

# Outils de la BM (2)

- Manipuler
  - Clonage
  - Séquençage de l'ADN
- Séparer/ Détecter
- Fusions génétiques
- GFP

# Séquençage d'ADN

T A A G C T T G G G C A

T A A G C T T G G G C

T A A G C T T G G G

T A A G C T T G G

T A A G C T T G

T A A G C T T

T A A G C T

T A A G C

T A A G

T A A

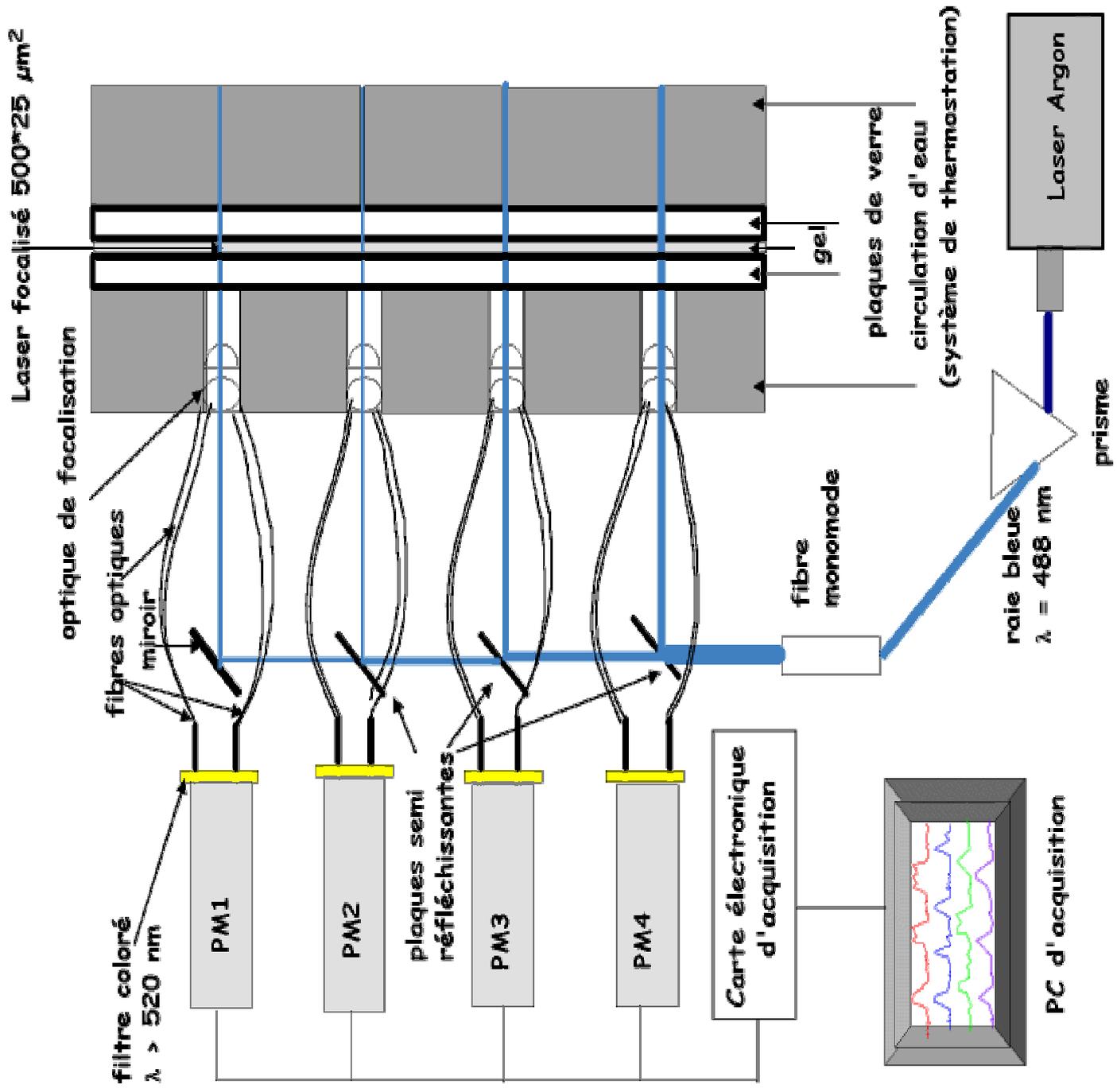
T A

T

Séquençage d'ADN













# Nucléase BAL 31

Ca<sup>++</sup>



# Clonage

# Principe

- Croissance clonale des cellules  
COLONIES
- Molécule à raison d'une (max) par cellule  
NB MOLECULES << NB CELLULES
- Cellules se multiplient en reproduisant  
fidèlement l'ADN exogène  
VECTEUR

