

# MANIPULATION DE L'ADN

# Jouer avec les brins

- double → simple : casser les liaisons hydrogène  
**dénaturation** (par chaleur ou agents chimiques)
- simple → double
  1. **hybridation** appariement de deux brins complémentaires
  2. enzymes (**polymérase**) pour compléter un brin (dans la présence de nucléotides à incorporer)

# Brins 2

hybridation : température de fusion (*melting temperature*) — 50% de ADN dénaturé  
 $T_m$  dépend de la séquence [G-C plus fort que A-T], et conditions expérimentales (agents chimiques)

approximation par formule de Wallace  $T_m = 2\{A, T\} + 4\{C, G\}$  [en Celsius]

polymérase : construit le brin  $5' \rightarrow 3'$  à partir d'une région déjà complémentée  
(**primer**)

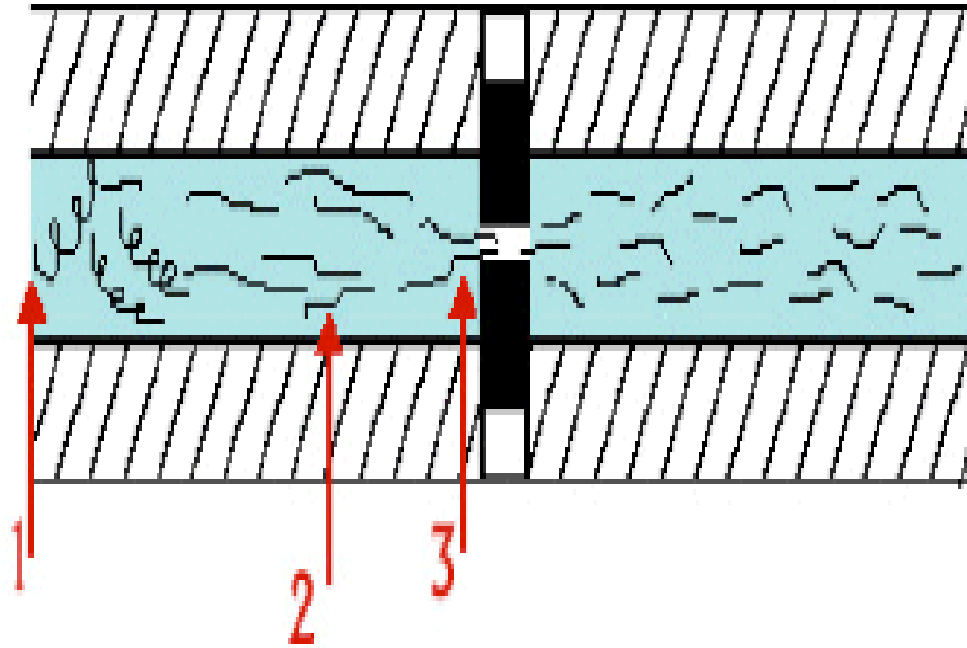
primer aléatoire (tous 6mers) ou sélectionné

# Comment couper l'ADN en petits morceaux ?

1. au hasard (p.e., **sonication** — par ondes de haute fréquence, **cisaillement**/*shearing*)

2. moins hasard (répérable) : **enzymes de restriction**

# Cisaillement



cisaillement hydrodynamique : les molécules s'accélèrent en approchant la région étroite : les forces d'allongation brise les molécules

# Enzymes de restriction

**endonucléase** — coupe l'ADN à un site spécifique (4–8 pb typiquement)

| Nom                     | Site    |
|-------------------------|---------|
| AluI                    | AG.CT   |
| EcoRI                   | G.AATTC |
| HindIII                 | A.AGCTT |
| centaines d'autres. . . |         |

# ER 2

site d'un ER est un palindrôme : le complément inverse a la même séquence



*sticky ends*

⇒ hybridation d'amorces compatibles (d'origines différentes)

+ enzyme de **ligase** pour les liaisons covalentes

# ER 3

Site reconnu et point de clivage

| Nom   | Site    |
|-------|---------|
| KasI  | G.GCGCC |
| NarI  | GG.CGCC |
| EheI  | GGC.GCC |
| BbeI  | GGCGC.C |
| HaeII | RGCGC.Y |

