



جامعة مولاي إسماعيل
UNIVERSITÉ MOULAY ISMAÏL



كلية العلوم والتقنيات
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

S6: biologie moléculaire

Chapitre 9:

Partie technique (3)

Génie génétique

Procédures et applications:

Du gène à la protéine

Génie génétique

Définition

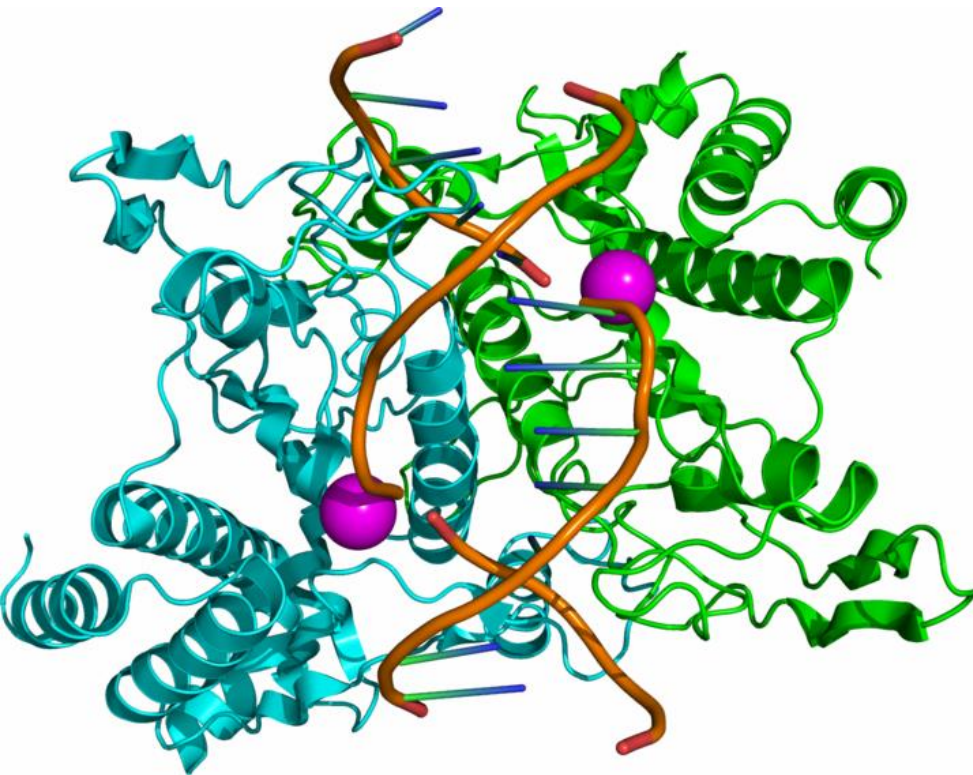
Science **appliquée** basée sur un ensemble de connaissances et de techniques issues de la biologie moléculaire.

Objet central : l'étude de l'ADN ; ARN et produire les Protéines

Finalité : créer ou améliorer des **applications**, surtout bio-médicales, végétales et agro-industrielles...(Biotechnologies...)

Génie génétique

Quelques dates clés



- découverte de la première enzyme de restriction en 1970 (Nathans, Arber & Smith → P.N. de médecine en 1978)

Génie génétique - Introduction

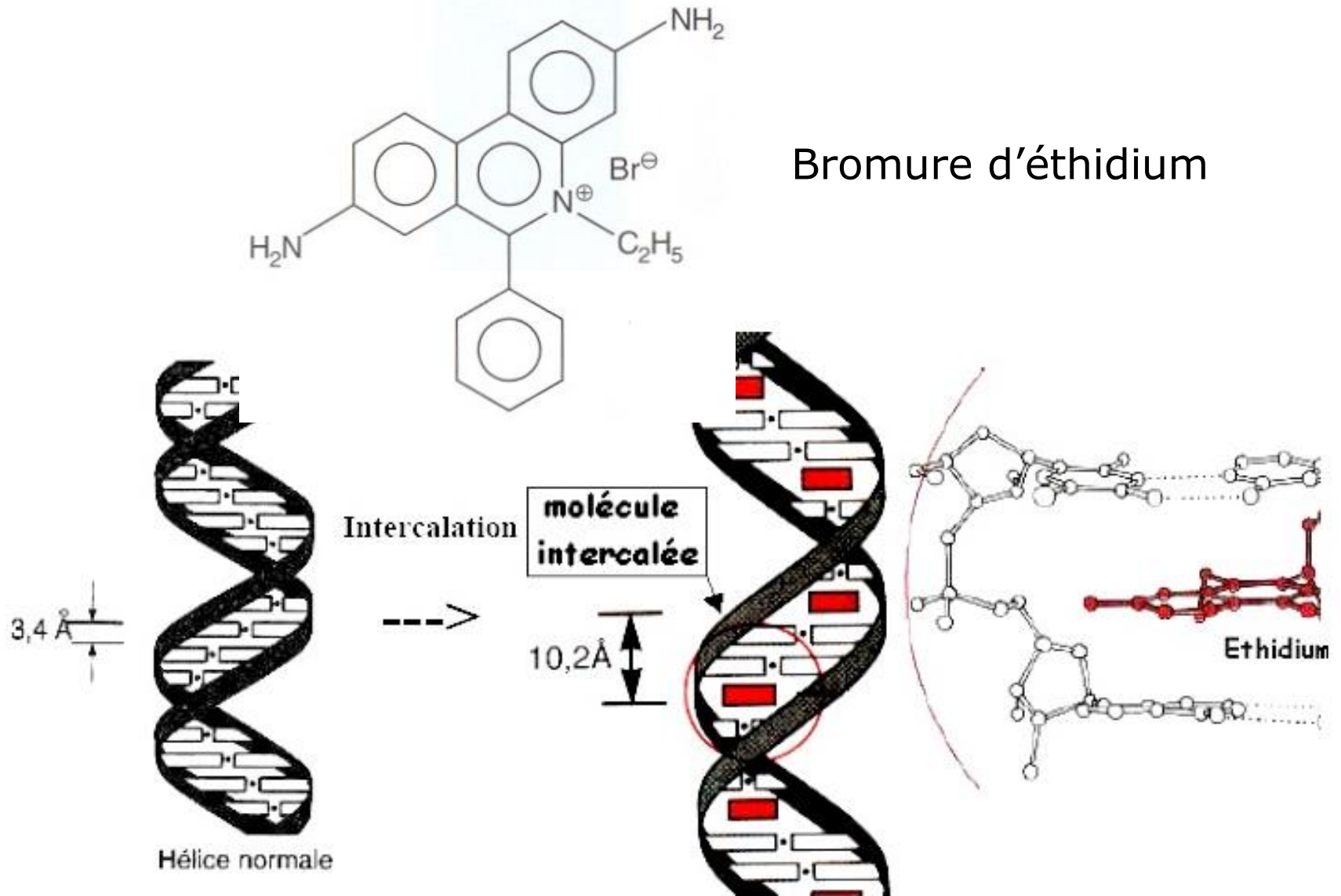
Matériel de base : l'ADN des êtres vivants++++ADNc.

Manipulations génétiques à l'aide d'outils enzymatiques spécifiques (issus de découvertes en microbiologie).

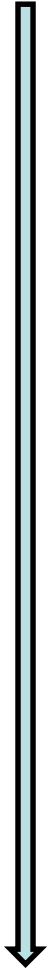
Modèle et outil essentiel : *Escherichia coli* et autres bactéries faciles à cultiver...+ les levures pour les cellules eucaryotes

Analyse de la qualité de l'ADN

2. Taille des fragments



Gène



Protéine

1- choix de la cible: ADNc ou gène (PCR + RT PCR)

2- Clonage: vecteur de type PLASMIDE ou autres

3- Séquençage (vérifier la séquence du gène)

4- Transformation bactérienne (2 méthodes)

5- Criblage des clones (sélection)

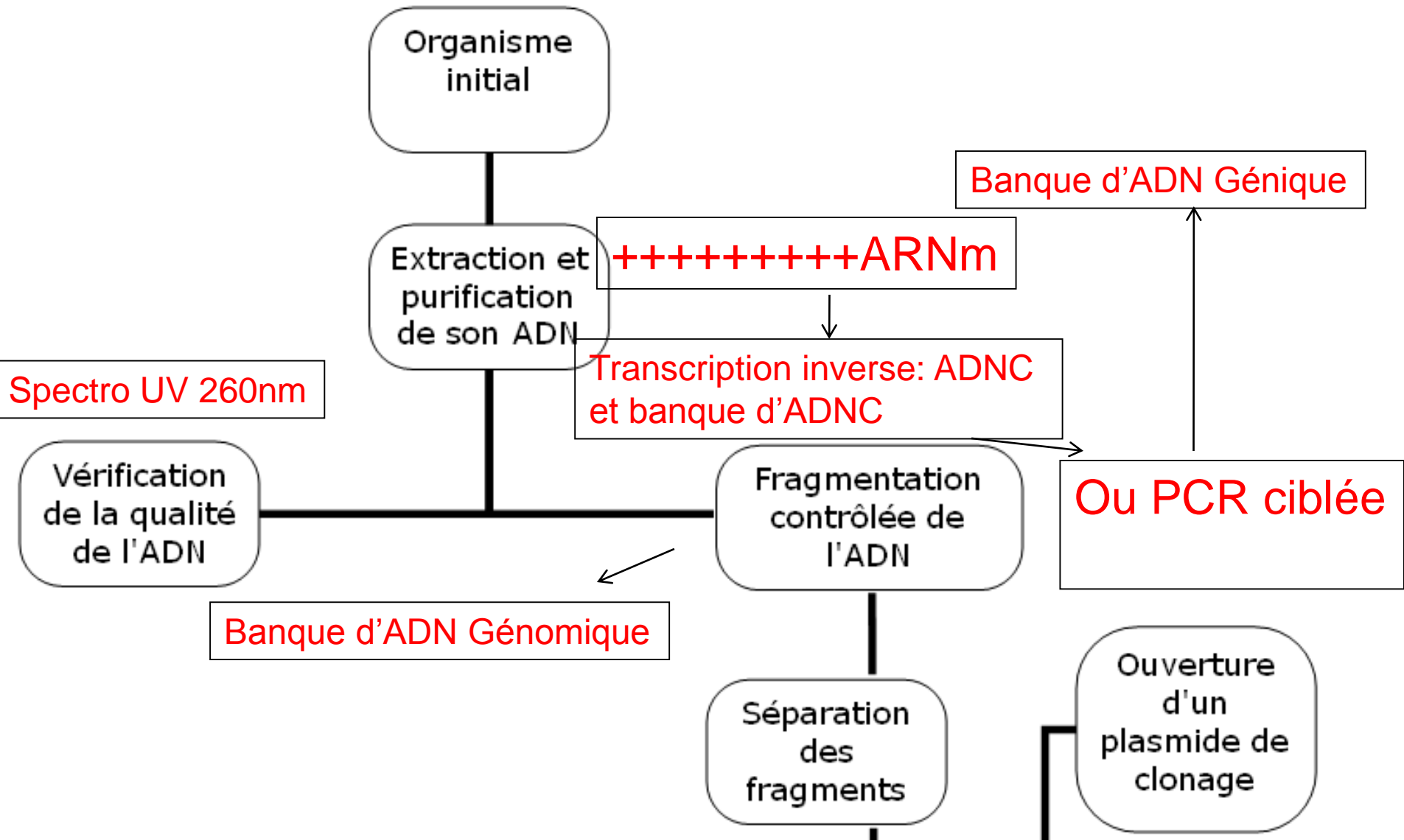
6- Expression du gène ou du CDNA: transcription + traduction
(Plasmides ou vecteur d'expression)

