

TUT' RENTREE UE11 PACES

Syndrome de Wolfram et clonage moléculaire.

Syndrome de Wolfram

4 symptômes:

- Diabète
- Atrophie optique
- surdité
- troubles neurologiques variables

Autosomique récessif

Gène WFS1 8 exons, le 1^{er} non codant

ATG sur le 2nd

Wolframine : régulation flux calcique mitochondrie/réticulum

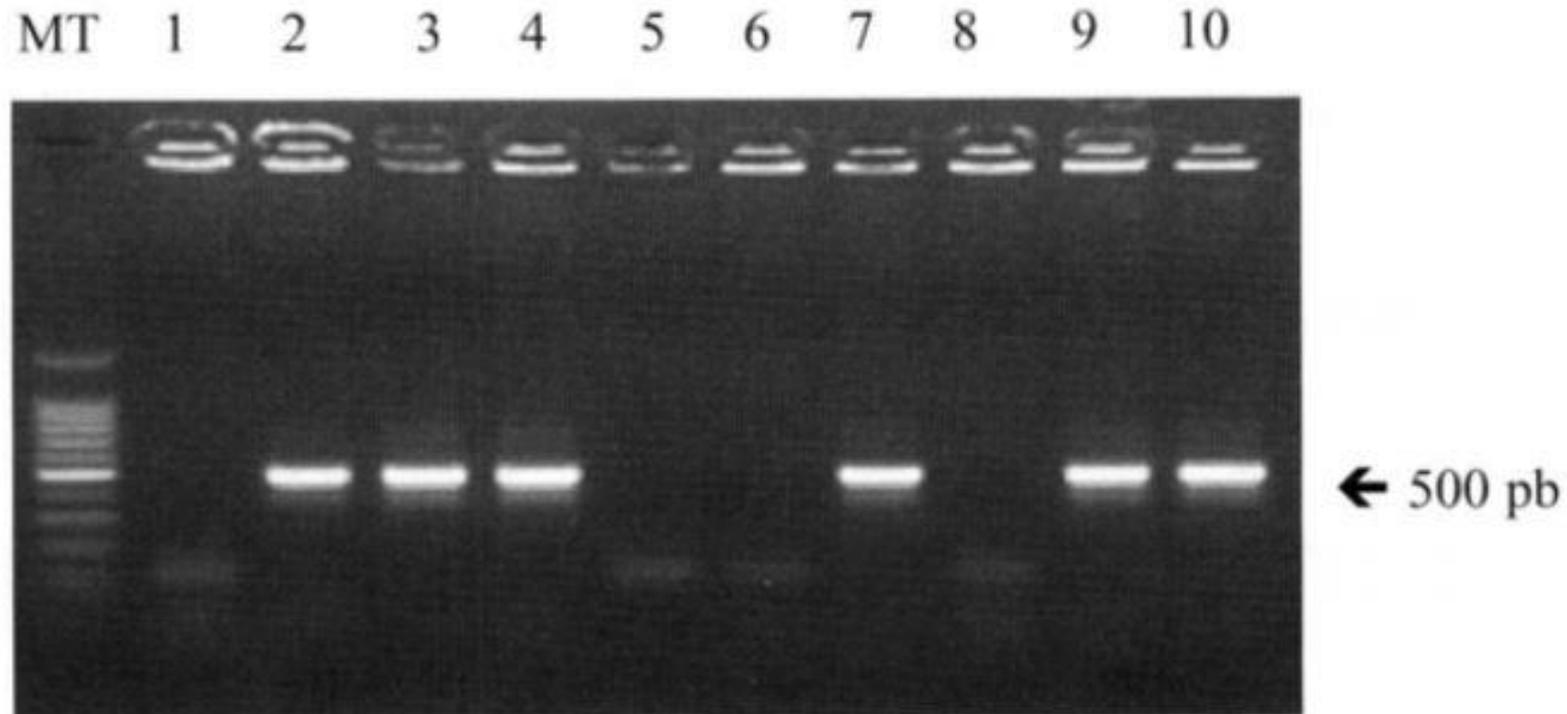


2-Séquençage:

séquençage des exons codants seulement + jonction avec l'intron (+/-5 nucléotides introniques de chaque côté) -> 7 PCR séquencées.

hétérozygotie composite.

site cryptique d'épissage (non codant)



2-Séquençage:

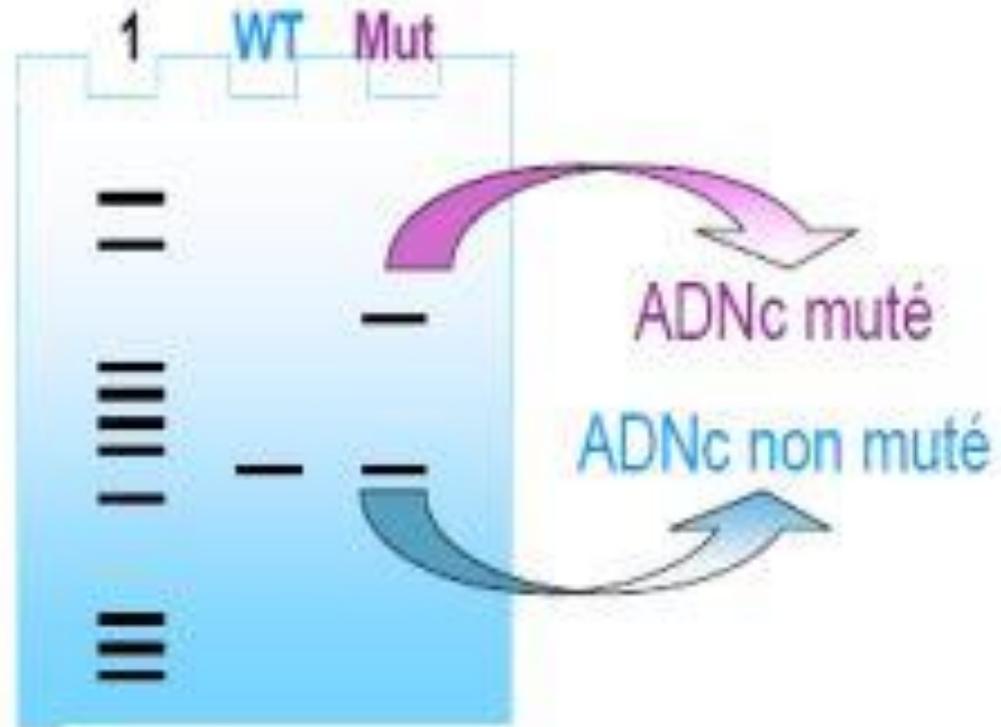
Pour l'ARNm :