# Conséquences

- Sélection
- Recombinaison in vitro
- Crible

# Principe

**1- Préparation des fragments d'ADN**

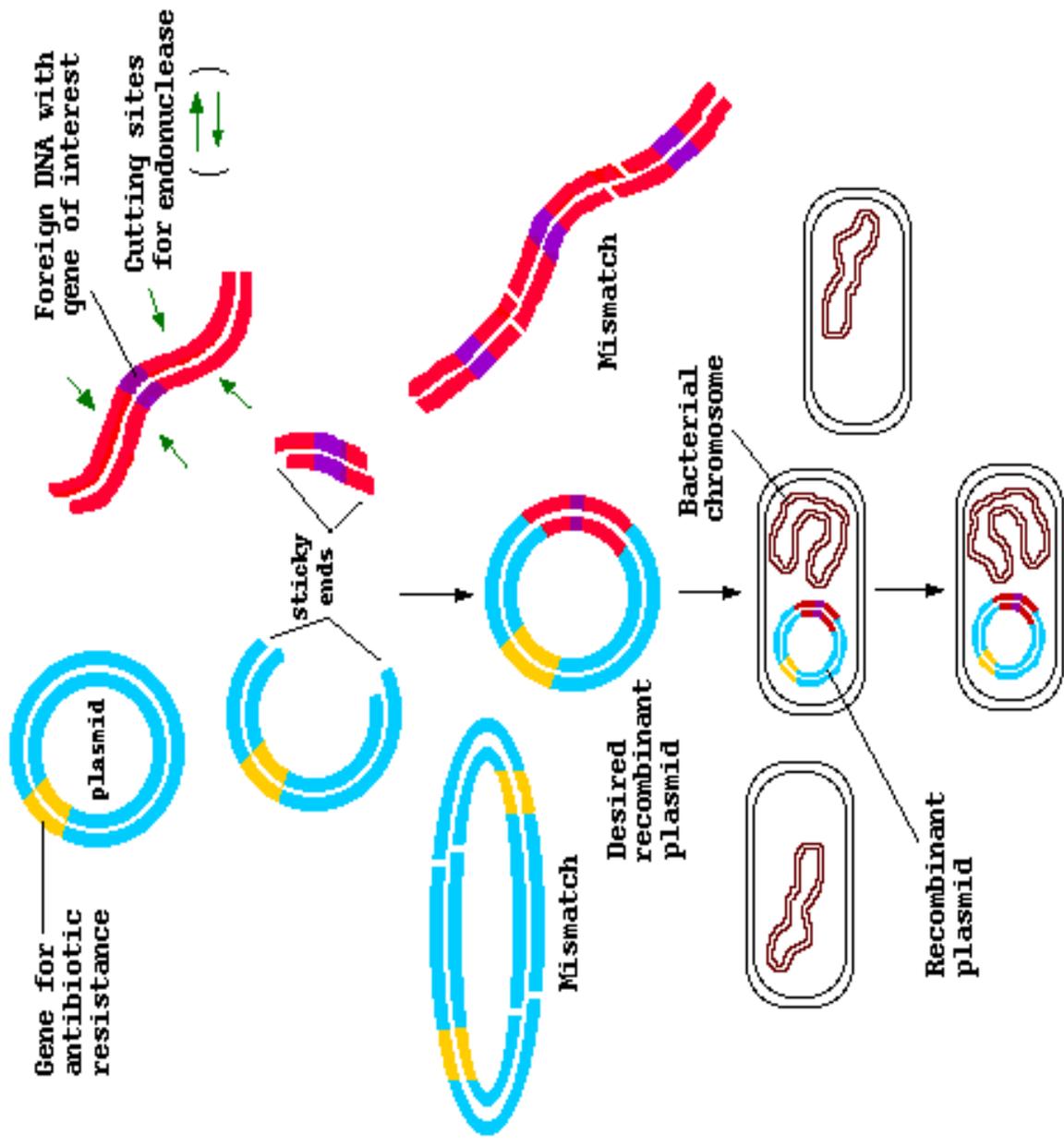
**2- Liaison à l'ADN vecteur**  
**RECOMBINAISON IN VITRO**

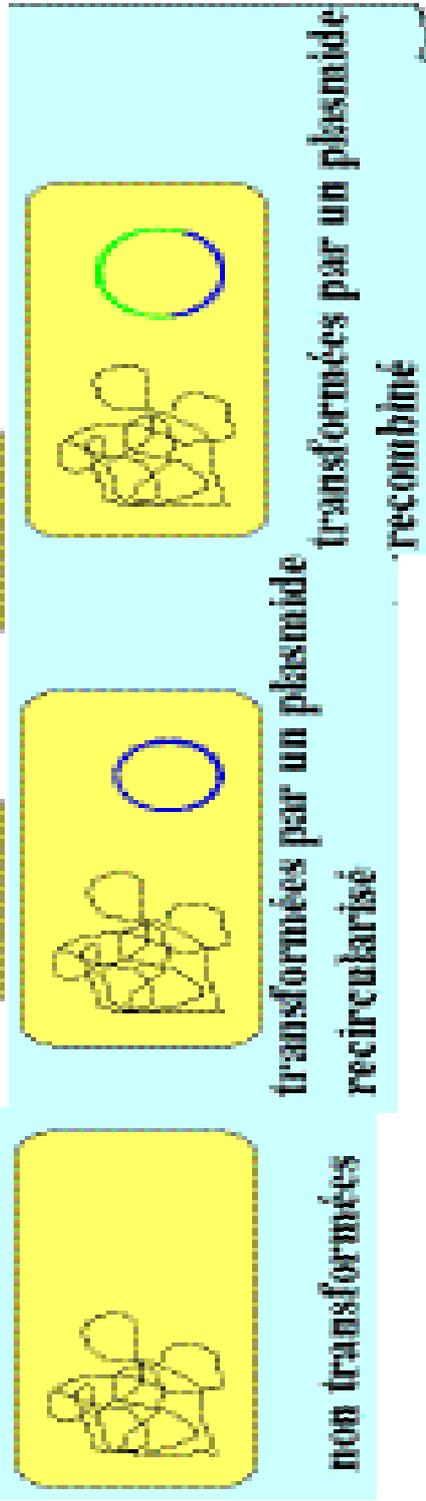
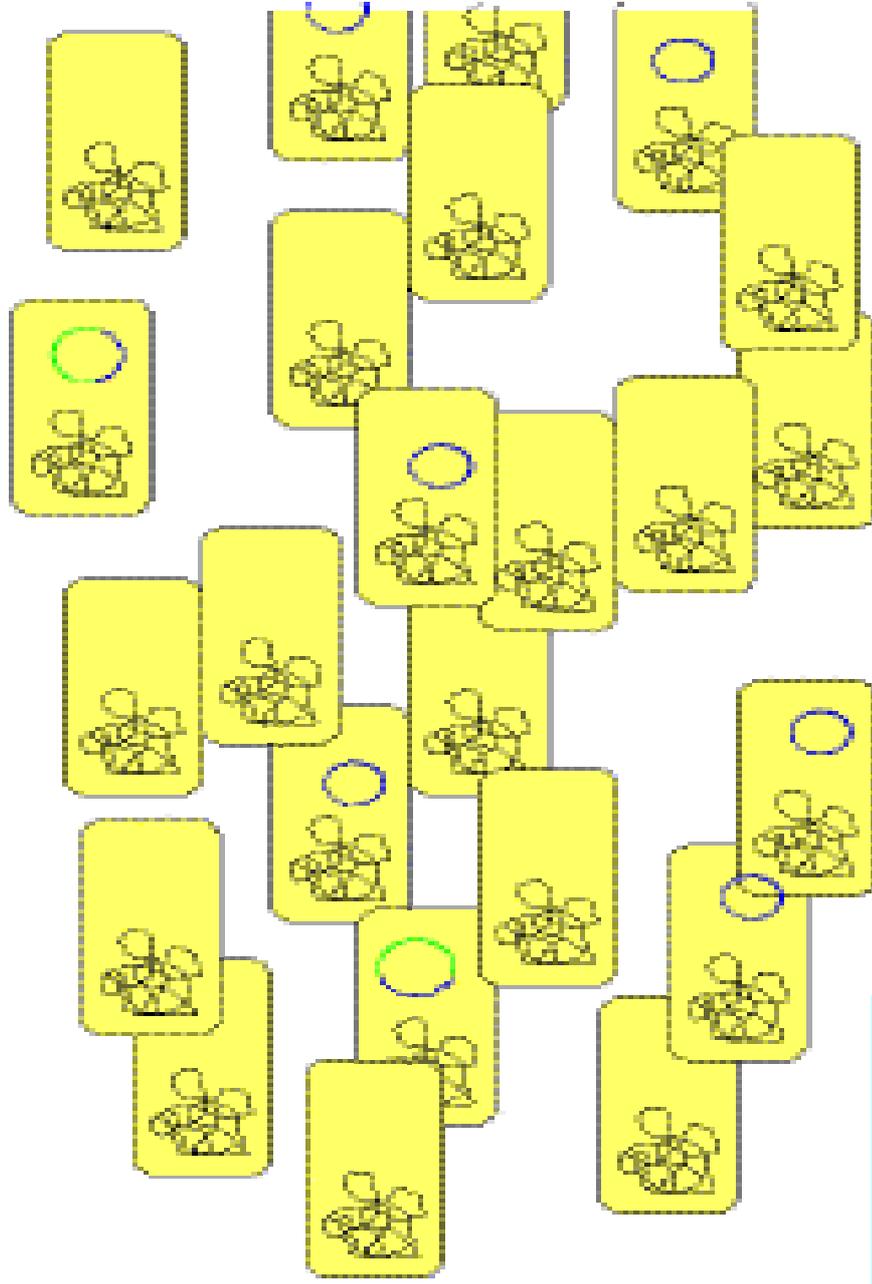
**3- Introduction de l'ADN recombiné  
dans les cellules**

