

# HARRY POTUT'RENTREE

## GENETIQUE



Disclaimer : fiche non complète



### SEQUENÇAGE + PCR + CLONAGE MOLECULAIRE

#### I – SEQUENÇAGE D'ADN

Le séquençage d'un fragment d'ADN est une technique qui permet de déterminer la succession des nucléotides qui le compose.

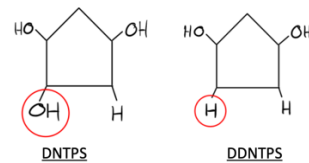
Rappel : l'ADN est cette double hélice composée des 4 nucléotides A/T/C/G reliés par des liaisons phosphodiester (dans un même brin), avec ces deux brins antiparallèles, liés entre eux par des liaisons hydrogènes

Pour séquencer on utilise une **ADN polymérase** → Les polymérases sont des enzymes qui permettent de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, dans le sens 5'-3', à partir d'un amorce (= petit brin d'ADN simple brin complémentaire d'une séquence d'ADN donnée).

La reproduction est fidèle à la séquence d'ADN utilisée.

#### **Sanger : une méthode de référence**

Parmi les différentes méthodes de séquençage, le séquençage Sanger est la méthode de référence et la plus ancienne (1977).



Elle repose sur les **di-désoxynucléotides**

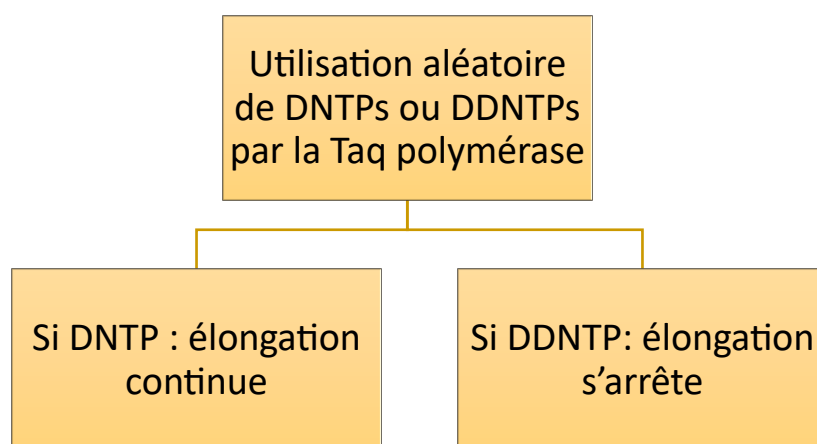
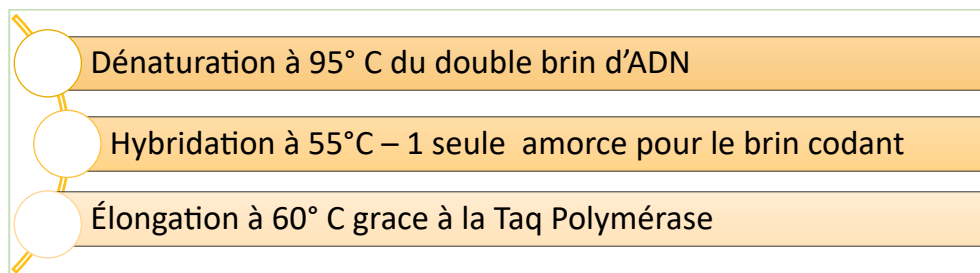
(petit schéma simple et efficace made by notre vieille)

4 tubes différents sont utilisés

Contenu d'un tube:

- L'ADN à séquencer
- Taq polymérase : enzyme qui synthétise un brin complémentaire à partir d'une amorce dans le sens 5' – 3'
- Une amorce
- Les nucléotides avec mélange DNTPs et DDNTPs – 1 seul type de DDNTP par tube
- Les tampons

### Les étapes



Après plusieurs cycles



Le tutorat est gratuit et la meilleure chose de ta P1. Toute vente ou reproduction est interdite.

nombreux fragments d'ADN **complémentaire** de taille différente

Les fragments obtenus sont séparés sur un gel par migration électrophorétique (du – vers le +)

On retrouve différents morceaux d'ADN migrants plus ou moins loin en fonction de l'endroit où le DDNTP était introduit.

L'identité des nucléotides est apportée en fonction des pistes dans laquelle on va lire le fragment (T, A, C ou G) et l'ordre des nucléotides se fait par rapport à la taille des fragments. De plus, il faut savoir que plus un morceau d'ADN est lourd, plus il a de difficultés à migrer. Donc on lit de haut en bas (du plus léger / plus court au plus lourd / plus long).

### La méthode automatisée

La méthode Sanger a été ensuite automatisée et simplifiée grâce à l'utilisation **de DDNTPs fluorescents**.

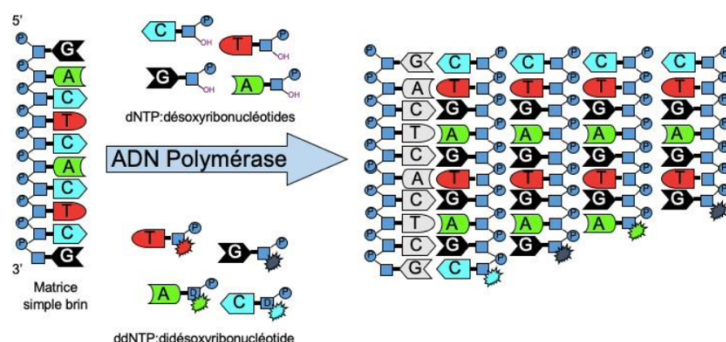
⇒ Chaque DDNTP est couplé à un fluorochrome de couleur différente.

Il se passe donc exactement la même chose que dans la méthode Sanger mais dans un seul et même tube puisqu'on mélange les 4 DDNTPs.

⇒ L'incorporation d'un DDNTP stoppe toujours la synthèse. Mais c'est grâce à un code couleur que l'on connaît quel nucléotide va être incorporé (et non plus selon le puits).