7- Production et purification :

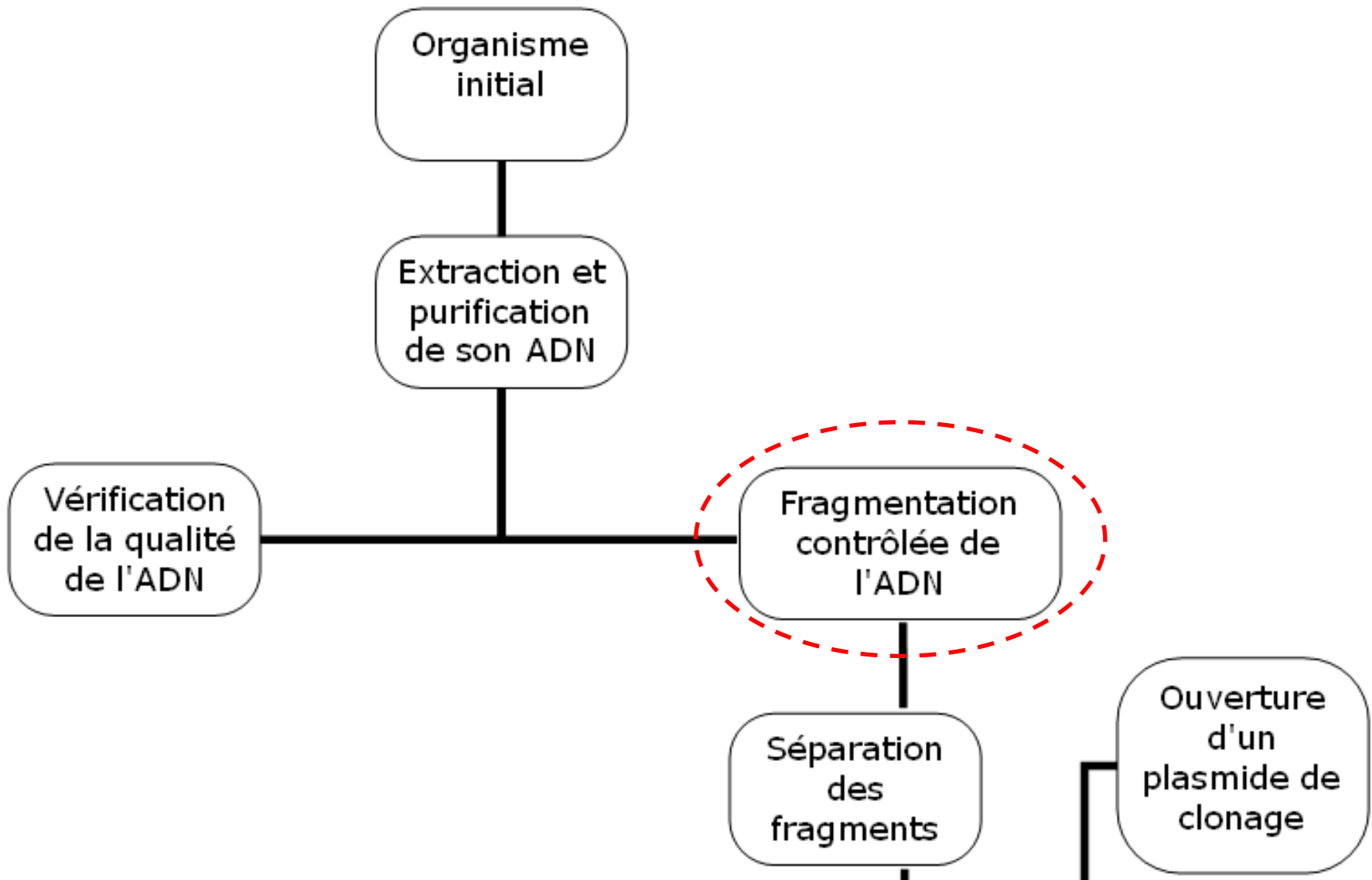
Protéine= Fonction????

