

Clonage de l'ADNc

L'ADNc est un segment monocaténaire d'ADN complémentaire de l'ARNm d'un segment d'ADN codant ou d'un gène entier. Il peut être utilisé comme sonde (sonde d'ADNc par opposition à une sonde génomique) pour le gène correspondant car il est complémentaire aux sections codantes (exons) du gène. Si le gène a été altéré par un réarrangement structural sur un site correspondant, par exemple par délétion, l'ADN normal et muté peuvent être différenciés. Ainsi, la préparation et le clonage de l'ADNc sont d'une grande importance. A partir de la séquence d'ADNc, des inférences essentielles peuvent être faites sur un gène et son produit génique. <fn>Watson, J.D., et al., Molecular Biology of the Gene, 3e éd. Benjamin / Cummings Publishing Co., Menlo Park, Californie, 1987. </fn>

Préparation de l'ADNc

L'ADNc est préparé à partir de l'ARNm. Par conséquent, un tissu est requis dans lequel le gène respectif est transcrit et l'ARNm est produit en quantités suffisantes. Premièrement, l'ARNm est isolé. Ensuite, une amorce est attachée de sorte que l'enzyme transcriptase inverse puisse former de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARNm. Puisque l'ARNm contient du poly (A) à son extrémité 3', une amorce de poly (T) peut être attachée. A partir de là, l'enzyme transcriptase inverse peut commencer à former de l'ADNc dans la direction 5' vers 3'. L'ARN est ensuite éliminé par la ribonucléase. L'ADNc sert de modèle pour la formation d'un nouveau brin d'ADN. Cela nécessite l'enzyme ADN polymérase. Le résultat est un double brin d'ADN, dont un brin est complémentaire de l'ARNm d'origine. A cet ADN, des séquences uniques (linkers) sont attachées qui sont complémentaires des extrémités monocaténaires produites par l'enzyme de restriction à utiliser. La même enzyme est utilisée pour couper le vecteur, par exemple un plasmide, de sorte que l'ADNc peut être

incorporé pour le clonage.

Vecteurs de clonage

Le clonage cellulaire de fragments d'ADN de différentes tailles est facilité par une grande variété de systèmes de vecteurs. Les vecteurs plasmidiques sont utilisés pour cloner de petits fragments d'ADN dans des bactéries. Leur principal inconvénient est que seulement 5-10 kb d'ADN étranger peuvent être clonés. Un vecteur de clonage plasmidique qui a absorbé un fragment d'ADN (vecteur recombinant), par exemple pUC8 avec 2,7 kb d'ADN, doit être distingué de celui qui ne l'a pas. De plus, un gène de résistance à l'ampicilline (Amp +) sert à distinguer les bactéries qui ont absorbé des plasmides de celles qui n'en ont pas. Plusieurs sites de restriction uniques dans le segment d'ADN plasmidique où un fragment d'ADN pourrait être inséré servent de marqueurs avec un gène marqueur, tel que le gène lacZ. L'absorption d'un fragment d'ADN par un vecteur plasmidique perturbe le gène marqueur du plasmide. Ainsi, dans le plasmide recombinant, l'enzyme β -galactosidase ne sera pas produite par le gène lacZ rompu, alors que dans le plasmide sans insert d'ADN (non recombinant), l'enzyme est produite par le gène lacZ encore intact. L'activité du gène et la présence ou l'absence de l'enzyme sont déterminées en observant une différence de couleur des colonies en présence d'un substrat de sucre artificiel. β -Galactosidase divise un sucre artificiel (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside) qui est similaire au lactose, le substrat naturel pour cette enzyme, en deux composants de sucre, dont l'un est bleu. Ainsi, les colonies bactériennes contenant des plasmides non recombinants avec un gène lacZ intact sont bleues. En revanche, les colonies qui ne sont pas des vecteurs recombinants restent pâles et blanches. Ces derniers sont cultivés dans un milieu contenant de l'ampicilline (le marqueur sélectionnable pour l'absorption des vecteurs plasmidiques). Par la suite, une bibliothèque de clones peut être construite. (Figure adaptée

de Brown, 1999).

Clonage de l'ADNc

Seules ces bactéries deviennent résistantes à l'ampicilline et ont incorporé un plasmide recombinant. Les plasmides recombinants, qui contiennent le gène de résistance à l'ampicilline, transforment les bactéries sensibles à l'ampicilline en bactéries résistantes à l'ampicilline. Dans un milieu contenant de l'ampicilline, seules les bactéries qui contiennent le plasmide recombinant avec le fragment d'ADN désiré se développent. Par une répllication supplémentaire dans ces bactéries, le fragment peut être clone jusqu'à ce qu'il y ait suffisamment de matière à étudier. (Figures d'après Watson et al., 1987).



Principe du Clonage de l'ADNc

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 plasmidique 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 tétracycline disparaît (la bactérie devient sensible à la tétracycline), 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.