



Cours de Génie Génétique

Licence biologie moléculaire

Chapitre III

Clonage moléculaire

Dr. Fathi Berrabah

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de biologie

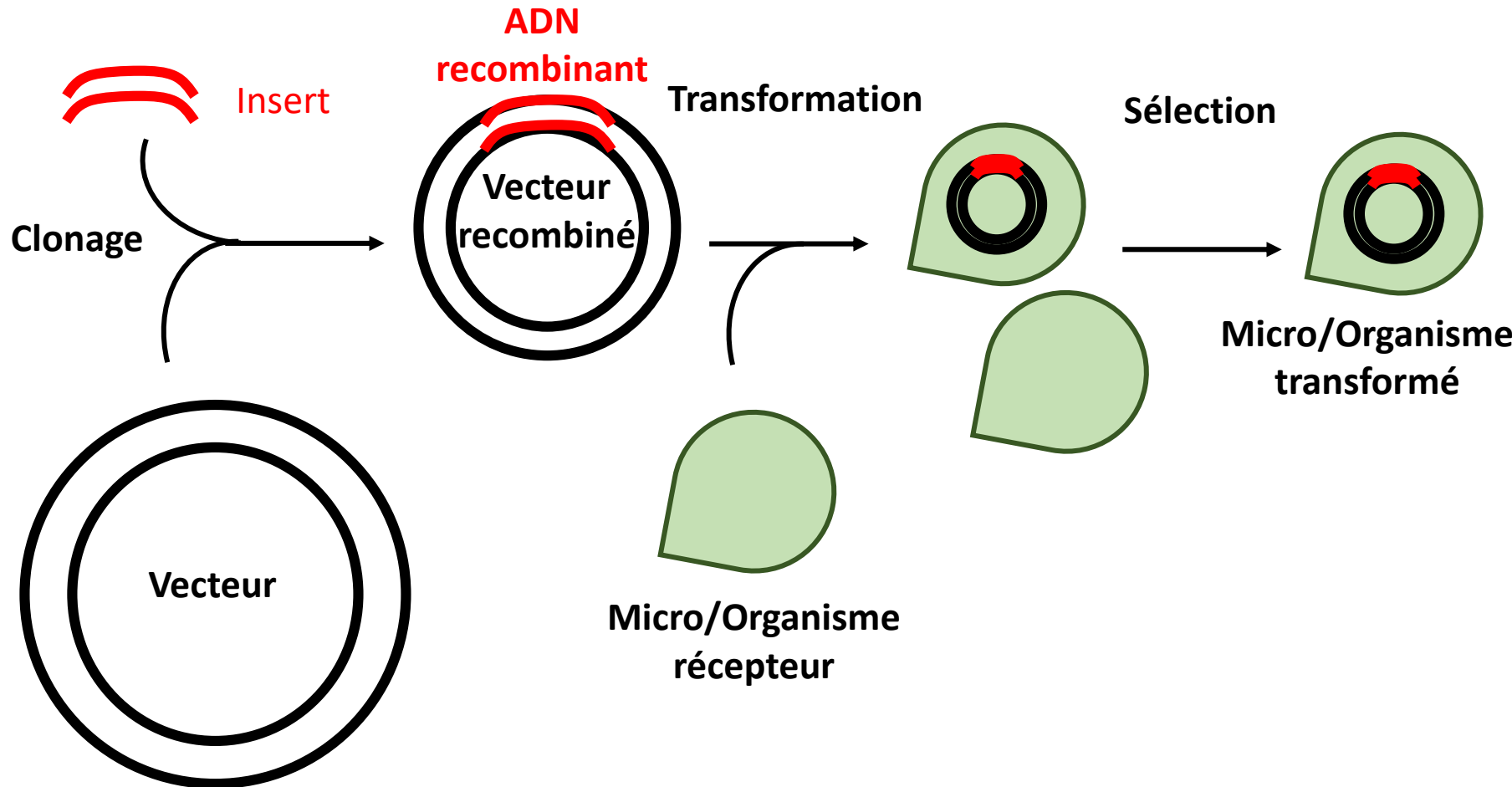
Université Ziane Achour Djelfa

2016/2017

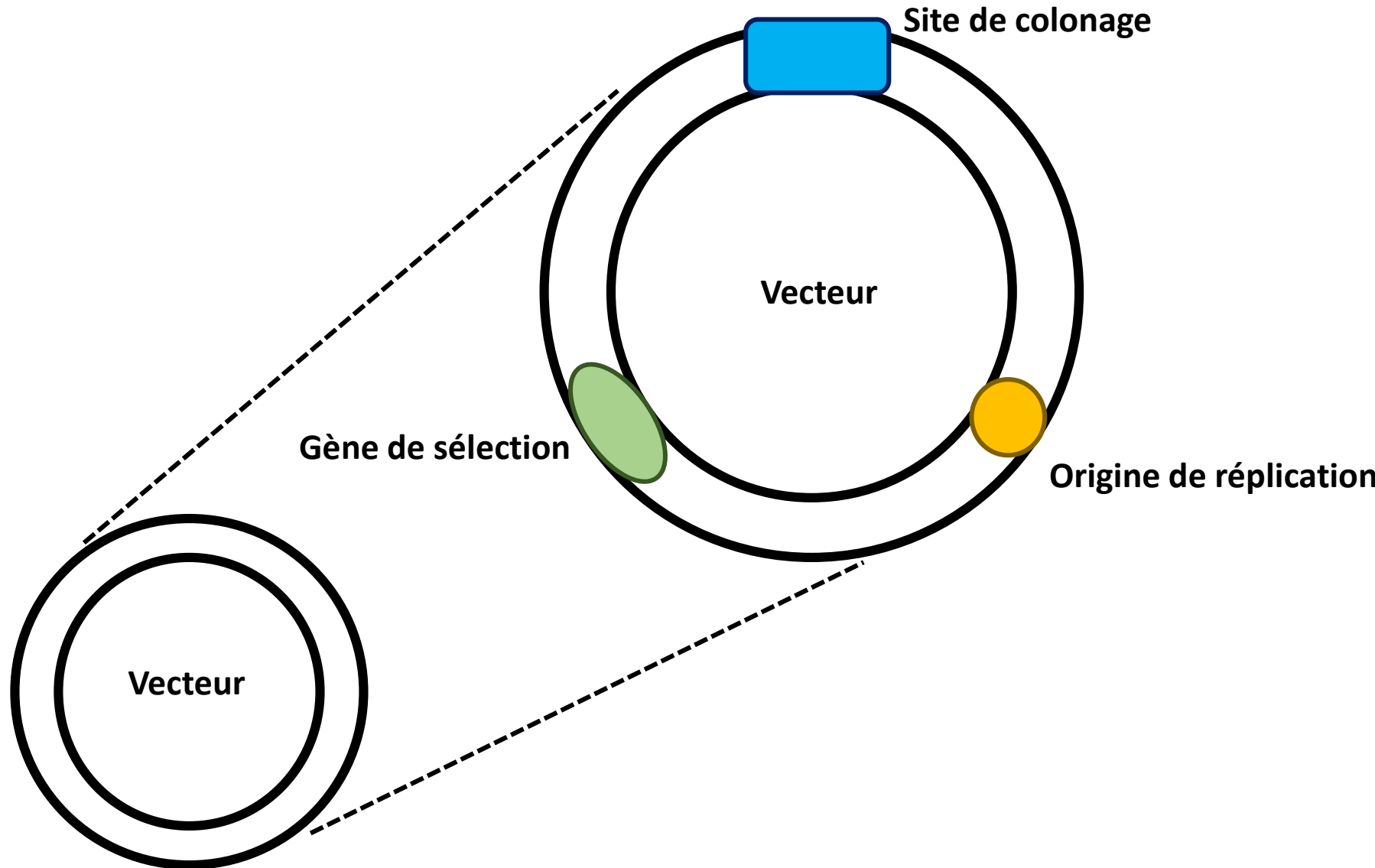
Principe du clonage moléculaire

Il s'agit d'intégrer un fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur.

Il existe différents type de vecteur associée à différents organisme.

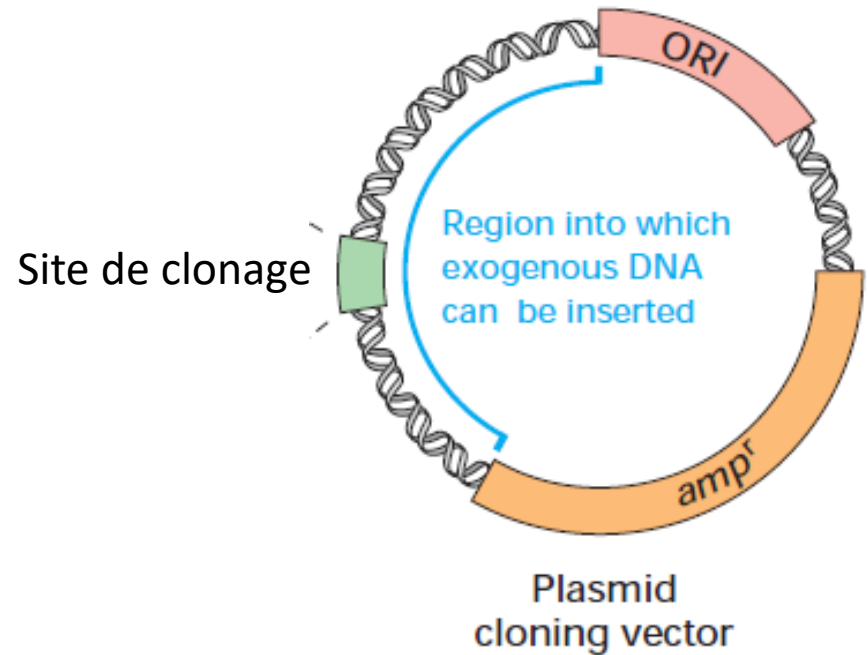


Structure minimal d'un vecteur de clonage

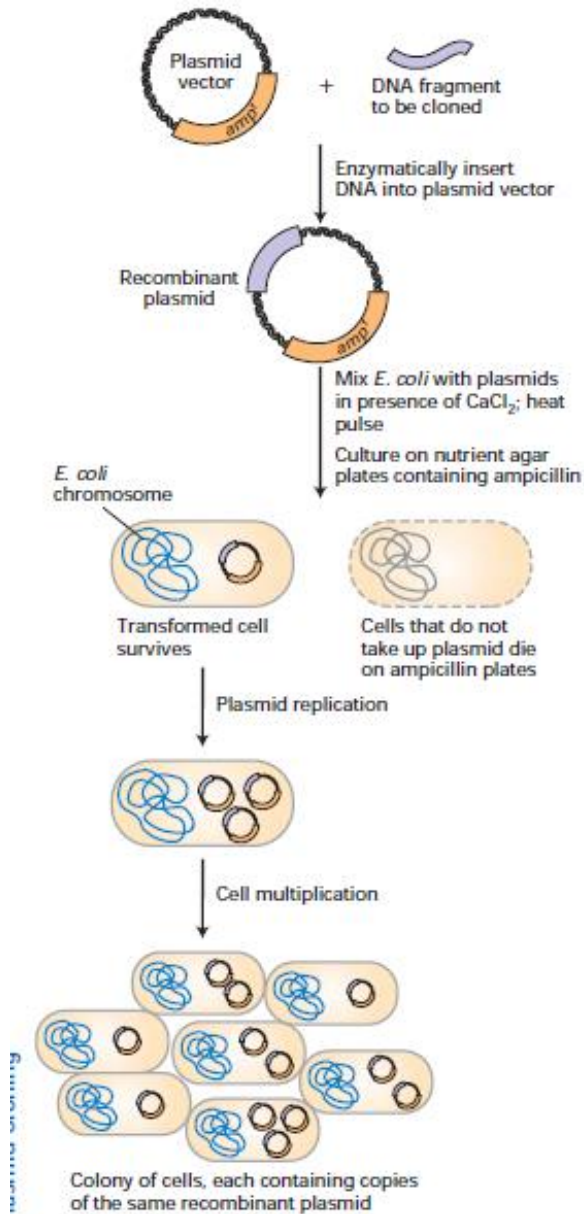


Vecteur bactérien

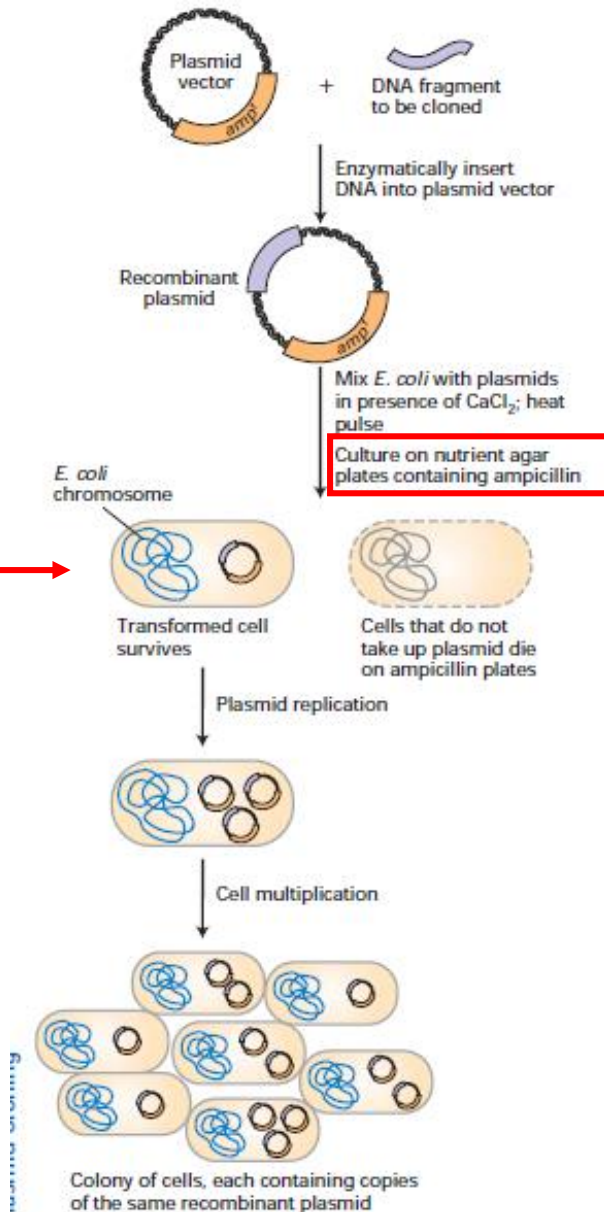
- Petite molécule d'ADN bicaténaire de 3 a 10 kb capable de se réplique dans une cellules bactérienne
- Le gène de sélection est généralement une gène de résistance à un antibiotique (exemple : ampicilline)
- L'organisme hôte est une bactérie, généralement E.Coli, dont le temps de génération est de 20 min.
- La taille de l'insert (ADN inseré) est de 0.1 a 10 Kb.
- Généralement utilisé pour stocké, multiplier de l'ADN.



Clonage dans un plasmide



Clonage dans un plasmide



Clone
bactérien

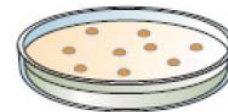


Dépôt des bactéries transformées

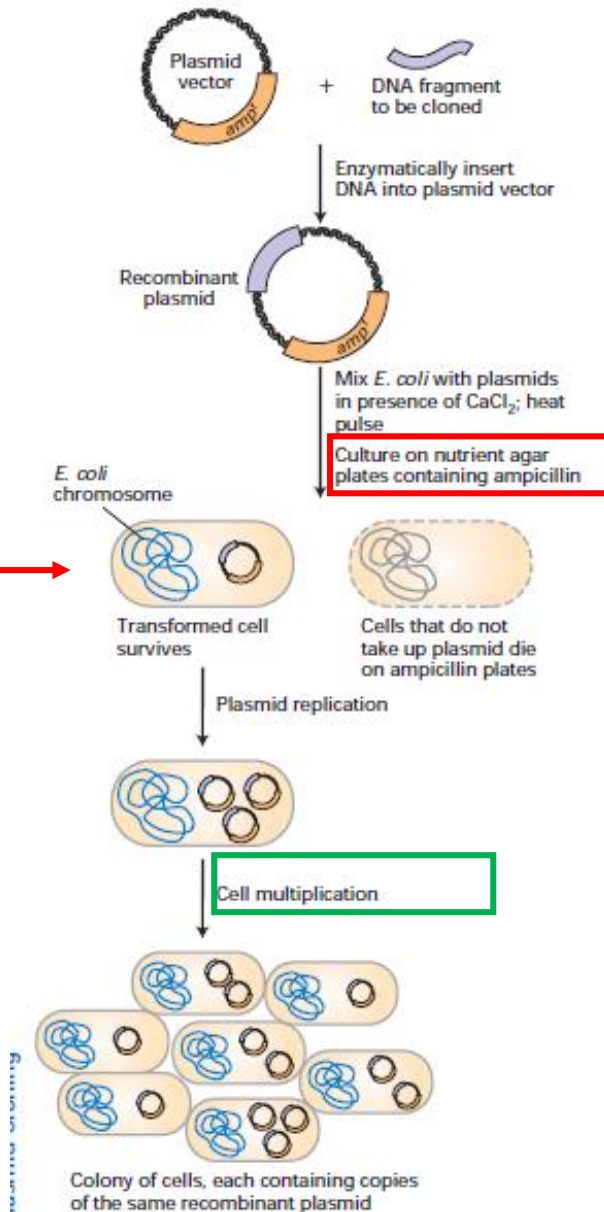


Milieux solide riche + ampicilline

37°C, Over night



Clonage dans un plasmide bactérien



Clone
bactérien

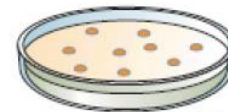


Dépôt des bactéries transformées



Milieux solide riche + ampicilline

37°C, Over night

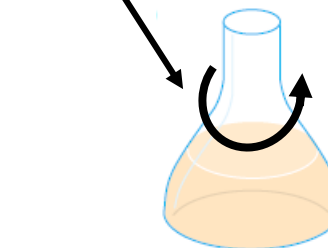


Growth



No growth

Prélèvement d'une colonie



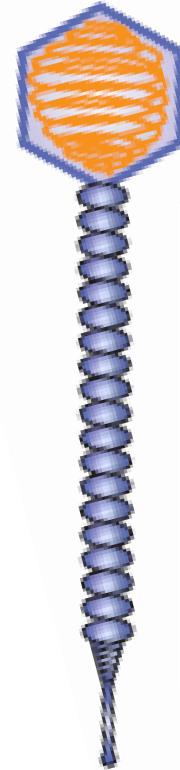
37°C, Agitation
Over night

Milieux liquide riche + ampicilline

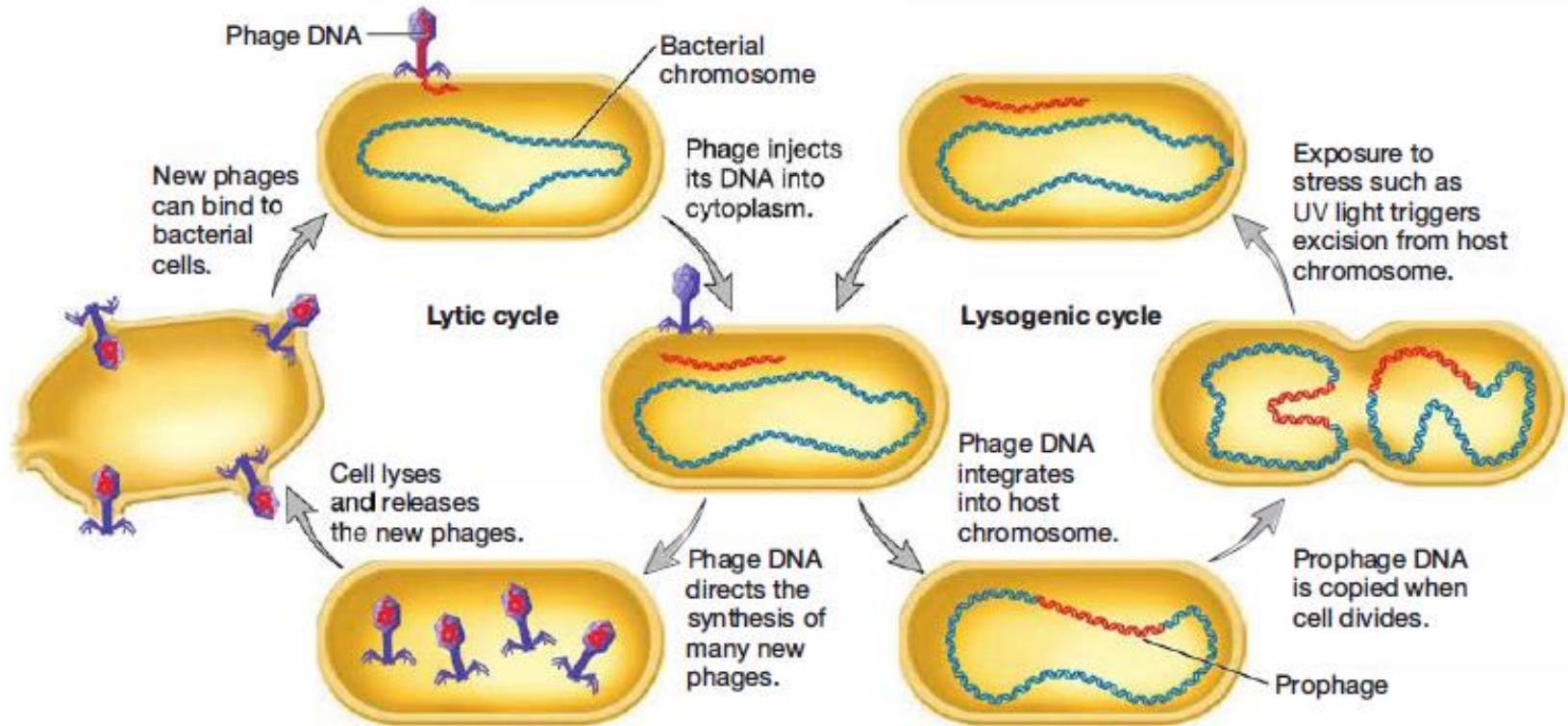


Clonage via Phage λ

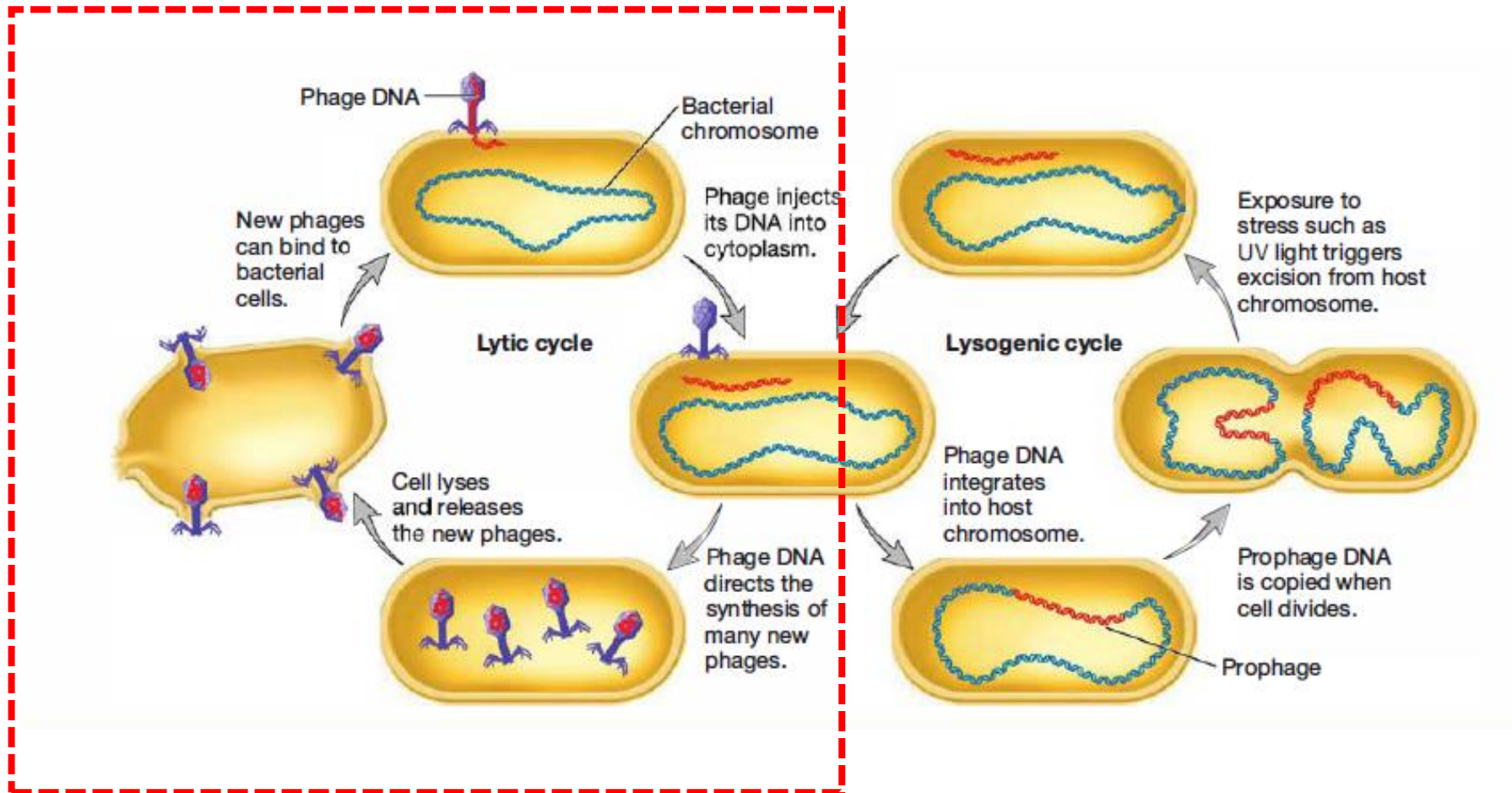
- Molécule d'ADN bicaténaire de 50 kb, dont l'organisme de réception est un phage (virus infectant les bactéries).
- La construction du vecteur recombinant est des milliers de fois plus efficace que celle d'un plasmide.
- Utilisé pour générer des bibliothèques d'ADN et peut contenir une séquence de 10 à 20 kb.



