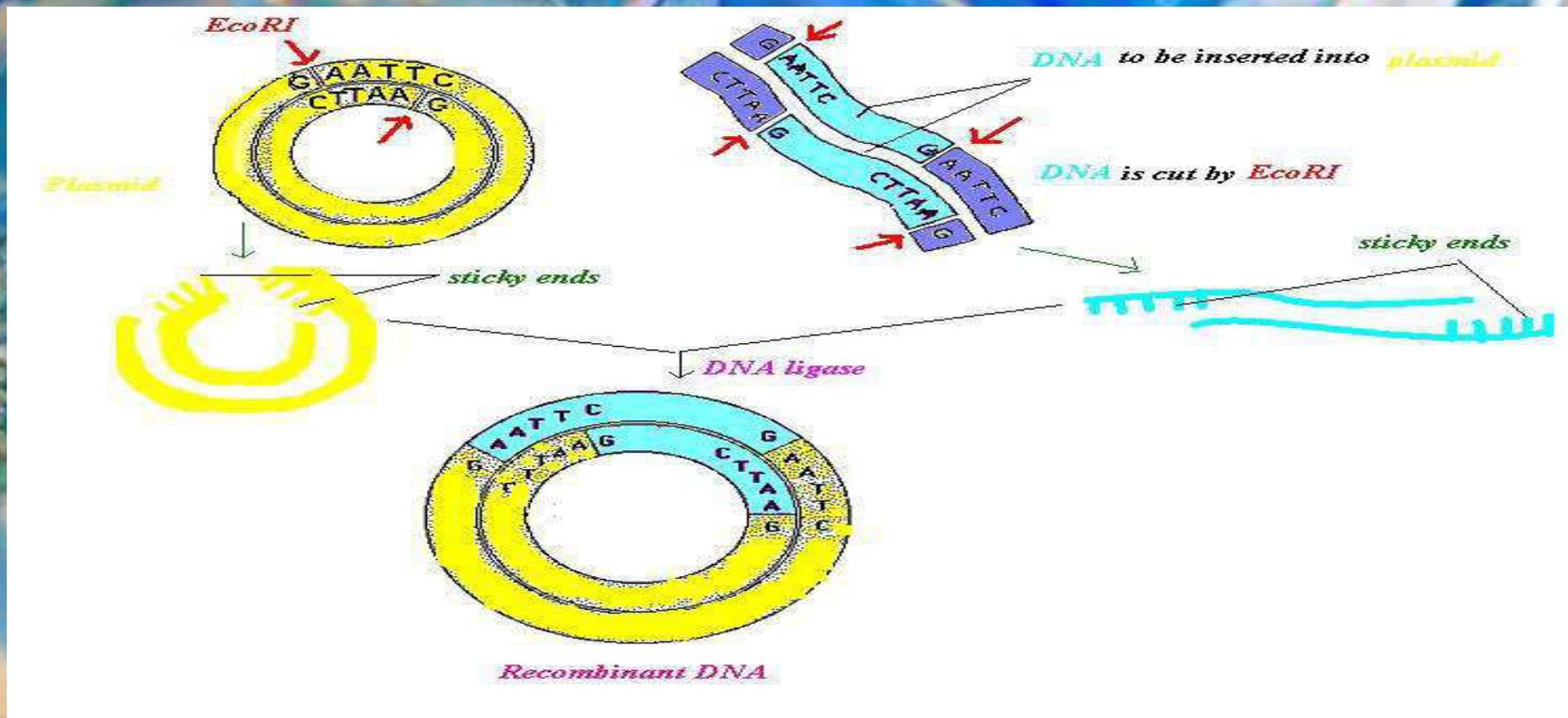
1-
co
l'e
de
à



2- traitement par phosphatase alcaline



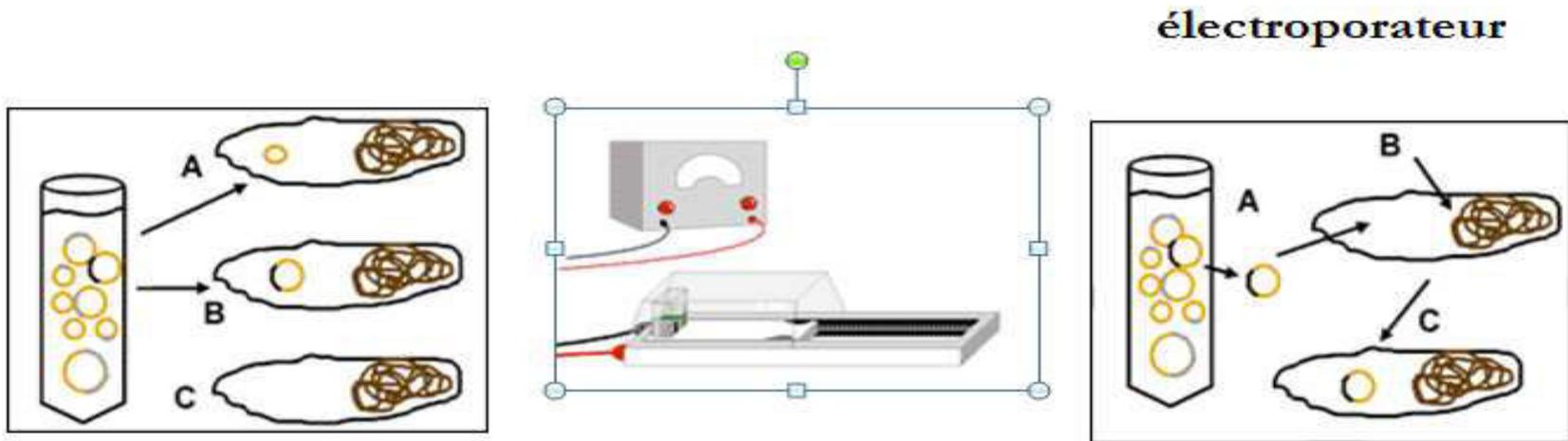
3 - L'insertion du l'insert dans plasmide



4- Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

De type procaryotique (bactéries):