$(R = \{A, G\}, Y = \{C, T\})$

KasI – BbeI sont *isoschisomeres*)

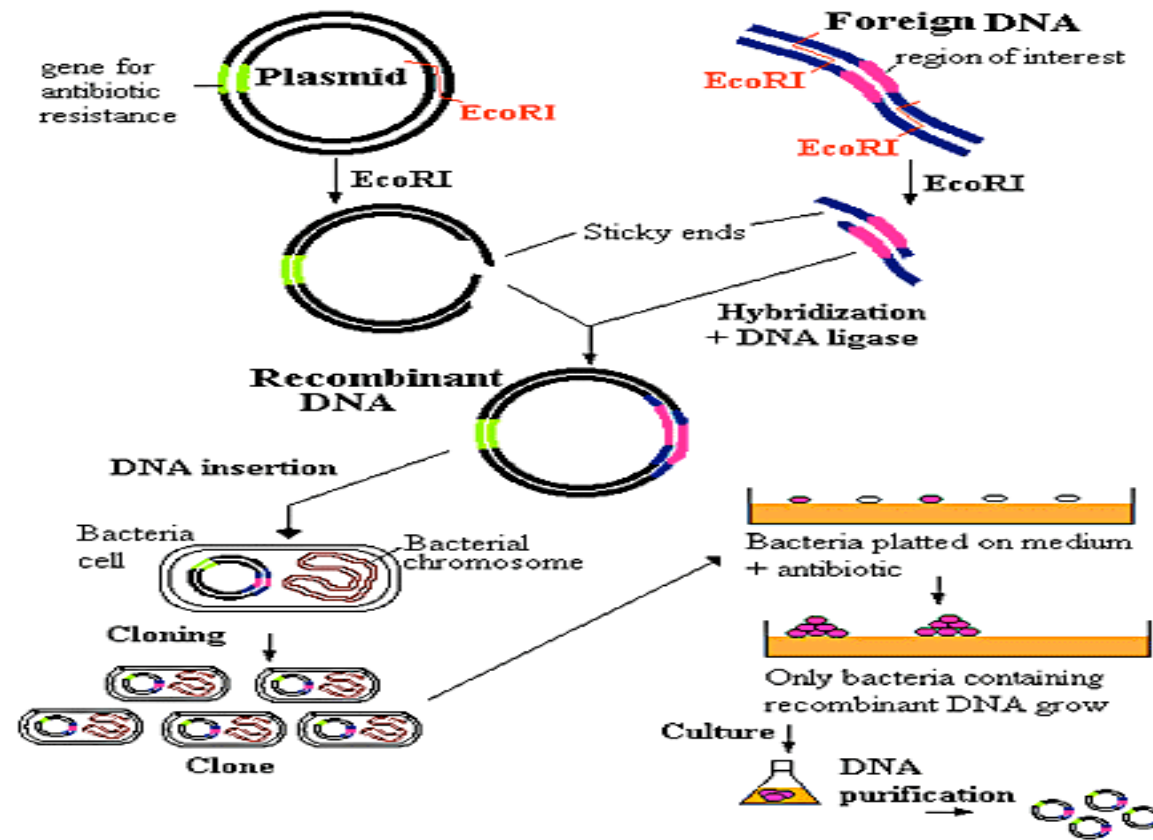
HaeII et BbeI sont *compatibles* : v. sticky end GGCGC

# Clonage : idée

Pour créer des copies de fragments d'ADN (amplification *in vivo*)

1. fragments d'ADN (après coupure par ER)
2. insertion dans **vecteur** d'une cellule hôte (bactérienne ou virale)
3. culture et purification

# Clonage



## Cloning into a plasmid

Lodish et al. *Molecular Cell Biology*, 4th ed., W. H. Freeman 1999; [Access Excellence](#)

# Plasmid

Caractéristiques nécessaires :