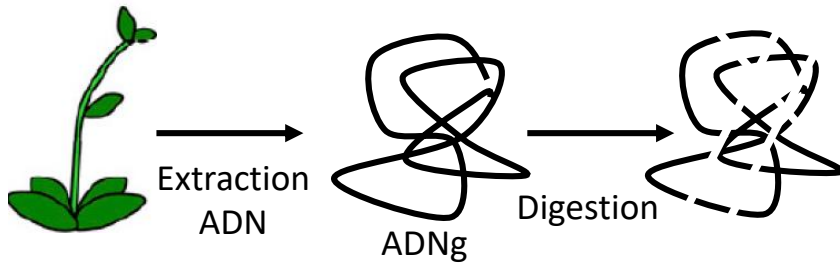
Le bactériophage λ est un phage lytique



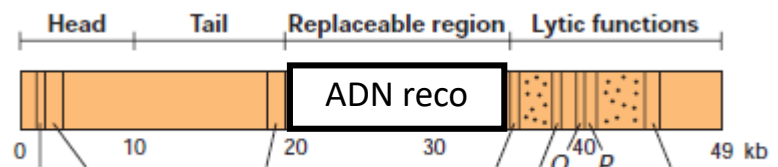
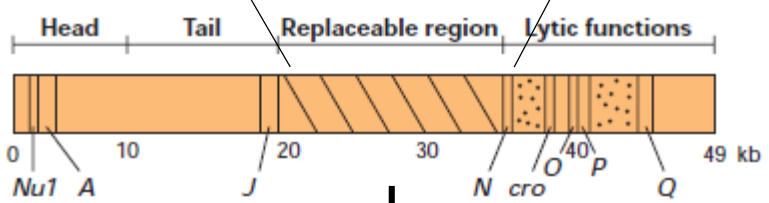
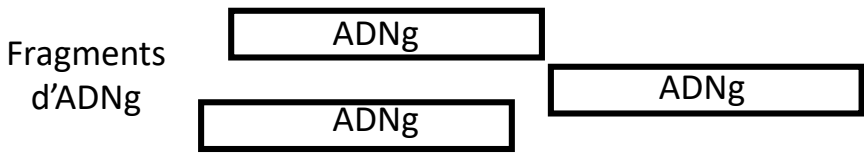
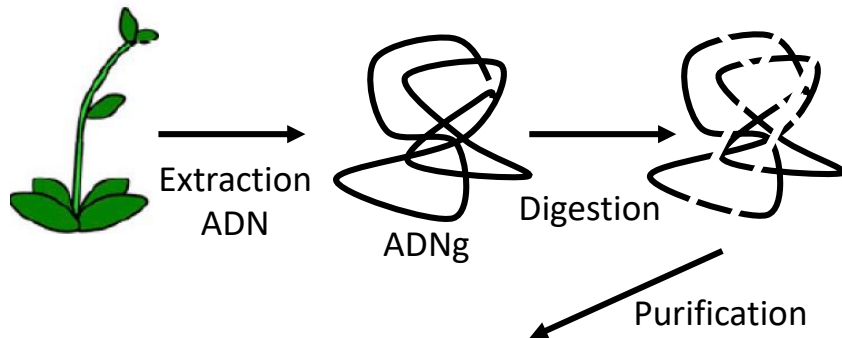
Le bactériophage λ est un phage lytique



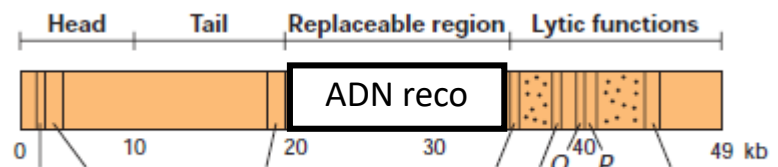
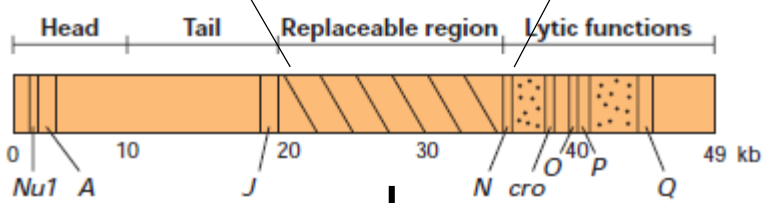
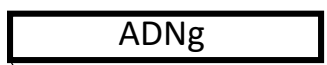
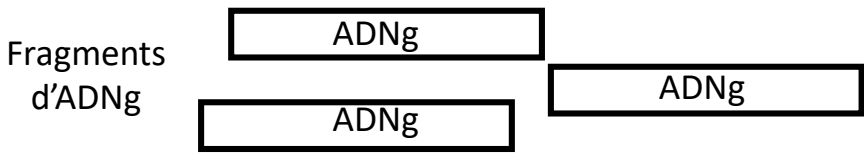
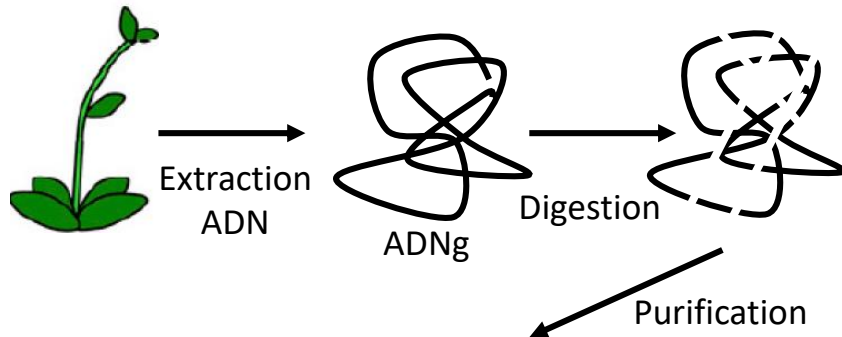
Étape de production d'un phage contenant l'insert



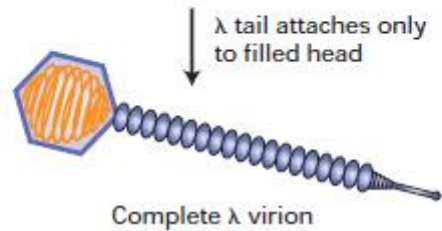
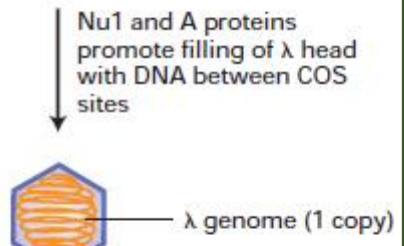
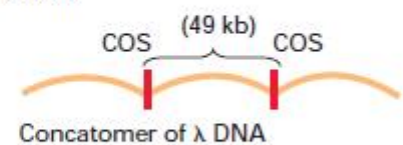
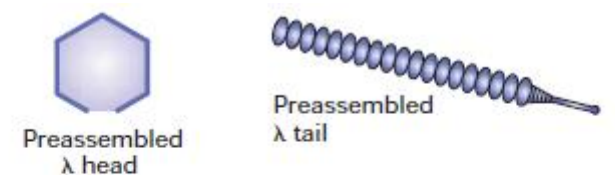
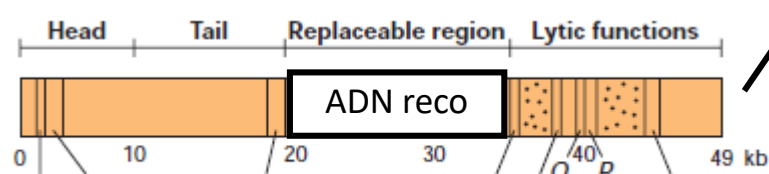
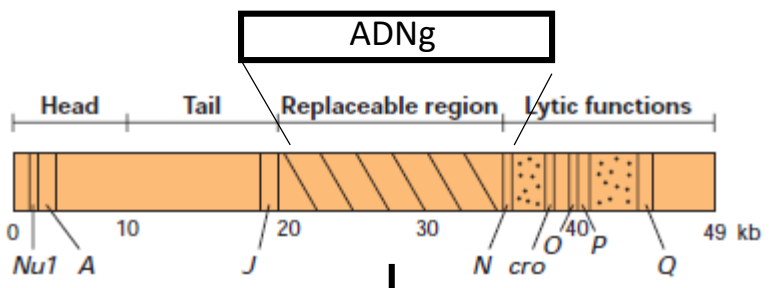
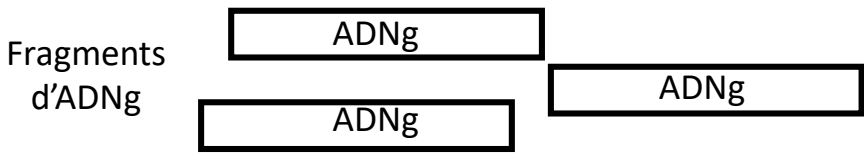
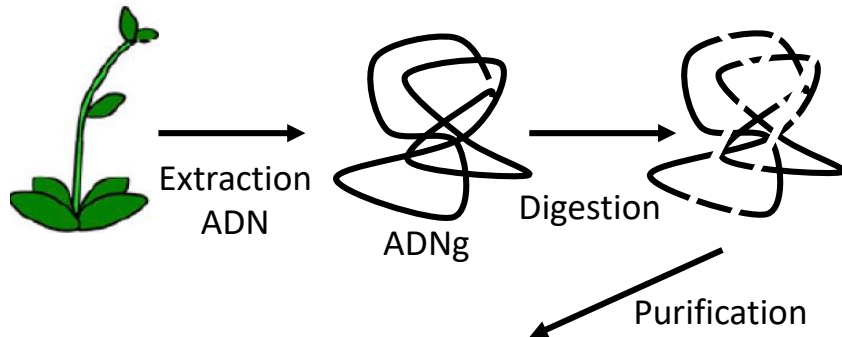
Étape de production d'un phage contenant l'insert



Étape de production d'un phage contenant l'insert

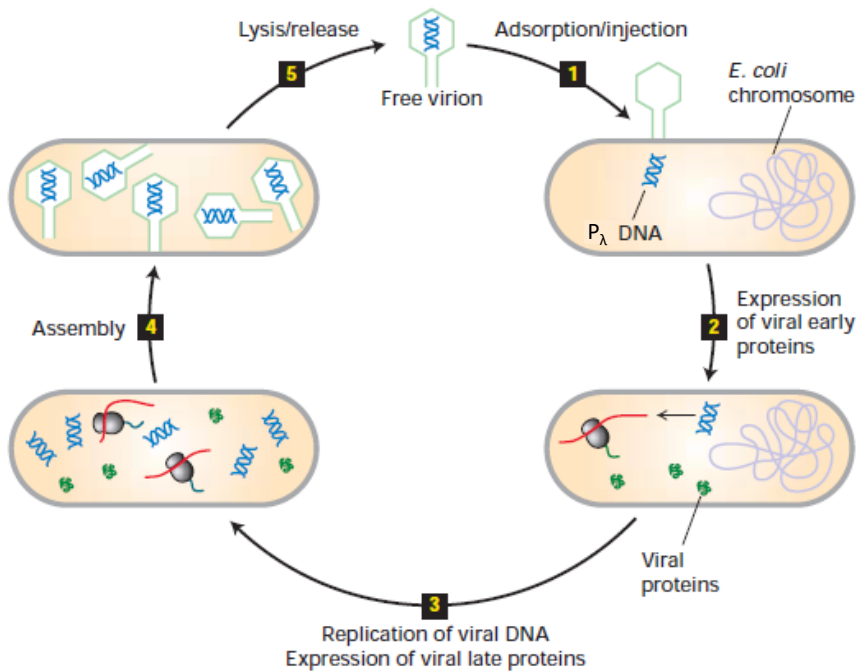
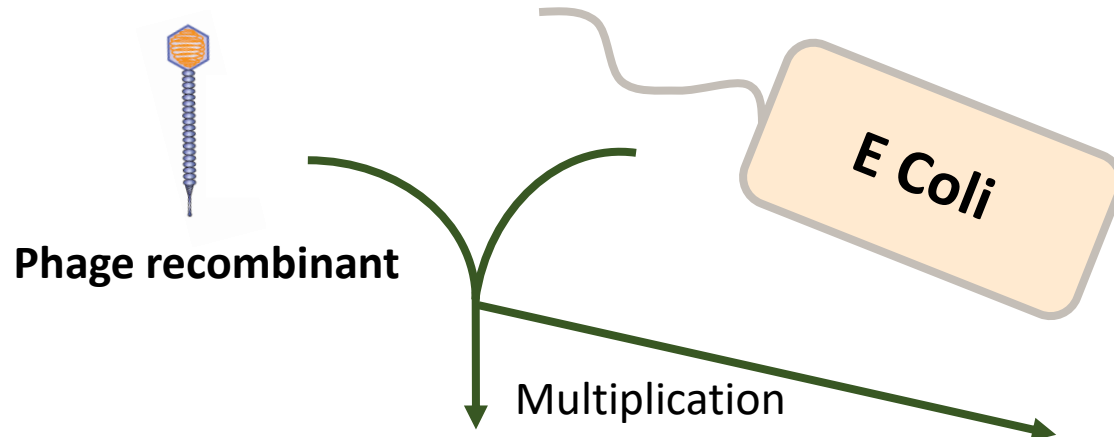


Étape de production d'un phage contenant l'insert



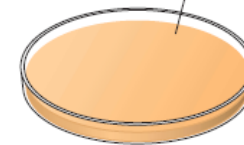
Assemblage in vitro du phage

Étape de production d'un phage contenant l'insert

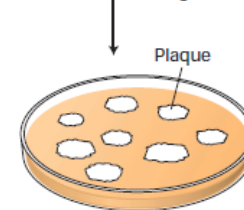


(a)

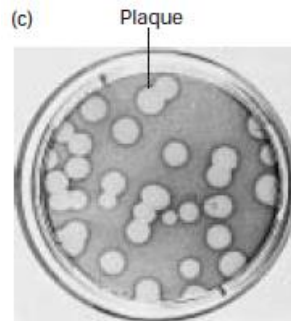
Confluent layer of susceptible host cells growing on surface of a plate



Add dilute suspension containing virus; after infection, cover layer of cells with agar; incubate (c)



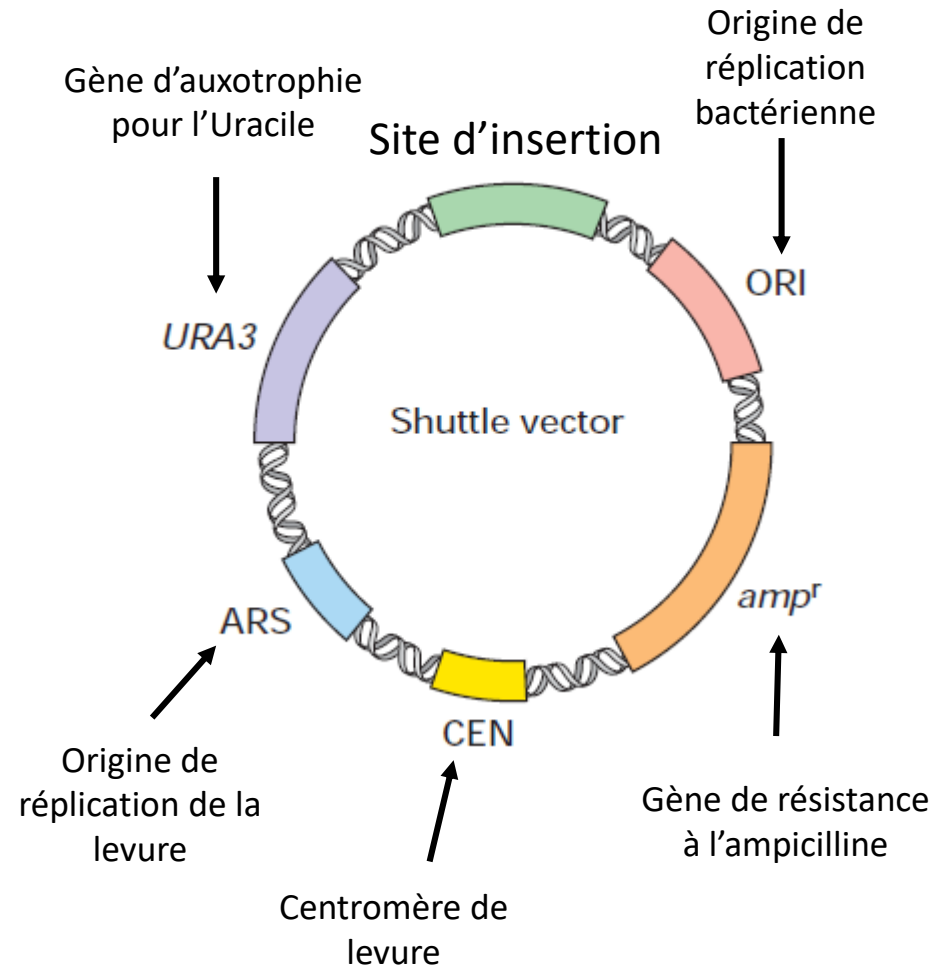
Each plaque represents cell lysis initiated by one viral particle (agar restricts movement so that virus can infect only contiguous cells)



Plaque

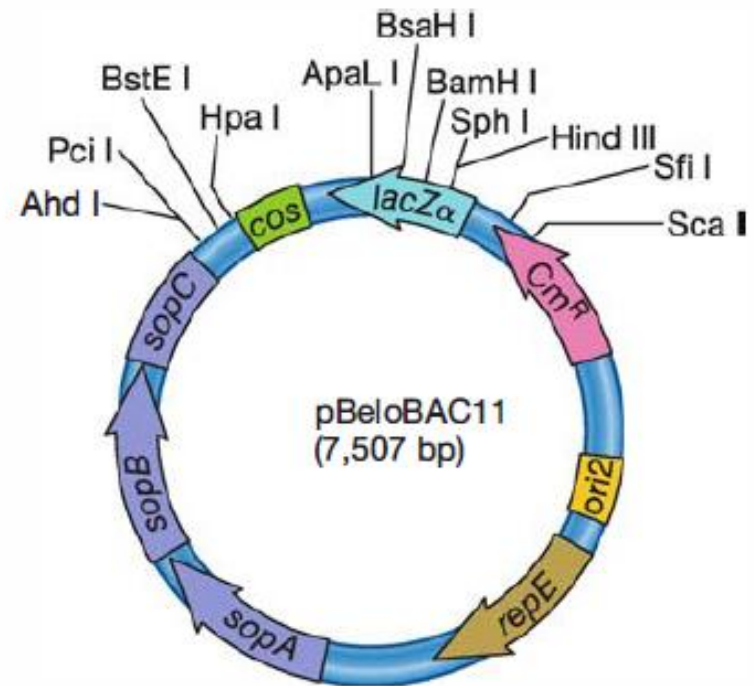
Clonage via Yeast Artificial Kromosomes (YAK)

- Molécule d'ADN bicaténaire dont l'organisme de réception est une levure
- Utilisé pour générer des bibliothèques d'ADNg et peut contenir une séquence de 200 à 1000kb.
- La méthode de clonage suit le même principe que le clonage dans un plasmide.
- Le vecteur peut être amplifié rapidement dans E Coli ou sauvegarder dans la levure



Clonage via Bacterial Artificial Kromosomes (BAK)

- Chromosome modifié de bactérie
- Utilisé pour générer des bibliothèques d'ADNg et peut contenir une séquence de 100 à 500kb.
- La méthode de clonage suit le même principe que le clonage dans un plasmide.
- Le vecteur peut être conservé dans des bactérie, des levures et des phage mais se conserve plus long temps dans les bactéries.