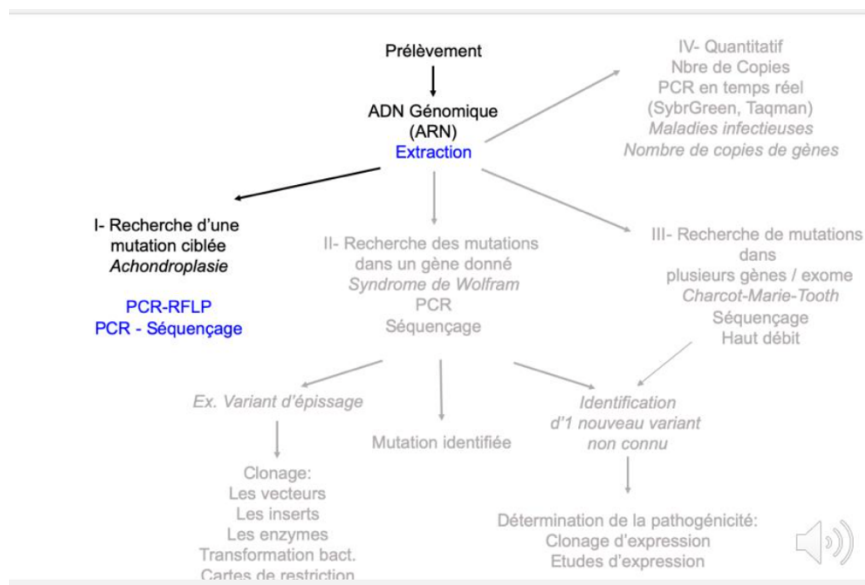
Toujours, les produits synthétisés sont séparés, en fonction de leur taille par migration électrophorétique.

**COULEUR → Nom du DDNTPS**  
**POIDS SUR ÉLECTROPHORÈSE OU MIGRATION → Position**

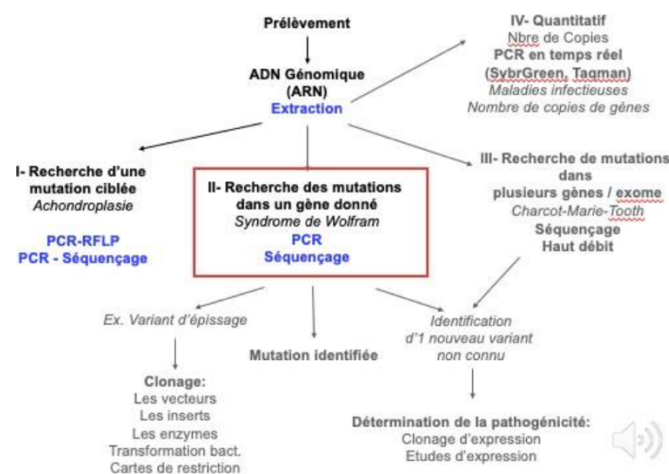


On sait quelle mutation rechercher, dans quel gène, quel changement nucléotidique attendu, on utilise la PCR-RFLP (PCR + Enzyme de restriction), dont le résultat peut être confirmé par une deuxième technique telle que la PCR suivie d'un séquençage.

⇒ Cette stratégie est appliquée pour l'**achondroplasie**, mais elle peut être appliquée pour toute recherche d'une mutation ciblée. C'est une technique qui nous donne rapidement une réponse.



### Analyse d'un gène par PCR et séquençage Sanger



On va voir maintenant une application de l'utilisation de la PCR et du séquençage, mais cette fois-ci dans le but de **screener la totalité d'un gène** → Lorsque on ne sait pas quelle mutation est présente, on va séquencer l'intégralité du gène pour identifier le variant pathogène.

### Étude de cas: Le syndrome de Wolfram

- maladie à transmission autosomique récessive → les individus atteints ont forcément les 2 allèles mutés pour que les signes apparaissent.
- Le gène WFS1** est un gène constitué de 8 exons, et l'ATG (codon permettant le début de la traduction de l'ARN messenger) se trouve dans le deuxième exon du gène. Cela signifie donc que le premier exon est non codant.

**Rappel:** dans le noyau on va retrouver l'ADN génomique organisé en chromosomes (contenant les gènes constitué d'exons et d'introns).

⇒ Ces gènes vont être transcrits en ARN, et après les mécanismes d'épissage, il ne restera plus que les **régions codantes**. Les introns seront donc éliminés pour obtenir un ARN messenger mature avec, à leur extrémités 3', une queue Poly A.

⇒ Ces ARN messagers vont ensuite être exportés du noyau vers le cytoplasme où ils seront traduits en protéines.

### L'organisation et l'expression des gènes

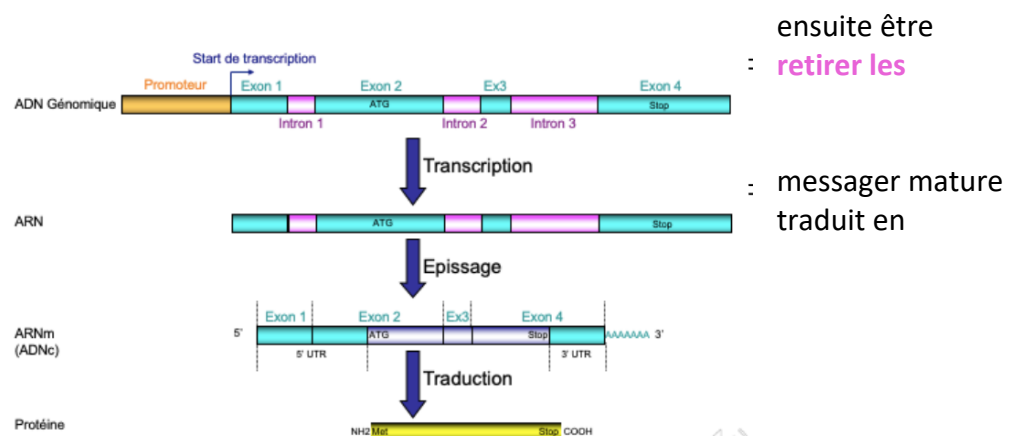
C'est le START de transcription qui permet de définir le cadre de lecture.

On retrouve les régions codantes (exons), séparées par les régions non codantes (introns).

⇒ Après transcription, on obtient la copie en ARN de cet ADN génomique.

L'ARN va être **épissé** → on va **retirer les introns**.

Cet ARN est ensuite traduit en protéine.

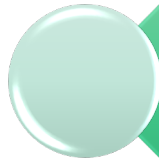


## Recherche de mutation dans un gène

En reprenant notre exemple de départ, le **screening du gène WFS1**, on remarque que ce gène est organisé en huit exons, et l'ATG se situe dans l'exon 2. Notre codon 1 doit donc être non traduit.



