

Clonage de l'ADN

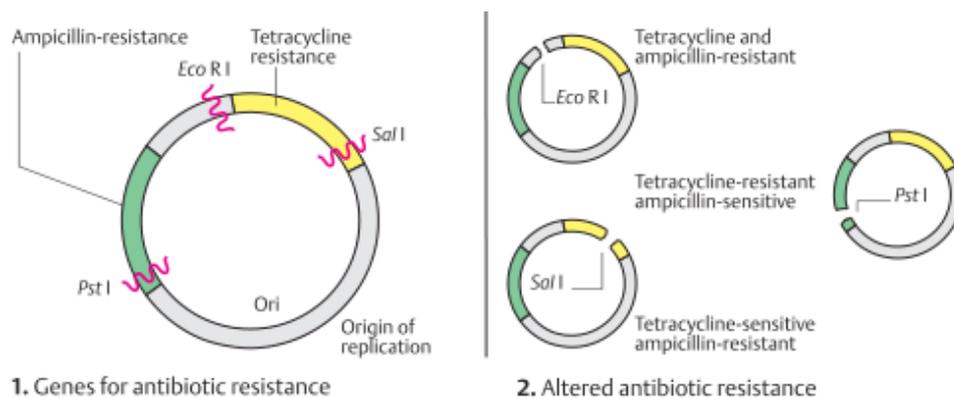
Pour obtenir des quantités suffisantes d'une séquence d'ADN spécifique (par exemple, un gène d'intérêt) pour l'étude, il faut l'amplifier sélectivement. Ceci est accompli par clonage d'ADN, qui produit une population homogène de fragments d'ADN à partir d'un mélange de molécules d'ADN très différentes ou de tout l'ADN du génome. Ici, des procédures sont nécessaires pour identifier l'ADN de la région correcte dans le génome, pour le séparer du reste de l'ADN, et pour le multiplier (cloner) sélectivement. L'identification du fragment d'ADN correct utilise l'hybridation spécifique d'ADN simple brin complémentaire (hybridation moléculaire). Un court segment d'ADN monocaténaire, issu de la séquence à étudier, s'hybridera à ses séquences complémentaires après dénaturation (simple brin, voir analyse par transfert de Southern). Après que la séquence hybridée a été séparée d'un autre ADN, elle peut être clonée. Les séquences d'ADN sélectionnées peuvent être amplifiées de deux manières fondamentales: dans des cellules (clonage à base de cellules) ou par clonage sans cellule.

Clonage d'ADN dans les cellules

Le clonage d'ADN à base de cellules nécessite quatre étapes initiales. Tout d'abord, une collection de différents fragments d'ADN est obtenue à partir de l'ADN désiré (ADN cible) en le clivant avec une enzyme de restriction. Puisque les fragments résultant du clivage par l'enzyme de restriction ont une courte extrémité simple brin d'une séquence spécifique aux deux extrémités, ils peuvent être ligaturés à d'autres fragments d'ADN qui ont été clivés avec la même enzyme. Les fragments produits à l'étape 1 sont joints à des fragments d'ADN contenant l'origine de réplication (OR) d'un réplicon, ce qui leur permet de se répliquer. De plus, un fragment peut être lié à un marqueur sélectionnable, par exemple, une

séquence d'ADN contenant un gène de résistance à un antibiotique. Les molécules d'ADN recombinant sont transférées dans des cellules hôtes (cellules bactériennes ou de levure). Ici, les molécules d'ADN recombinant peuvent se répliquer indépendamment du génome de la cellule hôte. Habituellement, la cellule hôte ne prend qu'une seule molécule d'ADN étrangère (bien qu'occasionnellement plus d'une). Les cellules hôtes transformées par l'ADN recombinant (étranger) sont cultivées en culture et multipliées (propagation, 4). La croissance sélective de l'un des clones cellulaires permet l'isolement d'un type de molécule d'ADN recombinant (5). Après une nouvelle propagation, une population homogène de molécules d'ADN recombinant est obtenue (6). Une collection de différents fragments d'ADN cloné est appelée une bibliothèque de clones (7, voir les banques d'ADN). Dans le clonage à base de cellules, les molécules d'ADN contenant des réplicons sont appelées molécules de vecteur.

Un vecteur plasmidique pour le clonage



Un vecteur plasmidique pour le clonage

De nombreux systèmes vectoriels différents existent pour le clonage de fragments d'ADN de différentes tailles. Les vecteurs plasmidiques sont utilisés pour cloner de petits fragments. L'expérience est conçue de telle sorte que l'incorporation du fragment à cloner modifie la résistance aux

antibiotiques du plasmide pour permettre la sélection de ces plasmides recombinants. Un vecteur plasmatique utilisé fréquemment (pBR322) est sélectionné. Ce plasmide contient des sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction PstI, EcoRI et SalI en plus des gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. Si un fragment d'ADN étranger est incorporé dans le plasmide au site de la séquence de reconnaissance EcoRI, alors la résistance à la tétracycline et à l'ampicilline sera conservée (2). Si l'enzyme PstI est utilisée pour incorporer le fragment à utiliser, la résistance à l'ampicilline est perdue (la bactérie devient sensible à l'ampicilline), mais la résistance à la tétracycline est conservée. Si l'enzyme Sali est utilisée pour incorporer le fragment, la résistance à la tetracycline disparaît (la bactérie devient sensible à la tetracycline), mais la résistance à l'ampicilline est conservée. Ainsi, en fonction de la manière dont le fragment a été incorporé, les plasmides recombinants contenant le fragment d'ADN à cloner peuvent être distingués des plasmides non recombinants par une résistance aux antibiotiques modifiée. Le clonage dans les plasmides (bactéries) est devenu moins important depuis que des chromosomes artificiels de levure (YAC) sont devenus disponibles pour le clonage de fragments d'ADN relativement grands.