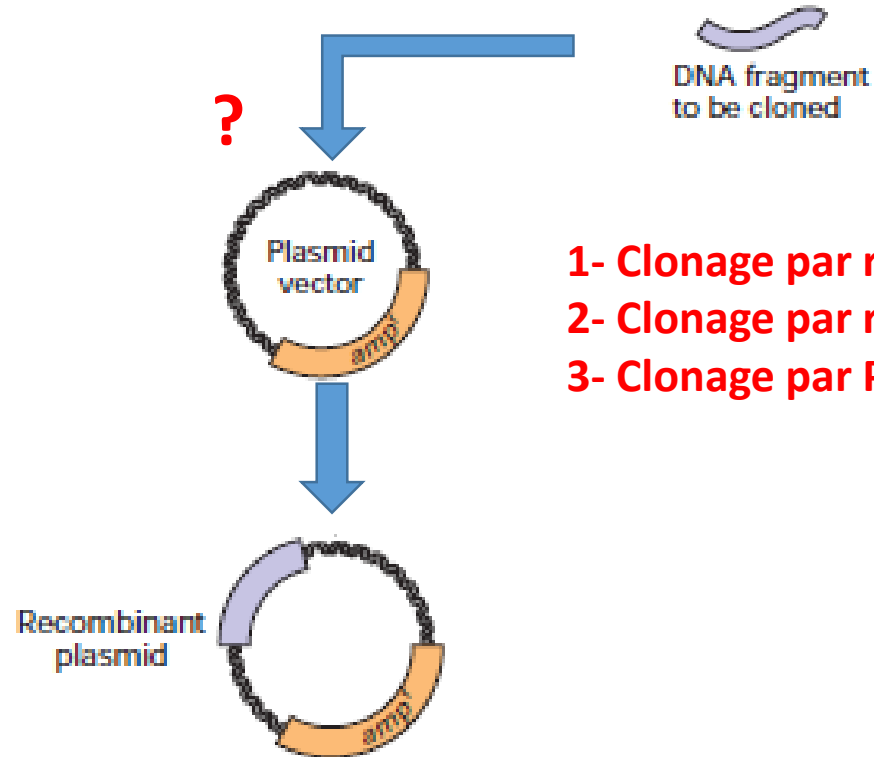


Les différents types de vecteurs et leurs caractéristiques associés

Table 17.3 Recombinant DNA Cloning Vectors

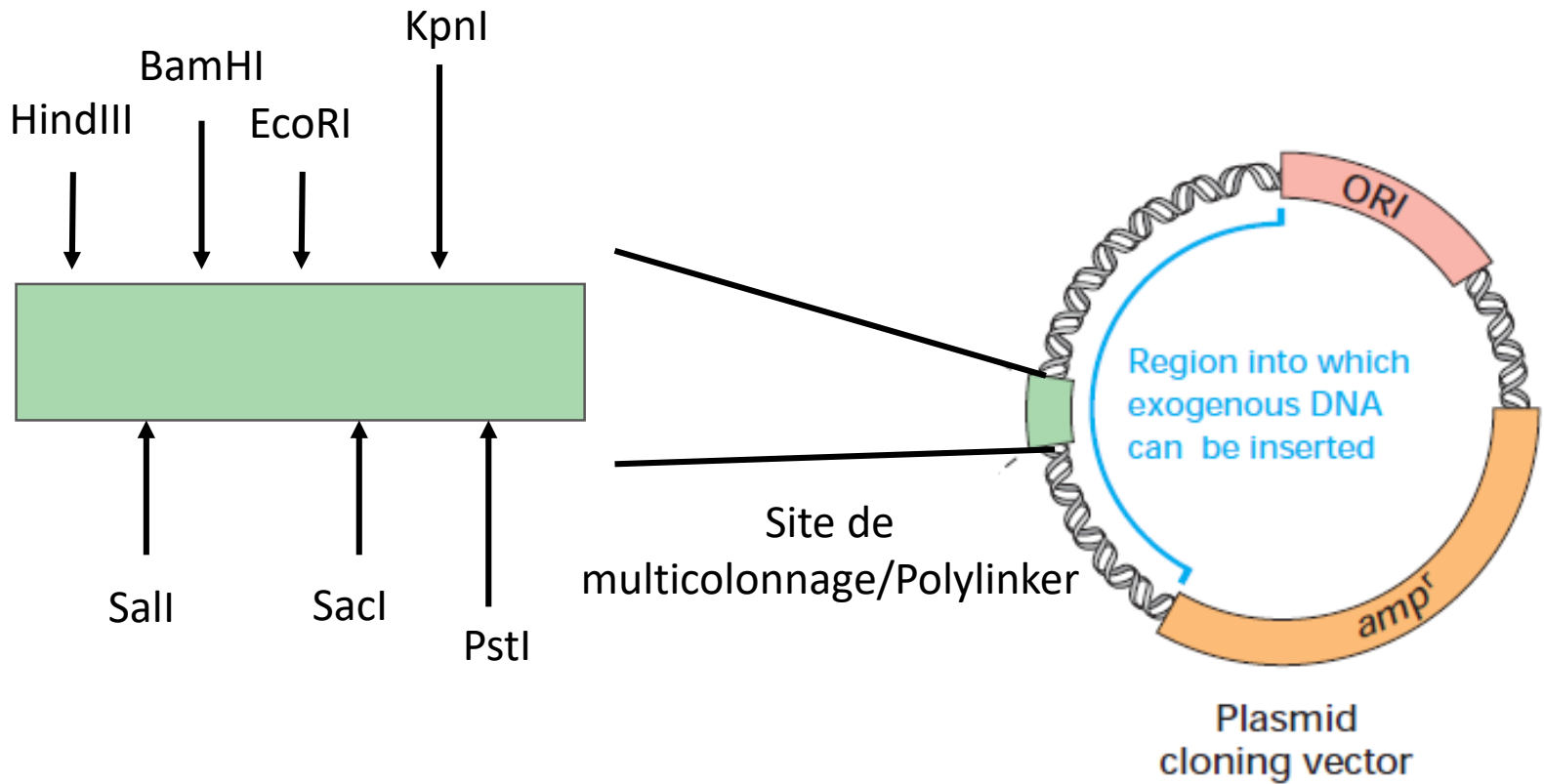
Vector	Insert Size (kb, 1 kb = 1,000 bp)	Example	Characteristics
Plasmid	<20 kb	pBR322, pUC19	Replicates independently of microbial chromosome so many copies may be maintained in a single cell
Bacteriophage	9–25 kb	λ 1059, λ gt11, M13mp18, EMBL3	Packaged into lambda phage particles; single-stranded DNA viruses such as M13 have been modified (e.g., M13mp18) to generate either double- or single-stranded DNA in the host
Cosmids	30–47 kb	pJC720, pSupercos	Can be packaged into lambda phage particles for efficient introduction into bacteria, then replicates as a plasmid
BACs (bacterial artificial chromosomes)	75–300 kb	pBAC108L	Modified F plasmid that can carry large DNA inserts; very stable within the cell
YACs (yeast artificial chromosomes)	100–1,000 kb	pYAC	Can carry largest DNA inserts; replicates in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Les stratégies de clonage d'insert dans les vecteurs

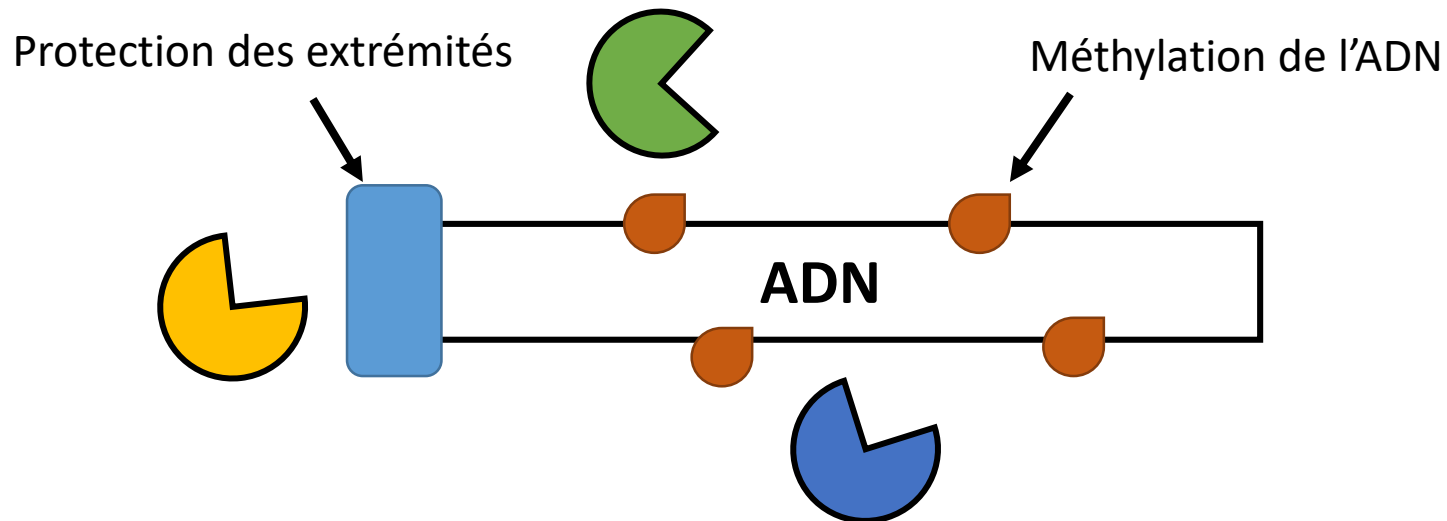
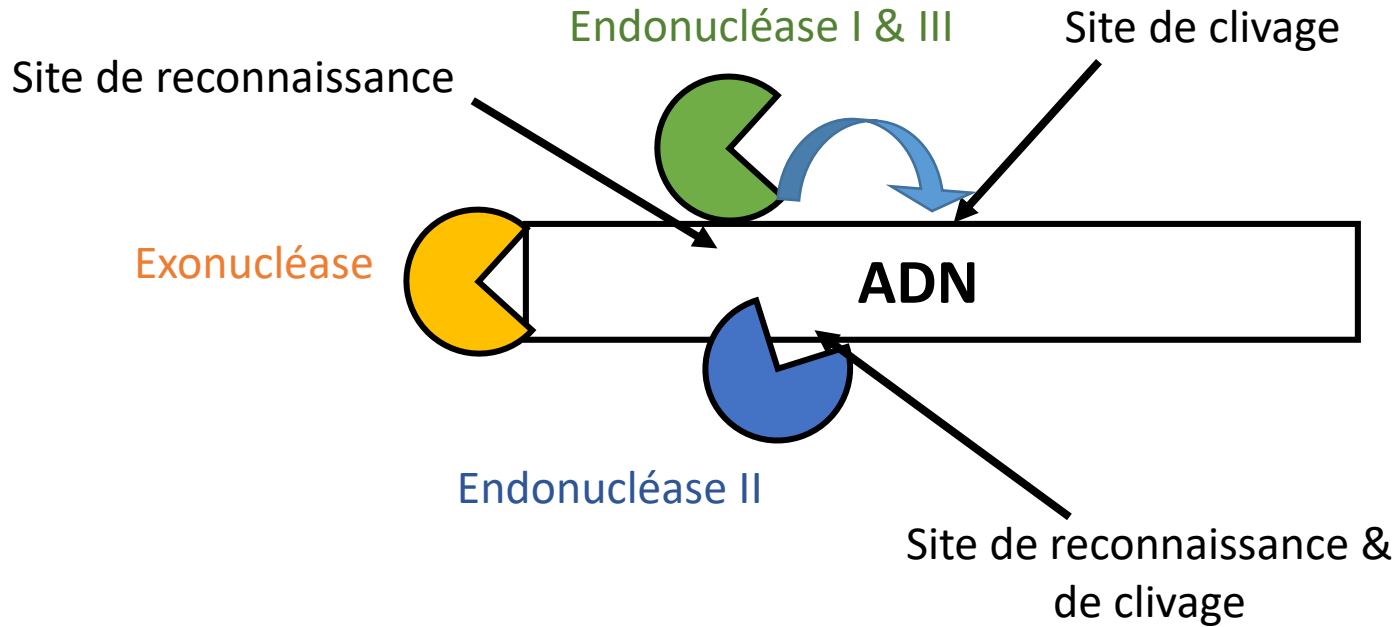


- 1- Clonage par restriction-ligation
- 2- Clonage par recombinaison
- 3- Clonage par PCR (Lic-PCR)

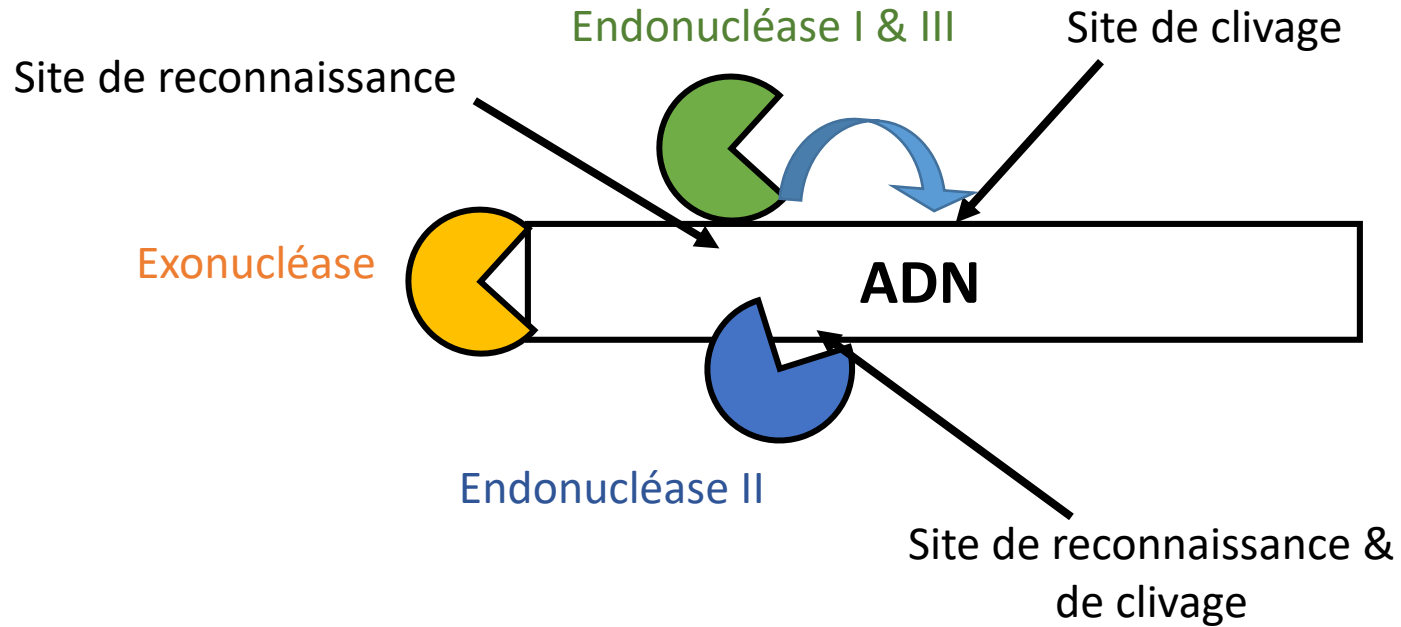
Clonage par restriction-ligation



Les enzymes de restriction

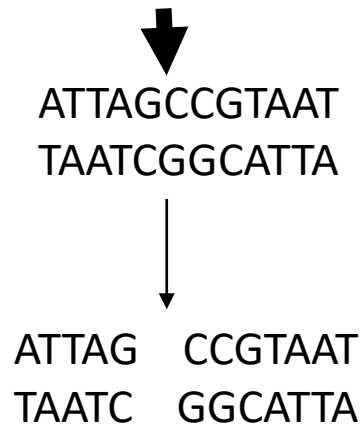


Les enzymes de restriction

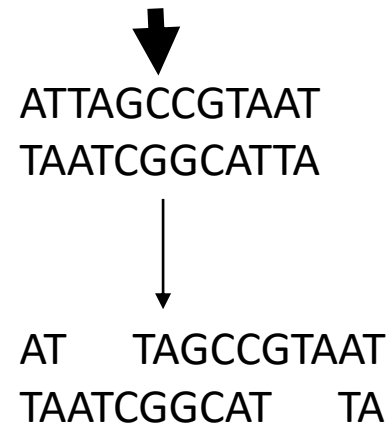


Les enzymes de restriction

Les enzymes reconnaissent des séquences palindromiques, selon l'enzyme peuvent libérer des extrémités à bout franc ou à bout cohésifs



Bout franc



Bout cohésif

Les enzymes de restriction

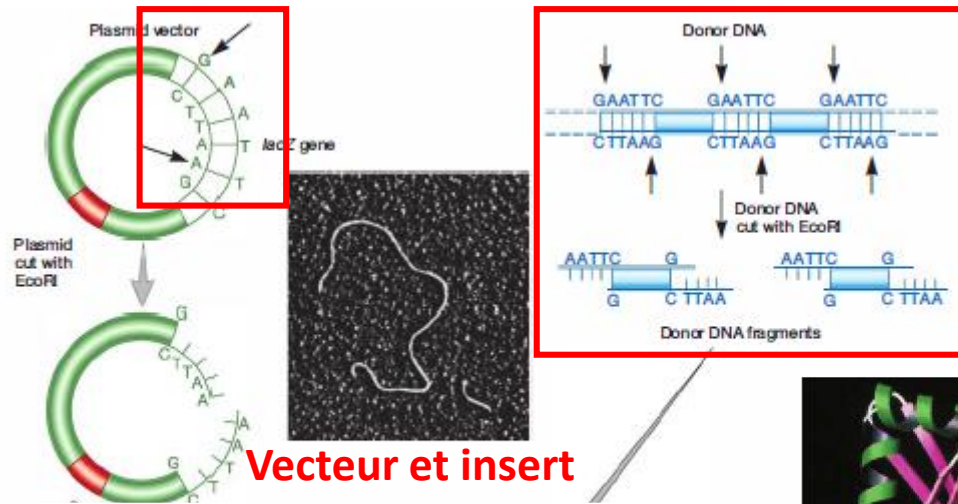
Enzyme	Source Microorganism	Recognition Site*	Ends Produced
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	↓ -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- ↑	Sticky
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	↓ -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- ↑	Sticky
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	↓ -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- ↑	Sticky
KpnI	<i>Klebsiella pneumonia</i>	↓ -G-G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G-G- ↑	Sticky
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	↓ -C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C- ↑	Sticky
SacI	<i>Streptomyces achromogenes</i>	↓ -G-A-G-C-T-C- -C-T-C-G-A-G- ↑	Sticky
SaI	<i>Streptomyces albus</i>	↓ -G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G- ↑	Sticky
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	↓ -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- ↑	Blunt
SphI	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	↓ -G-C-A-T-G-C- -C-G-T-A-C-G- ↑	Sticky
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	↓ -T-C-T-A-G-A- -A-G-A-T-C-T- ↑	Sticky