Pour le diagnostic, il faut identifier le variant nucléotidique responsable d'un dysfonctionnement de la Wolframine, qui modifie la fonction de cette protéine.

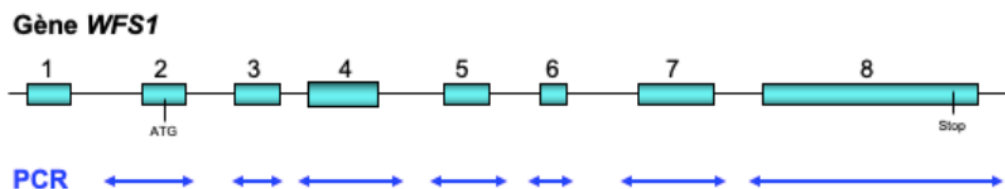


On s'intéresse aux régions codantes: on va amplifier les exons codants parce qu'on sait facilement interpréter des variants nucléotidiques situés dans les exons - qui modifient les acides aminés et donc la protéine



C'est pourquoi on va réaliser 7 PCR qui vont amplifier les régions codantes : les PCR seront faites sur les exons 2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7 / 8.

### PCR (exons + Jonctions intron/Exon) + Séquençage



## Famille A : Cas simple

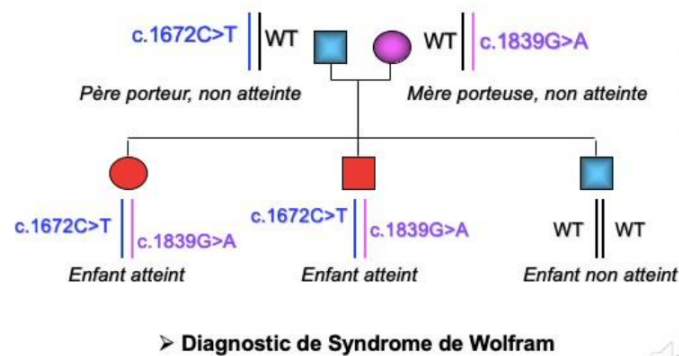
- Prenons l'exemple de cette famille : on a amplifié les 7 exons, on les a séquencé, et on a identifié chez le père un variant en position 1672 (qui modifie un C et T) à l'état hétérozygote.

⇒ Chez la mère, un deuxième variant apparaît, toujours sur le gène WFS1, mais en position 1839.

⇒ On voit donc que les deux enfants atteints ont hérité des deux gènes mutés : celui du père et celui de la mère. En revanche le troisième enfant a hérité des gènes non mutés.

⇒ Le résultat permet de poser le diagnostic de Syndrome de Wolfram. Cette pathologie étant autosomique récessive, les parents ne présentent donc aucun signe. En revanche les deux enfants atteints développeront la maladie cliniquement.

Le tutorat est gratuit et la meilleure chose de ta P1. Toute vente ou reproduction est interdite.



### Famille B : Cas plus compliqué

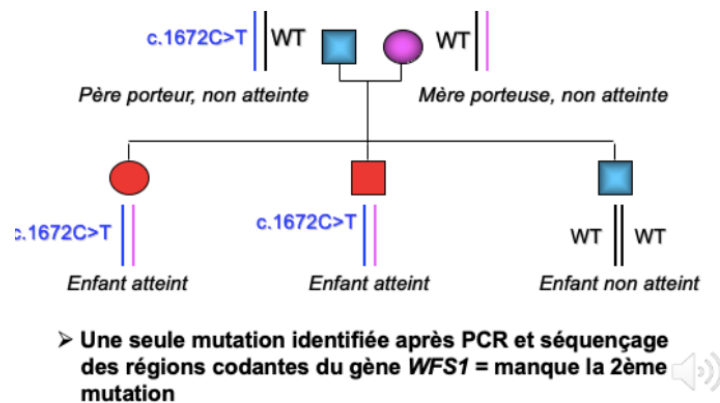
- Autre exemple de résultats qu'on peut obtenir : on identifie à nouveau une mutation en position 1672 à l'état hétérozygote chez le père et aucune mutation chez la mère. Les deux enfants atteints sont porteurs de la mutation du père à l'état hétérozygotes, et l'enfant sain a hérité des allèles sauvage non mutés.

⇒ Le syndrome de Wolfram étant une maladie autosomique récessive, on s'attend à ce que les enfants atteints portent deux mutations (sinon ils n'auraient pas de signes cliniques, puisqu'ils seraient à l'état hétérozygotes).

⇒ En effet le père présente une mutation. Pourtant il n'a pas de présentation clinique : il est hétérozygote. Cela sous-entend que l'allèle hérité de la mère est porteur d'un deuxième variant du gène puisque les enfants sont atteints.

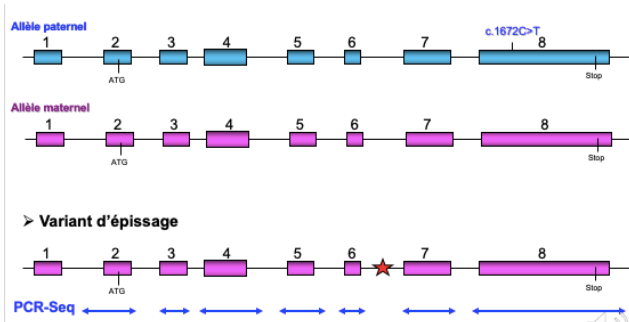
Il est vrai que d'habitude pour présenter une pathologie autosomique récessive on utilise des individus homozygotes sur un allèle. Cependant on peut avoir la même chose mais avec des mutations hétérozygotes. Dans pas cas, on parle de **d'hétérozygotes composites** pour les enfants atteints : ils sont porteurs de deux mutations à l'état hétérozygote.

- ⇒ Nous n'avons pas détecté de mutation chez la mère : il nous manque donc un élément pour diagnostiquer les enfants. **Il nous faut trouver la mutation maternelle!**



### Hypothèses (pour résoudre le mystère Watson)

On schématise les brin paternels et maternels avec les 8 exons, ainsi que la mutation en position 1672 de l'exon 8 de l'allèle paternel. Nous avons fait 7 PCR différentes, qui ne prenaient en compte que les régions codantes, mais en les encadrant largement puisqu'on a choisi d'utiliser des amorces situées de part et d'autre des exons, de façon à pouvoir amplifier également les jonctions exon/intron.