**Biotechnologies
Diverses...**

Stratégie générale pour le clonage d'un gène



Stratégie générale pour le clonage d'un gène



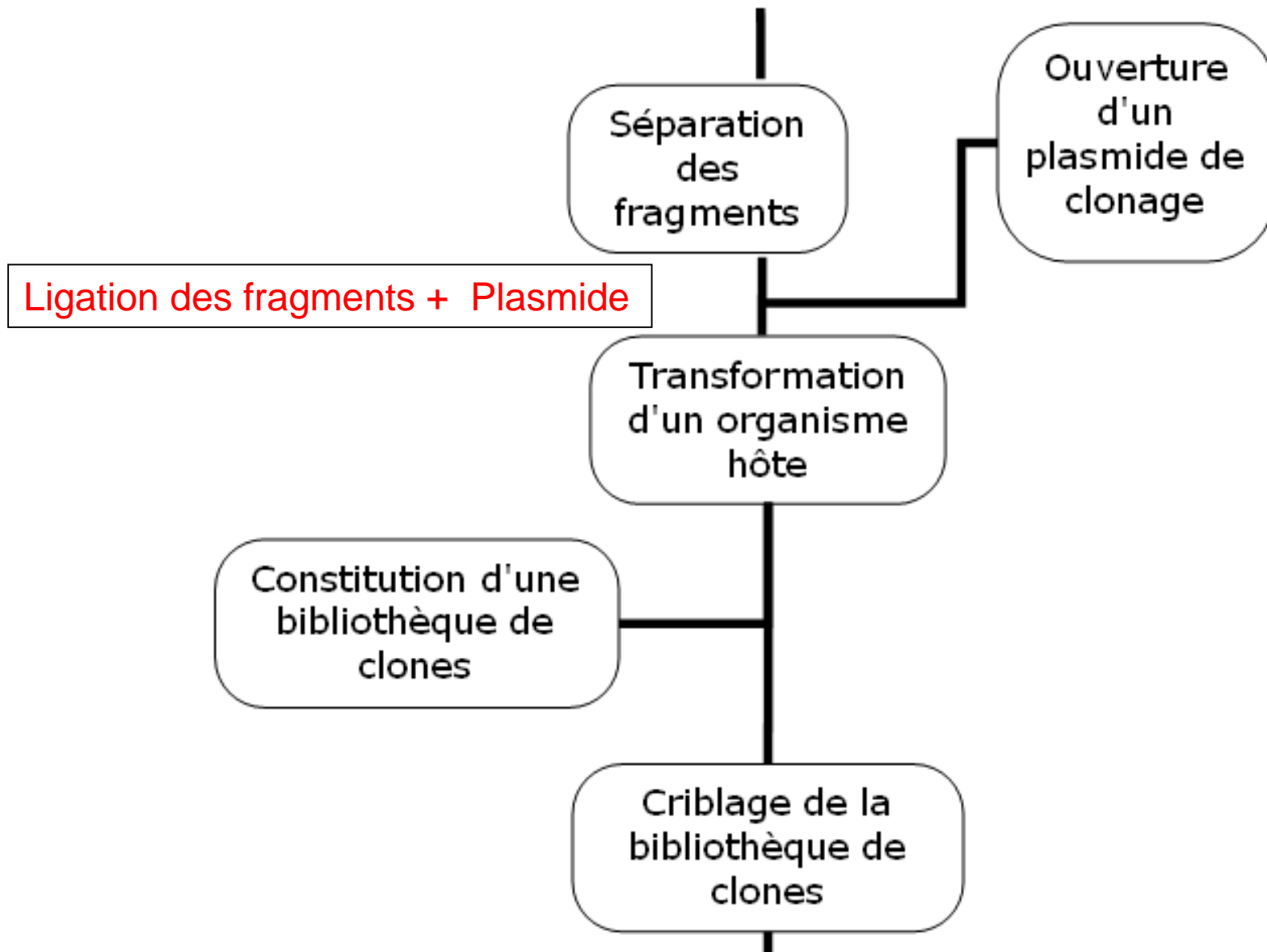
Analyse de la qualité de l'ADN

2. Taille des fragments

→ Électrophorèse en gel d'agarose

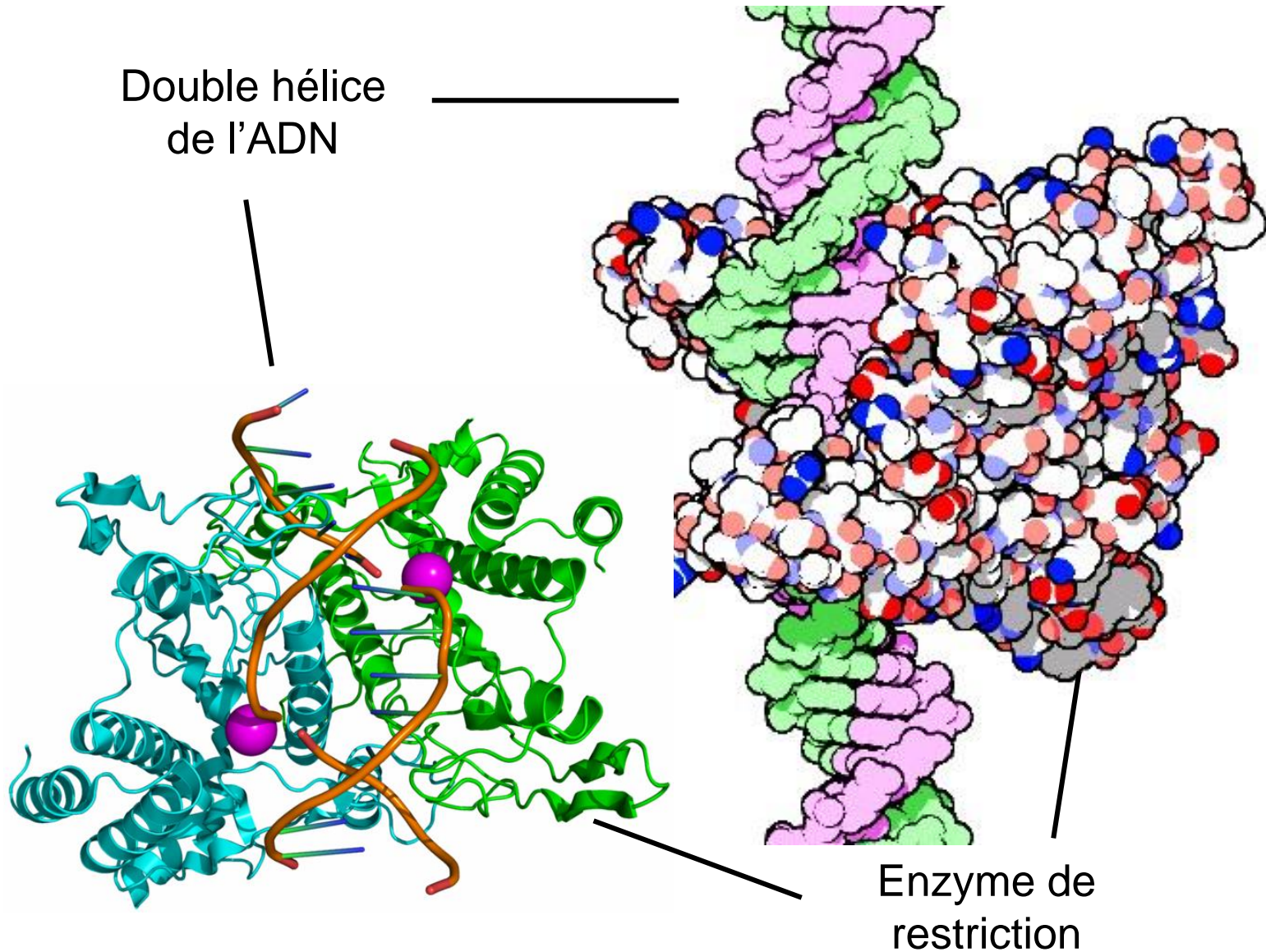


Stratégie générale pour le clonage d'un gène



Fragmentation contrôlée de l'ADN

Digestion par une enzyme de restriction



Fragmentation contrôlée de l'ADN

Digestion par une enzyme de restriction

1. Reconnaissance d'une séquence spécifique (palindrome – enzyme = homodimère)
2. Coupure bicaténaire

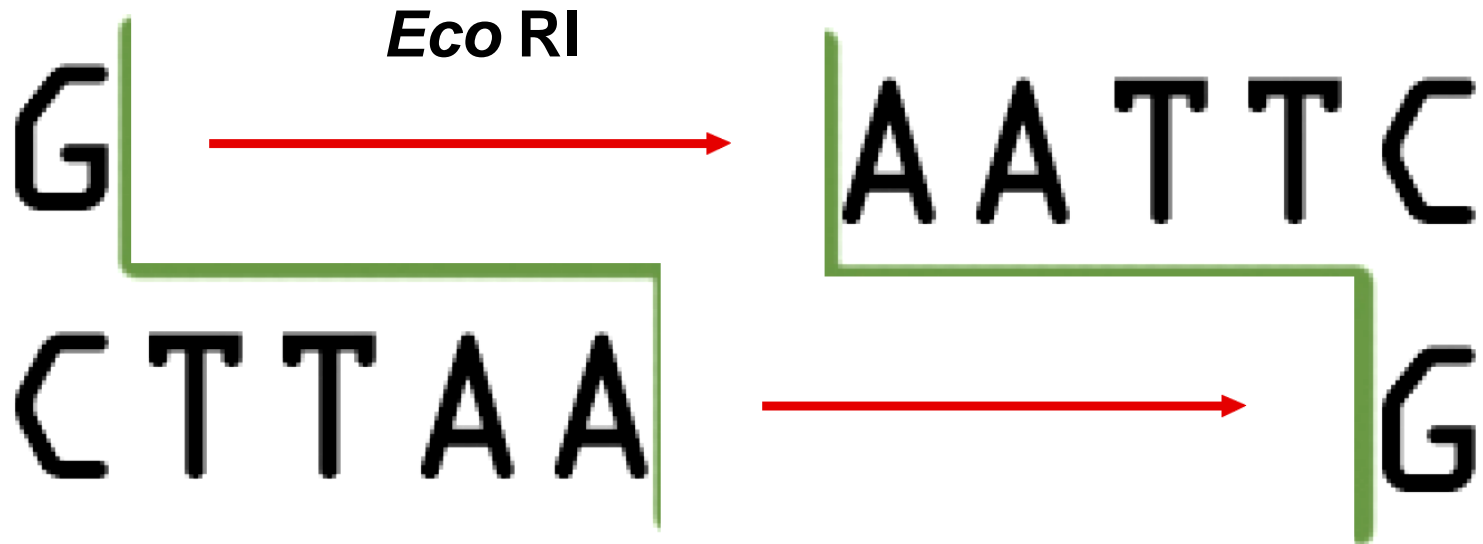


Site de restriction de l'enzyme *Eco* RI

Fragmentation contrôlée de l'ADN

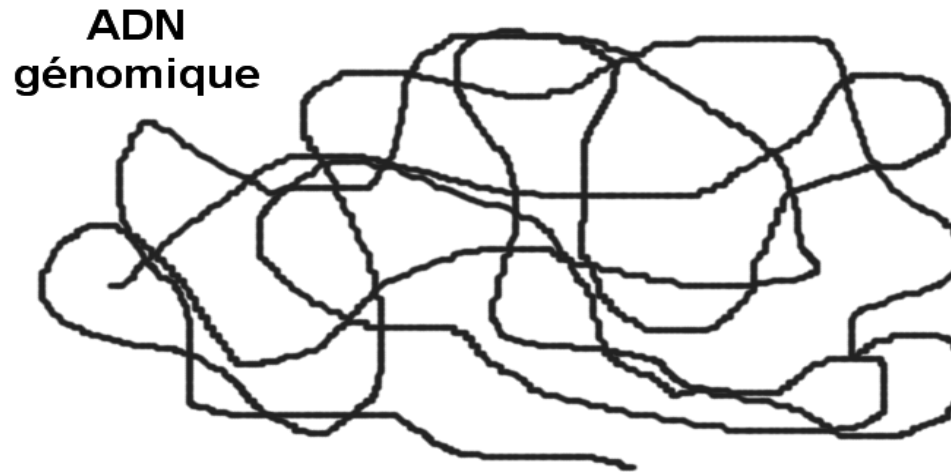
Digestion par une enzyme de restriction

Séparation des deux extrémités