Bout cohésif

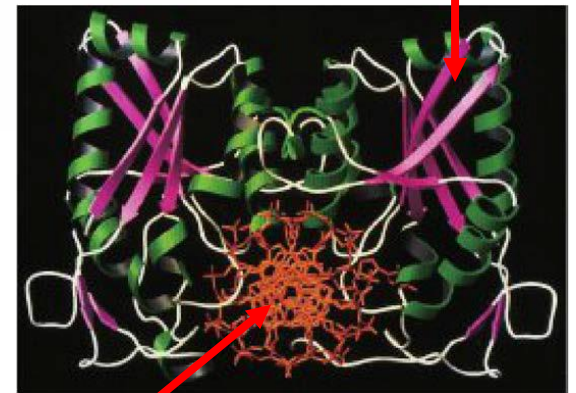
Bout franc

La restriction et la ligation

Restriction du vecteur et de l'insert



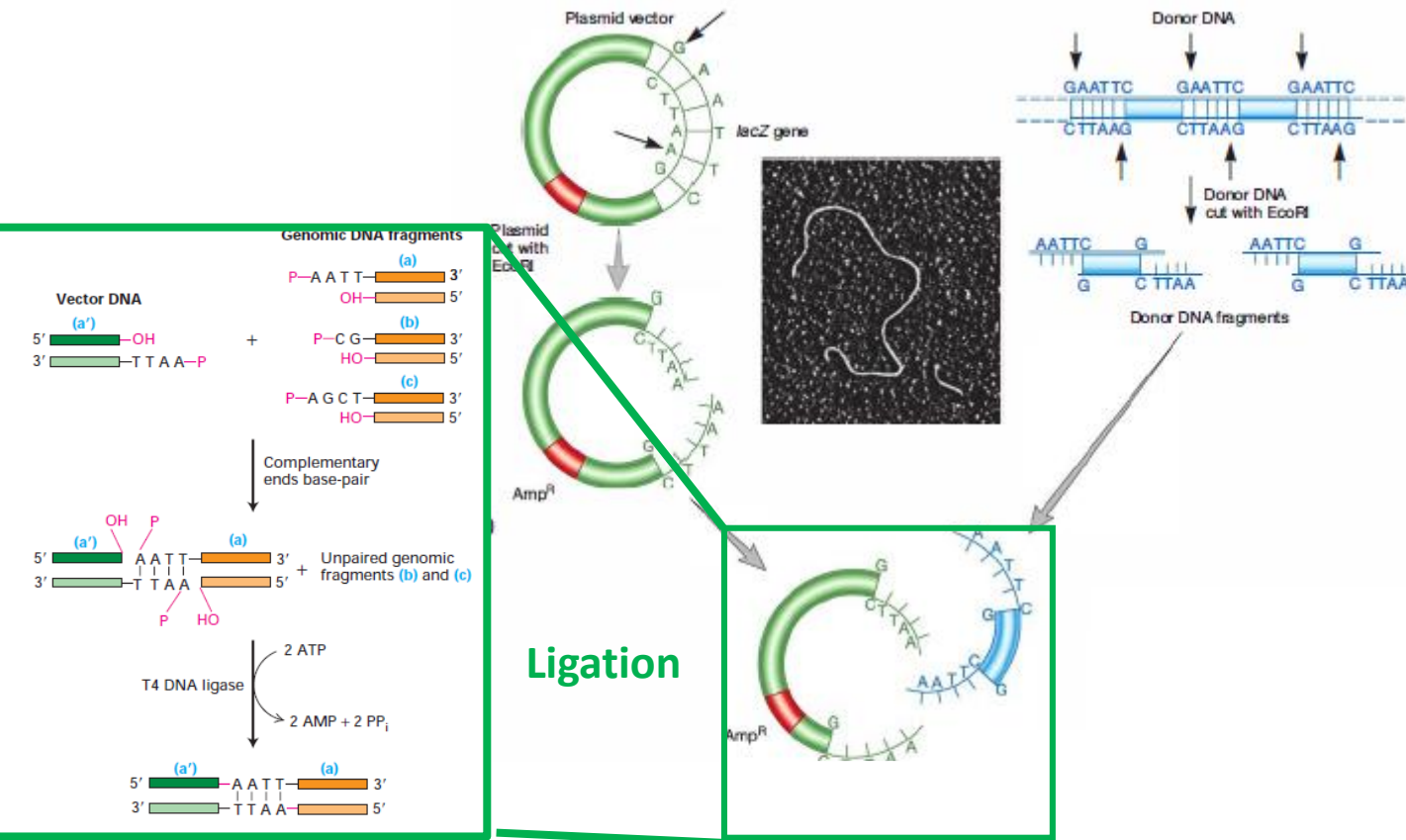
Endonucléase



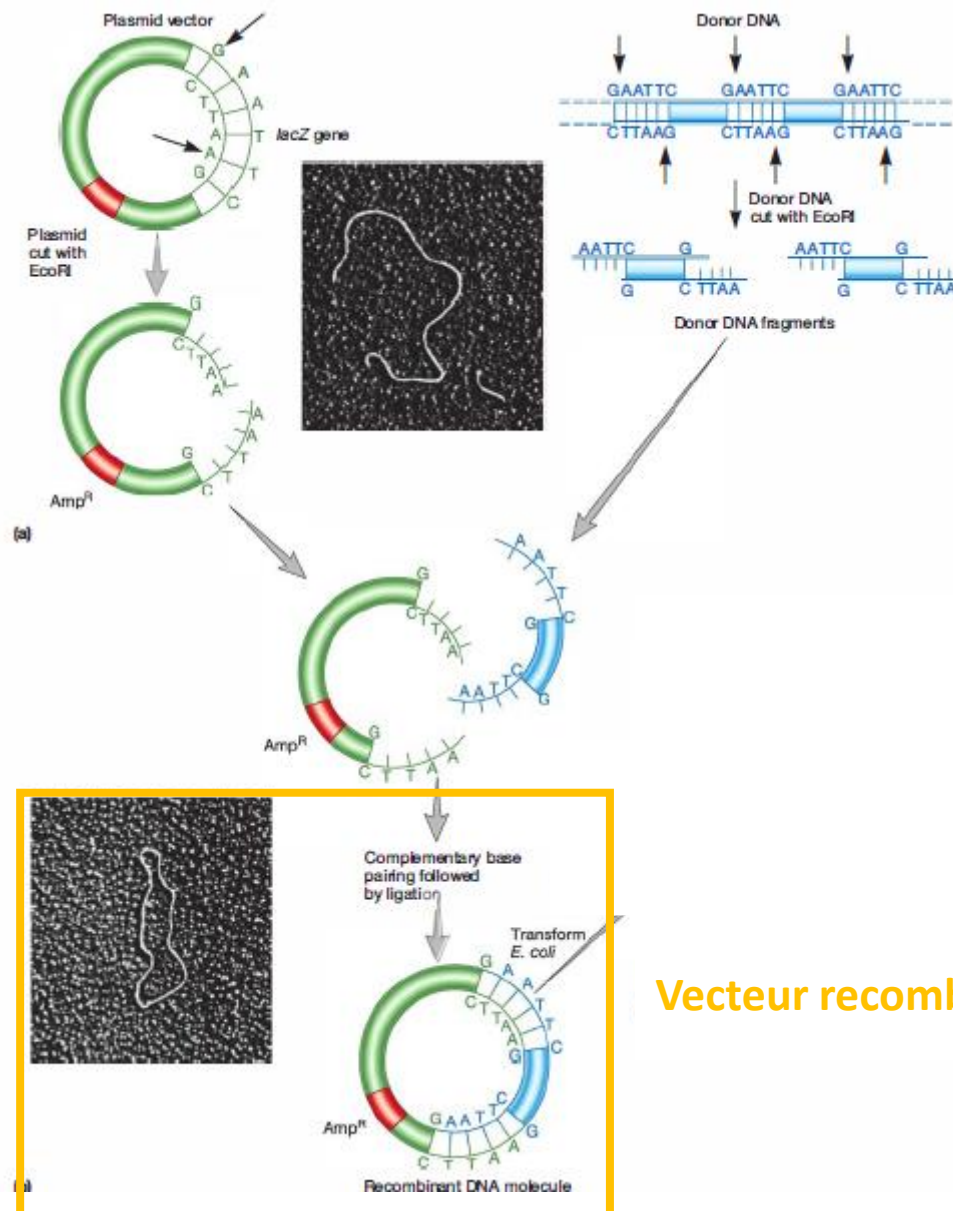
ADN

Mécanisme d'action de l'endonucléase

La restriction et la ligation

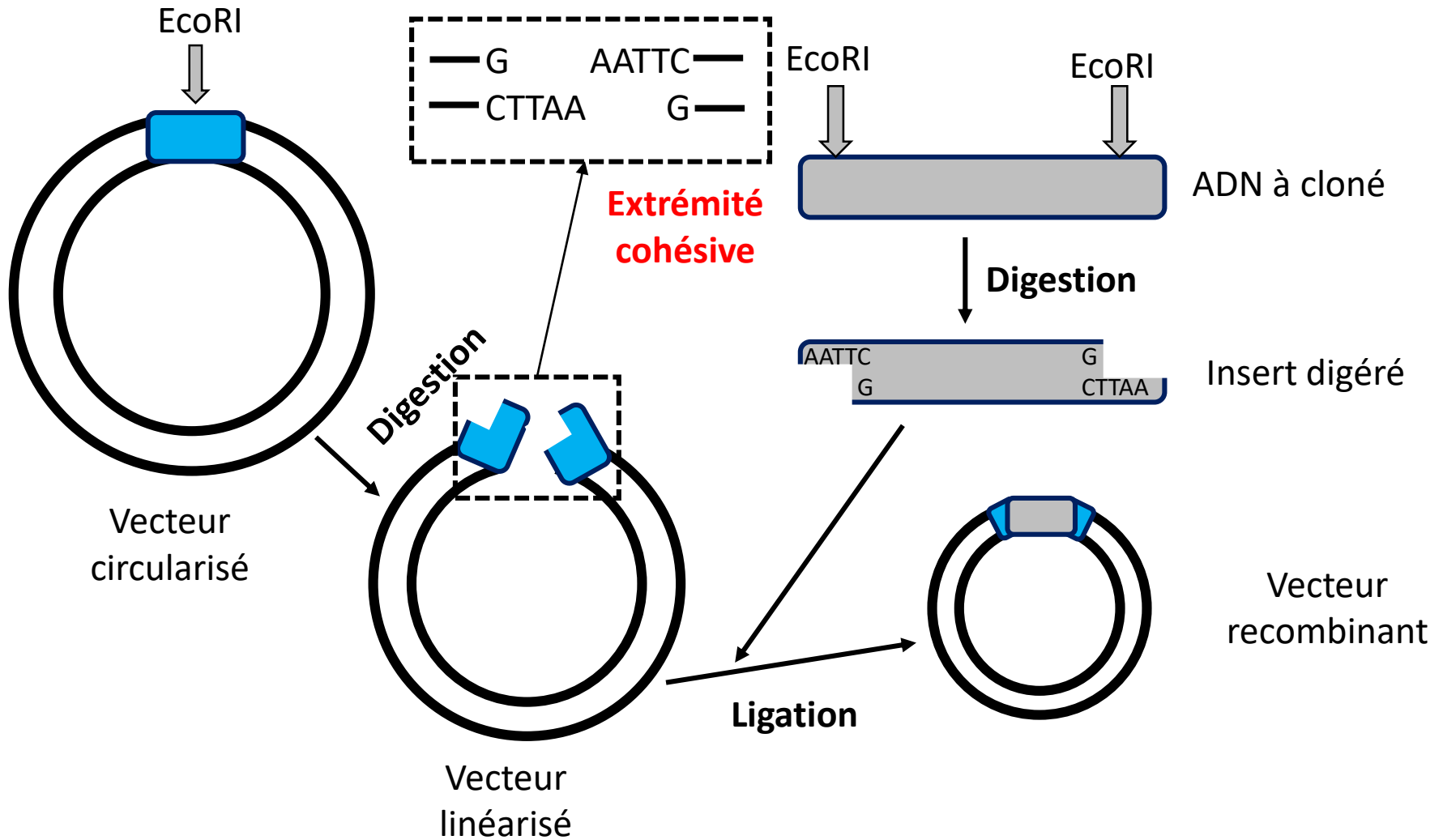


La restriction et la ligation

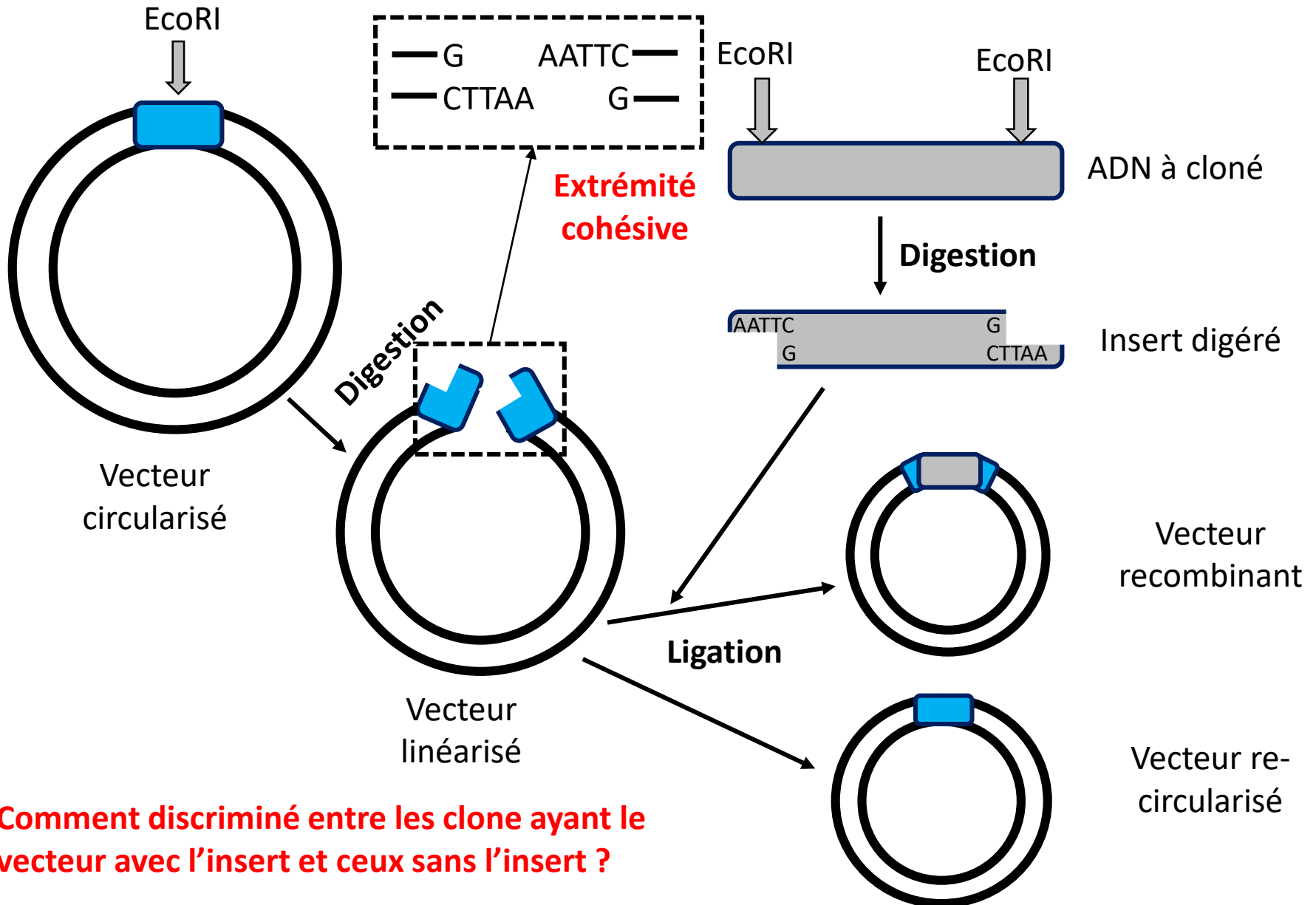


Vecteur recombinant re-circularisé

Stratégie de clonage par restriction-ligation

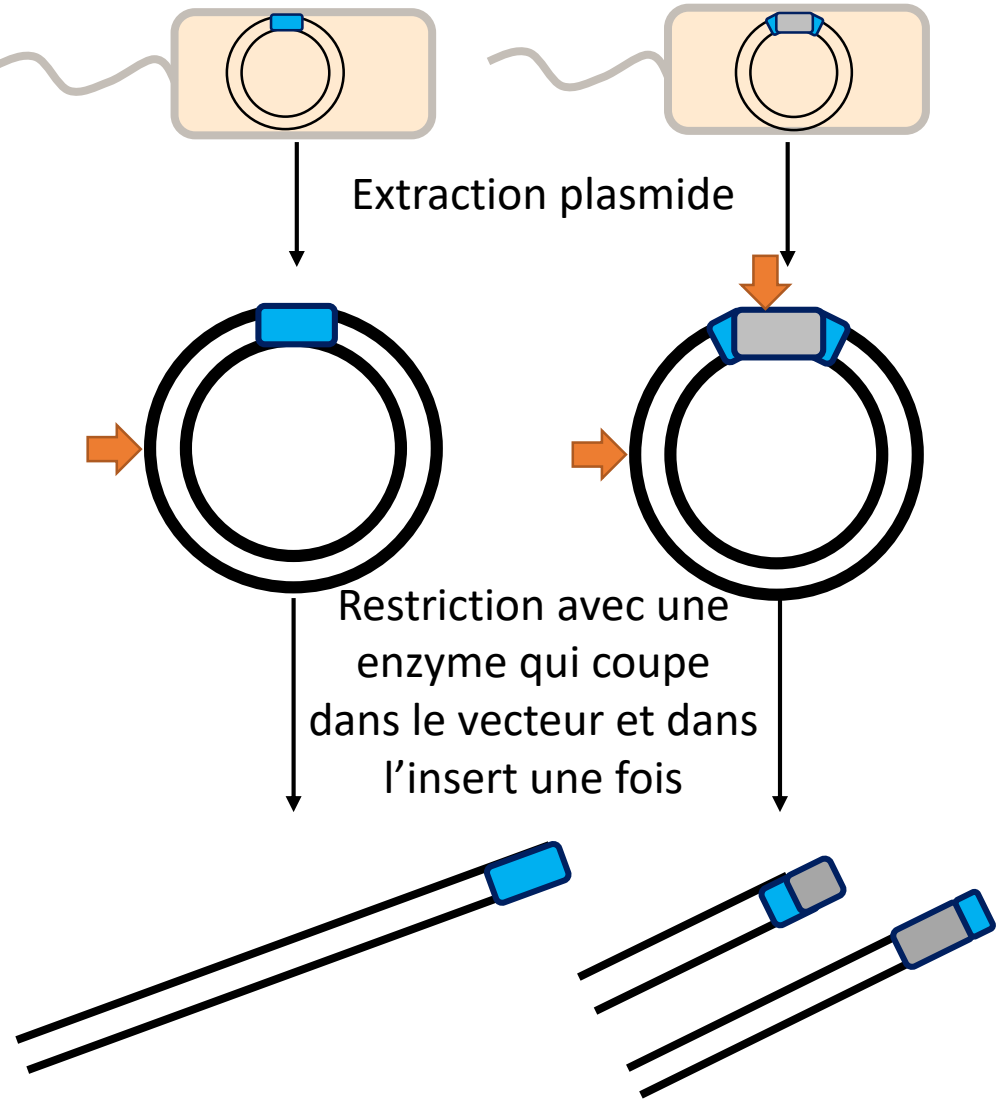


Stratégie de clonage par restriction-ligation

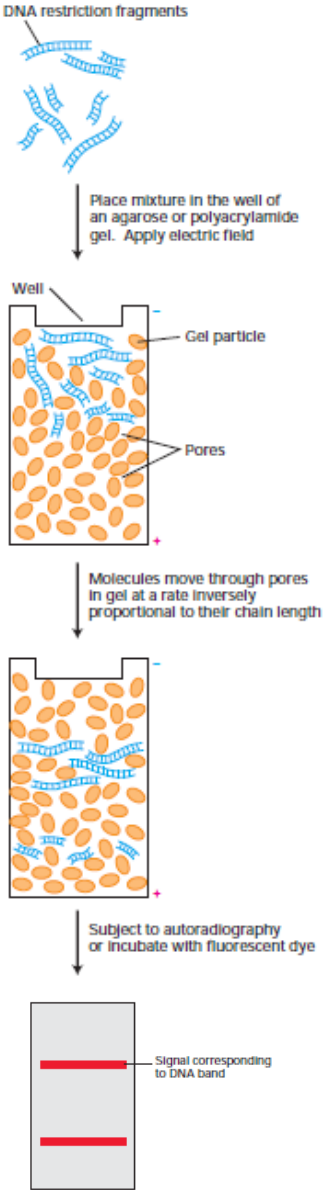
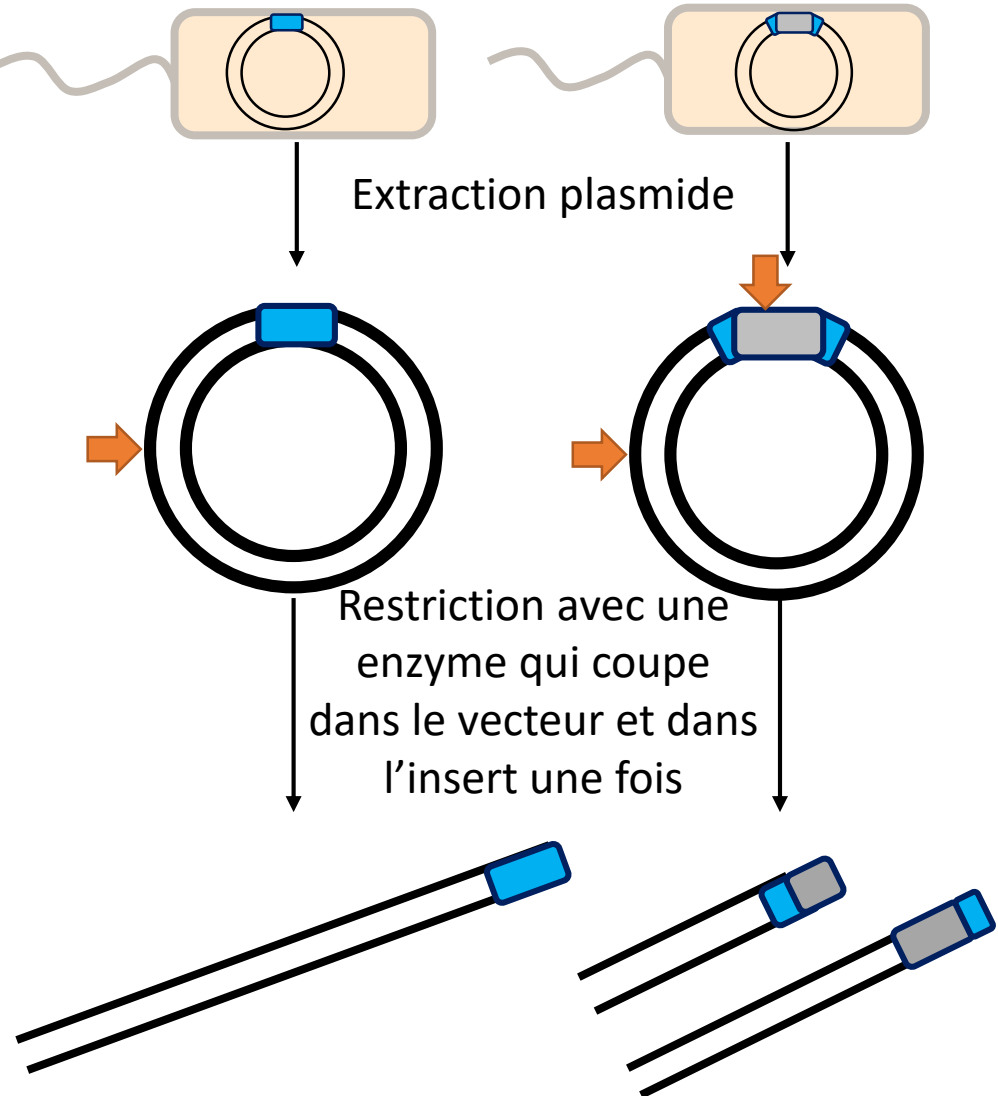


Comment discriminer entre les clones ayant le vecteur avec l'insert et ceux sans l'insert ?

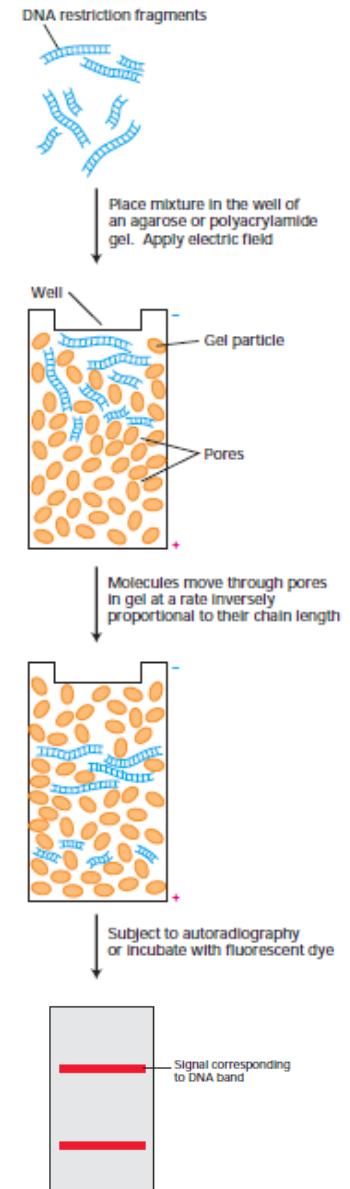
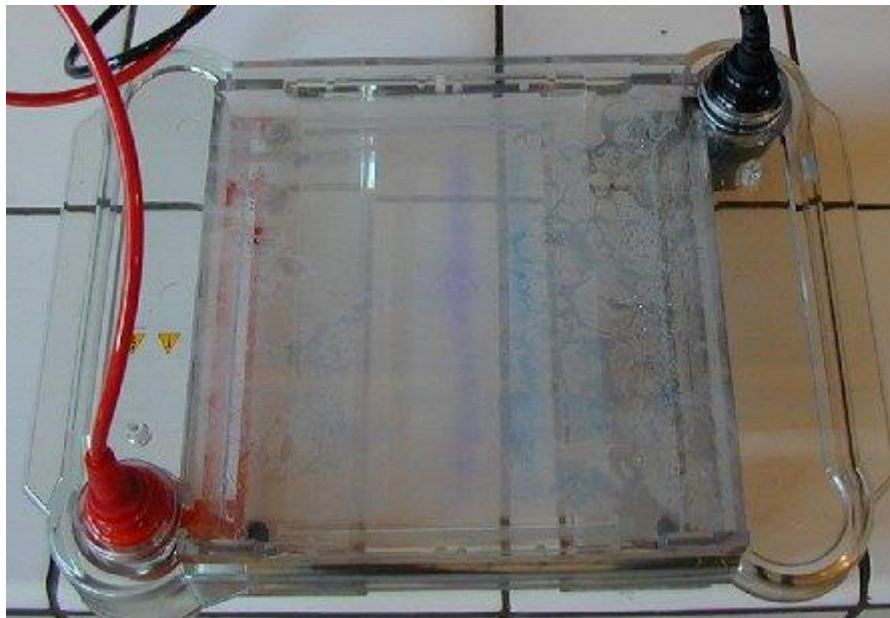
Cas 1 : re-digestion des plasmide recombinant



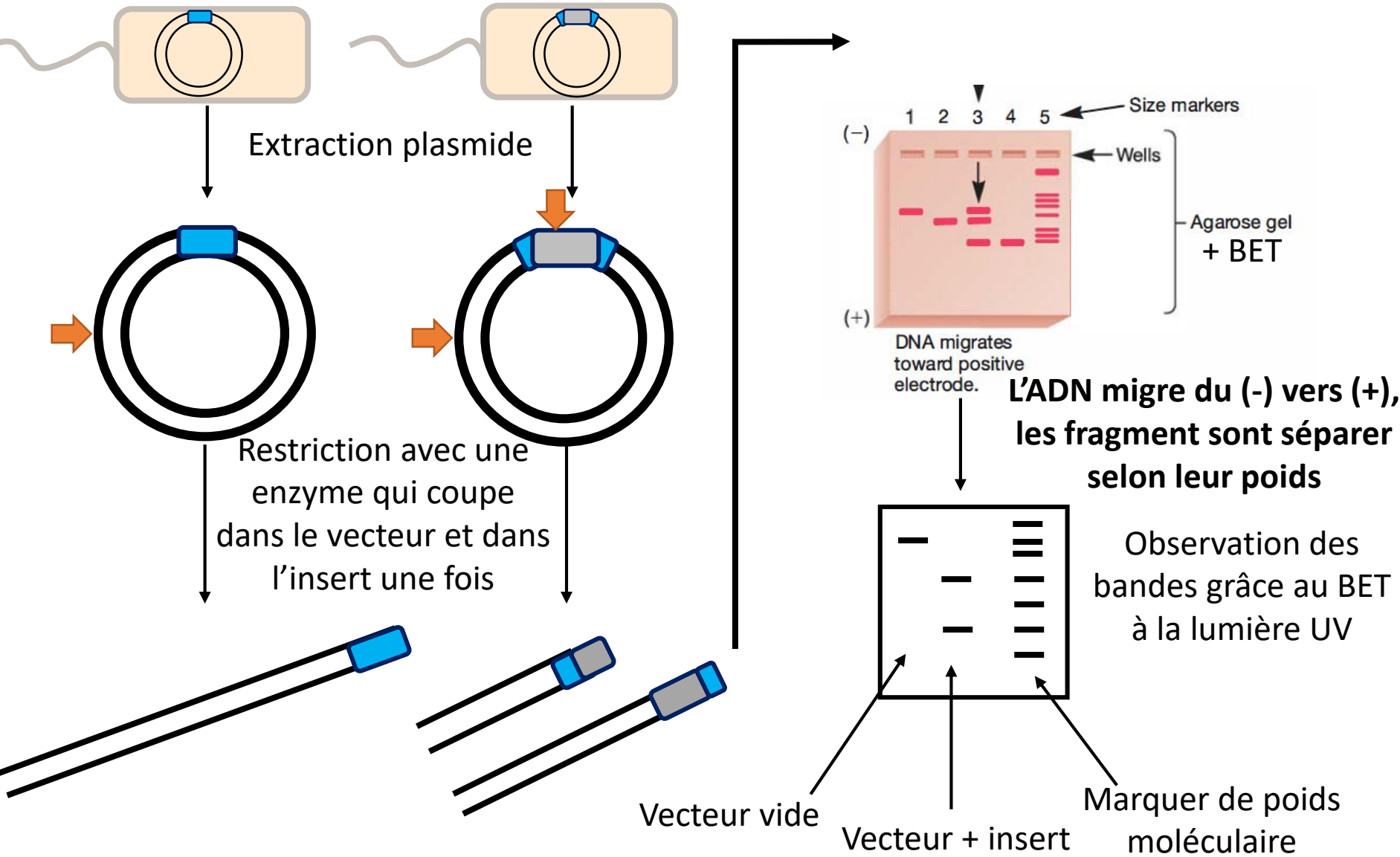
Cas 1 : re-digestion des plasmide recombinant