Cas d'un vecteur plasmidique: l'ADN est introduit dans les bactéries traitées spécialement le plus souvent par **choc thermique** ou par **choc électrique**.



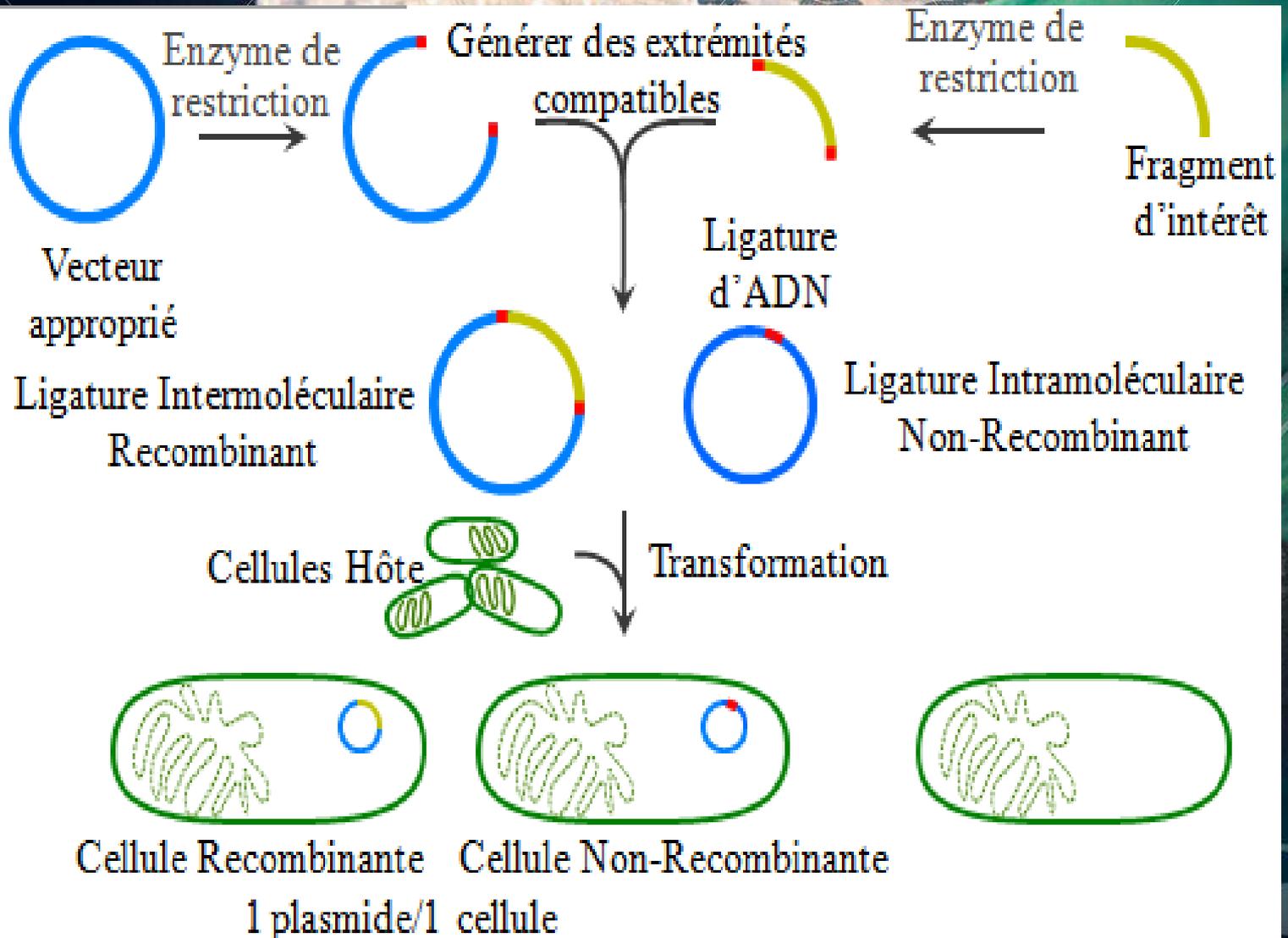
5 - la sélection des bactéries transformés:

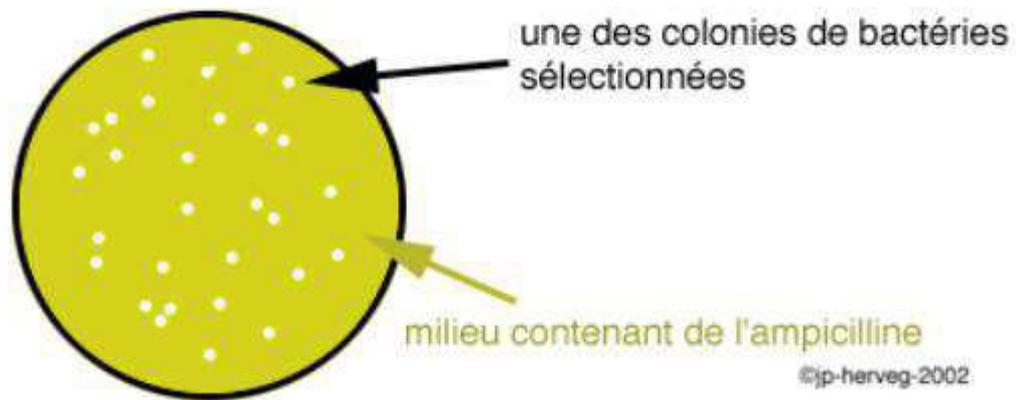
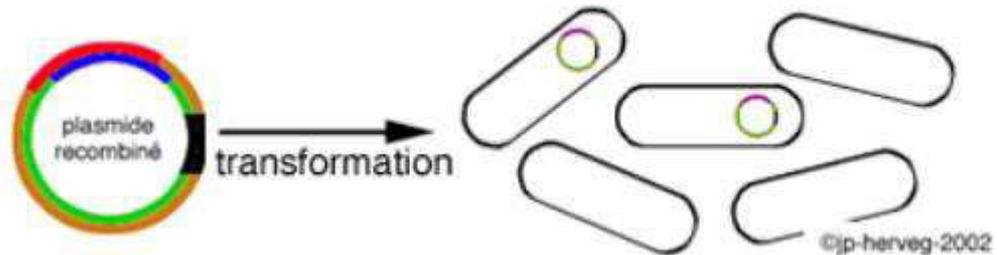


5 - la sélection des bactéries transformés:



5 - la sélection des bactéries transformés:





➤ Le taux de transformation des bactéries est généralement très faible.

➤ Si on utilise un gène de résistance dans plasmide on obtient une sélection séparer les bactéries comportant des plasmides et les bactéries sans plasmides car ces dernières sont tuées.