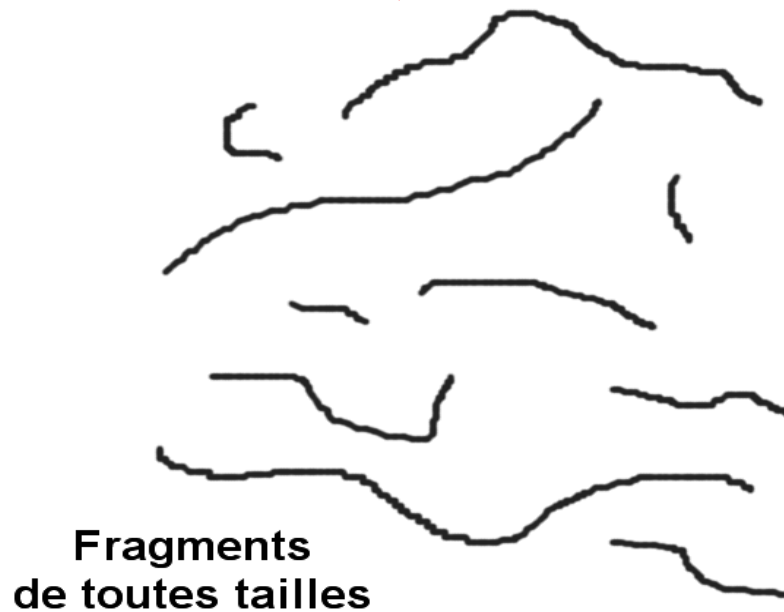


Fragmentation contrôlée de l'ADN

Digestion par une enzyme de restriction



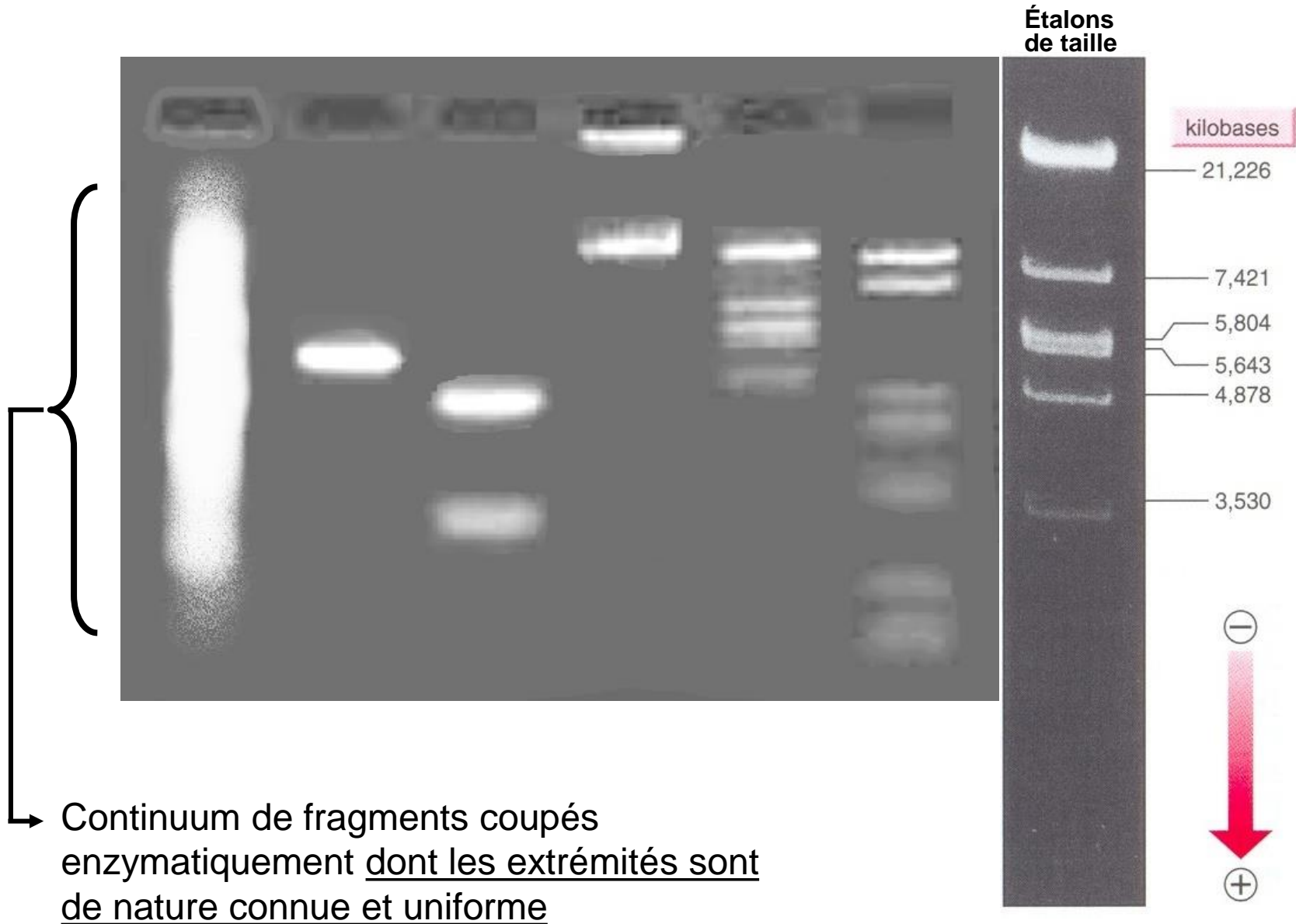
Eco RI

A thick red arrow pointing downwards, indicating the direction of the digestion process.

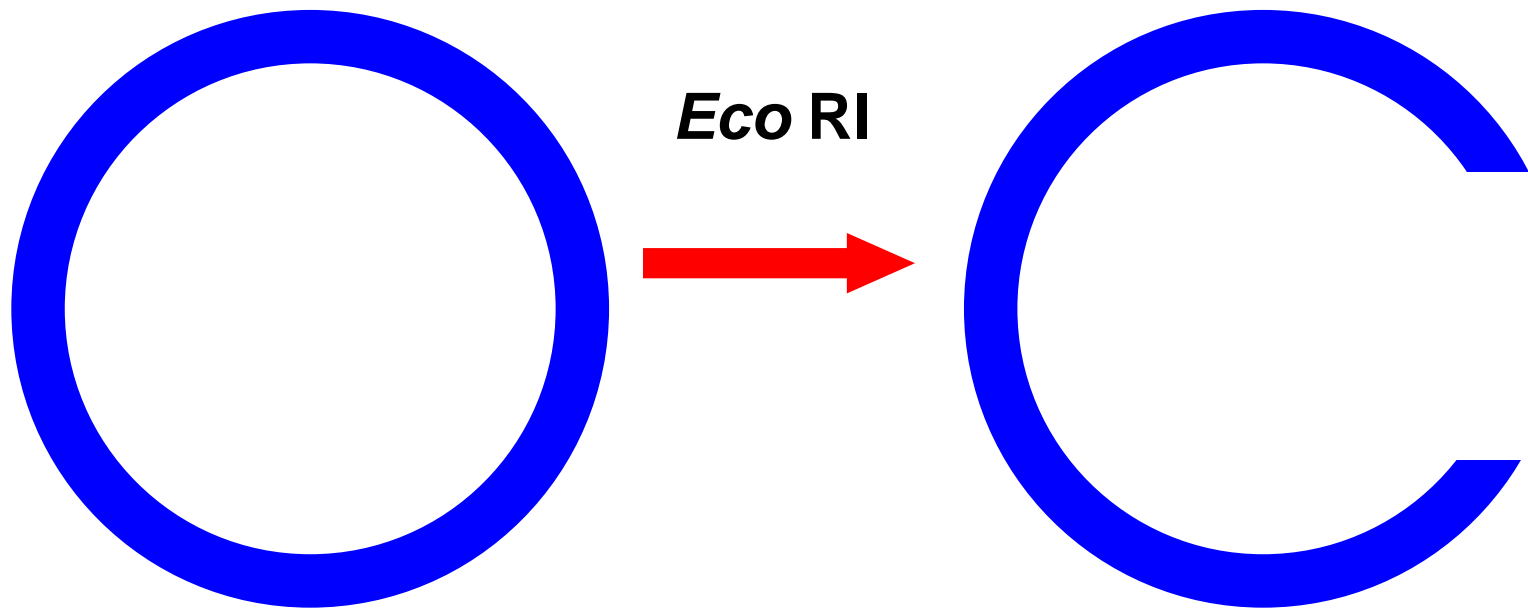
Fragments
de toutes tailles

Fragmentation contrôlée de l'ADN

Digestion par une enzyme de restriction

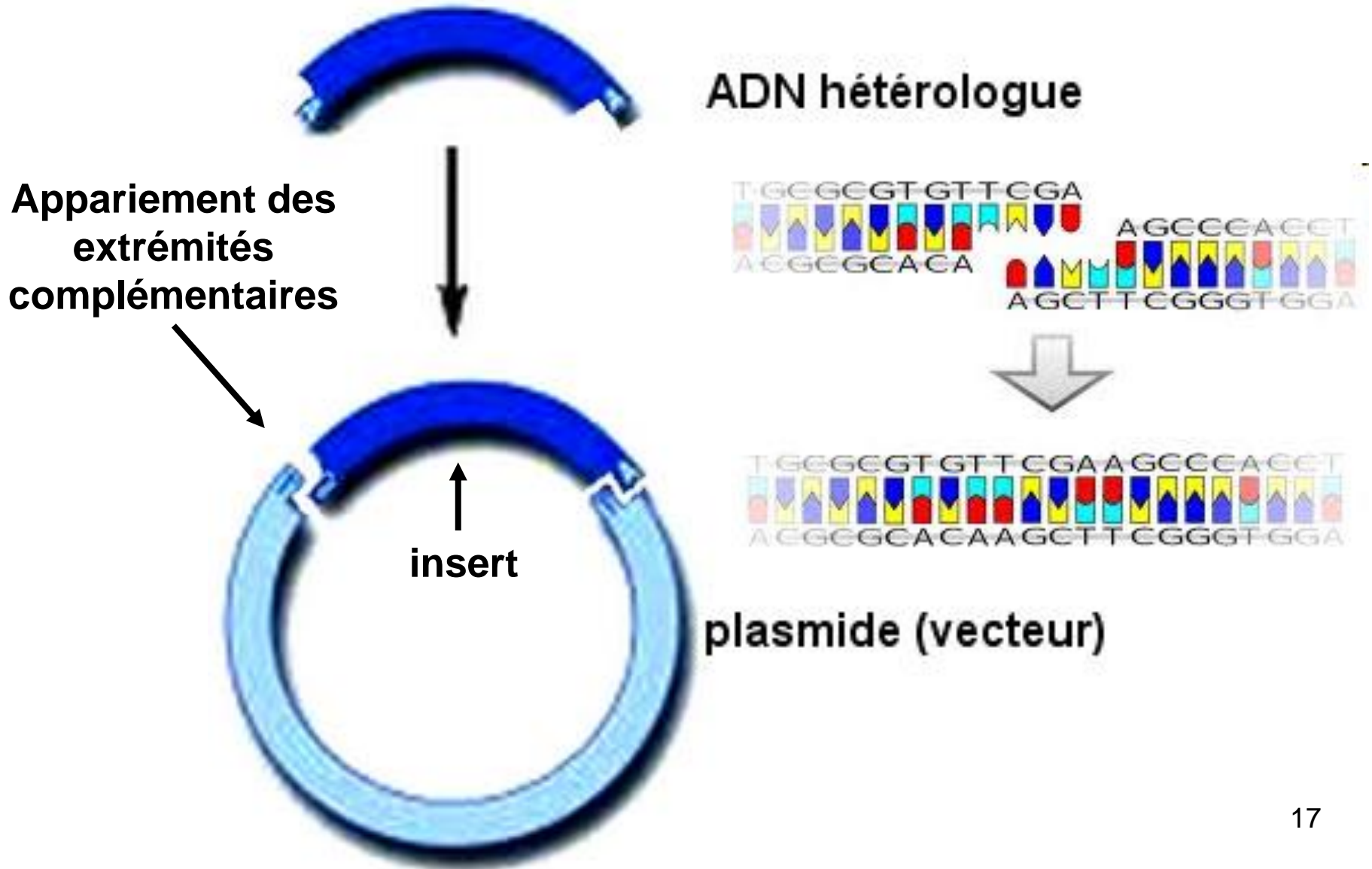


Digestion du plasmide par la même enzyme de restriction



Ligation de l'ADN hétérologue et du plasmide

Ligation par une ligase



Ligation de l'ADN hétérologue et du plasmide

Ligation par une ligase

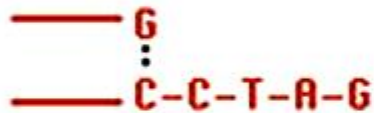
MOLECULE A



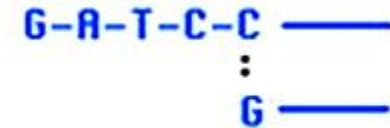
MOLECULE B



Digest each with same restriction endonuclease, **BamHI**



Sticky ends



Mix



Seal with DNA ligase (●)

