

Clonage d'Expression

Diapo 2020-2021

Introduction

- ◇ Technique permettant de déterminer la **pathogénicité** d'un variant.
- ◇ Etude de la localisation/la conformation de la protéine.
- ◇ Surexpression dans des modèles cellulaires/biologiques.

Réalisation chez les Eucaryotes

- ◇ Reverse transcriptase de l'ARNm
- ◇ Amplification par PCR de l'ADN
- ◇ Insertion au plasmide

Le plasmide

-Une **ORI** procaryote et une ORI eucaryote.

-Un **gène de résistance** procaryote (ampicilline) et un eucaryote (néomycine).

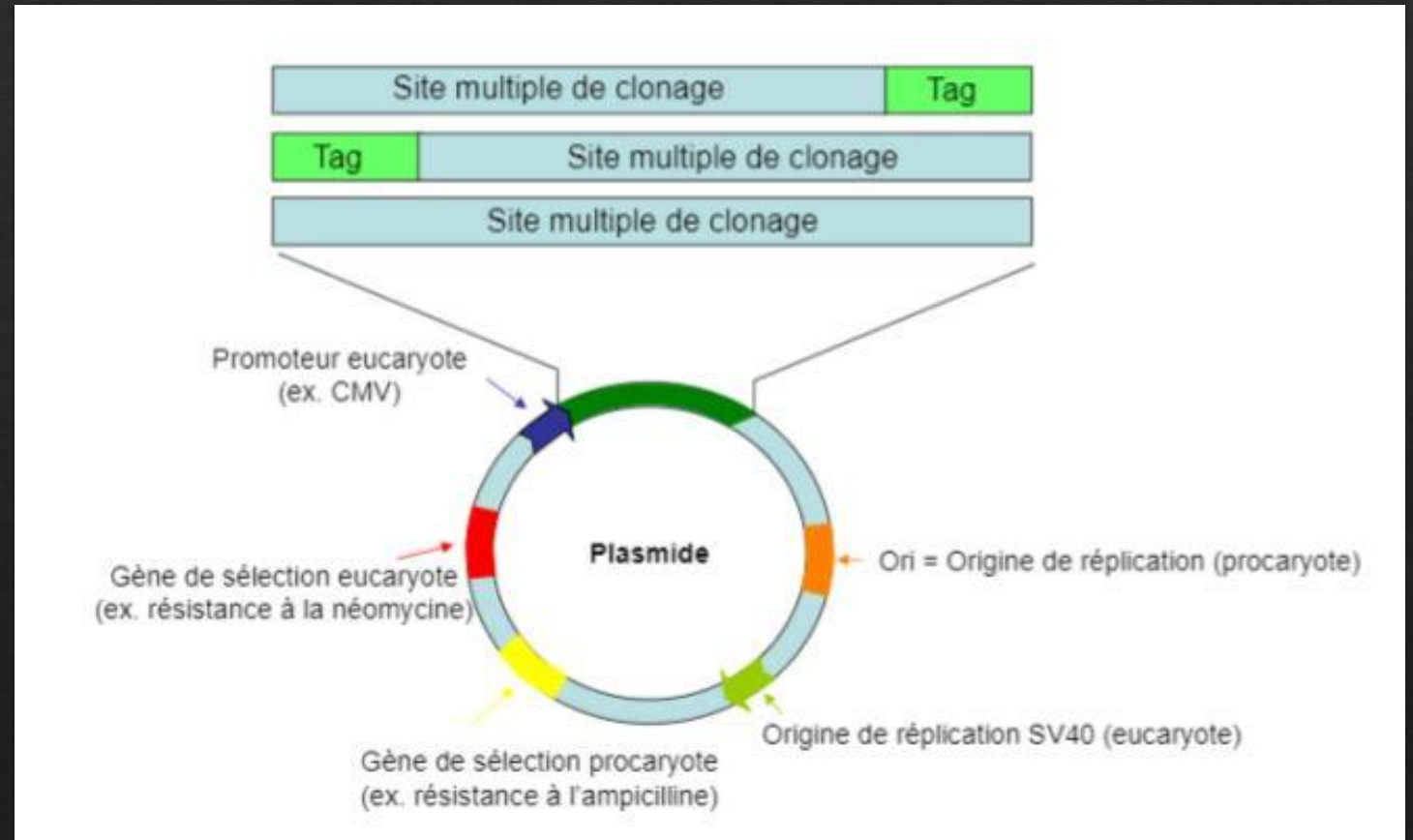
-Un **polylinker** = site multiple de clonage (site de coupure de l'enzyme, insertion de l'ADN)

-Des **tags**: peptide fluorescent ou peptide reconnu par des anticorps.

-Un **promoteur** eucaryote.

+++**Protéine de fusion**= ADN+tag+++

Attention à la position du tag, ajout par triplet, ne doit pas modifier l'expression ou la conformation de la protéine



ADN recombinant=ADN+plasmide

- ◇ +++L'expression d'un ADN dans une cellule PROCARYOTE=TRANSFORMATION+++
- ◇ +++L'expression d'un ADN dans une cellule EUCARYOTE=TRANSFECTION+++
- ◇ Transfection par:
 - ◇ -Phosphate de calcium
 - ◇ -Electroporation
 - ◇ -micro-injection
 - ◇ Virus
- ◇ -> Etude souvent par fluorescence de l'expression normale ou anormale d'une protéine

QCM 1

- ◇ 1) à propos du clonage d'expression
- ◇ A) Il permet d'obtenir de nombreux fragments identiques.
- ◇ B) On utilise la reverse transcriptase pour obtenir de l'ARNm à partir de la protéine étudiée
- ◇ C) L'ADN d'intérêt est ajouté dans le plasmide au niveau du polylinker
- ◇ D) L'ADN recombinant résulte de l'ajout d'un tag à une protéine.

QCM 1 correction

- ◇ 1) à propos du clonage d'expression
- ◇ A) Il permet d'obtenir de nombreux fragments identiques. Faux, def de la PCR. Le clonage d'expression permet de déterminer la pathogénicité= étude de l'effet d'une mutation
- ◇ B) On utilise la reverse transcriptase pour obtenir de l'ARNm à partir de la protéine étudiée. Faux, de l'ADN à partir de l'ARNm
- ◇ C) L'ADN d'intérêt est ajouté dans le plasmide au niveau du polylinker. Vrai
- ◇ D) L'ADN recombinant résulte de l'ajout d'un tag à une protéine. Faux, def de la protéine de fusion. ADN recombinant=ADN+plasmide

QCM 2

- ◇ 2) A propos du clonage d'expression,
- ◇ A) Une protéine de fusion peut être fluorescente ce qui la rend facile à étudier
- ◇ B) Dans une protéine de fusion, le tag est placé en aval du codon stop
- ◇ C) L'expression d'une molécule d'ADN dans une cellule procaryote est appelé transformation.
- ◇ D) L'électroporation permet la transfection de l'ADN recombinant.

QCM 2 correction

- ◇ 2) A propos du clonage d'expression,
- ◇ A) Une protéine de fusion peut être fluorescente ce qui la rend facile à étudier. **Vrai**
- ◇ B) Dans une protéine de fusion, le tag est placé en aval du codon stop. **Faux, en amont sinon il n'appartient pas à la protéine/il n'est pas traduit.**
- ◇ C) L'expression d'une molécule d'ADN dans une cellule procaryote est appelé transformation. **Vrai**
- ◇ D) L'électroporation permet la transfection de l'ADN recombinant. **Vrai**