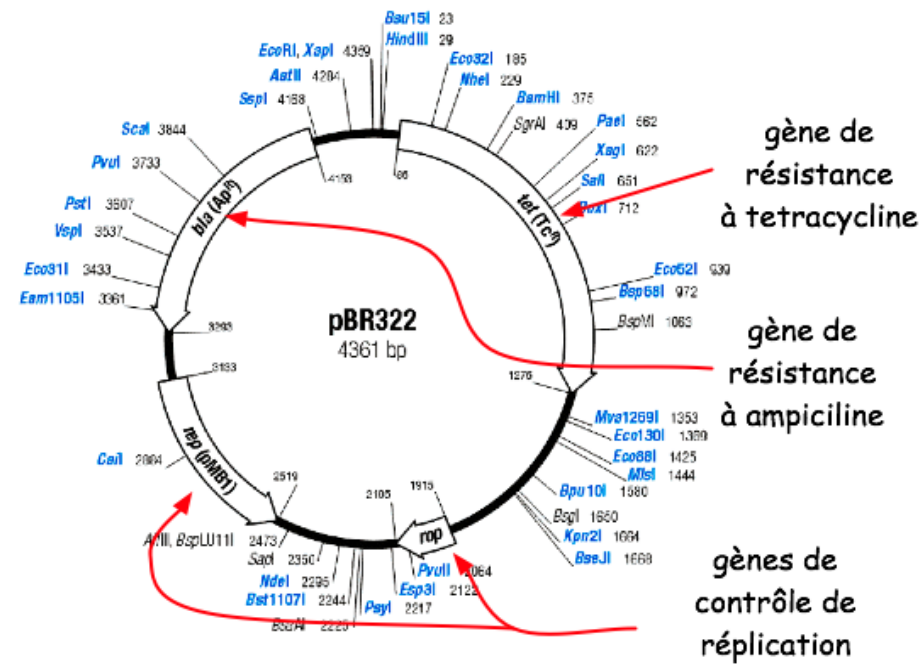
**(Ins)** site de restriction (avec *sticky ends*) pour insertion

**(Pla)** criblage pour cellules avec plasmids

**(Frg)** criblage pour plasmids avec fragments insérés

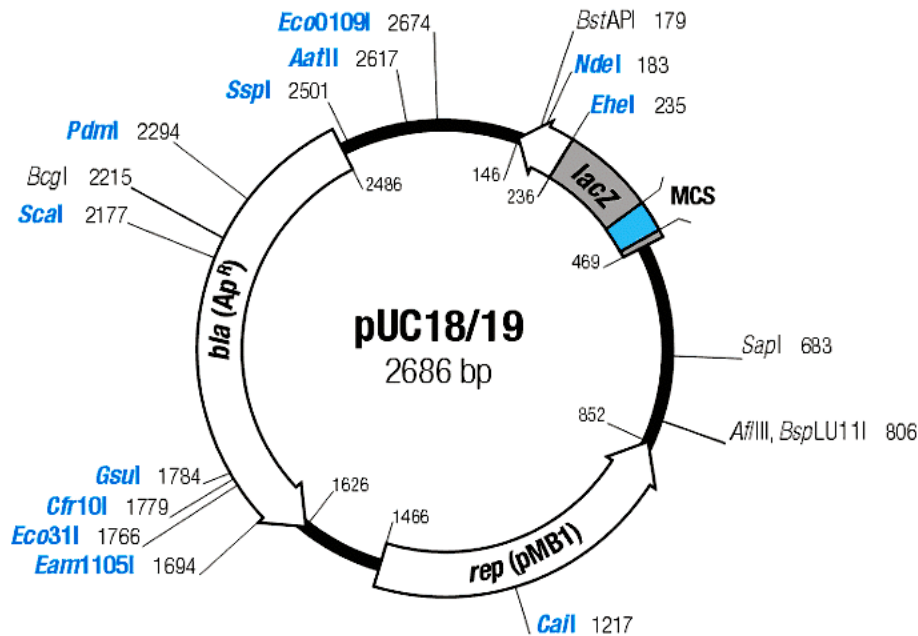
Thème général de **(Frg)** : fonction d'un gène interrompue par l'insertion