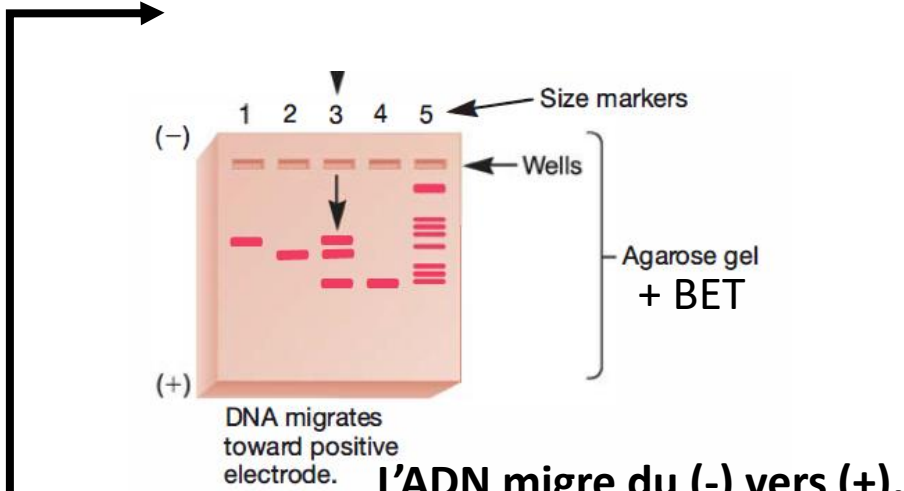
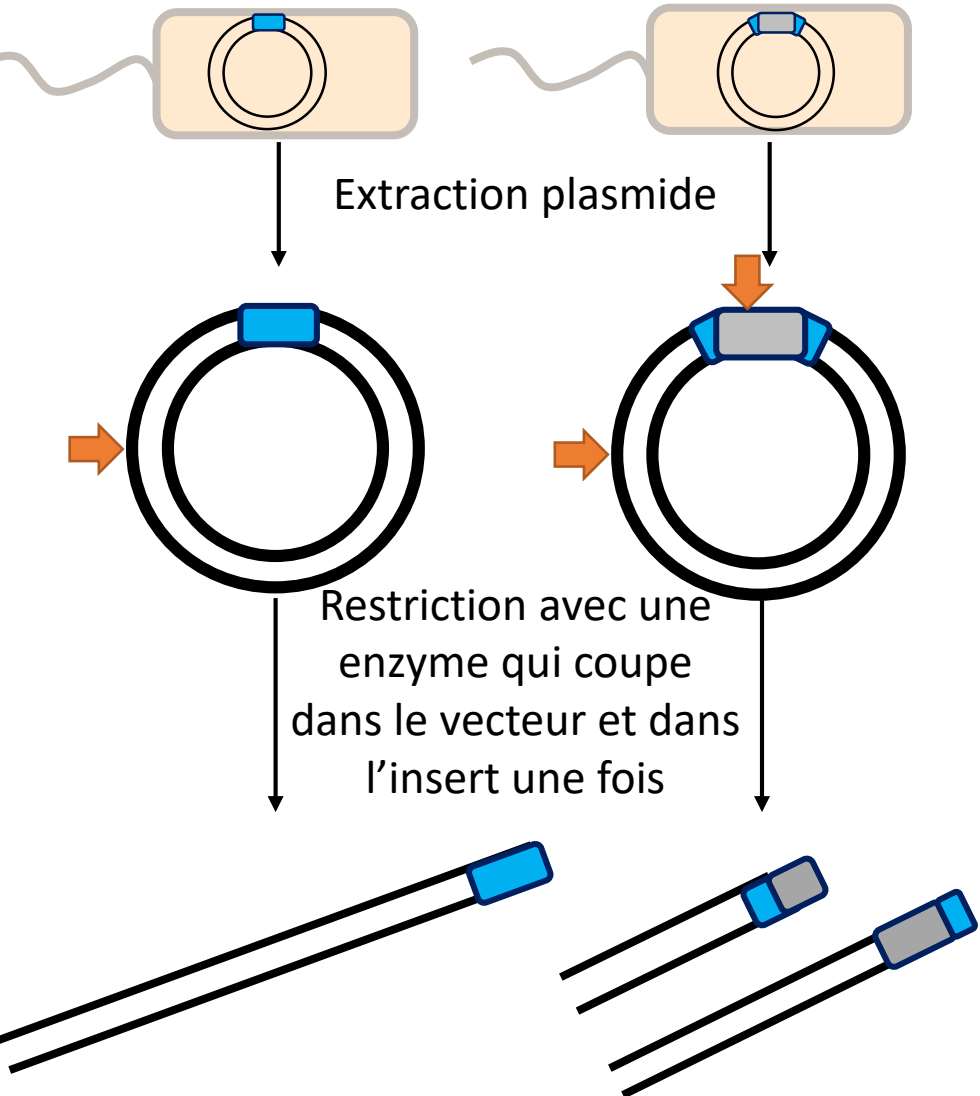
Cas 1 : re-digestion des plasmide recombinant



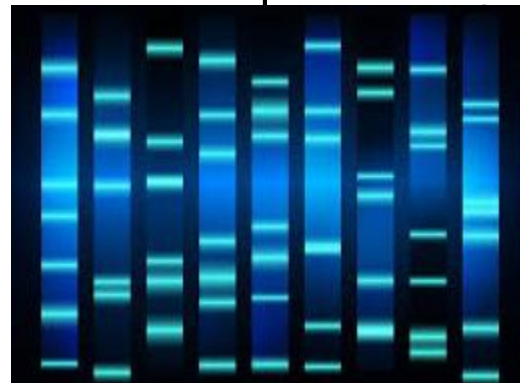
Cas 1 : re-digestion des plasmide recombinant



Cas 1 : re-digestion des plasmide recombinant



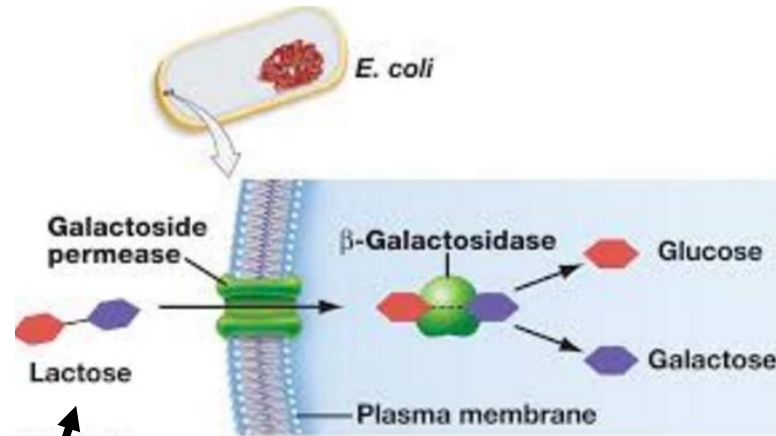
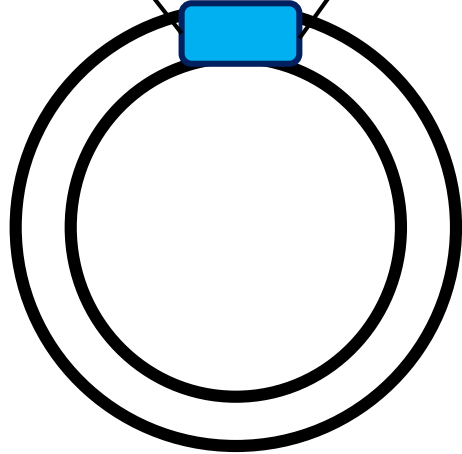
L'ADN migre du (-) vers (+), les fragment sont séparer en leur poids



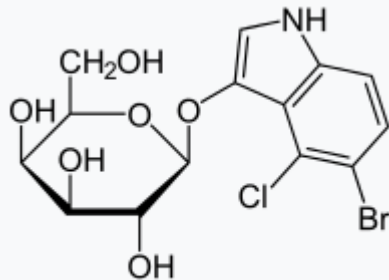
Cas 2 : criblage bleu blanc

LacZ

Le polylinker contient
une séquence qui
code pour l'enzyme
LacZ



En changeant le lactose par X-gal

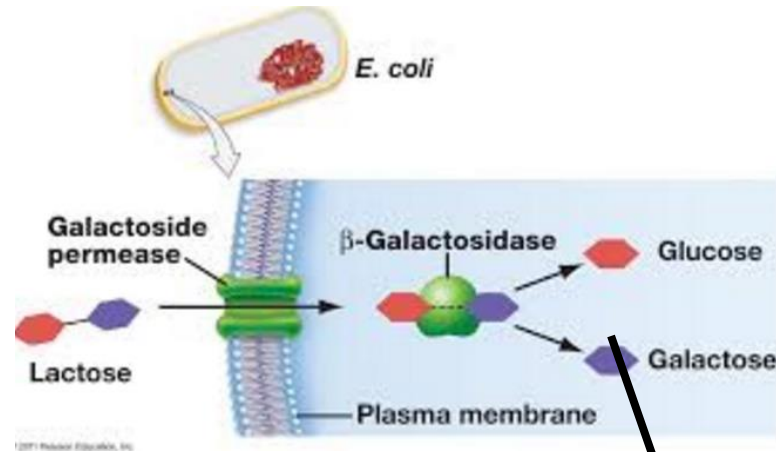
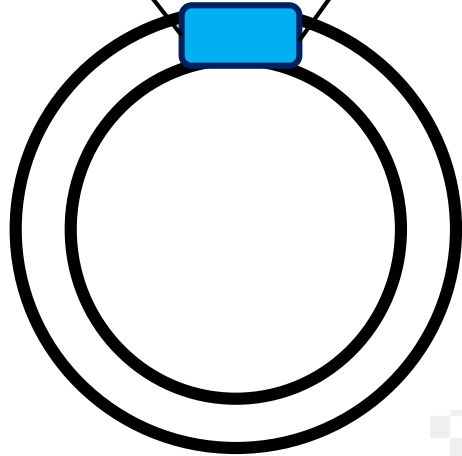


Structure du X-gal.

Cas 2 : criblage bleu blanc

LacZ

Le polylinker contient
une séquence qui
code pour l'enzyme
LacZ



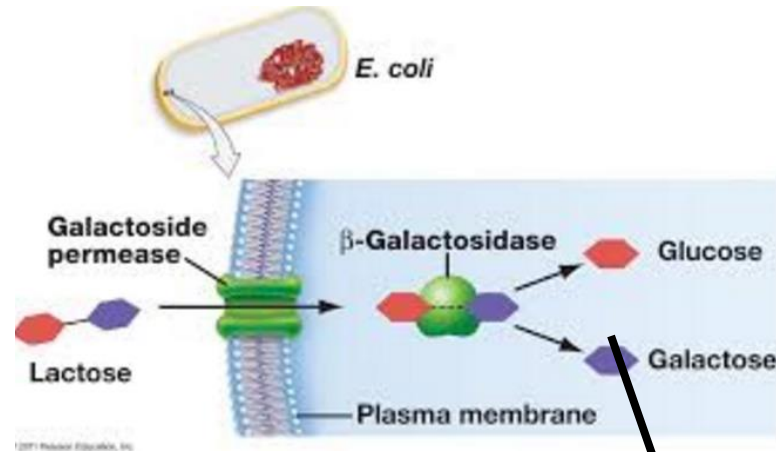
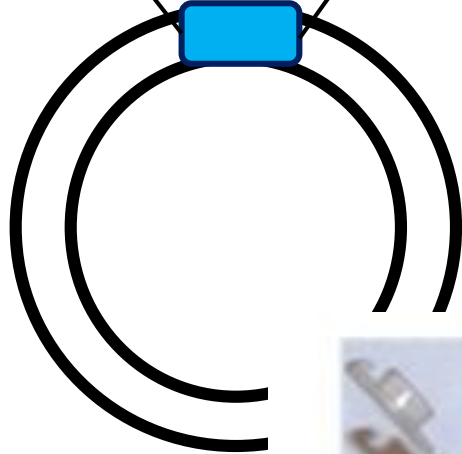
La Galactosidase hydrolyse le X-gal et donne un produit coloré



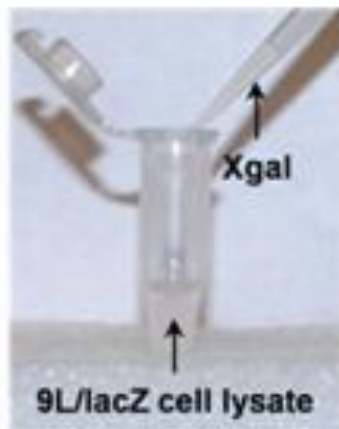
Cas 2 : criblage bleu blanc

LacZ

Le polylinker contient
une séquence qui
code pour l'enzyme
LacZ



La Galactosidase hydrolyse le X-gal et donne un produit coloré



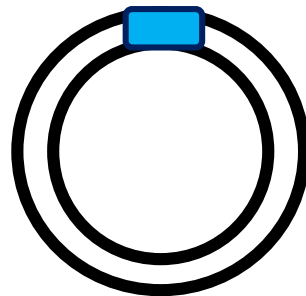
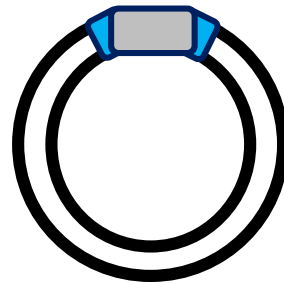
24 hours