**4- Sélection des cellules recombinantes**  
**ou**

**5- criblage des clones recombinants recherchés.**

# Plasmid Insertion





**non transformées**

**transformées par un plasmide recircularisé**

**transformées par un plasmide recombiné**

## VECTEUR :

- Structure biologique capable de complexer une macromolécule et de l'intégrer spécifiquement dans une cellule vivante.



## Cellules-hôtes

*Escherichia coli*

DH5 $\alpha$  : expression de pUC19

HB 101 : expression de pBR322

JM109 : lac  $\alpha$  pour sélection

*Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces pombe*

*Pichia Pastoris*

*Spodoptera frugiperda*

*Trichoplusia*

Chinese Hamster Ovaries (CHO)

Baby hamster kidney (BHK)

cellules HeLa

lignée 3T3

Récepteur de l'ecdysone (Drosophile)

+ Promoteur activé par l'ecdysone

## Vecteurs hybrides

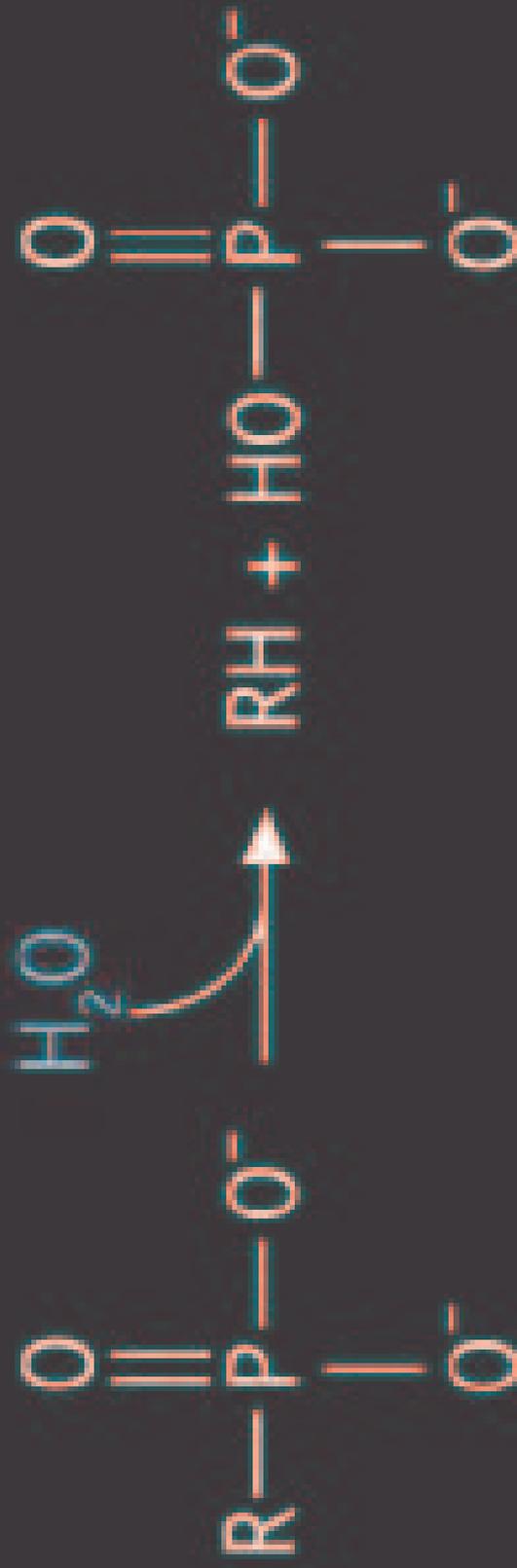
- **Phagémides**
  - Phage filamenteux + plasmide
  - exemples : pBluescript II, vecteur T
  - inclus dans un phage  $\lambda$  =  $\lambda$ . ZAP II
- **Cosmides**
  - plasmide + phage  $\lambda$ . (grands inserts)
- **Vecteurs navettes (hôtes eucaryotes et procaryotes)**
- **Chromosomes artificiels de levure (YAC)**