pBR322



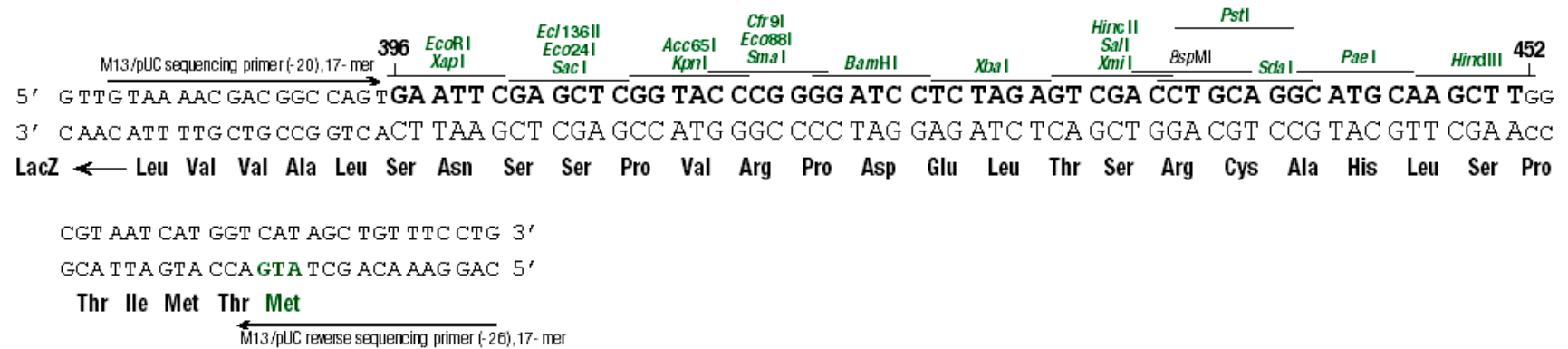
**(Ins)** : site de *Bam*HI (375), **(Pla)** : *bla*, **(Frg)** : copie + *tet*

# pUC18



**(Ins)** : Multiple Cloning Site, **(Pla)** : *bla*, **(Frg)** : *lacZ* (colonies bleues en présence de X-gal sans insertion, blanches avec)