Avec cette stratégie, on ne s'intéresse pas aux régions introniques : ne pourra pas détecter une mutation présente, par exemple, sur l'intron 6.

### Notion de variants d'épissage

Pourtant, dans cet exemple, le variant présent sur l'intron 6 peut avoir des conséquences sur l'épissage de notre ARN messager, donc sur la séquence de notre protéine.

⇒ En effet, en fonction du changement nucléotidique, peut se créer de façon anormale des sites accepteurs ou des sites donneurs d'épissage.

Dans cet exemple, on voit que le variant dans l'intron 6 a créé un **site accepteur** ou **site cryptique d'épissage** qui fait que l'épissage entre l'exon 6 et l'exon 7 est modifié.

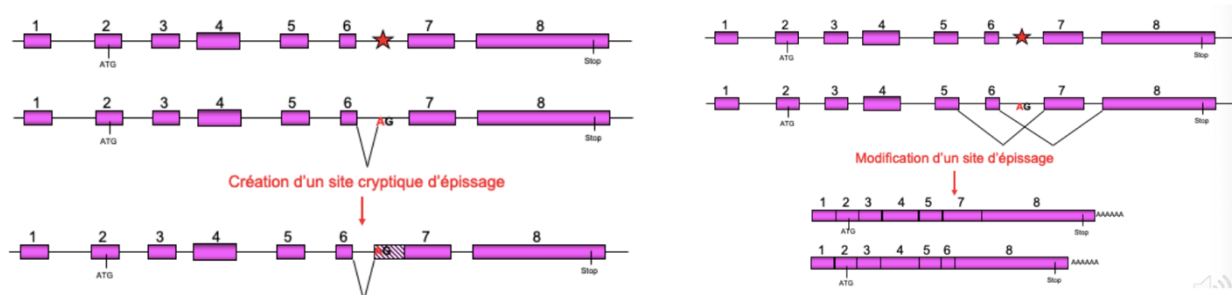
⇒ Ces variants introniques peuvent donner différentes modifications d'épissage :



- Soit la création de sites cryptiques d'épissage
- Soit une modification des sites accepteurs / donneurs habituellement utilisés.

Dans ce exemple, vous voyez que ce variants dans l'intron 6 peut générer un épissage entre l'exon 5 et l'exon 7 (on perd tout l'exon 6), et à l'inverse, on peut avoir un épissage entre l'exon 6 et l'exon 8, qui entrainerai la perte de l'exon 7.

**Dans les deux cas, les protéines sont anormales parce que la séquence de l'ARN messager est modifiée.**



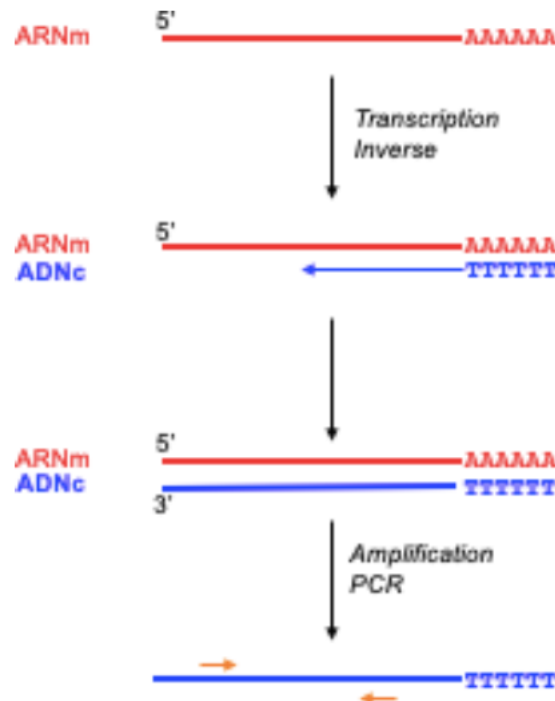
### Études des ARN messagers

**Les effets de ses variant d'épissage** ne peuvent **se voir que sur les ARN messagers** après épissage. Cependant, ils ne peuvent être amplifiés directement par PCR puisque la Taq Polymérase ne travaille que sur des fragments d'ADN. Ils doivent être copiés sous forme d'ADN.

⇒ Il va donc falloir copier des ARN messager en ADN simples brins : on les appellera les **ADN complémentaires**. Ils seront la copie conforme de l'ARN messager, mais toujours en complémentarité des bases.

⇒ On utilise donc la **Transcriptase Inverse**, qui va synthétiser un ADN simple brin complémentaire à l'ARN messager.

⇒ À partir du moment où on a ce brin d'ADN complémentaire, on peut combiner différents primers et **amplifier cet ADN** / des régions de cet ADN complémentaire.



### La Transcriptase Inverse

La transcriptase Inverse (ou Reverse Transcriptase) est une **enzyme d'origine virale**.

C'est une **ADN polymérase** capable de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) en prenant un ARN comme matrice pour former un hybride ADN/ARN.

Elle possède une activité 5' 3' ADN polymérase, à partir d'une amorce d'ADN hybridée sur l'ARN. L'ADNc est donc une copie ADN d'une séquence d'ARN.

En pratique, on rajoute (*dans la potion magique*):

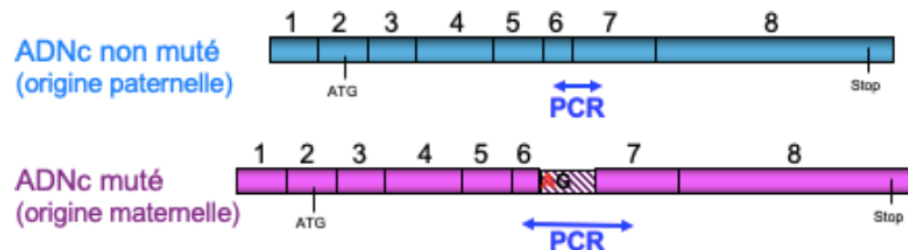
- ♦ une amorce complémentaire de la queue poly-A des ARNm.
- ♦ la Reverse Transcriptase
- ♦ des DNTPs (pour que la polymérase puisse copier le brin ARN en brin ADN).
- ♦ la RNase H (qui a la capacité de dégrader les brins ARN lorsqu'ils sont hybridés sur un brin d'ADN).