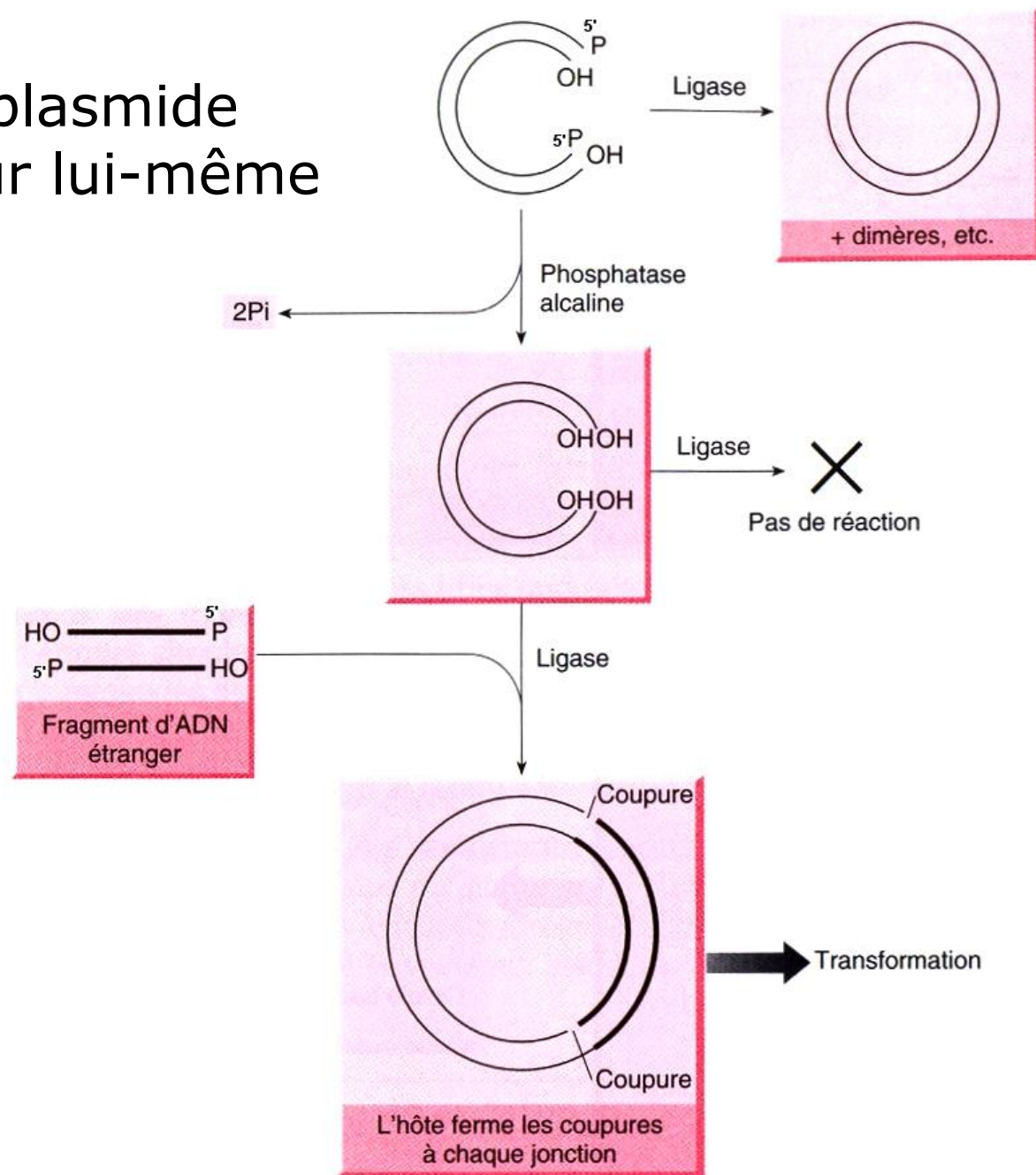


Recombinant DNA

Nouveaux liens covalents

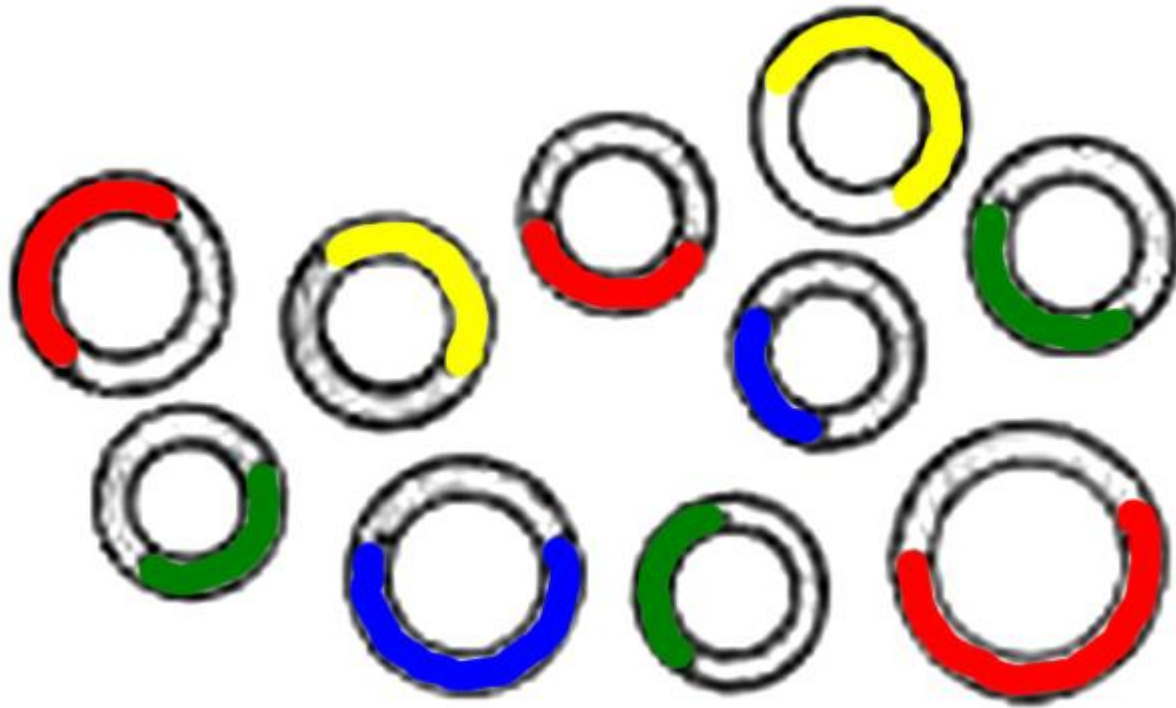
Ligation de l'ADN hétérologue et du plasmide

Éviter que le plasmide ne se referme sur lui-même

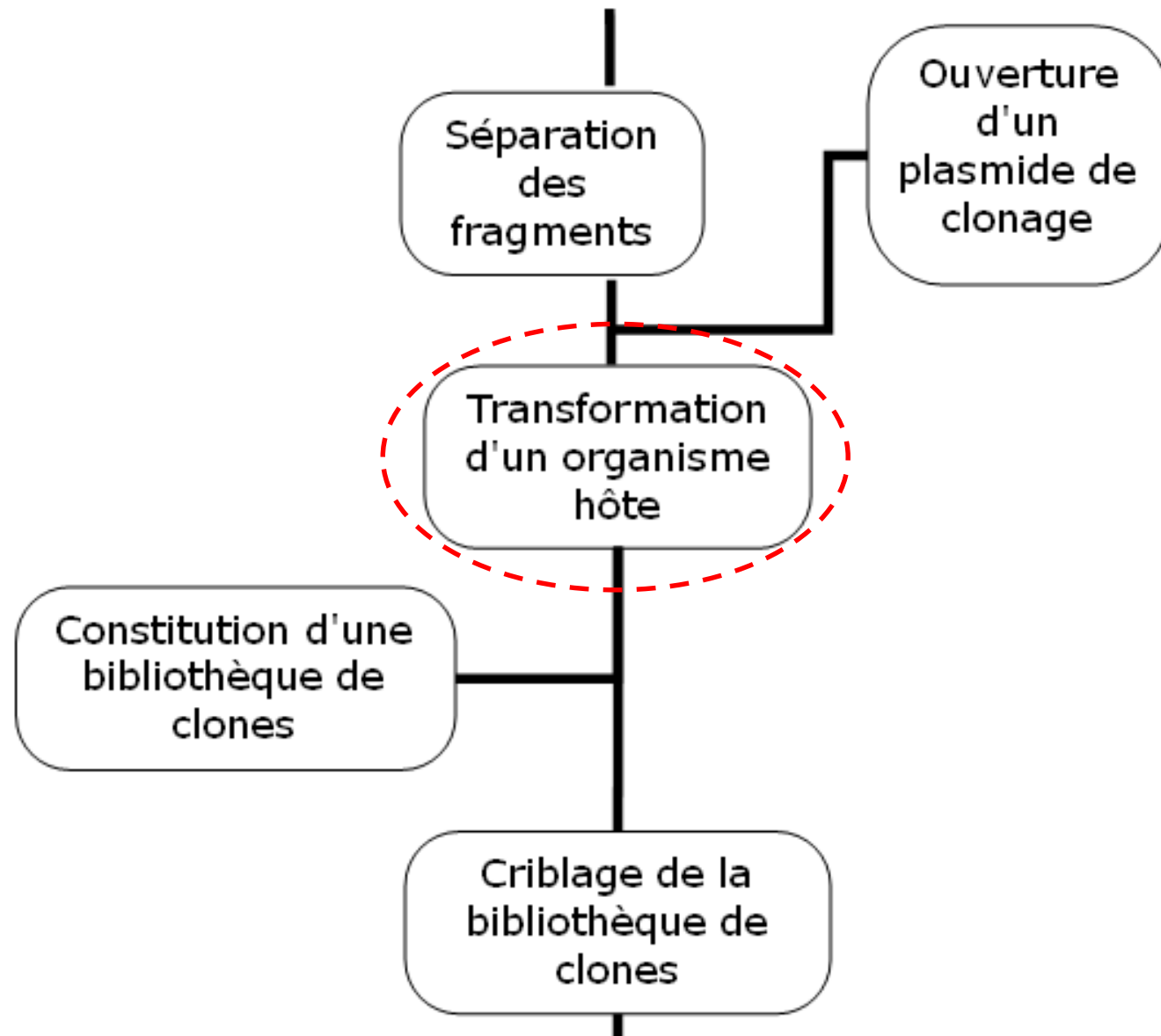


Ligation de l'ADN hétérologue et du plasmide

Le résultat de la ligation est un mélange de plasmides contenant des inserts différents