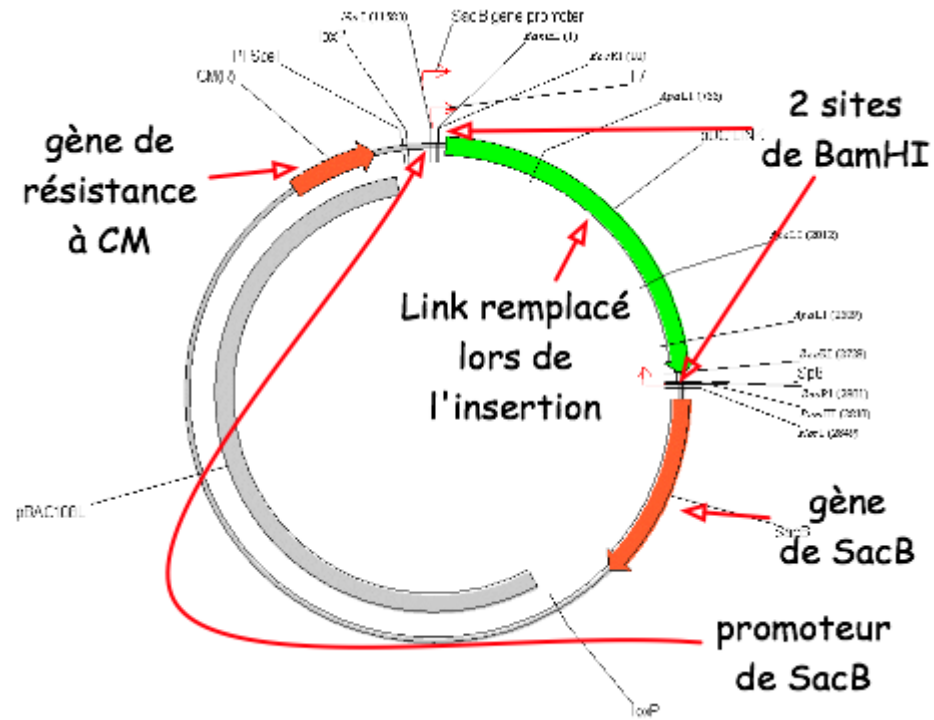
# Multiple Cloning Site



# Vecteurs

| <b>Vecteur</b>  | <b>Hôte</b>          | <b>Taille d'insert (<math>\times 1000</math> pb)</b> |
|-----------------|----------------------|------------------------------------------------------|
| M13             | <i>E. coli</i>       | 1–4                                                  |
| Plasmid         | <i>E. coli</i>       | 1–5                                                  |
| Phage $\lambda$ | <i>E. coli</i>       | 2–25                                                 |
| Cosmid          | <i>E. coli</i>       | 35–45                                                |
| BAC             | <i>E. coli</i>       | 50–300                                               |
| YAC             | <i>S. cerevisiae</i> | 100–2000                                             |

# BAC

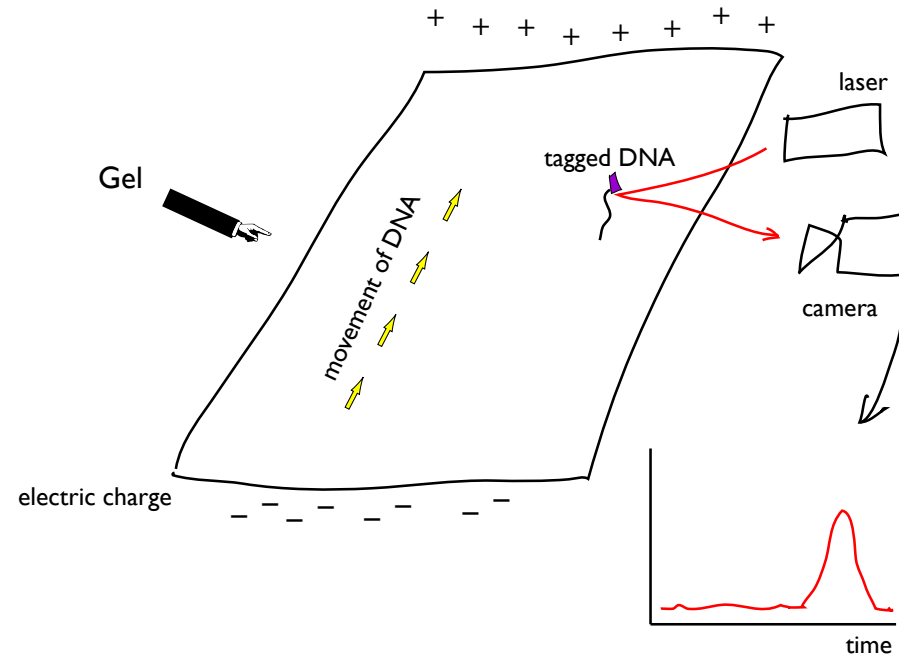


**(Ins)** : LINK remplacé (paires de sites de restriction), **(Pla)** :  $\text{CM}^{\text{R}}$ , **(Frg)** : SacB (produit une toxine)