*Intestin de veau*

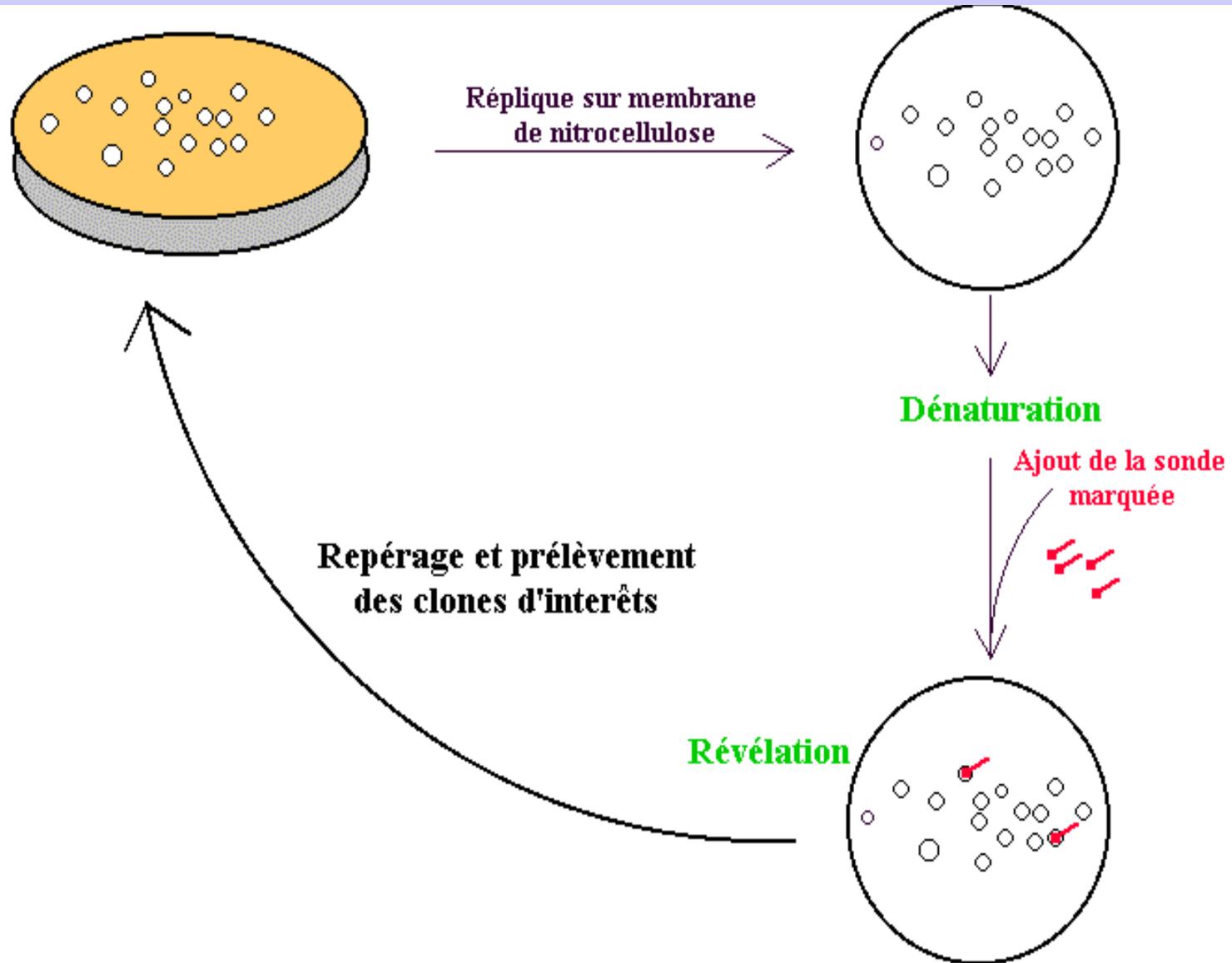
*3.1.3.1*

## *Phosphatase alcaline*

$Zn^{++}$



# Criblage sur Réplique



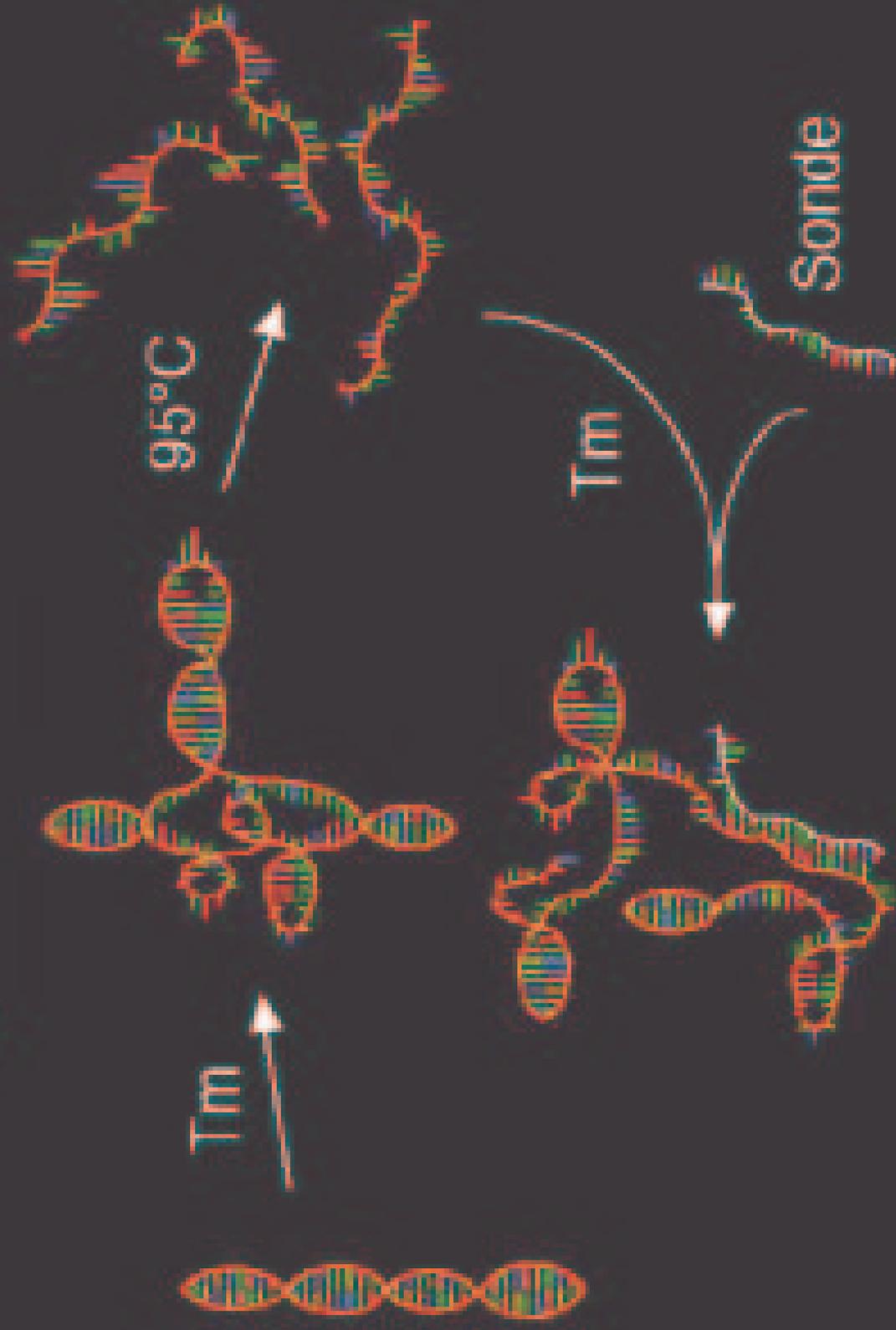
# Criblage (2)

- Hybridation d'une sonde pure
  - Criblage Immunologique
    - Criblage différentiel

## SONDE NUCLÉIQUE :

- Molécule d'acide nucléique, antiparallèle et complémentaire d'une séquence spécifique d'un génome ou d'une banque, capable de reconnaître par hybridation et de marquer cette séquence pour permettre son identification ou son isolement.