Cas 2 : criblage bleu blanc

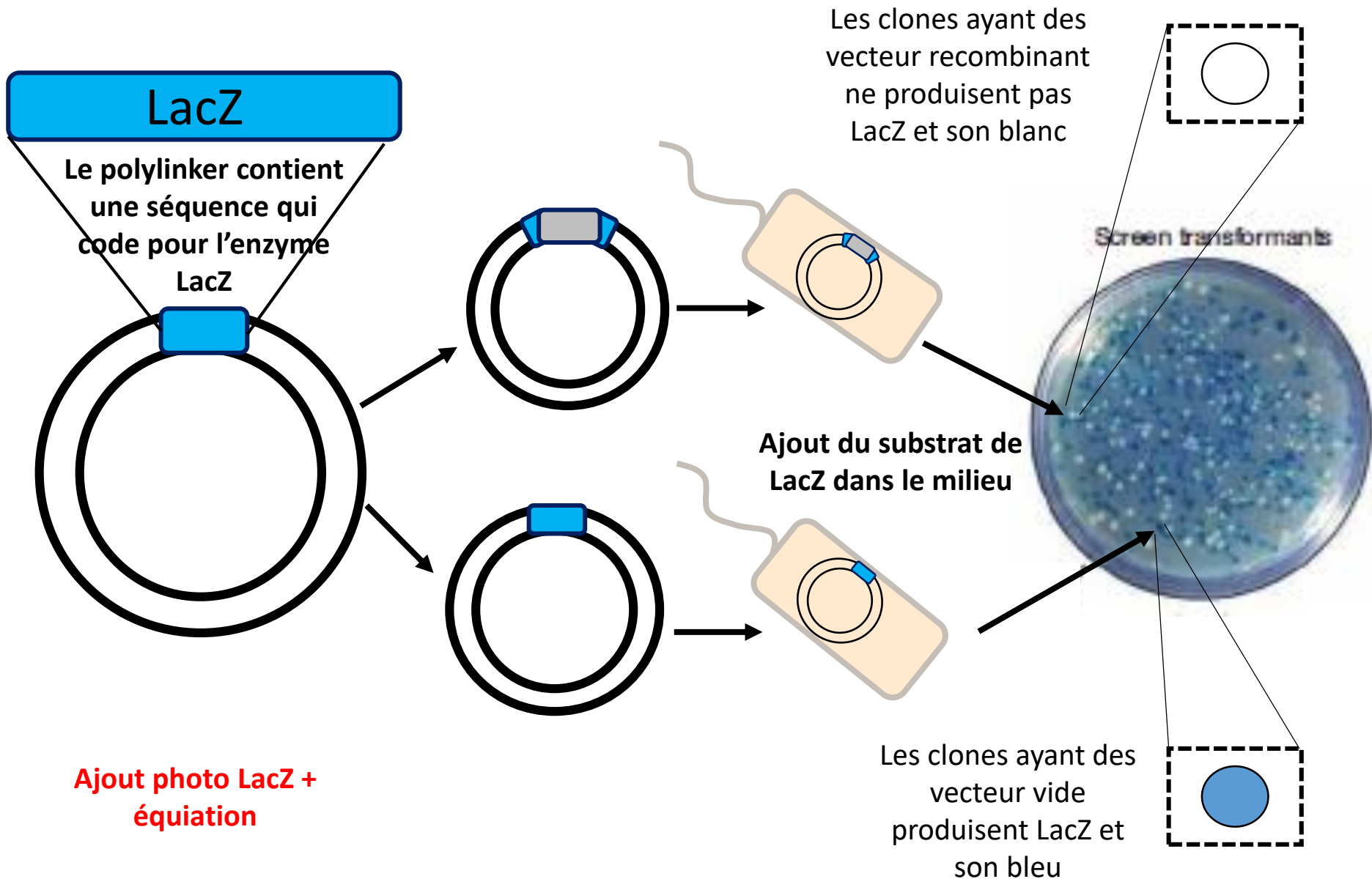
LacZ

Le polylinker contient
une séquence qui
code pour l'enzyme
LacZ

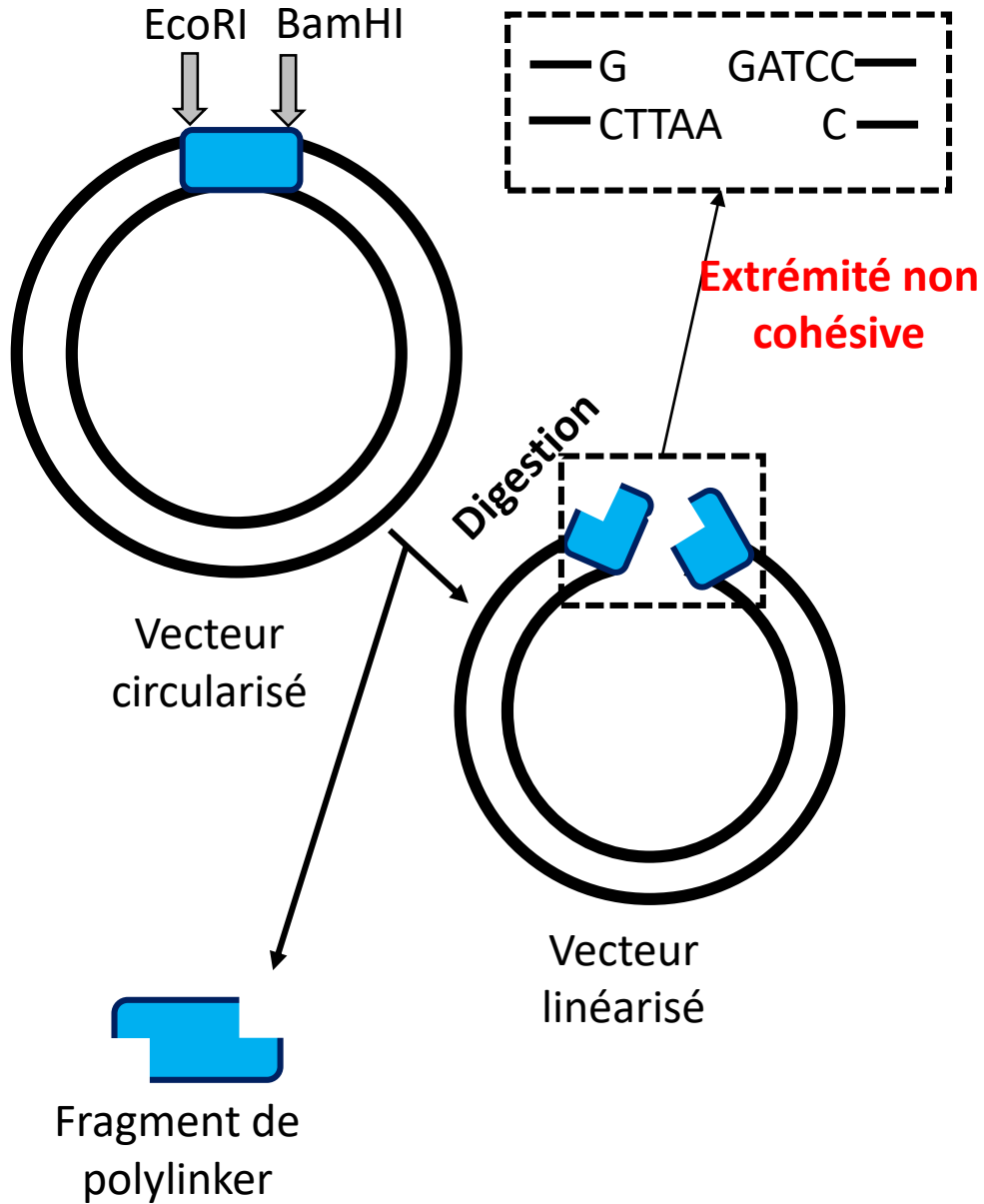


Ajout photo LacZ +
équation

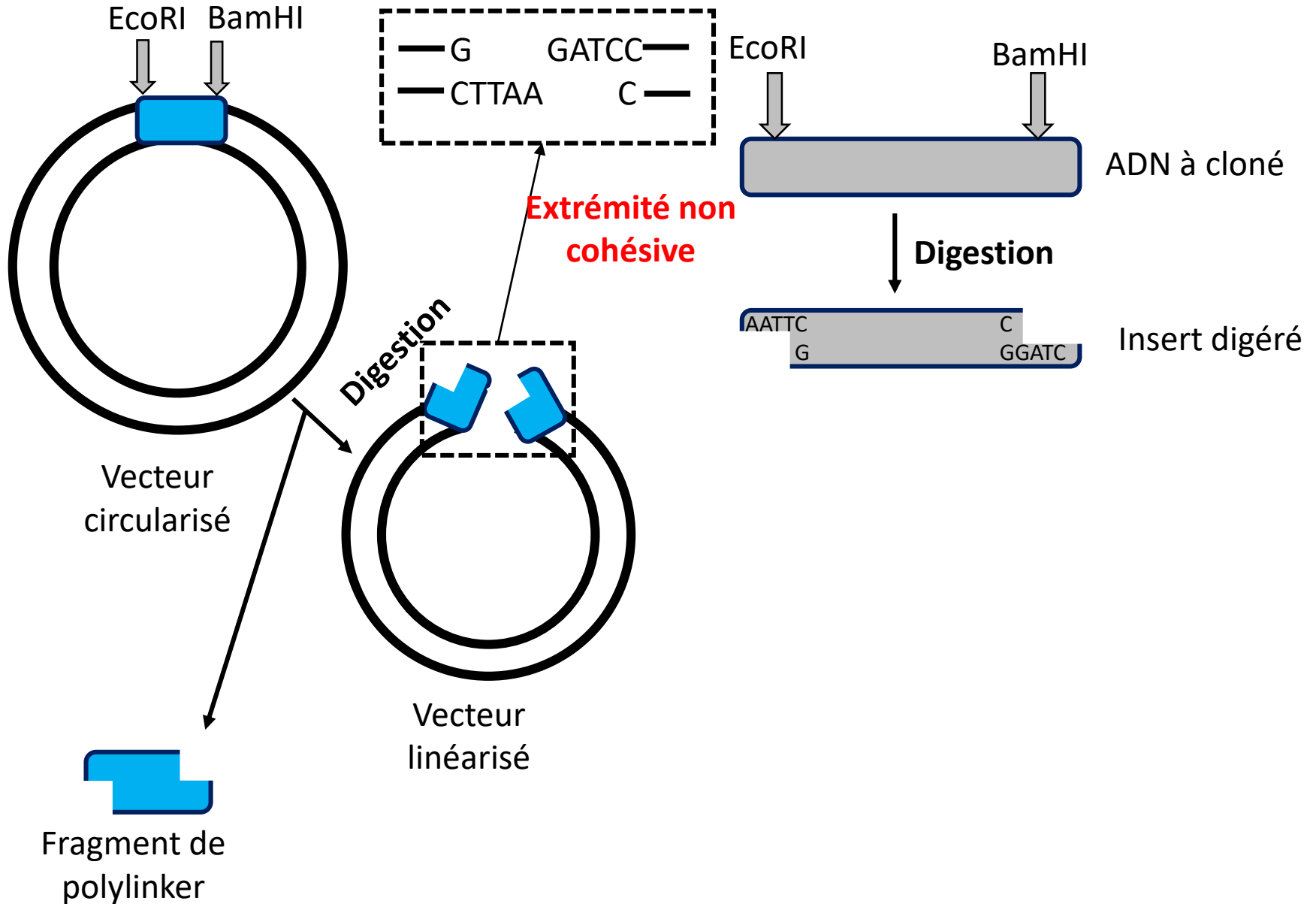
Cas 2 : criblage bleu blanc



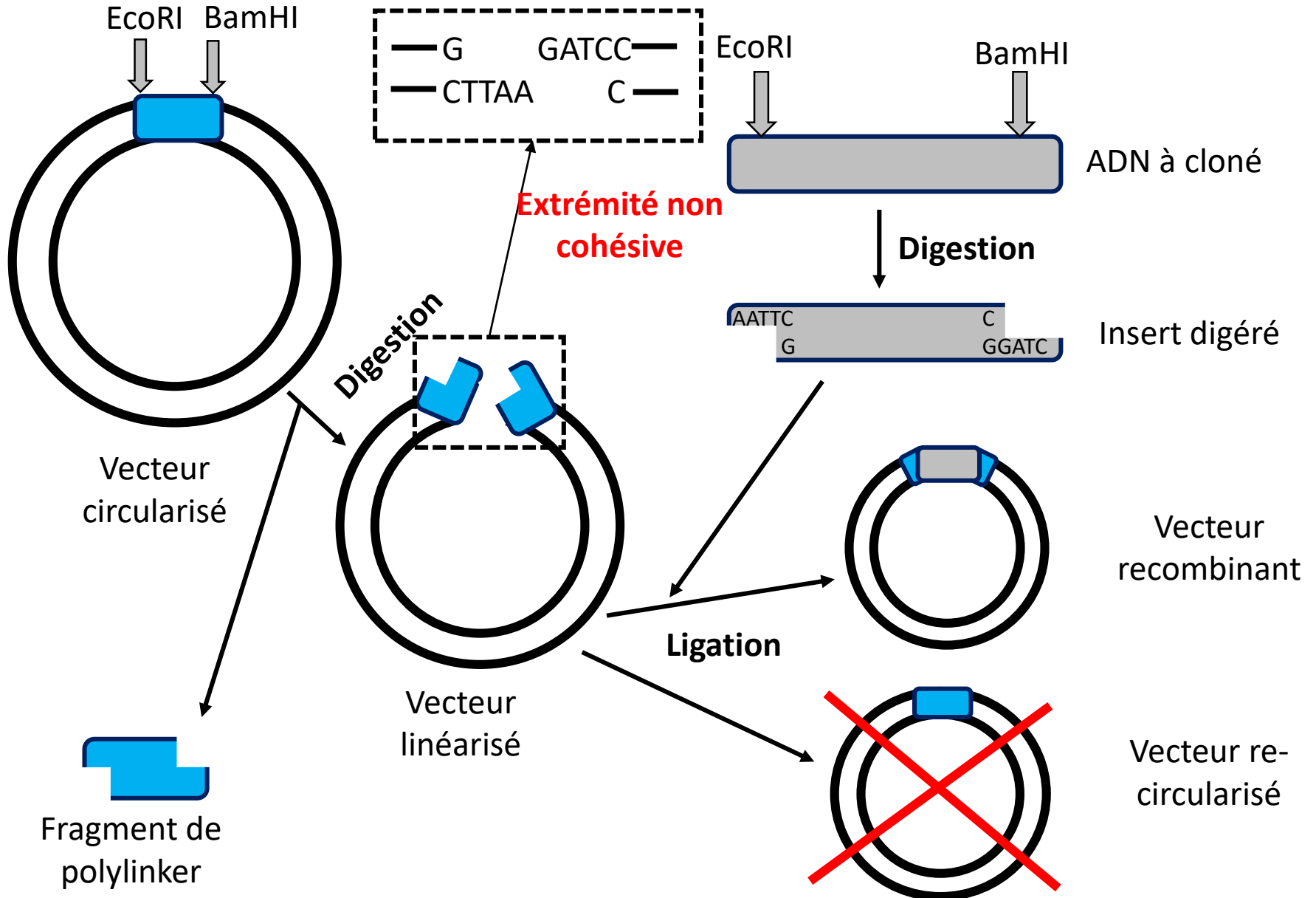
Cas 3 : double digestion avec enzymes différentes au cours du clonage



Cas 3 : double digestion avec enzymes différentes au cours du clonage

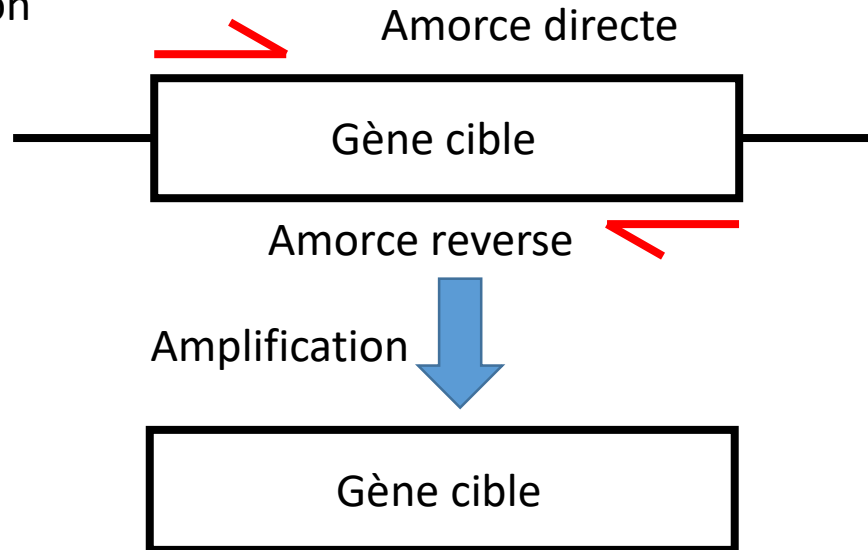


Cas 3 : double digestion avec enzymes différentes au cours du clonage



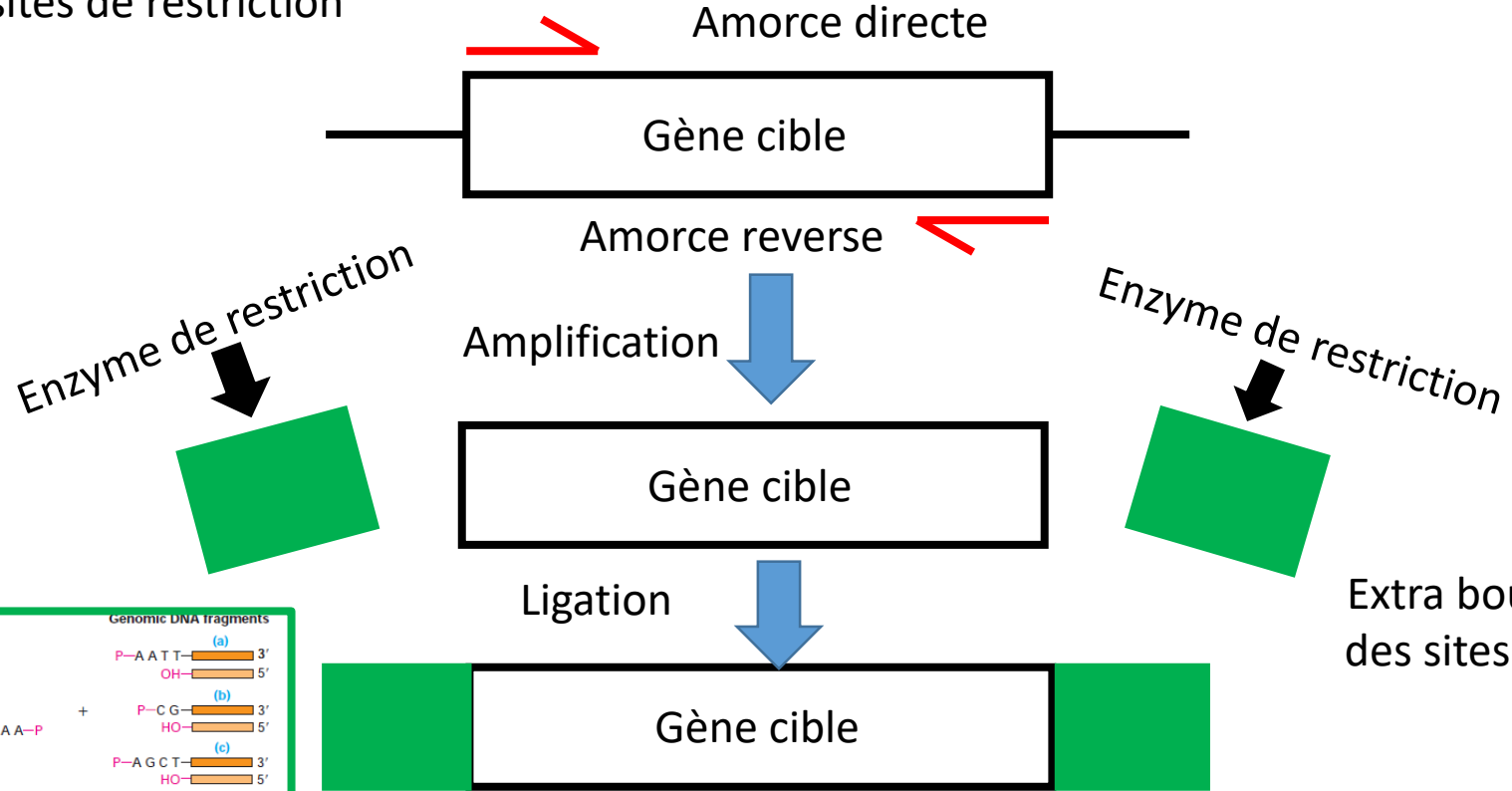
Générer des sites de restriction par ligation

Extra bouts possédant
des sites de restriction



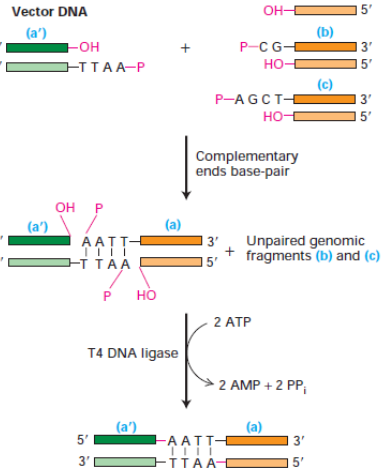
Générer des sites de restriction par ligation

Extra bouts possédant des sites de restriction



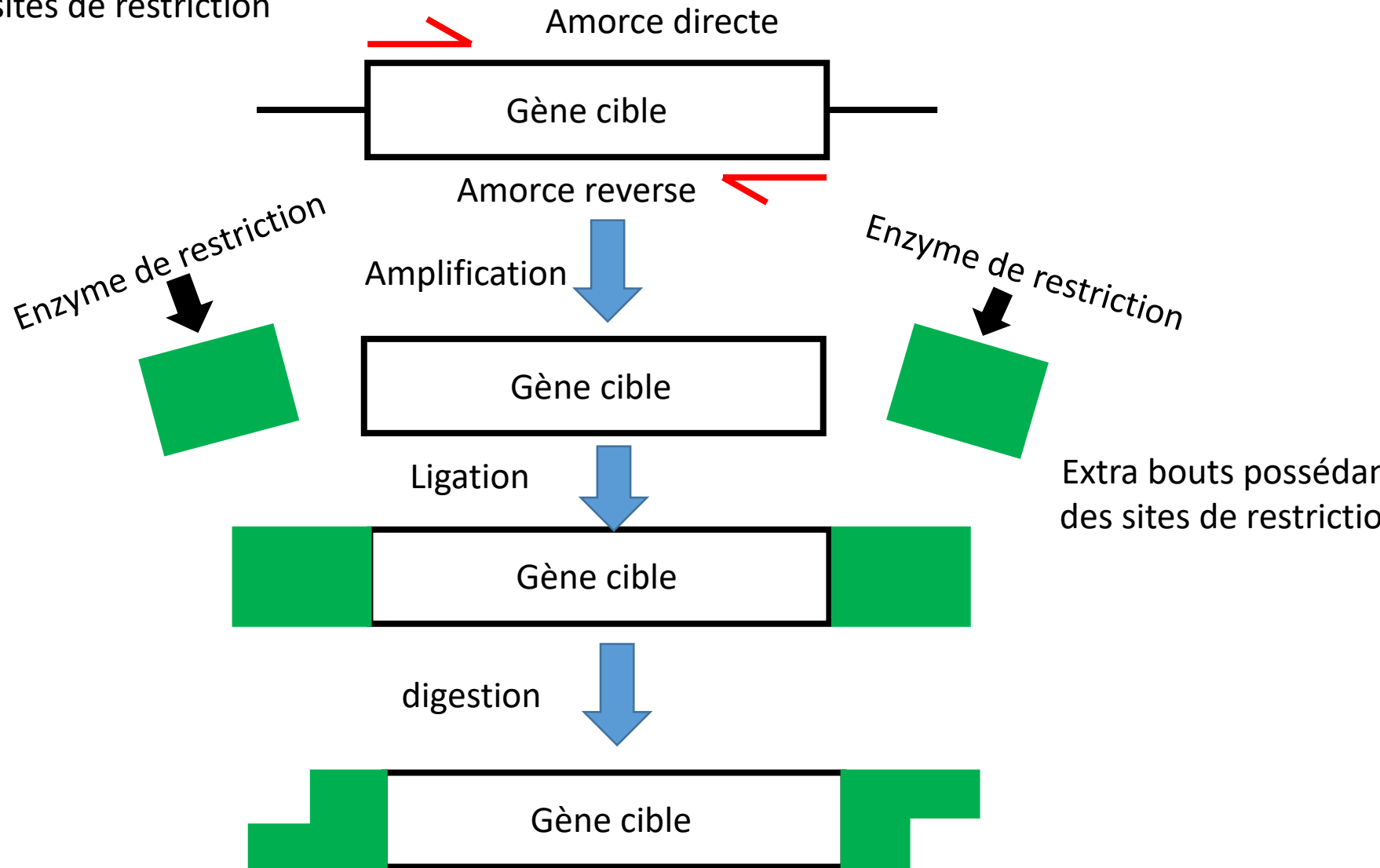
Extra bouts possédant des sites de restriction

Genomic DNA fragments



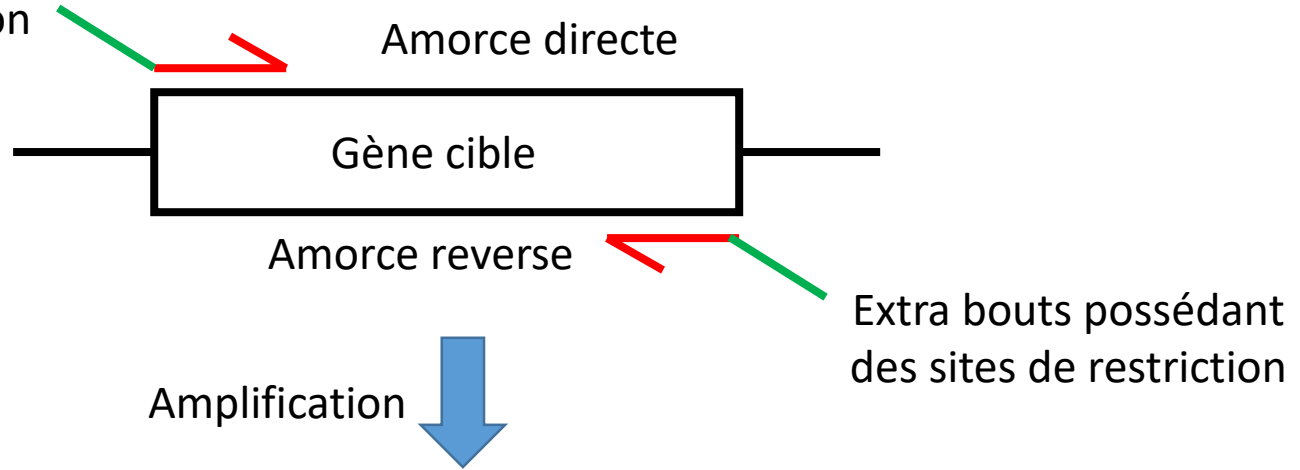
Générer des sites de restriction par ligation

Extra bouts possédant des sites de restriction



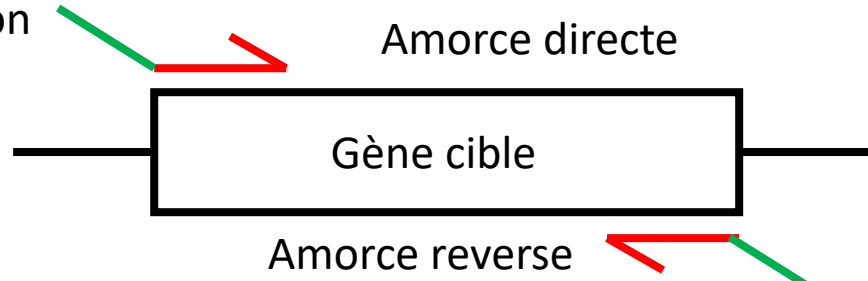
Générer des sites de restriction par PCR

Extra bouts possédant
des sites de restriction



Générer des sites de restriction par PCR

Extra bouts possédant des sites de restriction



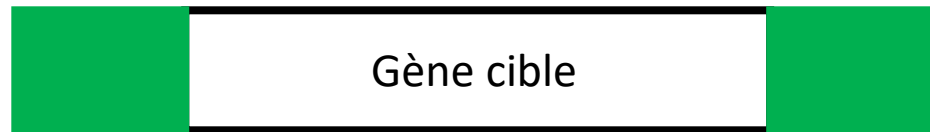
Enzyme de restriction



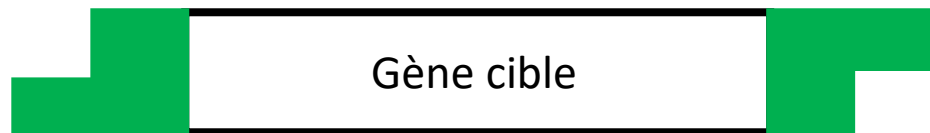
Amplification



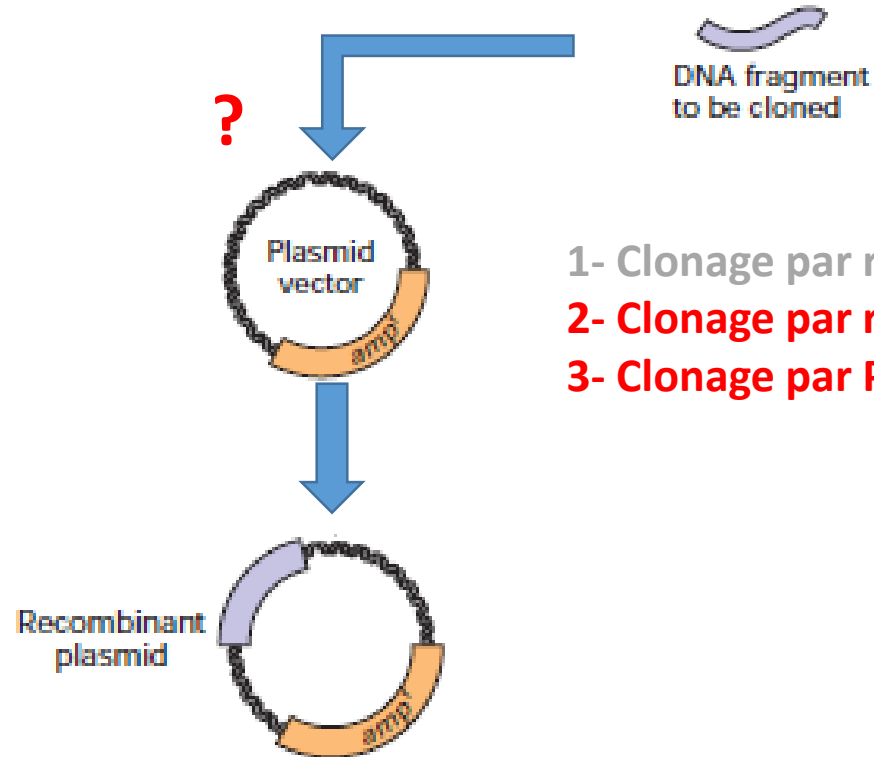
Enzyme de restriction



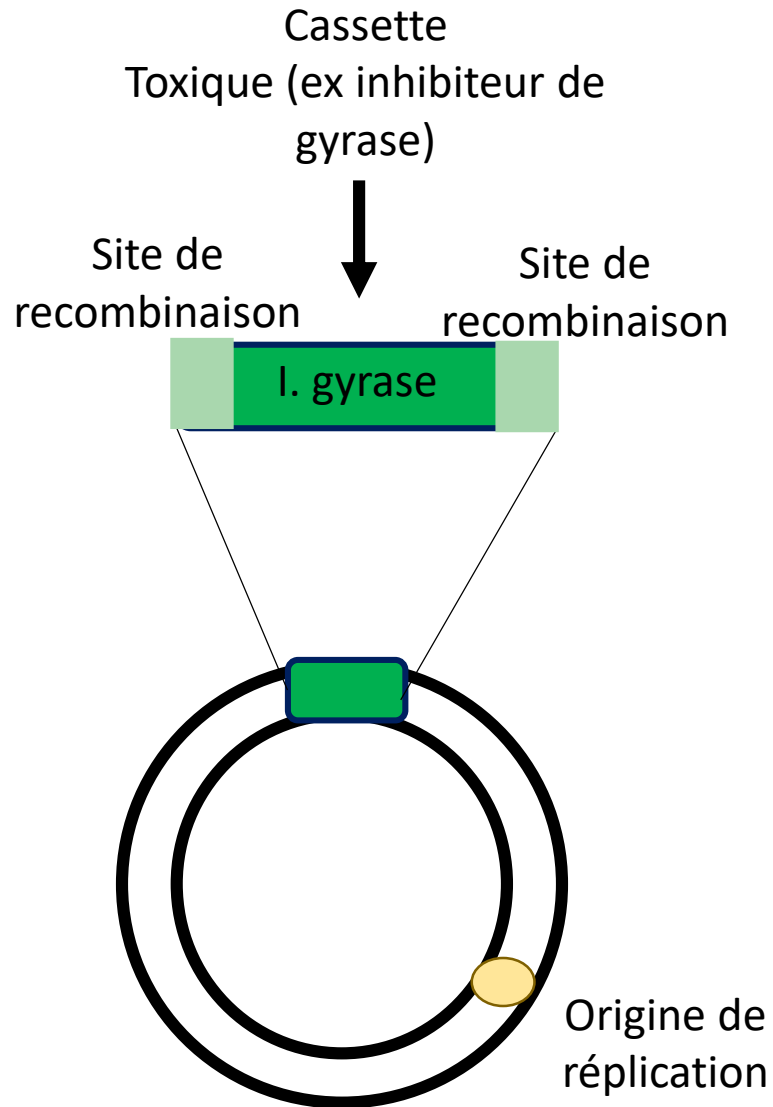
digestion



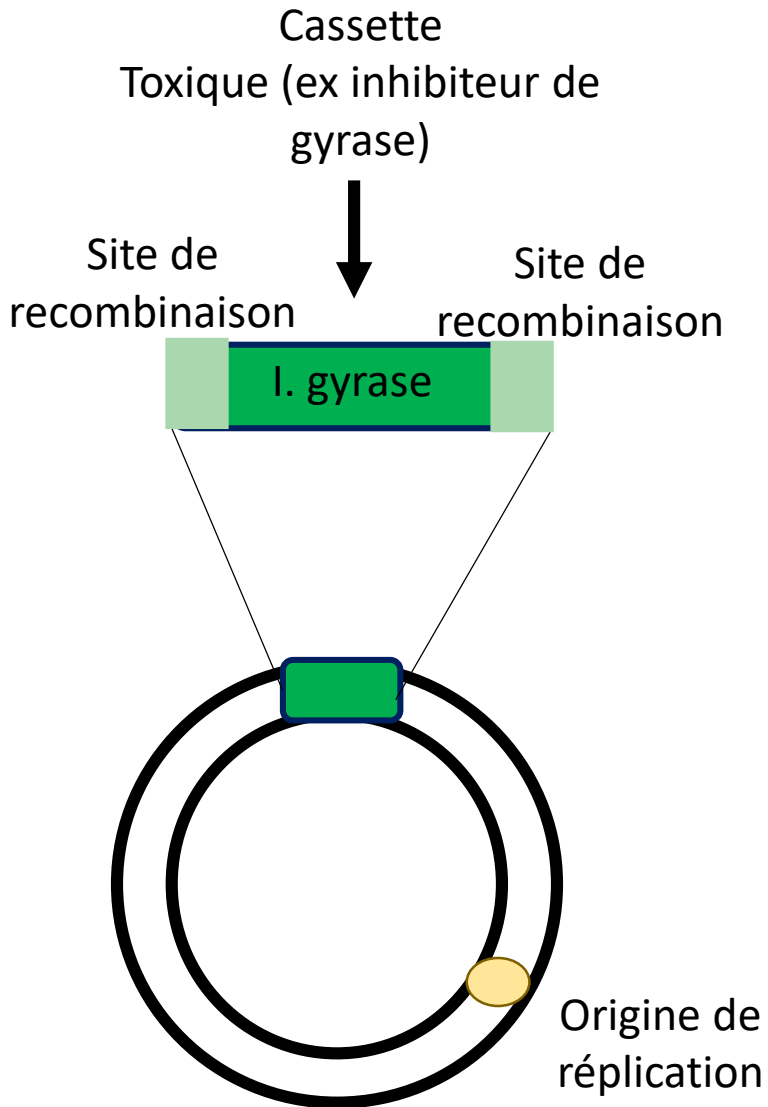
Les stratégies de clonage d'insert dans les vecteurs