CHORI BACPAC

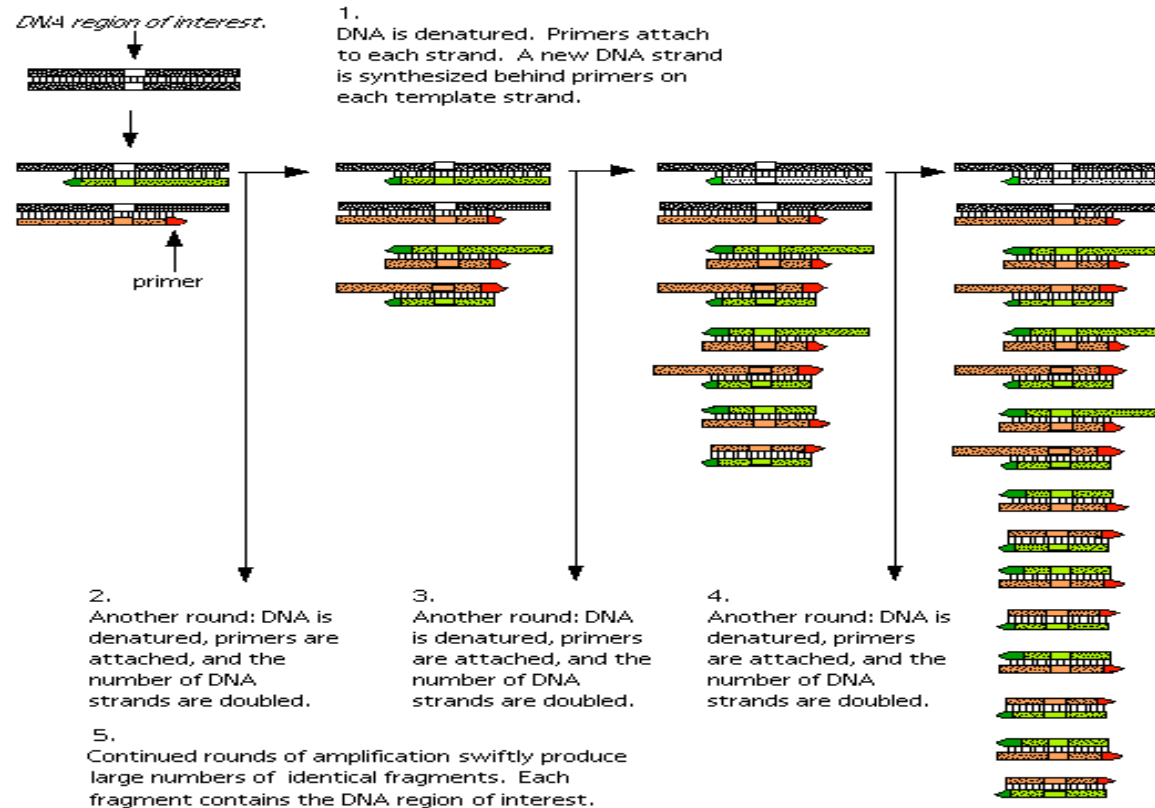
# Electrophorèse

mesure la taille d'un fragment ADN

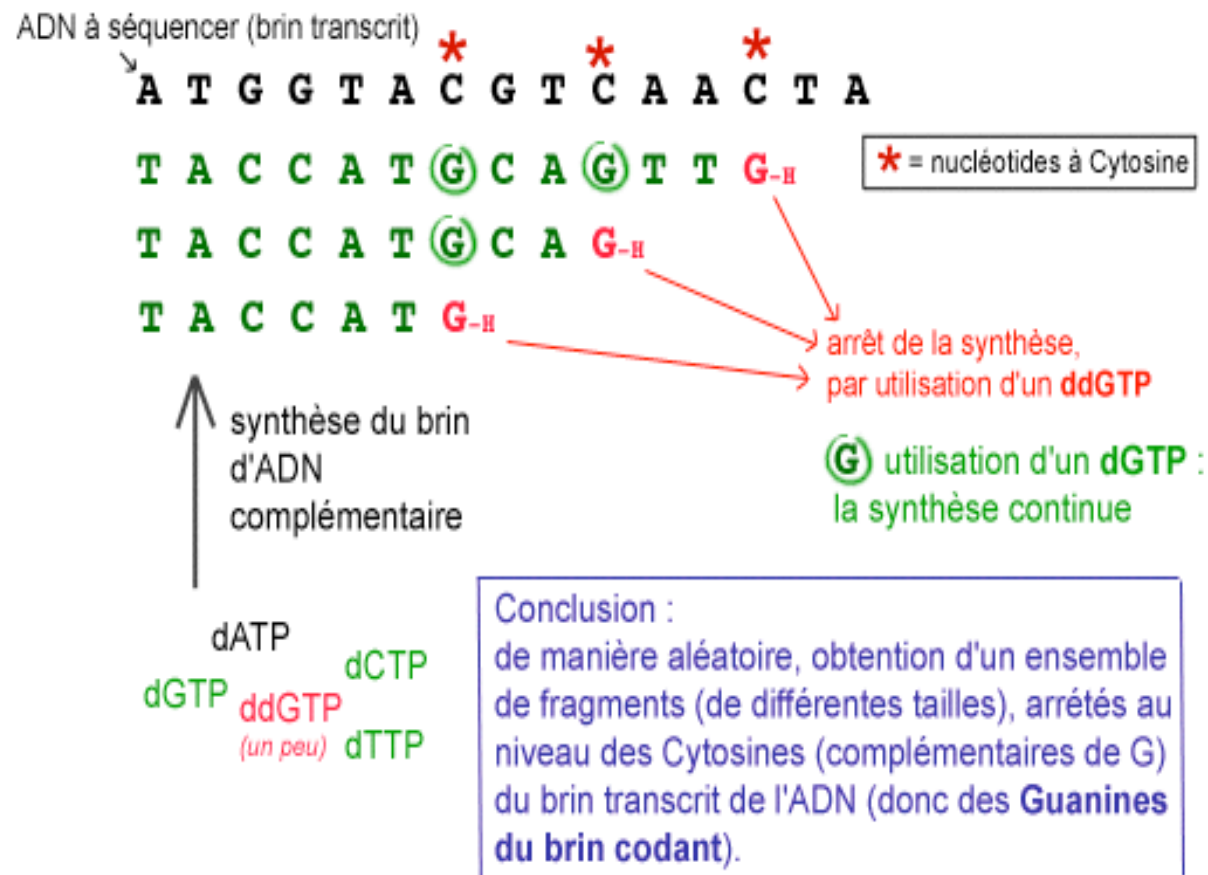


# Polymerase Chain Reaction

## POLYMERASE CHAIN REACTION