# Hybridation d'une sonde



# T4 Polynucleotide kinase

dithiothréitol-SH, Mg<sup>2+</sup>



RNA ou DNA simple brin



## Vecteurs de thérapie

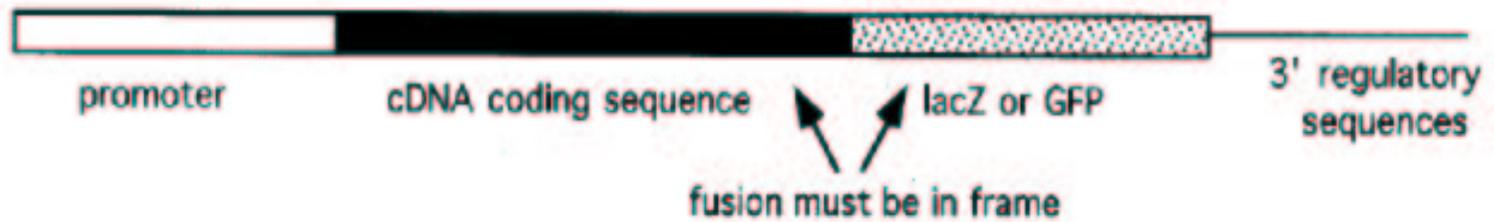
- Rétrovirus
- Adénovirus
- Herpès
- Liposomes