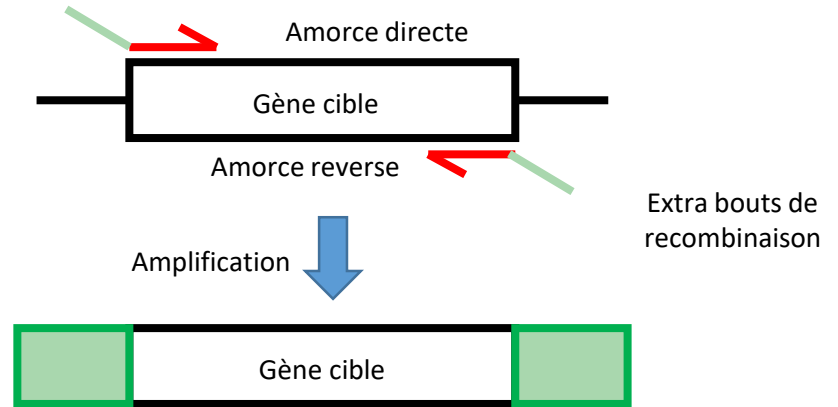
Le clonage par recombinaison Gateway



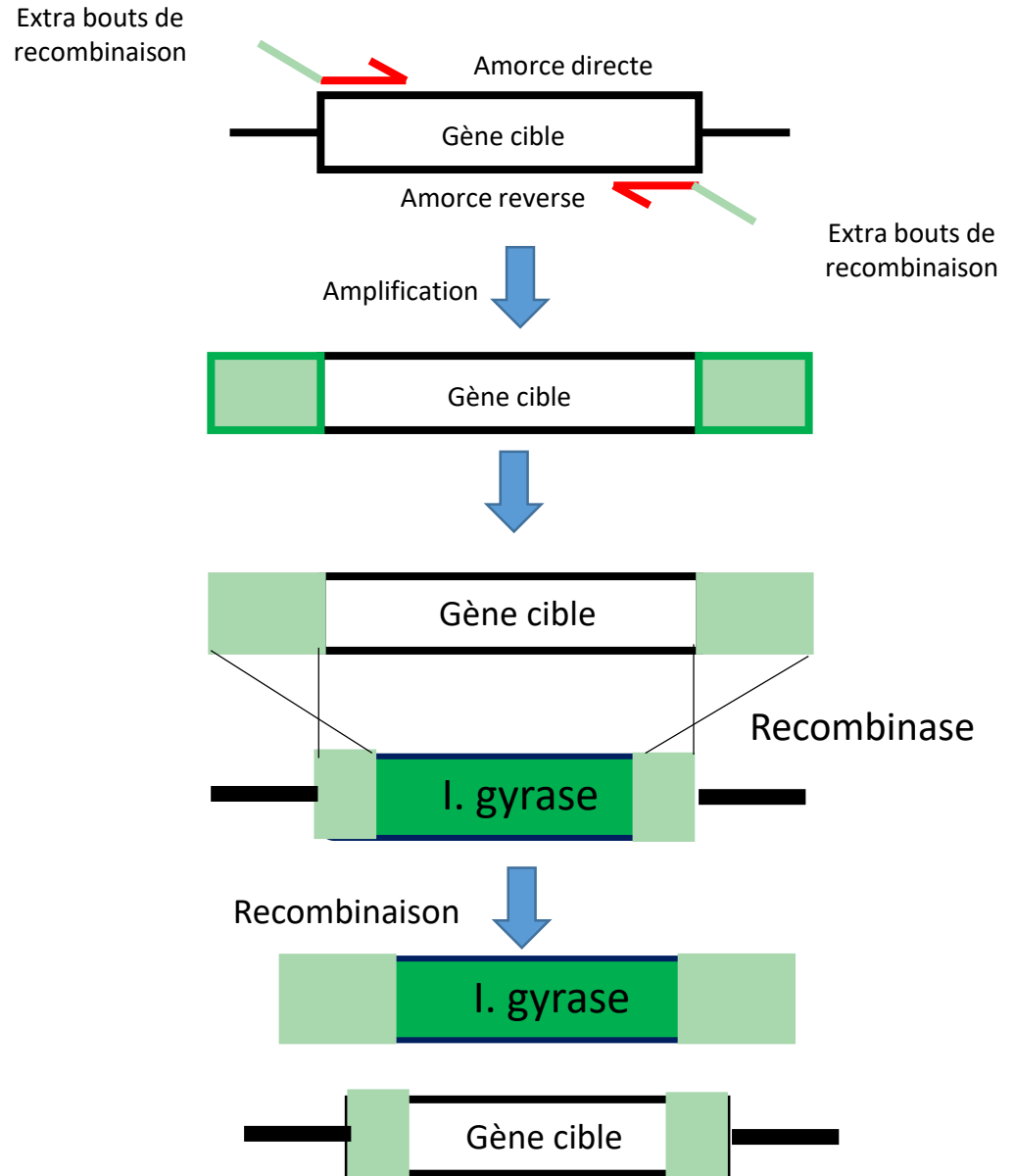
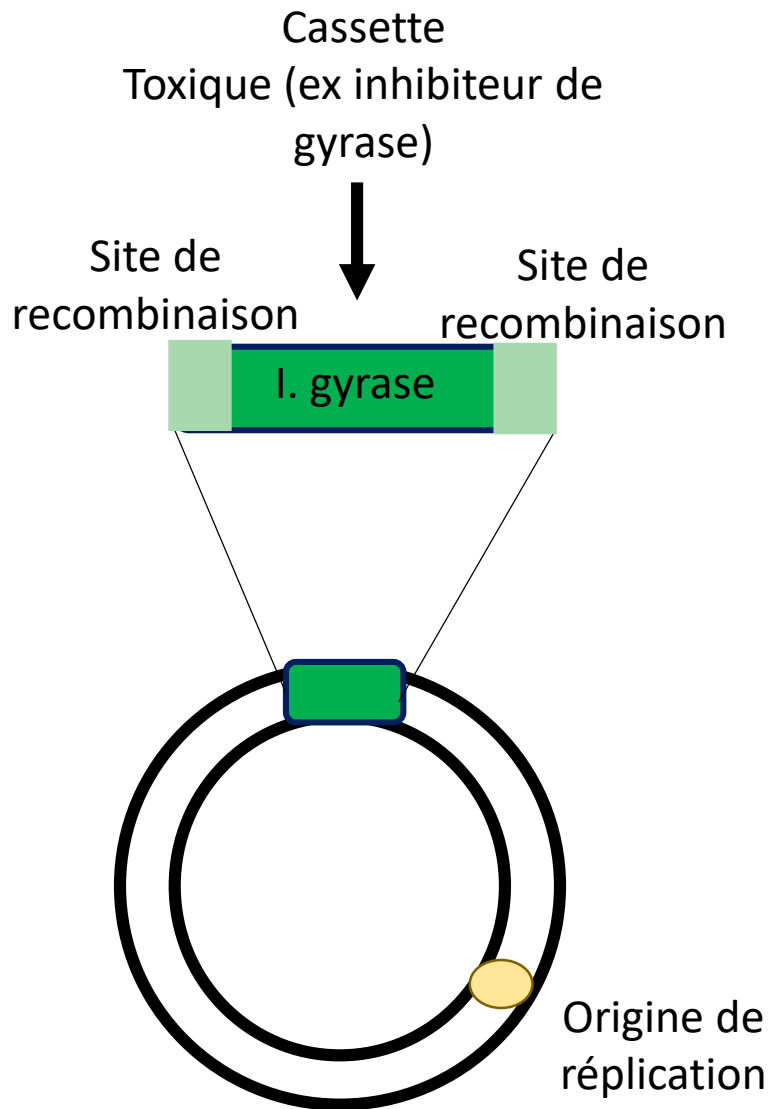
Le clonage par recombinaison Gateway



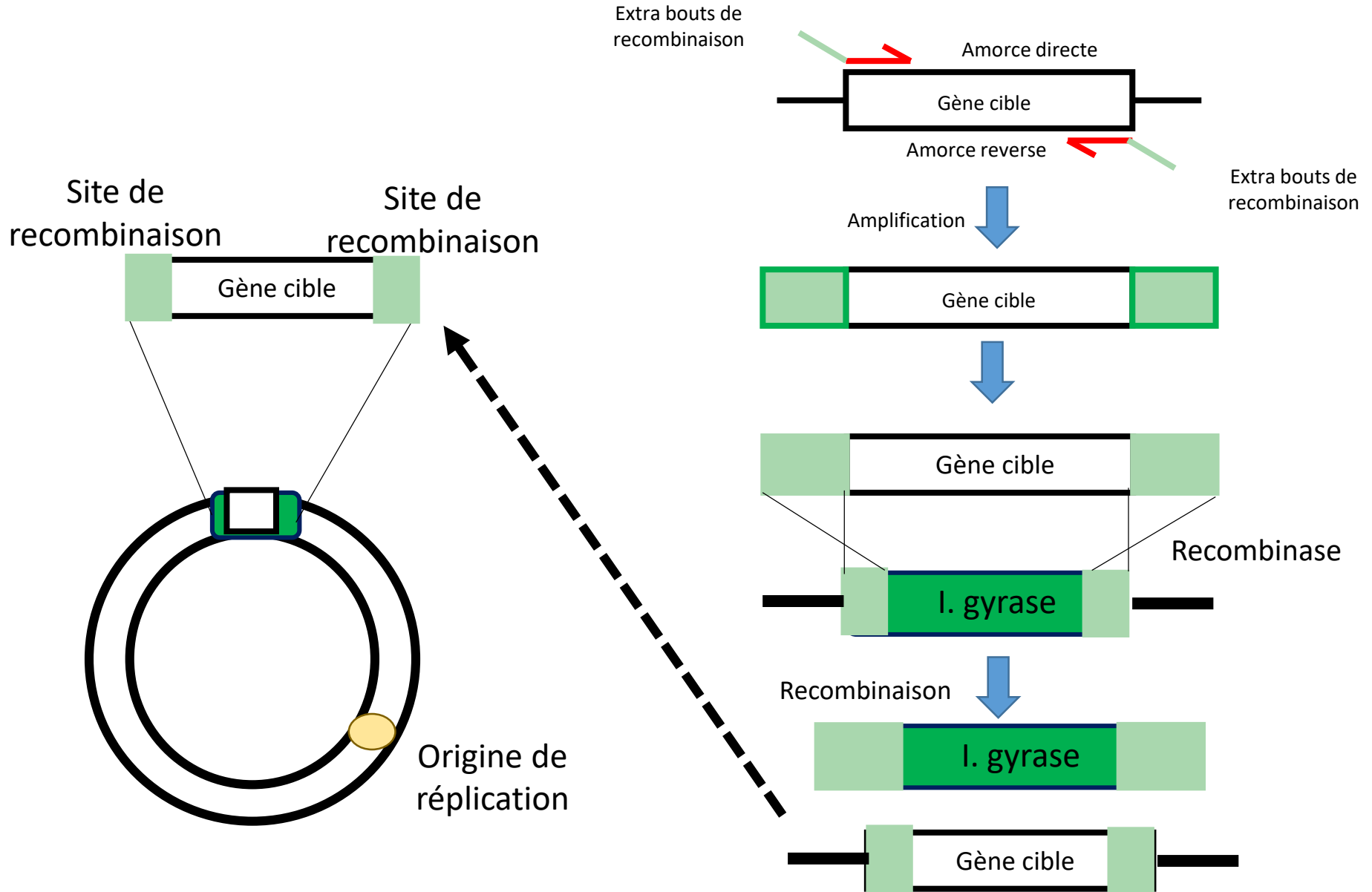
Extra bouts de recombinaison



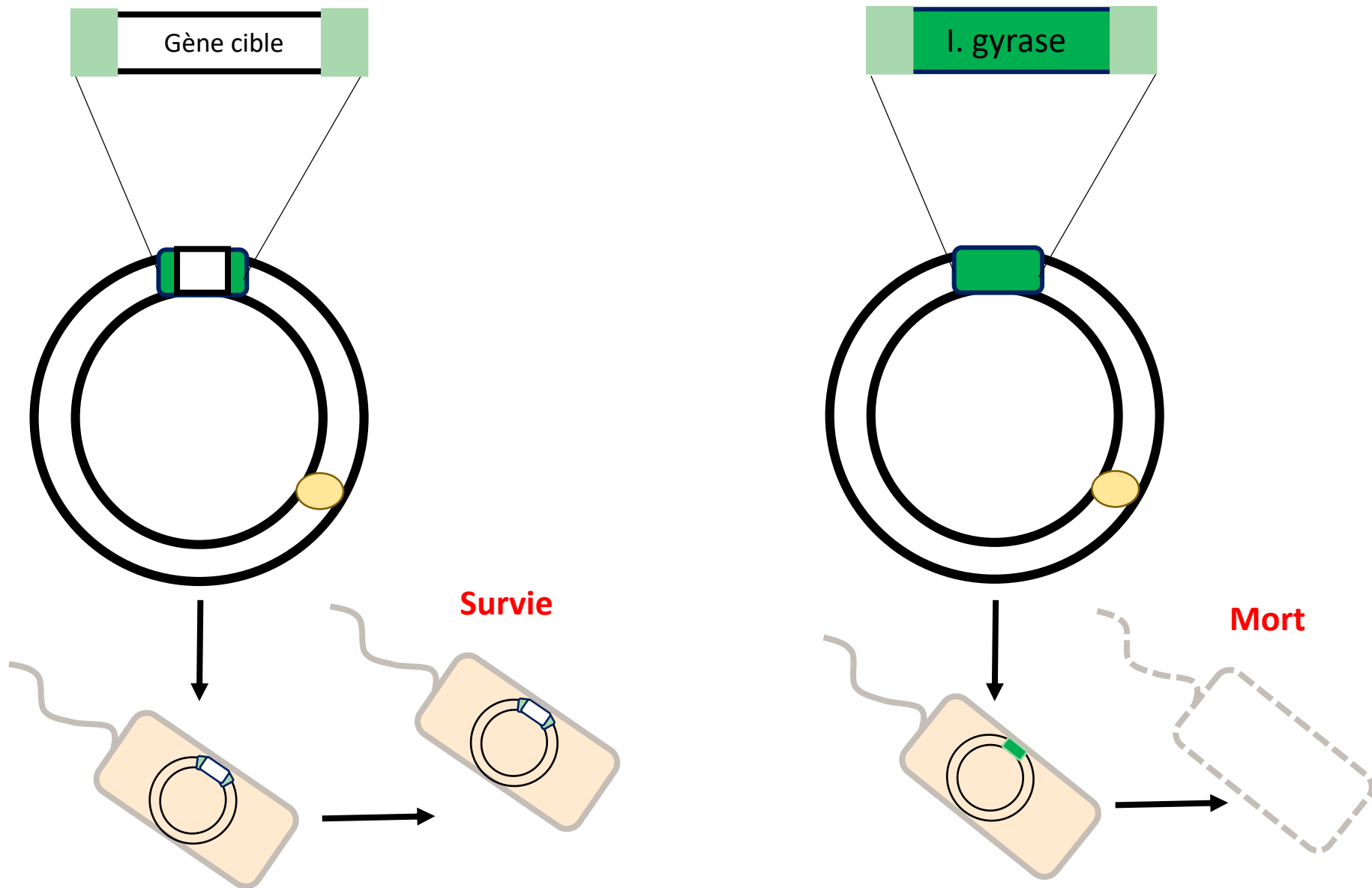
Le clonage par recombinaison Gateway



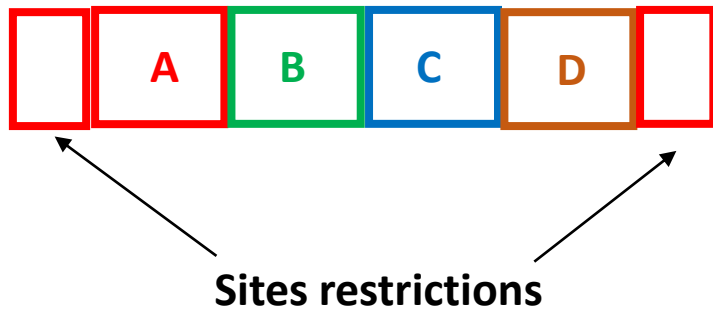
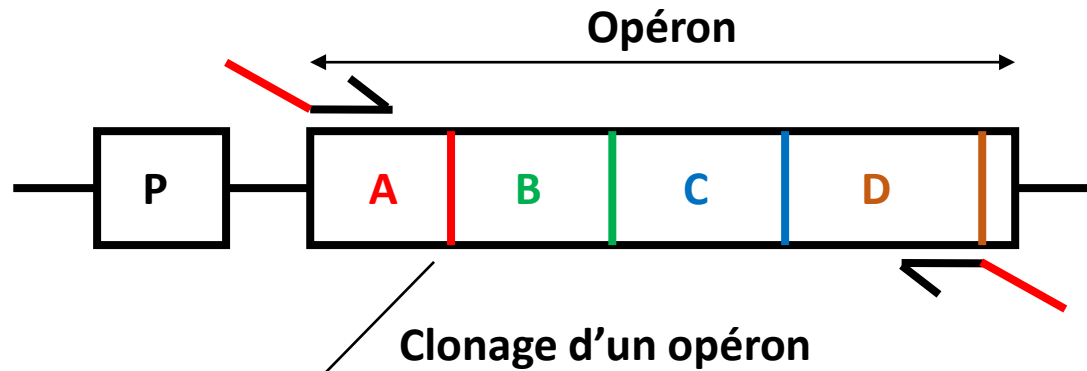
Le clonage par recombinaison Gateway