# Séquençage — méthode Sanger



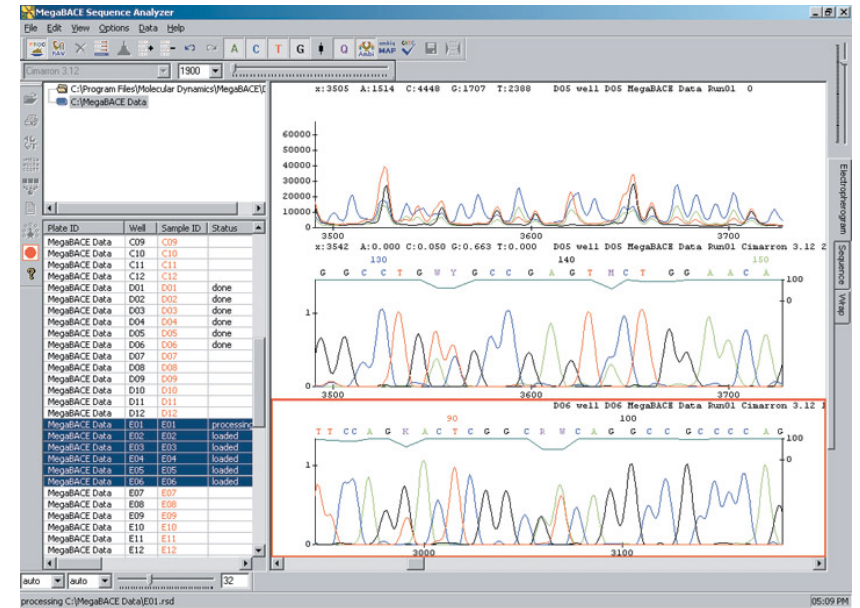
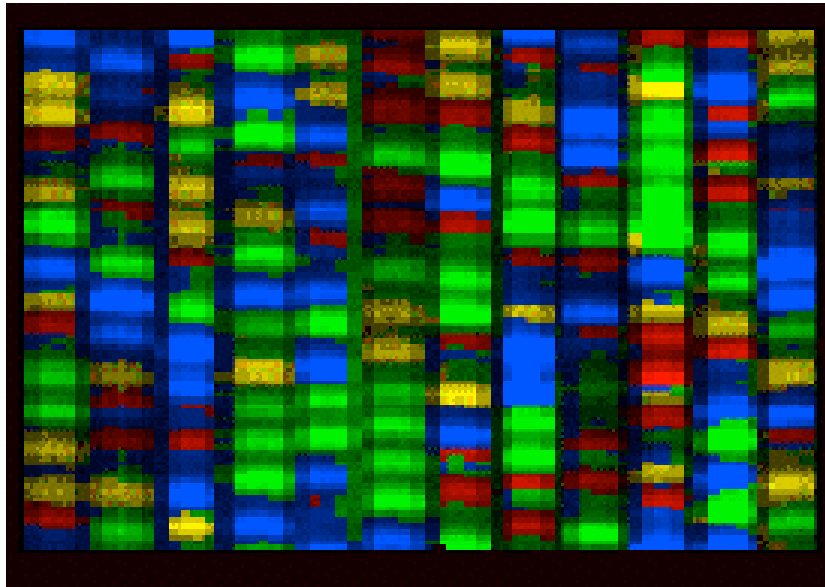
Lodish et al. *Molecular Cell Biology*, 4th ed., W. H. Freeman 1999 ; Delarue et Furelaud, Jussieu