**Résultat :** ADN simple brin dont la séquence est complémentaire à l'ARNm que nous voulions étudier.

Cet ADN pourra ensuite être amplifié par PCR et obtenir des ADN double brin correspondant à l'ARNm.

### Recherche des variants d'épissage

Voilà le résultat qu'on aurait obtenu à partir de notre exemple précédent à savoir avoir un variant dans l'intron 6 qui induit un site cryptique d'épissage :



Chez la mère, on a deux produits PCR :

- L'un provenant de l'allèle non muté : identique à celui du prélèvement. paternel
- Un autre de plus grande taille (migre moins loin car plus lourd) : correspondant à l'ADNc obtenu à partir de l'ARNm qui portait ce site cryptique d'épissage et pour lequel on a eu une différence d'épissage entre l'exon 6 et l'exon 7

### Résultats

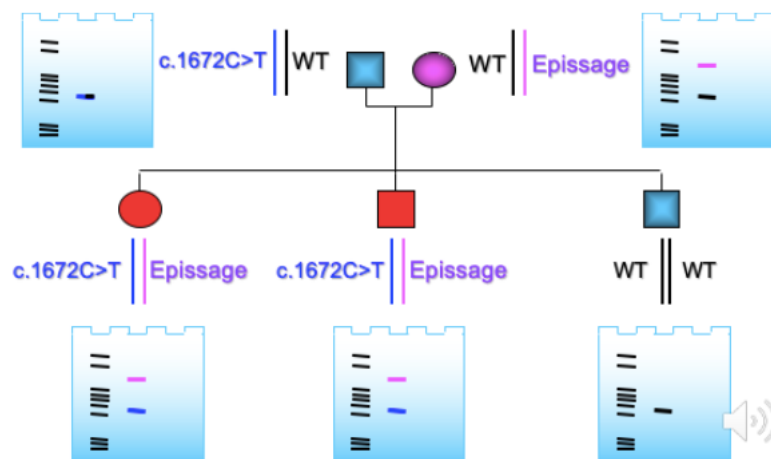
Dans cette famille, le père était porteur de la mutation 1672 à l'état hétérozygote qui ne modifie pas l'épissage exon 6 / exon 7.

En revanche, la mère est porteuse à l'état hétérozygote de ce variant dans l'exon 6 qui modifie l'épissage.

Le enfants atteints, après épissage, ont le même profil que la mère puisqu'ils sont porteurs de :

- Variant 1672 : ne modifie pas l'épissage donc au même niveau que le père et que l'allèle sain de la mère et que l'allèle sain du père
- Variant d'épissage qui entraîne un ARNm plus lourd, venant de la mère

À contrario, l'enfant non atteint n'a que le profil des 2 allèles sains, puisqu'il possède deux allèles sains, de même poids moléculaire que les deux allèles du père. Il n'a pas de modifications d'épissage des exons 6 et 7.



### Identification de la mutation

Pour identifier le variant d'épissage et connaître directement la conséquence de ce variant d'épissage sur la séquence de notre ARNm (et par conséquent, la séquence de notre protéine), **on réalise un séquençage.**

Ces produits PCR sont séquencés, et on va obtenir les résultats suivant :

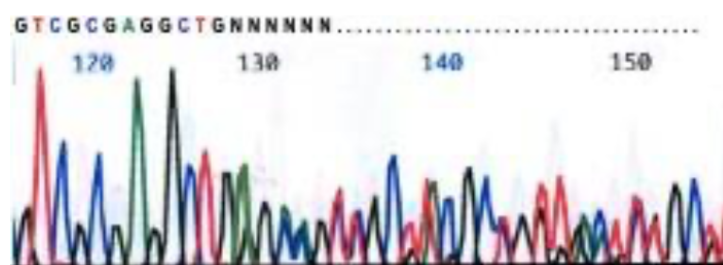
L'électrophorégramme de cette séquence est extrêmement difficile à lire puisqu'à partir du 130<sup>e</sup> nucléotide, on a un **chevauchement de 2 pics**, l'un au-dessus de l'autre.

On a un mélange de séquence provenant du fait que nos deux produits PCR ont des tailles et des séquences différentes.

Le début de l'exon 6 est le même, que ce soit un ADNc qui provienne de l'ARNm Wild Type ou de l'ARNm muté.

Mais lorsque l'on va séquencer nos produits PCR, qui sont mélangés, on a les produits de petites tailles et de grandes tailles, utilisant ou pas le site cryptique d'épissage. C'est pourquoi après le CTG, jusqu'auquel on arrive très bien à lire, **on a deux suites qui se mélangent :**

- **Le début de l'exon 7**
- **Le morceau d'intron en trop**



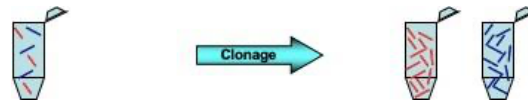
Les morceaux de mêmes tailles sortent au même moment de notre séquenceur pour passer devant la caméra, mais ayant des DDNTPs de couleurs différentes (puisqu'on peut avoir un G ou un A) → superposition des différentes couleurs : ça devient illisible (grr).

On ne peut pas déterminer la séquence que l'on a au-delà du 130. 😞

Pour connaître cette séquence il faudrait séparer les produits PCR et les séquencer individuellement. Si ce n'est pas possible, alors on ne peut pas connaître le variant de notre patient. Pour séparer 2 produits PCR ou 2 fragments d'ADN, il faut passer par le **clonage moléculaire**.

Et goo la transition...

### Le clonage moléculaire



Permet d'obtenir un grand nombre de copies identiques absolument pures d'une séquence donnée d'ADN.