# Synthèse de protéines

- *Même Principe  
mais....*
- *Protéines de fusion*

# *Fusion*

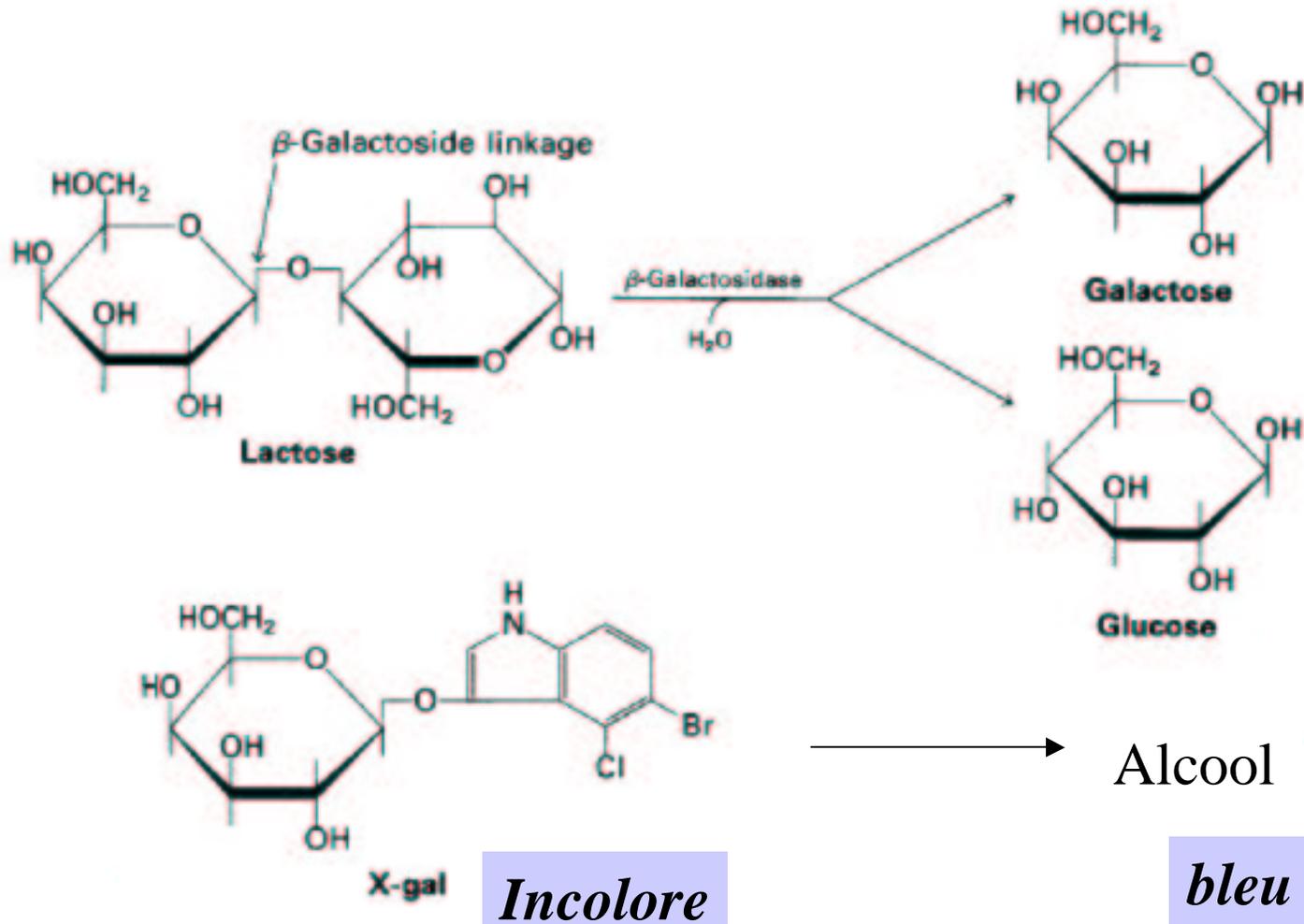
## 1) Translational fusion



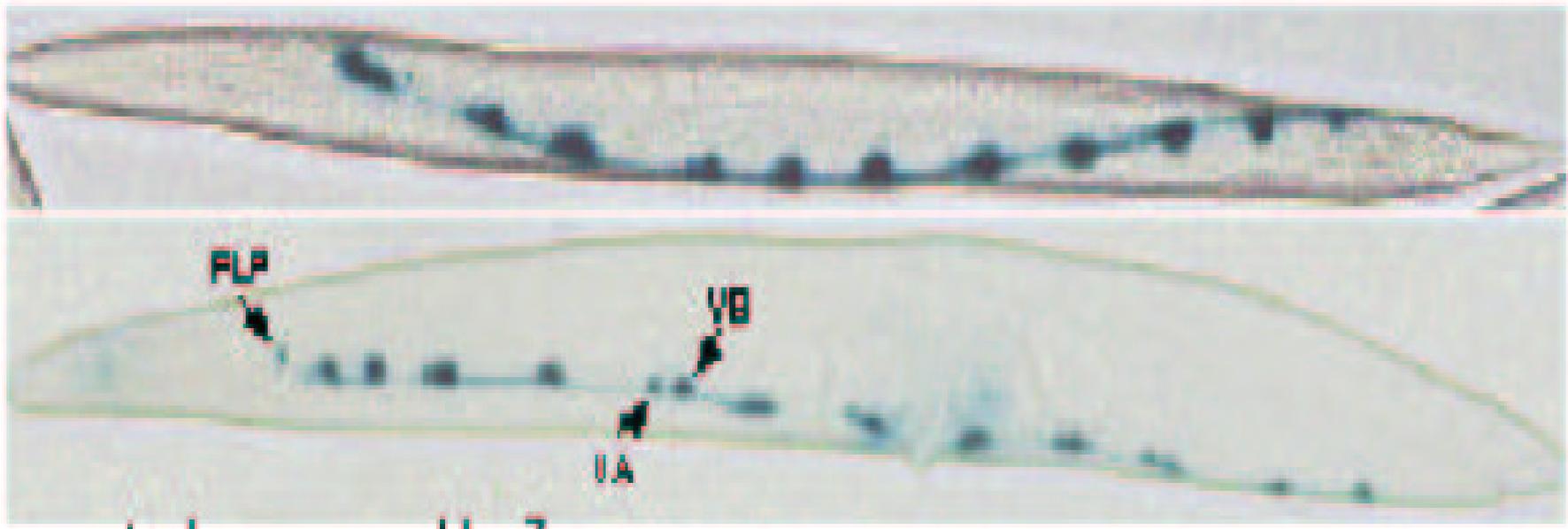
## 2) Transcriptional fusion



# *B-Galactosidase*



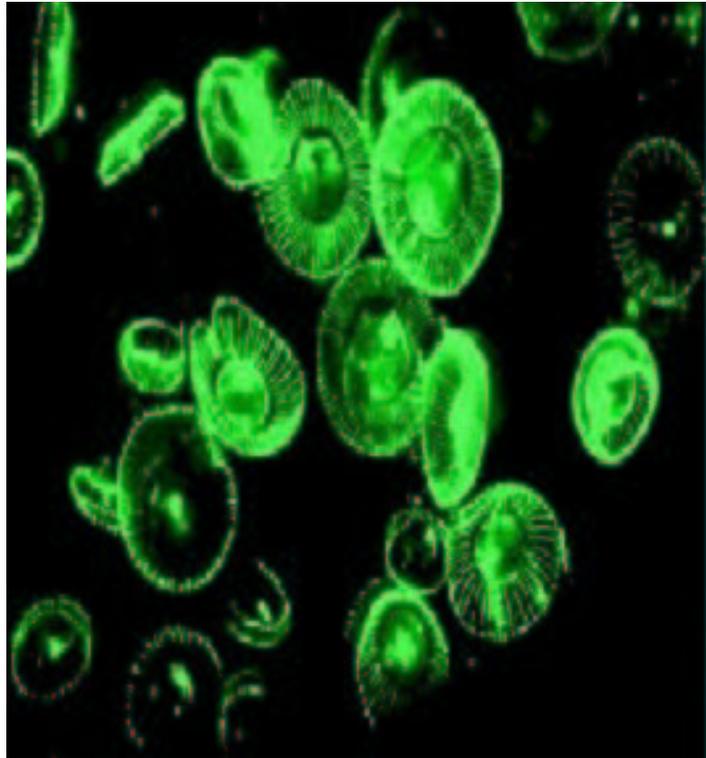