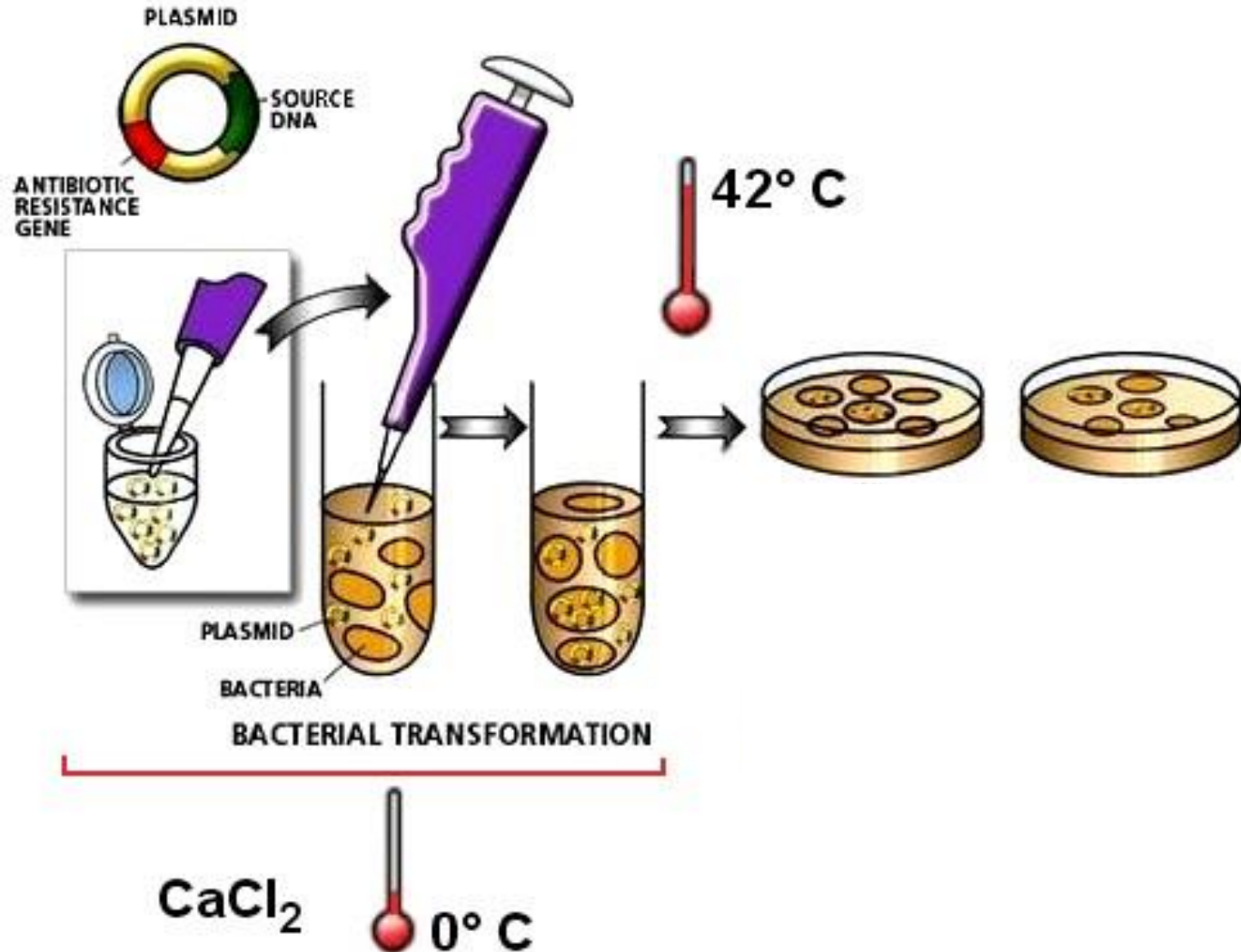


Stratégie générale pour le clonage d'un gène



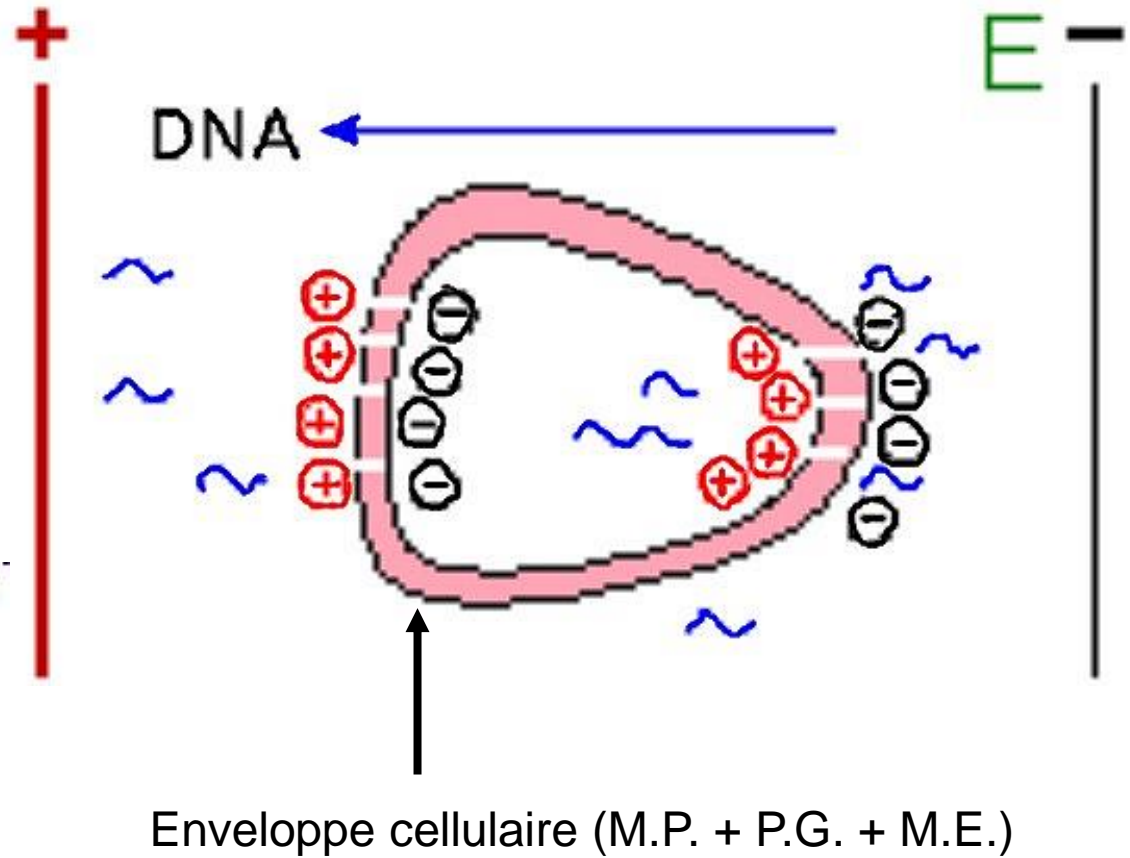
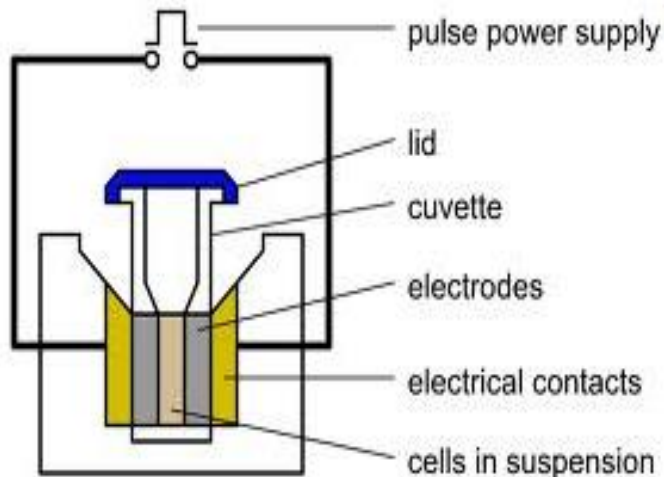
Transformation d'un organisme hôte