⇒ Principe et différentes étapes :

Intégrer un fragment d'ADN (appelés insert) dans un vecteur. Lors de cette étape, nous préparons nos **ADN recombinant (= vecteur + insert)**

- Introduire le vecteur dans une cellule hôte (bactérie)
- Sélectionner, isolé et amplifier les clones bactériens
- Obtenir un fragment d'ADN pure en grande quantité

### Préparation de notre ADN recombinant

<b>Caractéristiques</b>	<p>Ce sont des ADN circulaires doubles brins qui sont capables de réplication autonome indépendante de l'ADN de la cellule hôte.</p> <p>permettent l'insertion d'un fragment d'ADN étranger de différentes tailles.</p> <p>ils possèdent des gènes de sélection permettant de sélectionner les cellules hôtes qui ont intégré le vecteur.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Il faut que ce vecteur confère à la bactérie des <b>avantages</b> : ex. résistance dans un milieu particulier. Grâce à cette résistance qu'auront acquise les</li></ul>
-------------------------	---

	bactéries intégrées par le vecteurs, qu'elles vont pouvoir se multiplier dans un milieu qui contient par exemple un ATB. On pourra alors sélectionner les bactéries intégrées par ce vecteur
<b>2 catégories de vecteurs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les vecteurs de clonage : destinés à isoler physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et à amplifier le nombre de copies de cet ADN. Ils sont utilisés dans des systèmes procaryotes uniquement.</li> <li>• Les vecteurs d'expression : destinés à transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote. Ils permettent : <ul style="list-style-type: none"> <li>o Dans un premier temps, d'isoler et d'amplifier un ADN d'intérêt dans un système procaryote</li> <li>o Dans un second temps, ils vont pouvoir être transférés dans un système eucaryote</li> </ul> </li> </ul>

### Clonage dans un plasmide

<b>Un Polylinker</b>	<p><b>C'est site multiple de clonage</b></p> <p>Il contient un certain nombre de séquences reconnues par un certain nombre d'enzyme de restrictions</p> <p>C'est donc une <b>concentration de sites de restrictions potentiellement utilisables</b></p>
<b>Une origine de répllication (Ori)</b>	Les vecteurs doivent être capable de se répliquer de façon autonome
<b>Un gène de sélection</b>	<p>Ils Les vecteurs doivent coder pour un gène de résistance à un antibiotique ou une drogue particulière (exp : ampicilline)</p> <p>Ainsi, la bactérie qui aura inséré ce plasmide pourra résister à une pression de sélection exercée par un antibiotique</p>

### Préparation du vecteur et de l'insert

On va utiliser des enzymes de restriction : ce sont des **endonucléases** qui ont la capacité de couper l'ADN double brin.

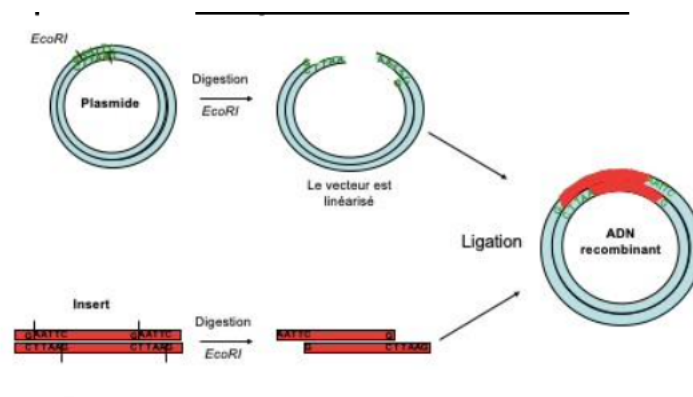
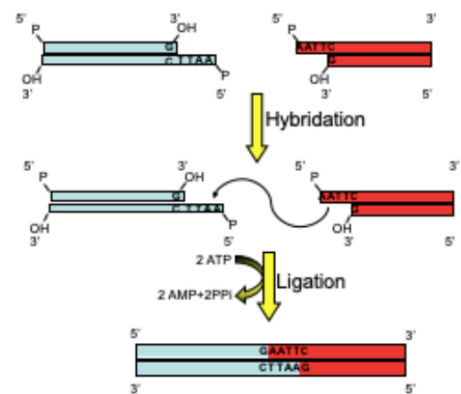
Le tutorat est gratuit et la meilleure chose de ta P1. Toute vente ou reproduction est interdite.

Dans cet exemple **EcoRI** :

La digestion du plasmide par EcoRI va permettre

- De linéariser le vecteur
- De libérer les extrémités 5' et 3' de l'ADN compatibles avec les extrémités libérées dans le vecteur.

Lorsqu'on va mettre en contact le vecteur et l'insert, et grâce à la **T4 DNA Ligase**, nous allons pouvoir reformer un ADN recombinant (plasmide refermé avec l'ADN / l'insert d'intérêt)



### La ligation

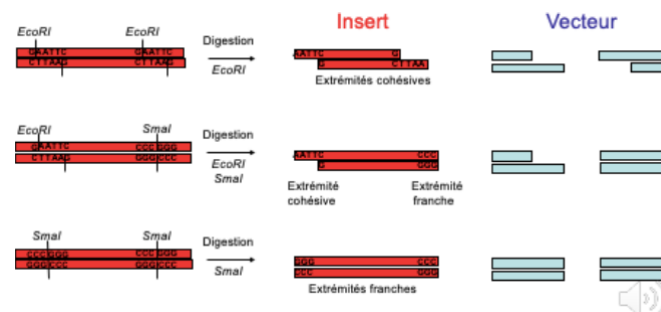
Elle se fait grâce à la **T4 DNA Ligase**, qui est une enzyme qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre un 3'OH et un 5'Phosphate en présence d'ATP et d'ions divalents.

Cela permet de reformer une liaison covalente entre deux molécules d'ADN (qui sont l'insert et le vecteur).

Cette enzyme agit après hybridation des extrémités cohésives par complémentarité des bases (spontanément), car cette étape n'est pas spontanée.

### Les stratégies de clonage

Le tutorat est gratuit et la meilleure chose de ta P1. Toute vente ou reproduction est interdite.



Extrémités cohésives	Extrémités différentes	Extrémités franches
<p>Certaines enzymes de restriction (EcoRI) peuvent libérer des extrémités dites cohésives.</p> <p>Dans le cas d'EcoRI on pourra réutiliser cette enzyme de restriction pour préparer l'insert et le vecteur.</p> <p>On peut aussi utiliser des enzymes de restriction différentes et qui vont toutes les deux libérer des extrémités cohésives.</p>	<p>Dans d'autres cas, on peut combiner des enzymes de restriction qui vont libérer des extrémités cohésives et des extrémités franches et au niveau du vecteur</p>	<p>En fin, on peut être amené à utiliser des enzymes de restriction entraînant des extrémités franches.</p> <p>Dans ce cas, il n'y a ni orientation ni aide due à la complémentarité des bases lors de l'insertion de l'ADN dans le vecteur.</p>

Dans certains cas, le choix des enzymes utilisées n'est pas optimal, et on se retrouve avec un insert et un vecteur ayant des extrémités non compatibles.