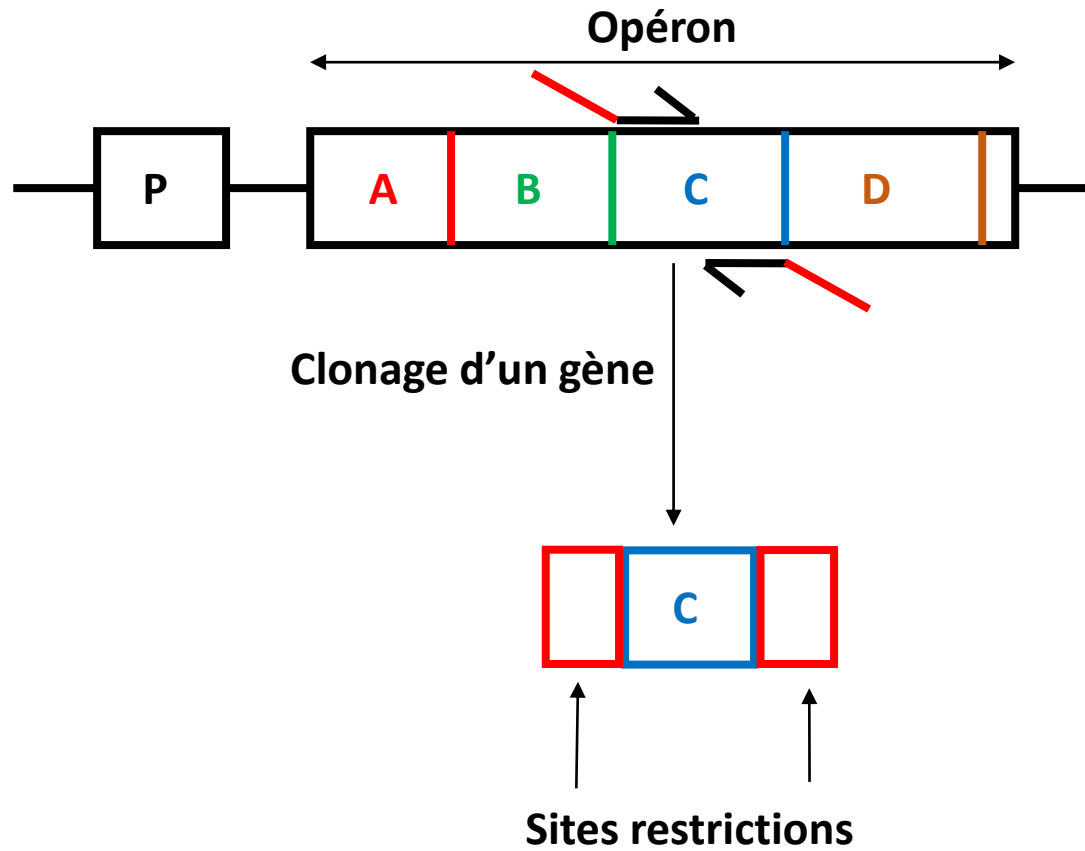
Le clonage par recombinaison Gateway



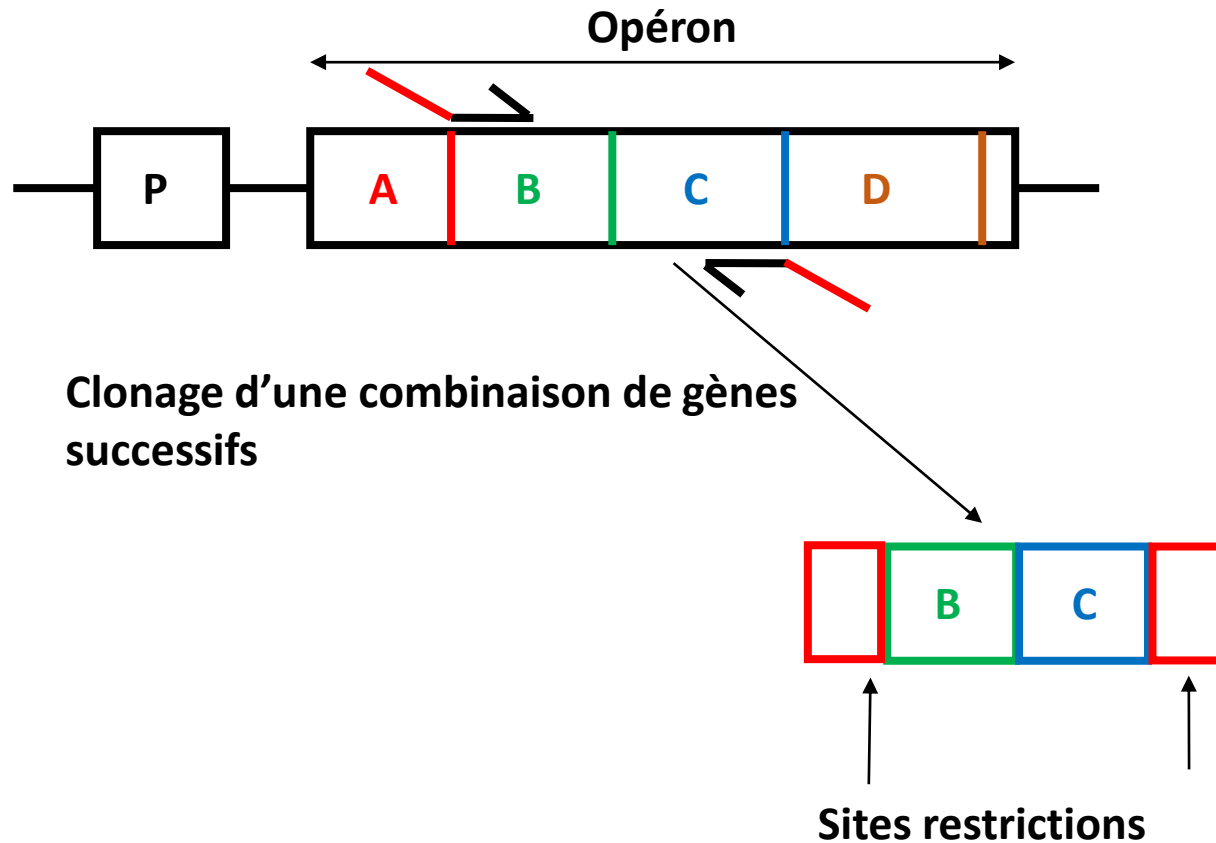
Stratégie de clonage de gène bactérien



Stratégie de clonage de gène bactérien

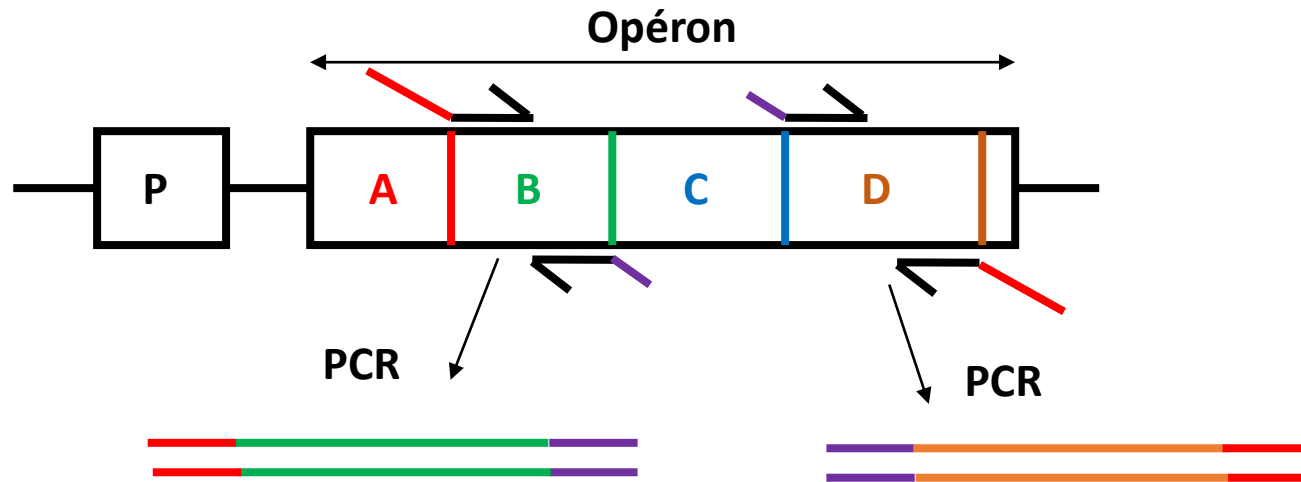


Stratégie de clonage de gène bactérien



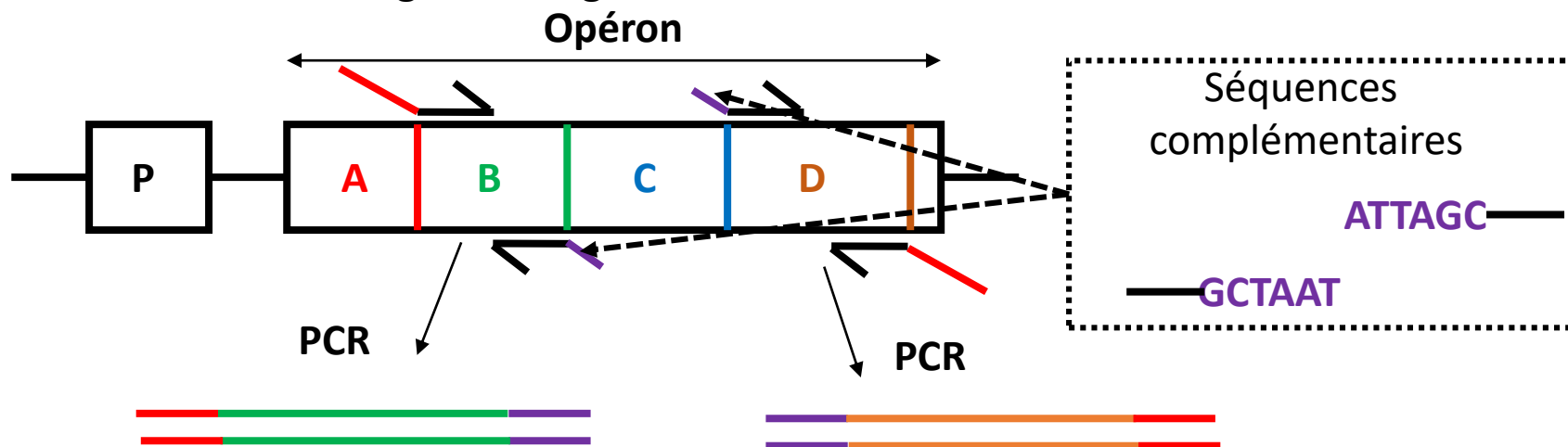
Stratégie de clonage de gène bactérien

Clonage d'une combinaison de gènes éloignés



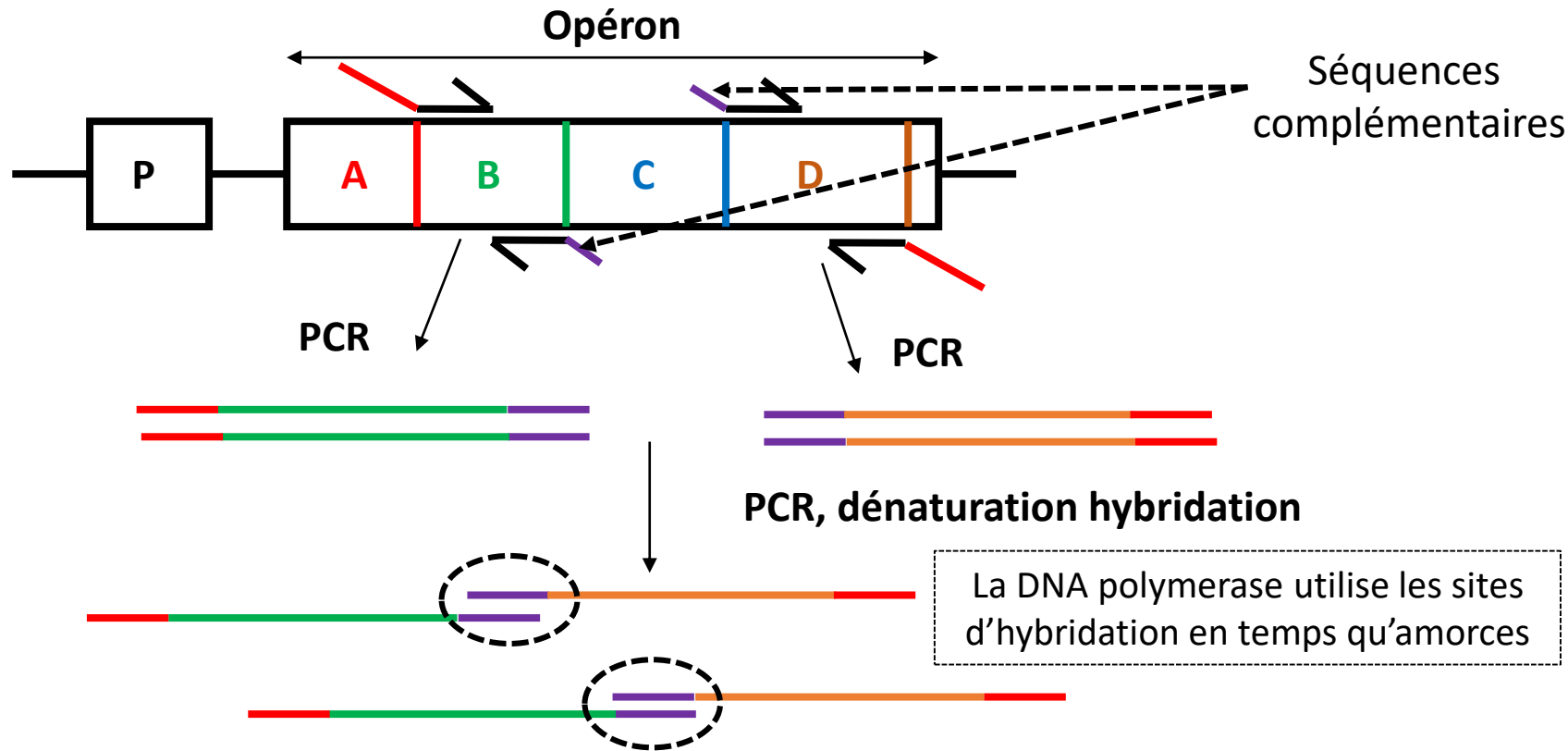
Stratégie de clonage de gène bactérien

Clonage d'une combinaison de gènes éloignés



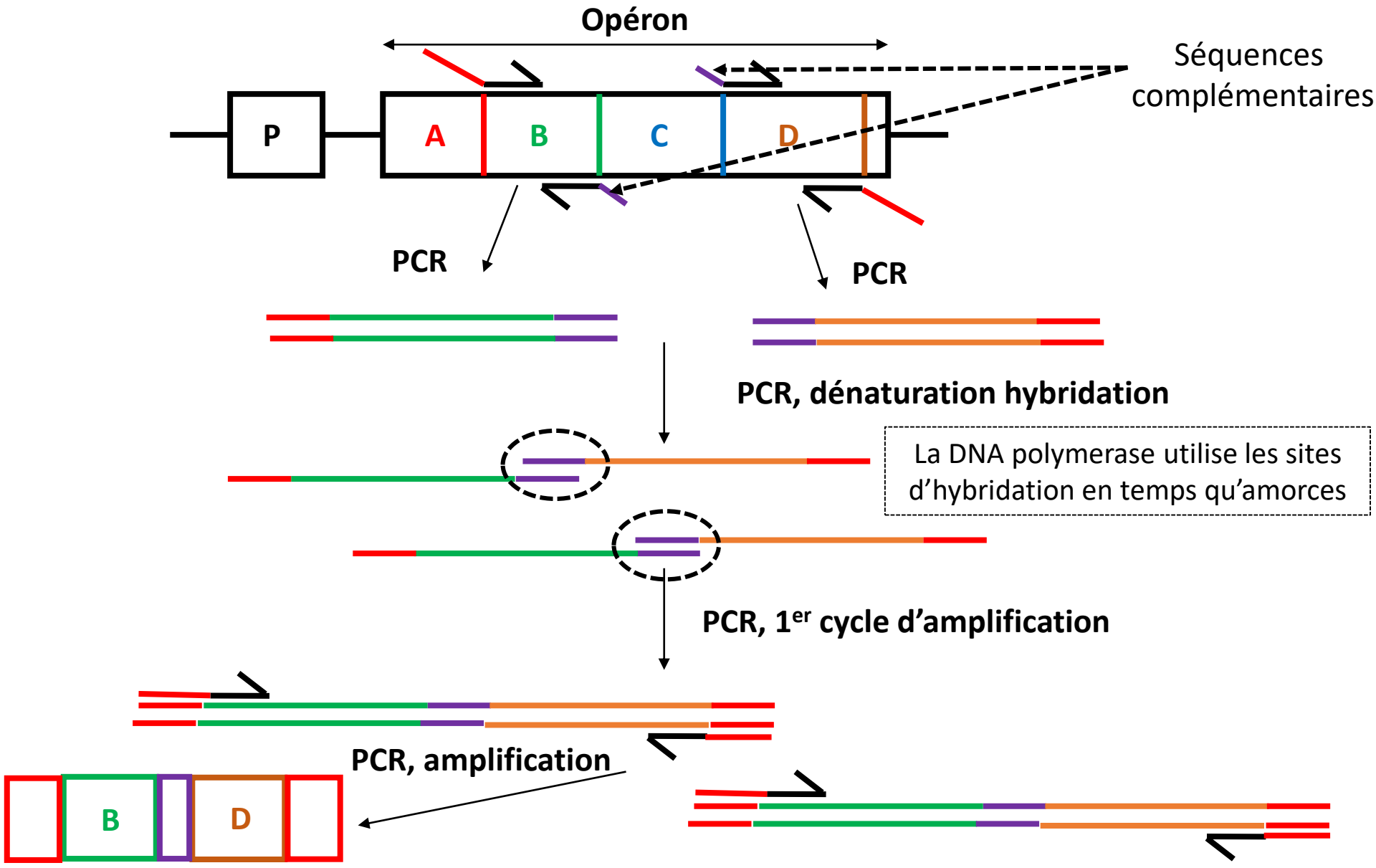
Stratégie de clonage de gène bactérien

Clonage d'une combinaison de gènes éloignés



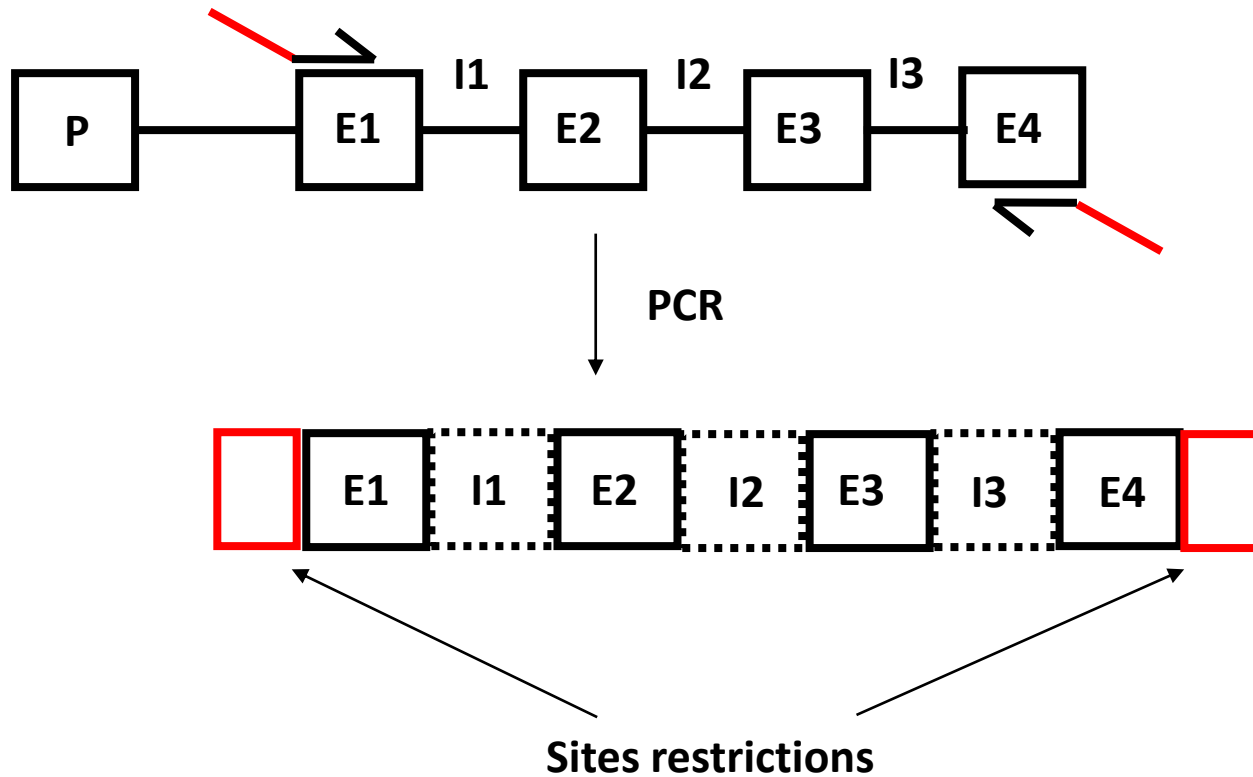
Stratégie de clonage de gène bactérien

Clonage d'une combinaison de gènes éloignés

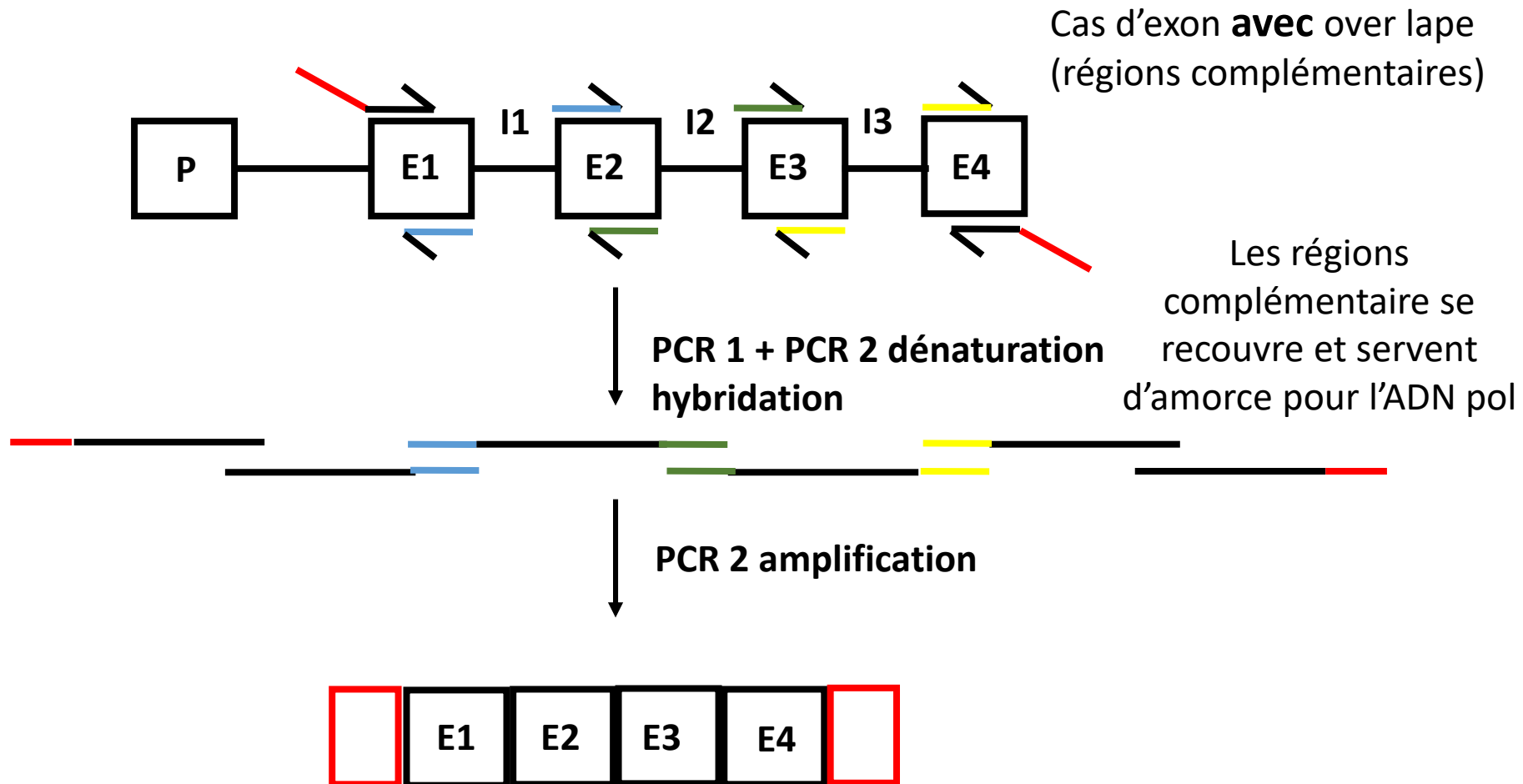


Stratégie de clonage d'un gène eucaryote

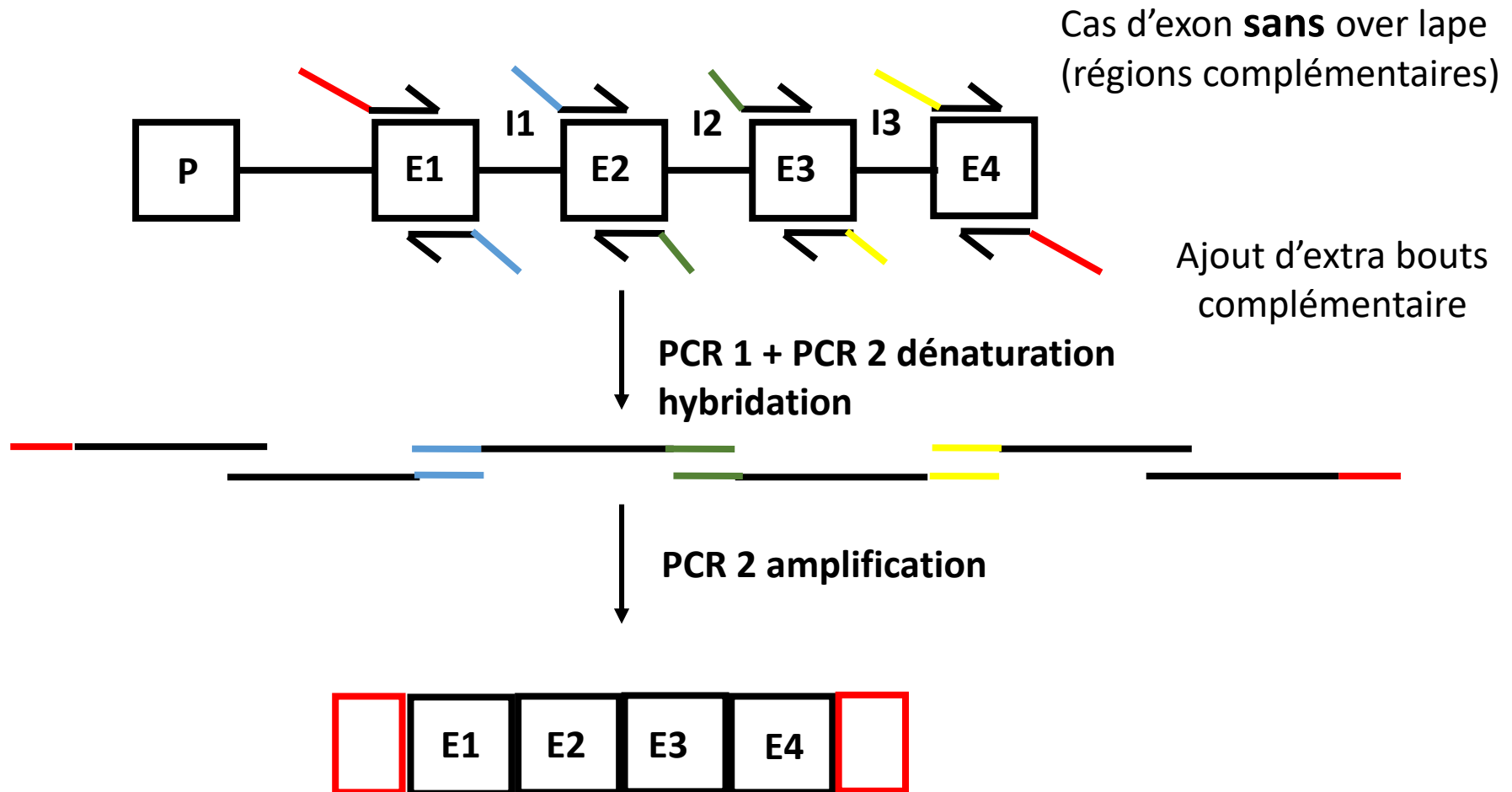
Clonage d'un gène entier



Stratégie de clonage d'un gène eucaryote, épissage par PCR



Stratégie de clonage d'un gène eucaryote, épissage par PCR



Fin du chapitre III