# *Fusion translationnelle*



**Mise en évidence de la corde nerveuse  
centrale chez un Nématode**

*Rutgers et al*

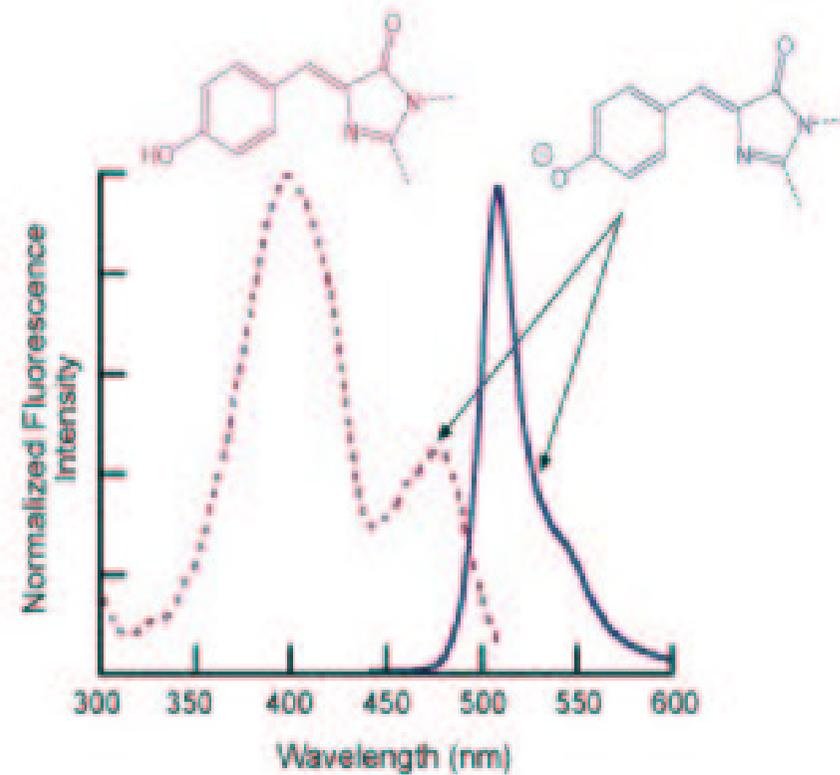
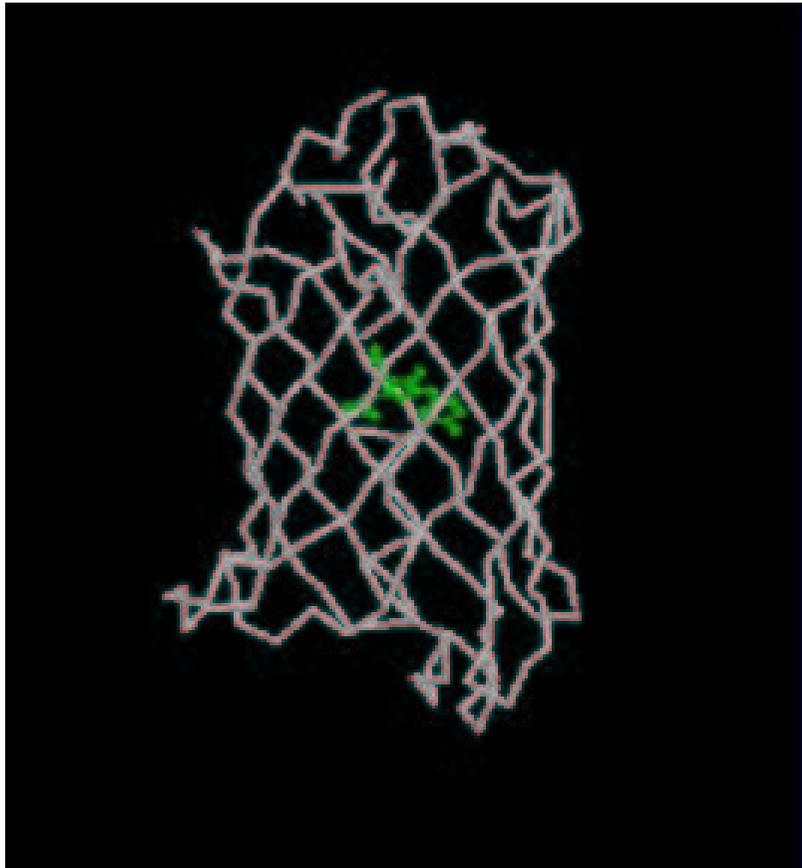
# *Green Fluorescent Protein (GFP)*