Dans cet exemple notre insert a des extrémités cohésives tandis que le vecteur a des extrémités franches.

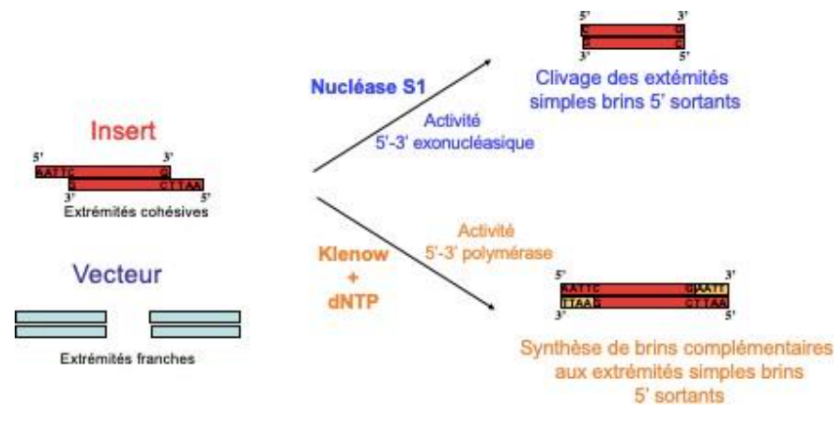
Nous avons différentes stratégies avec différentes enzymes que nous pouvons utiliser de façon à pallier à cela :

- **Nucléase S1** : traite l'insert et permet de cliver l'extrémité cohésive 5' simple brin débordante. L'activité de cette nucléase est 5' 3' exonucléasique (les exonucléases «grignotent» l'ADN). Ainsi, nous nous retrouvons dans une situation d'extrémités franches.



- **Klenow + dNTP** : permet de combler ces extrémités simples brins, et ainsi de rendre notre insert bords francs. Cette fois-ci, l'activité de l'enzyme est 5'3' Polymérase (les polymérases synthétisent de l'ADN). Par la synthèse de brins complémentaires aux extrémités simples brins 5' sortants / cohésifs, on obtient in fine, un ADN double brin.

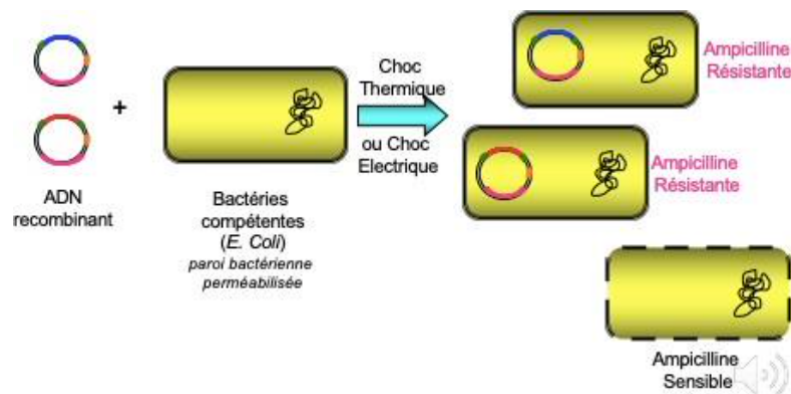
Dans les deux cas, on passe d'un insert à bords cohésifs, à un insert à bords francs.



ACTIVITÉ	ENZYMES
<b>Couper l'ADN double brin</b>	Enzymes de restriction / Endonucléases : coupent à l'intérieur du double brin  Exonucléases : coupent aux extrémités du double brin
<b>Copier</b>	Polymérases (DNA polymérase)
<b>Coller</b>	Ligases (T4 DNA Ligase)

## Introduction du vecteur dans la cellule hôte (bactérie)

### Transformation bactérienne

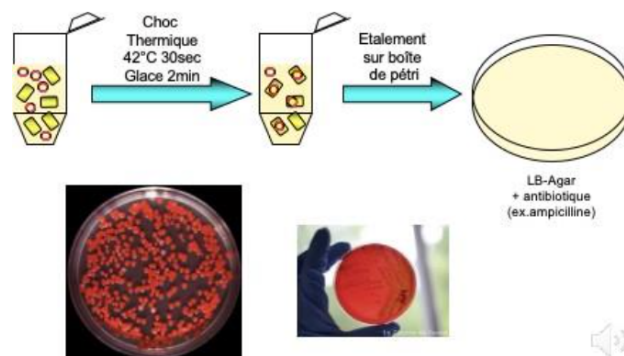


On utilise la transformation bactérienne grâce à des **bactéries dites compétentes** : ce sont des bactéries généralement **issues de la souche Escherichia Coli**. Elles sont pré-traitées de façon à ce que la paroi bactérienne soit déjà perméabilisée.

- Lorsque l'on va mélanger l'ADN recombinant et les bactéries compétentes, et que l'on va appliquer un choc thermique ou un choc électrique, cet ADN va être capable de rentrer dans les bactéries, le but étant ici d'introduire un seul ADN recombinant par bactérie. Ce n'est que comme ça que l'on va pouvoir séparer nos différentes populations d'ADN recombinant.
- Nos ADN recombinant codent pour un gène de résistance à un antibiotique, c'est ainsi que l'on va pouvoir sélectionner les bactéries ayant capté un ADN recombinant. Elles pourront pousser dans ce milieu, à la différence des bactéries pas d'ADN recombinant qui seront tuées par l'antibiotique.

### Étapes de la transformation bactérienne

1. Dans un tube on mélange notre ADN recombinant et nos bactéries.
2. On réalise un choc thermique, en chauffant notre tube à 42° pendant 30 secondes, puis en le plongeant dans la glace pendant 2 minutes. Ce choc thermique permettra aux ADN recombinant de rentrer dans les bactéries, puisque leur paroi aura été fragilisée.
3. Les bactéries seront ensuite étalées sur une boîte de pétri, boîte contenant le milieu nutritionnel nécessaire aux bactéries pour pousser et de former des colonies (LB-Agar), et l'antibiotique permettant la sélection des bactéries ayant capté l'ADN recombinant.
4. Après une nuit d'incubation à 37°C, on obtient des colonies de bactéries contenant nos fragments d'ADN.



### Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens

**Attention:** Chaque colonie bactérienne provient **d'une seule bactérie à l'origine**: on parle de sélection bactérienne puisque seuls les bactéries ayant capté l'ADN recombinant seront capables de former leur colonie car elles seront résistantes à l'ampicilline.