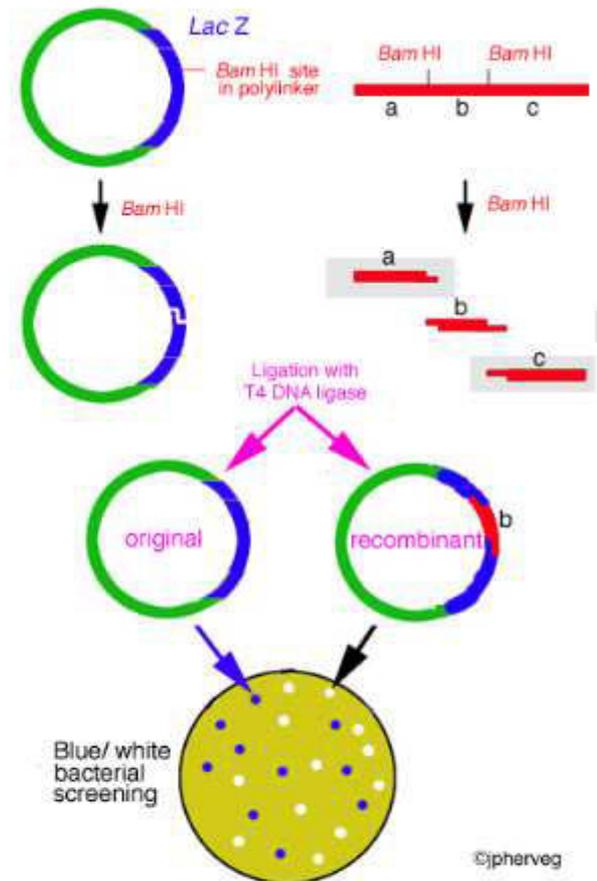
➤ cette méthode permet pas de distinguer les bactéries avec plasmides intacts des bactéries avec plasmides recombinants.

➤ On utilise pour cela une résistance à un second antibiotique , ou plasmide a un gène code (LacZ) pour un protéine β galactosidase.

5 - la sélection des bactéries transformés:

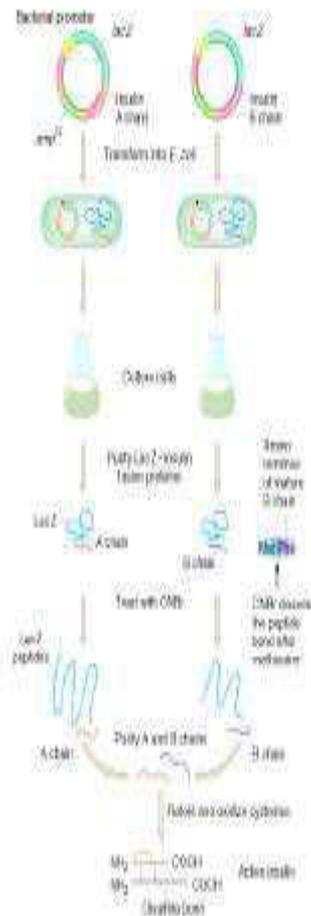
Le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D galactoside (X-Gal) est clivé par la β - galactosidase pour donner une substance bleue insoluble et en présence d'IPTG (colonies bleues)

Si on introduit un ADN étranger dans le polylinker, on détruit la grille de lecture: pas de β -galactosidase active (colonies blanches)

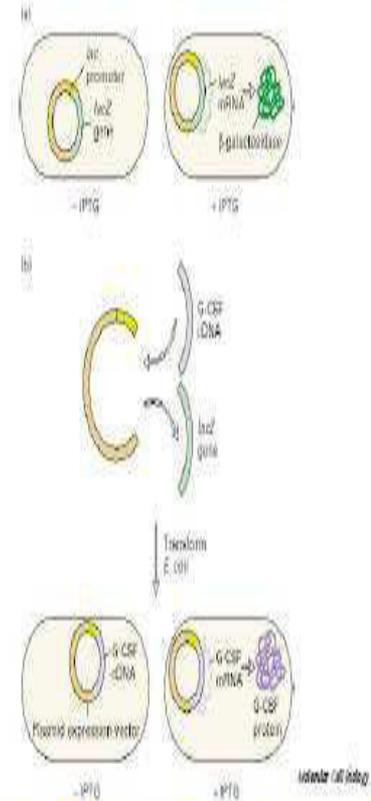


Insertion dans la partie *LacZ* de l'opéron lactose

Exemple de l'insuline



Production de protéines Utilisation de vecteur d'expression



Quelles types de protéines cherchiez vous à produire?

Autres exemples

Levures et bactéries utilisées comme usines:
production d'antibiotiques -pénicilline, tétracycline-,
d'enzymes comme lipases -lessives-...





➤ **En médecine:**

-Production des hormones et des protéines :

-insuline → traitement de diabète.

-Interférons α , β , δ agent antiviraux, anti-tumoraux et anti-inflammatoires.

-Streptokinase → anticoagulant (Prescott et la ; 2010).