# Séquençage automatique

→ marqueurs fluorescents, multiplexage, capillaires, cycleurs thermiques

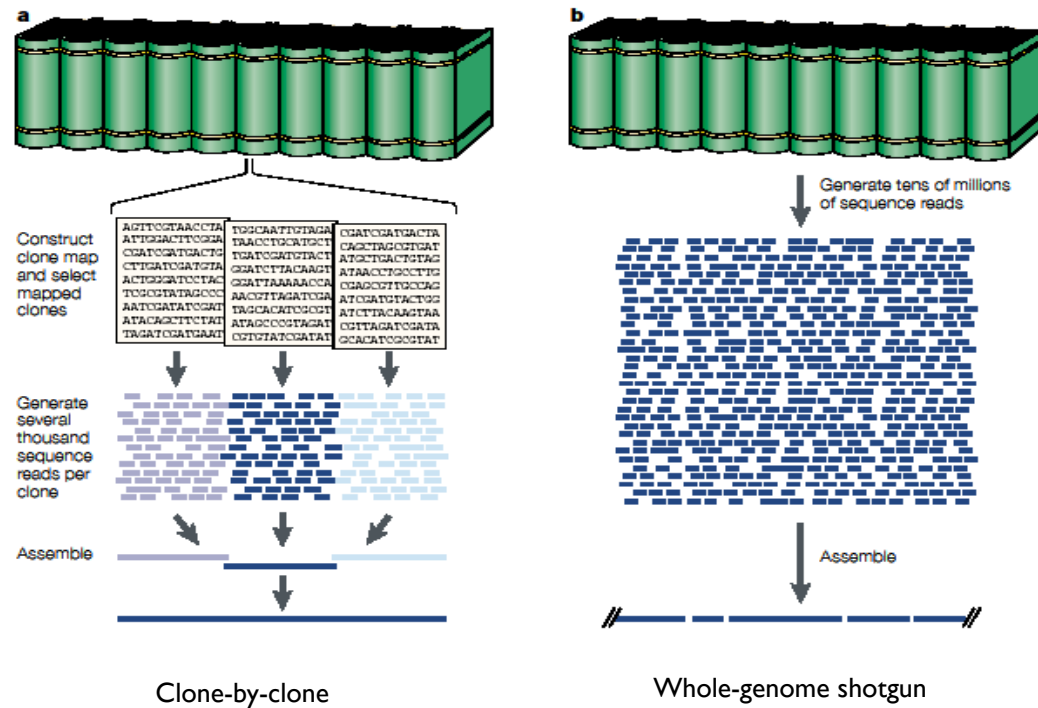
tailles jusqu'à 1000 pb (typiquement 600 pb)

# Electrophorèse en séquençage



<http://www.megabace.com/>

# Séquençage d'un génome



E. Green. Nature Reviews Genetics 2:573 (2001)

# Approche hiérarchique