1 colonie (clone pur) correspond à 1 bactérie

Les bactéries sont dispersées de sorte à ce qu'elles puissent pousser, sans mélanger leurs descendances (ce que re- mélangerait nos fragments).

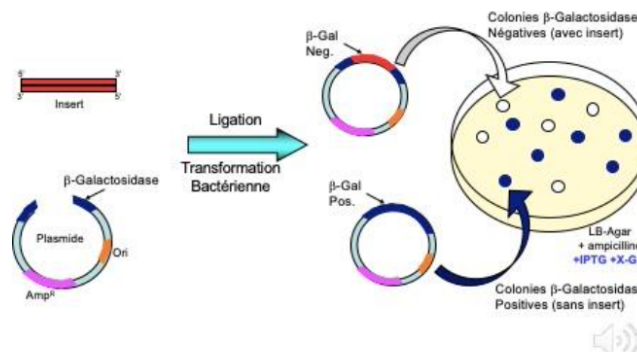
Cette séparation dans les bactéries permet la sélection d'une colonie, issue d'un clone unique (maternel ou paternel). *Et bam exactement ce qu'on voulait*

#### Sélection blanc / bleu

Pour faciliter la sélection des bactéries transformées, *aka* les bactéries ayant intégré cet ADN recombinant, on peut utiliser le système de sélection blanc / bleu.

Le plasmide code pour le **gène de la B-Galactosidase**. Le site de polylinker (qui permet de couper notre plasmide et d'insérer notre insert) se situe en plein milieu du gène en question.

➡ Cela signifie que les vecteurs ayant intégré l'insert auront des gènes pour la B-Galactosidase non fonctionnels (puisqu'ils auront été coupés en deux pour permettre l'introduction de l'insert)



**Les colonies resteront donc blanches** lorsque l'on introduira, sur nos boîtes de pétri, le substrat de la B-Galactosidase, puisqu'il ne pourra pas être utilisé.

En revanche, les bactéries ayant intégré un vecteur sans insert (donc refermé sur lui-même) pourront métaboliser le substrat en question puisque le gène sera fonctionnel. Les bactéries produiront une couleur bleue : ce sera le cas pour toute la colonie.

Cette technique permet de sélectionner des bactéries contenant l'insert : **on garde les colonies blanches** (contiennent l'ADN recombinant en entier = plasmide + insert).

**Sélection des bactéries ayant intégré le plasmide : grâce à la résistance à l'antibiotique**

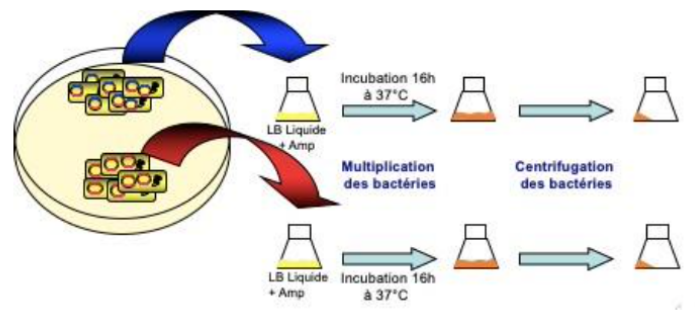
**Sélection des bactéries ayant intégré l'insert : grâce à la sélection blanc / bleu de la B-Galactosidase**

### **Obtenir un ADN recombinant pur en grande quantité**

À partir de ces colonies, on peut réaliser une **amplification clonale** → chaque colonie est mise en culture dans un milieu liquide de culture adapté à la croissance bactérienne.

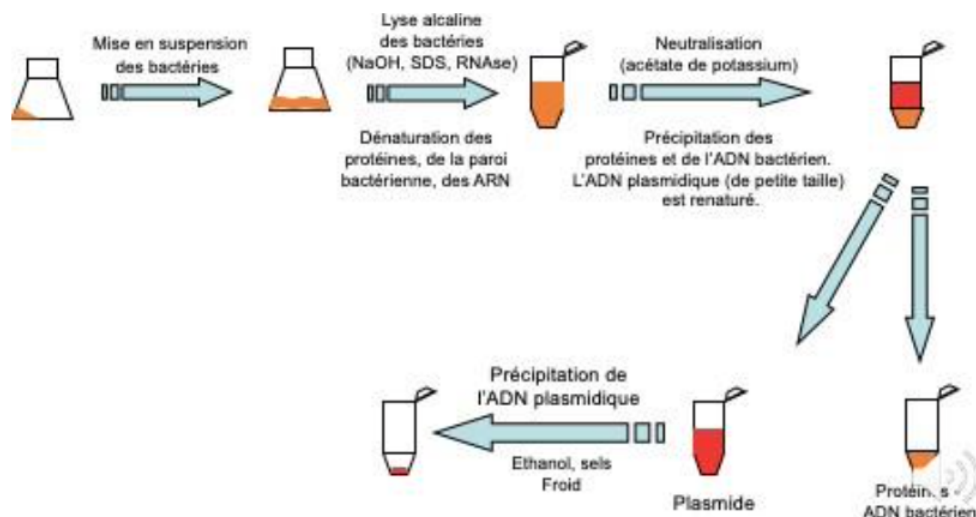
Ces bactéries vont être incubées 16h à 37°C pour qu'elles se multiplient. Au cours de cette répllication bactérienne notre ADN recombinant va également être répliqué : on obtient ainsi une grande quantité de notre ADN recombinant.

Le tutorat est gratuit et la meilleure chose de ta P1. Toute vente ou reproduction est interdite.



### Extraction de l'ADN recombinant

Après une étape de centrifugation, on va pouvoir récupérer le culot bactérien, c'est-à-dire les bactéries qui contiennent notre ADN d'intérêt.



Nous allons ensuite réaliser une extraction d'ADN (je vous renvoie au cours de mes super co-tuts).

Voilaaaaa c'est la fin de ce cours ~~de l'enfer~~ géniaaaaal, accrochez-vous bien et au bout de quelques relectures ça va passer comme une lettre à la poste.

Vos tutrices d'amour sont là pour vous tout le semestre, donc vraiment s'il y a des questions ou des incompréhensions, n'hésitez surtout pas à nous écrire sur le forum!

À bientôt pour de nouvelles fiches eheh