*Aequoria Victoria*



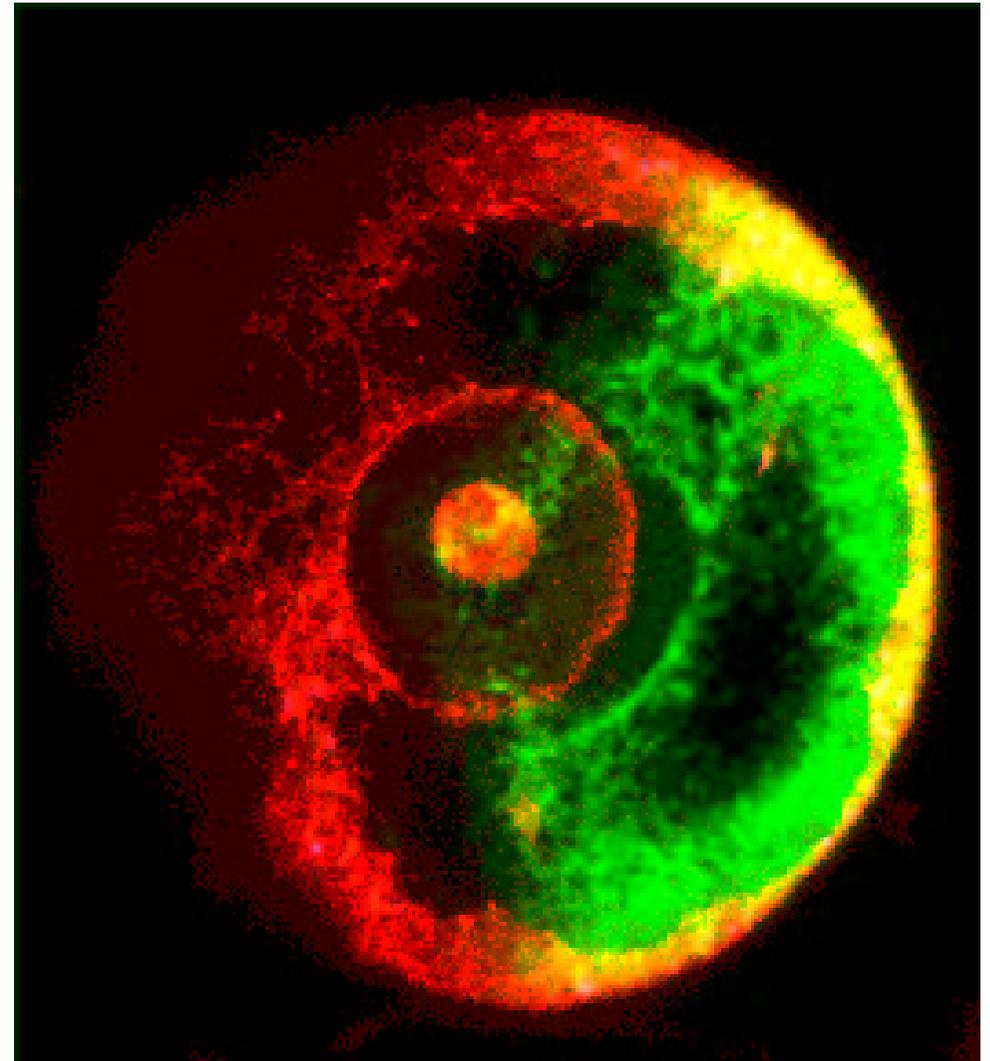
# *Fluorophore*



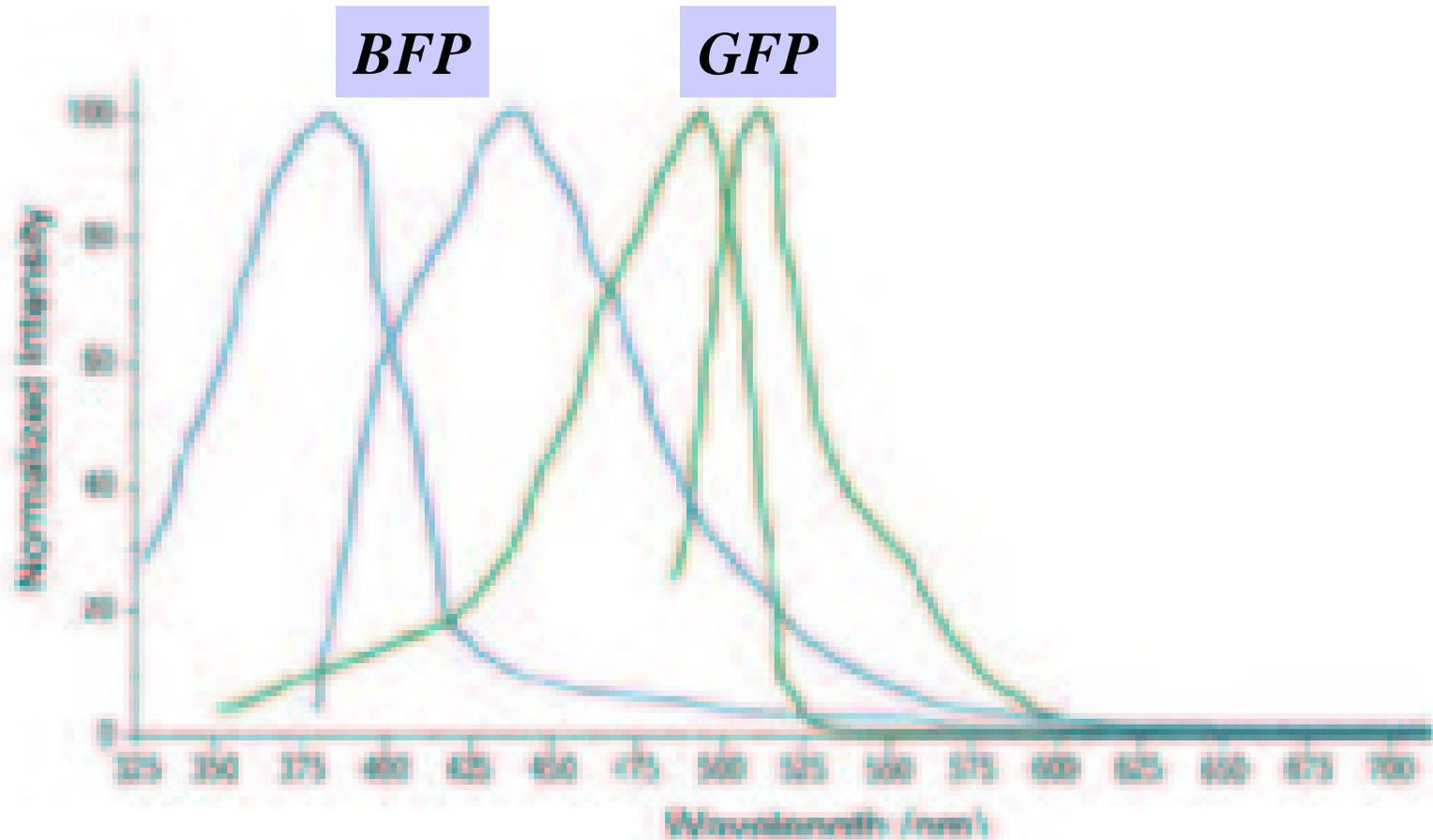
# *Protéine de Fusion: Tagging*

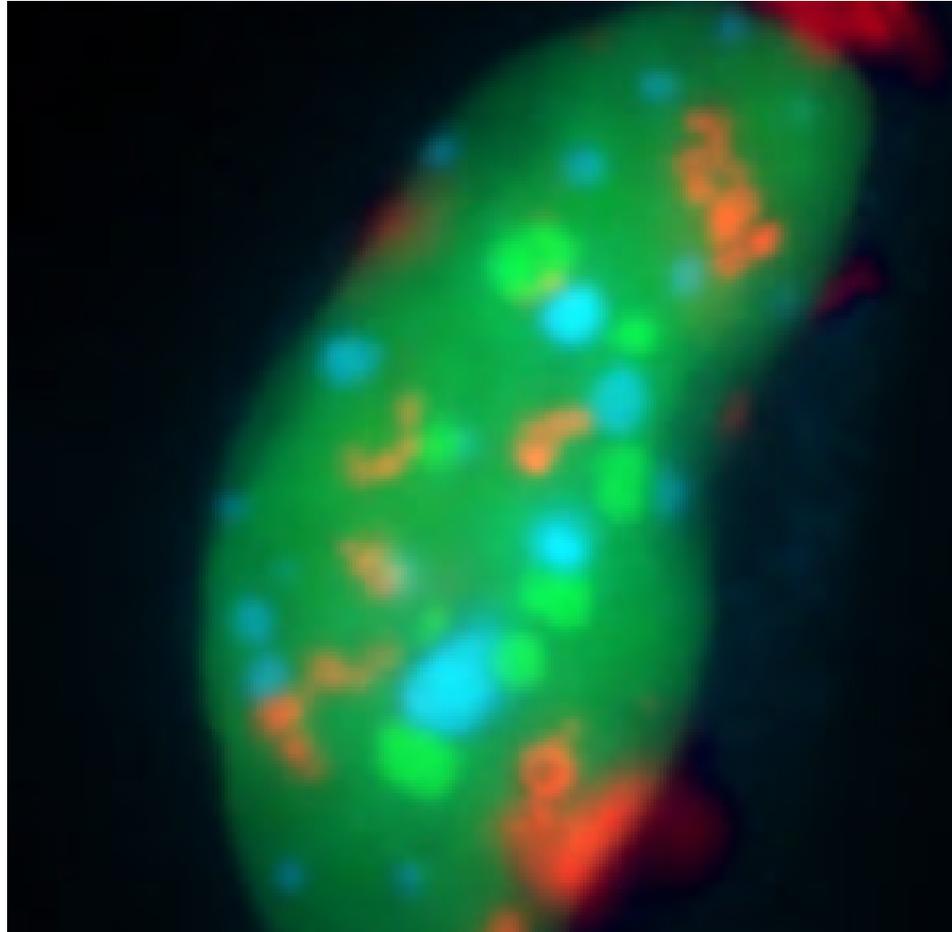
*Localisation de myosine  
dans des cellules  
vivantes de Tabac*

A. Reudenreich



# *FRET (principe)*





***Noyau d'une souris vivante marqué pour la reconnaissance de différents facteurs (GFP-Lhx3 B3B4) (nucleoli), BFP-C/EBPa (subnuclear foci), et PML-DsRed (nuclear dots).***

<http://www.cci.virginia.edu/ws-fret-images.html>