Transformation à froid en présence de Ca^{++}



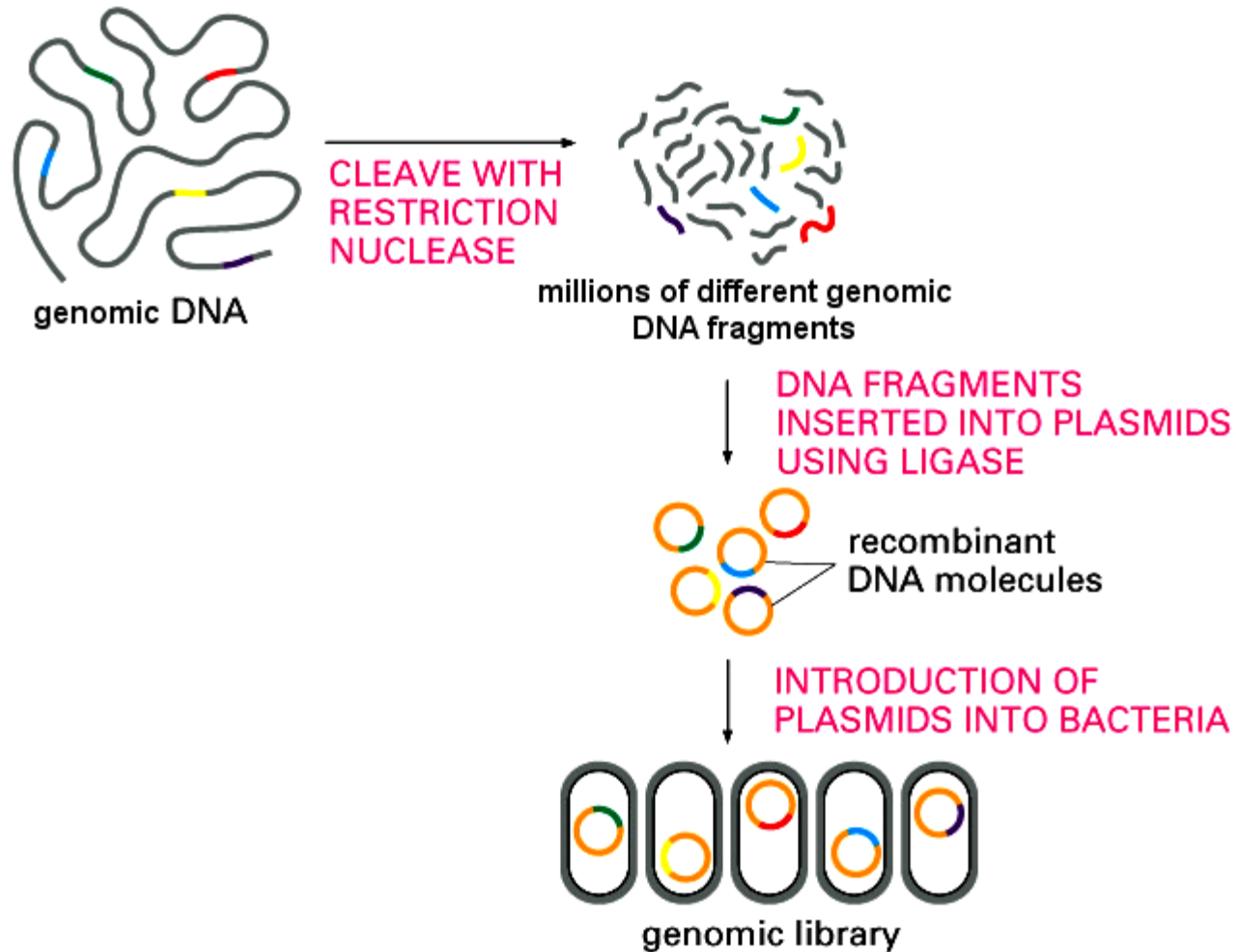
Transformation d'un organisme hôte

Transformation par électroporation



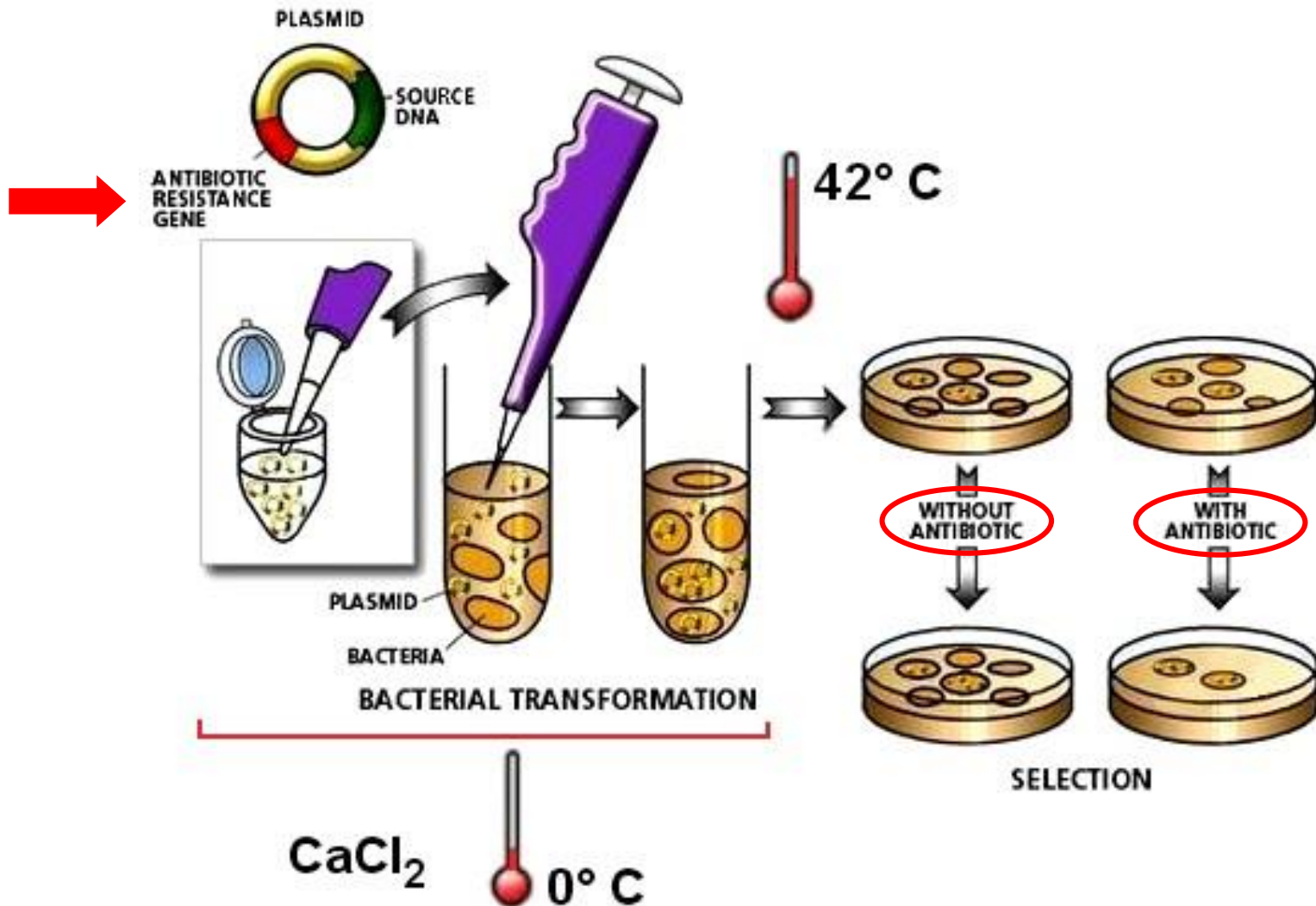
Obtention d'une bibliothèque génomique

Chaque plasmide différent entre dans une cellule bactérienne et constitue un clone différent



Criblage d'une bibliothèque génomique

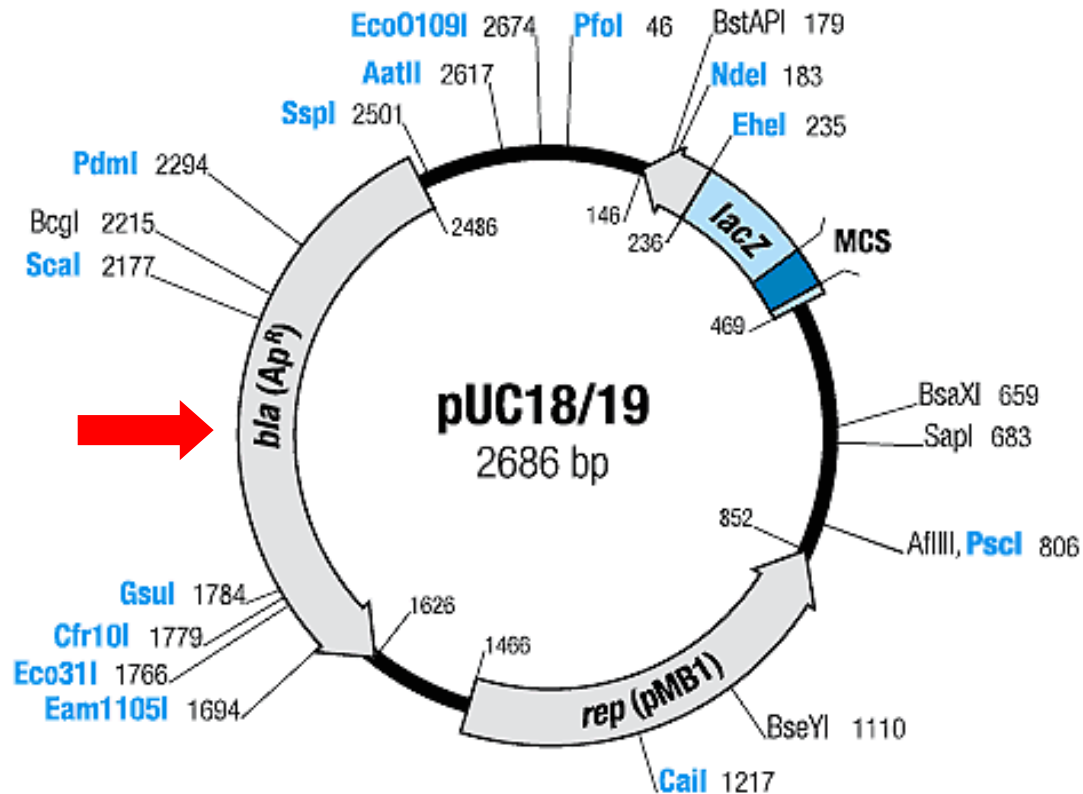
Éliminer les cellules non transformées : sélection à l'aide d'un gène marqueur conférant la résistance à un antibiotique



Criblage d'une bibliothèque génomique

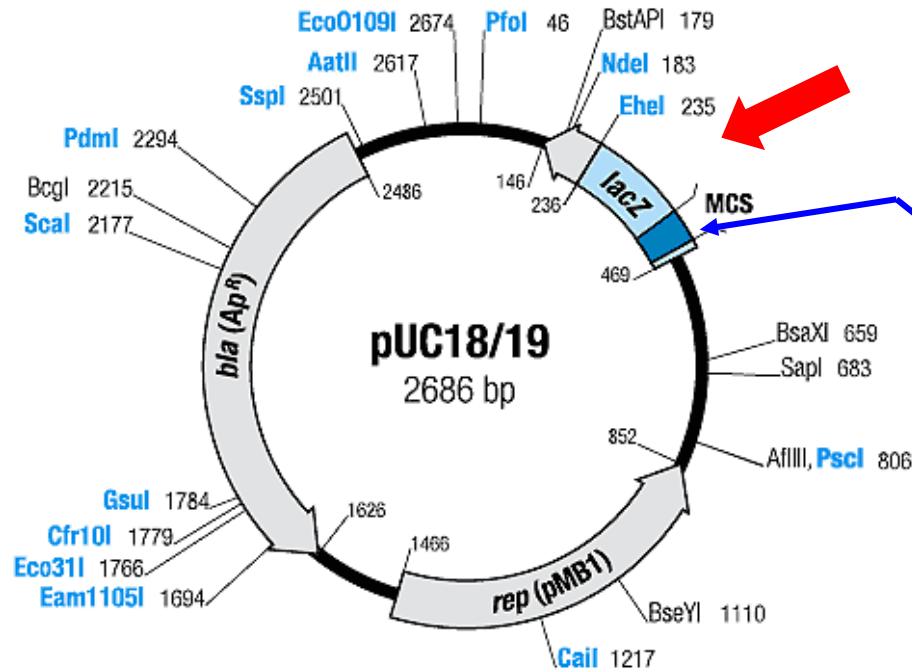
Éliminer les cellules non transformées : sélection à l'aide d'un gène marqueur conférant la résistance à un antibiotique situé sur le plasmide de clonage (ex. : pUC18)

Gène *bla* de résistance à l'ampicilline (code pour une bêta-lactamase)



Criblage d'une bibliothèque génomique

Éliminer les cellules possédant un plasmide « vide » :
sélection par la méthode « blanc/bleu » (α -complémentation)



Site de restriction
Eco RI

Séquence du site de clonage multiple (MCS) :

M13/pUC sequencing primer (-20), 17-mer

5' G TAA AAC GAC GGC CAG TGC CAA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG

3' C ATT TTG CTG CCG GTC ACG GTT CGA ACG TAC GGA CGT CCA GCT GAG ATC

LacZ ← Val Val Ala Leu Ala Leu Ser Ala His Arg Cys Thr Ser Glu Leu

Restriction sites: HindIII, PaeI, PstI, SdaI, BveI, HincII, Sall, XmiI, XbaI, BamHI, Cfr9I, Eco88I, SmaI, Acc65I, KpnI, Ecl136II, Eco24I, SacI, EcoRI, XapI, 485

AGG ATC CCC GGG TAC CGA GCT CGA ATT CGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'

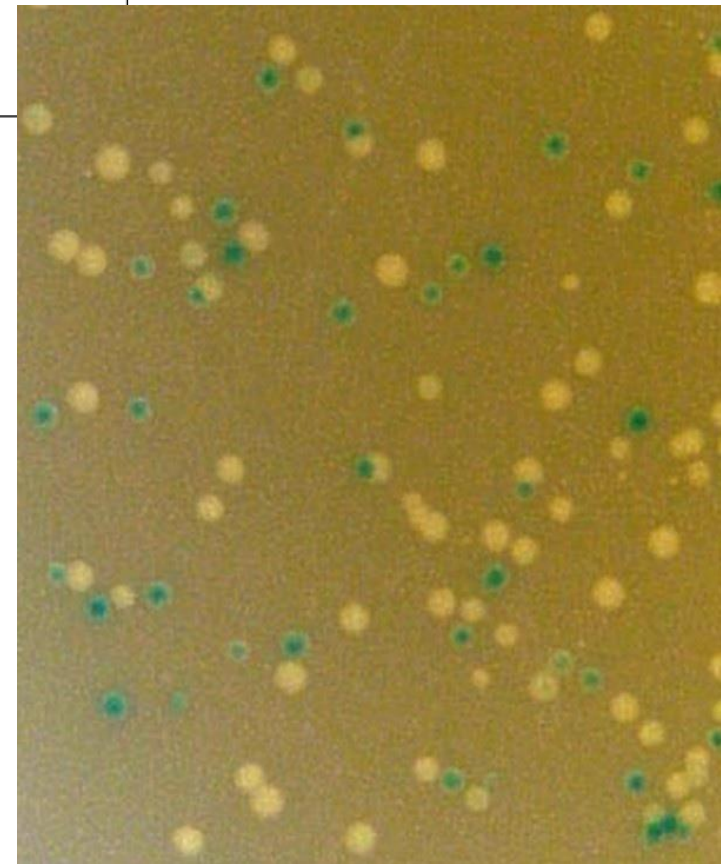
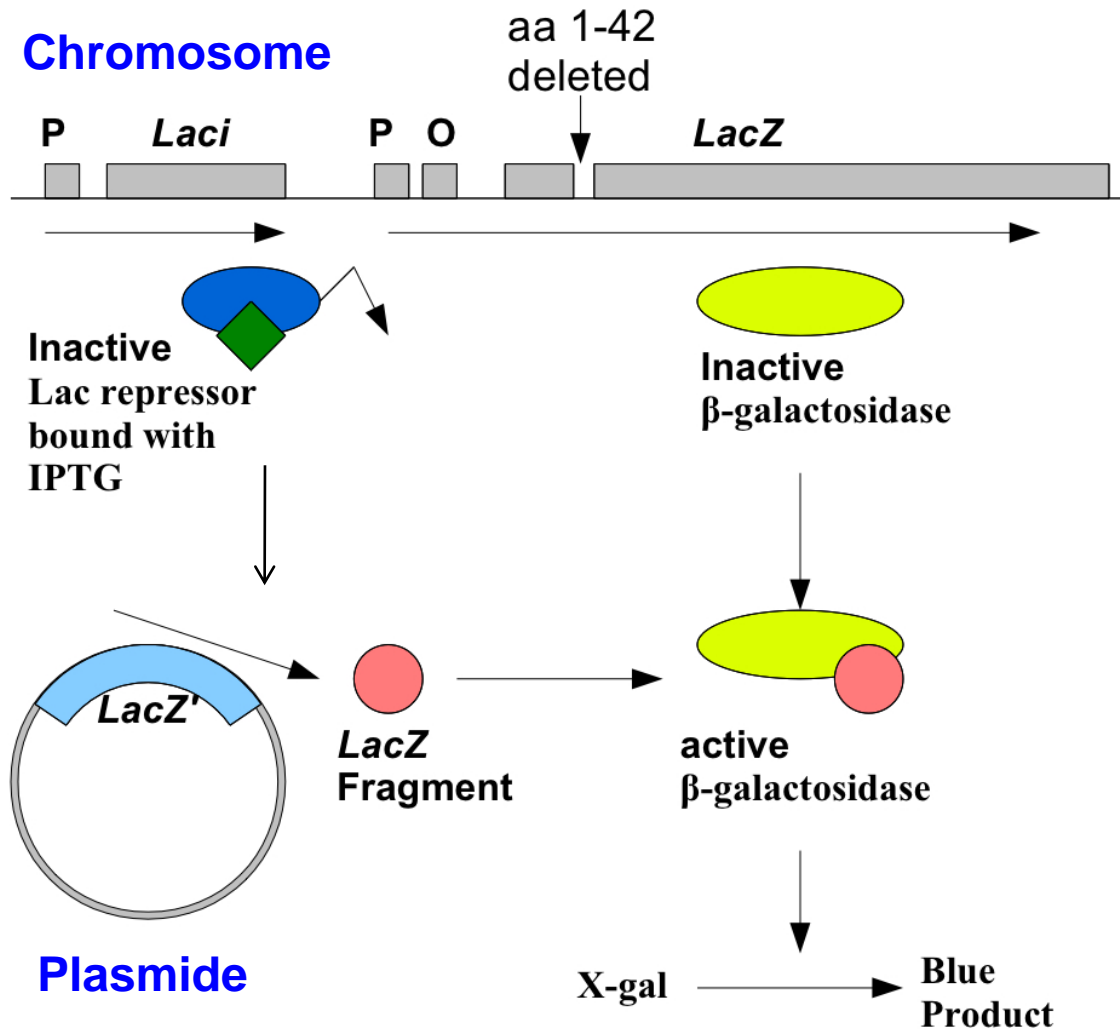
TCC TAG GGG CCC ATG GCT CGA GCT TAA GCA TTA GTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'

Pro Asp Gly Pro Val Ser Ser Ser Asn Thr Ile Met Thr Met

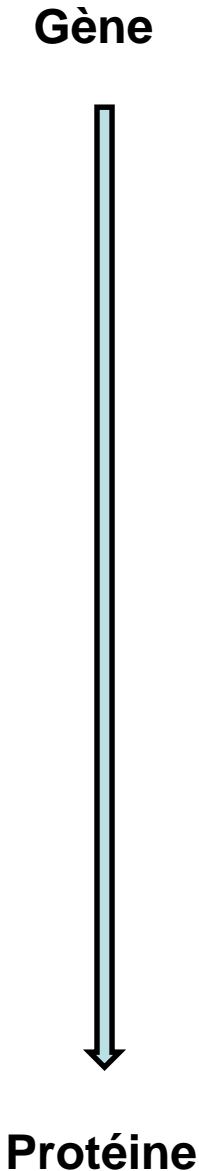
M13/pUC reverse sequencing primer (-28), 17-mer

Criblage d'une bibliothèque génomique

Éliminer les cellules possédant un plasmide « vide » :
sélection par la méthode « blanc/bleu » (α -complémentation)



Ce qu'il faut retenir



1- choix de la cible: ADNc ou gène (PCR + RT PCR)

2- Clonage: vecteur de type PLASMIDE ou autres

3- Séquençage (vérifier la séquence du gène)

4- Transformation bactérienne (2 méthodes)

5- Criblage des clones (sélection)

6- Expression du gène ou du CDNA: transcription + traduction
(Plasmides ou vecteur d'expression)

7- Production et purification :

**Protéine= Fonction???? Biotechnologies
Diverses...**