- Lyse dans du phénol à pH acide (≠phénol chloroforme pour l'ADN)
 - recueil des ARNm via leur queue poly-A (sur support oligo-dT) qui est spécifique du type d'ARNm.
 - transcriptase inverse (=enzyme virale, activité 5'-3' ADN polymérase) sur amorce(= queue d'oligo-dT)
 - obtention d'un hétéroduplex =hybride ARN/ADNc
 - lyse de l'ARN hybridé à l'ADN par la RNase H (seulement si hybridé).
 - PCR (sans dénaturation au départ car ADN simple brin)
 - Vérification par électrophorèse sur gel analytique.
- ++savoir lire un gel d'électrophorèse++

Le fragment le + lourd migre moins loin.

2 traits = 2 alleles différentes

La simple substitution n'est pas visible sur électrophorèse.

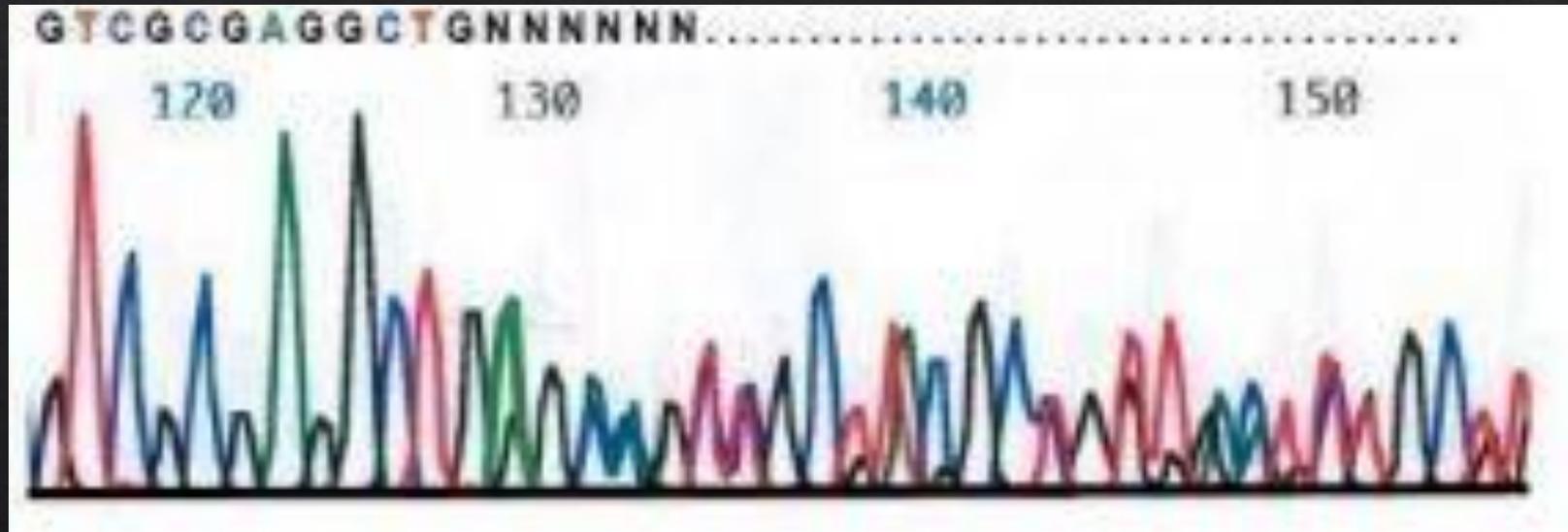


3-Clonage moléculaire

But: séparer les deux allèles pour pouvoir les séquencer individuellement.-> Copies PURES et IDENTIQUES.

Notion ADN recombinant=insert+vecteur

Transformation (≠transfection)



Les vecteurs:

ADN circulaire, double brin, bactérien, petite taille.

Réplication épisomiale

vecteurs de clonage \neq vecteurs d'expression

Un plasmide:

- une origine de réplication procaryote

- un gène de résistance (antibio)

- un polylinker/ site multiple de clonage, là où

l'ADN s'insère après ouverture du plasmide par une enzyme.



→ Ici on choisit cette solution

- Extrémities franches uniquement (ex : SmaI) -> pas top, car le vecteur a tendance à se refermer sur lui-même



- Les deux à la fois : on peut les combiner



Digestion du vecteur :

Extrémities:
 Cohésives: EcoRI
 Franches : SmaI (+/- déP)
 Combinées

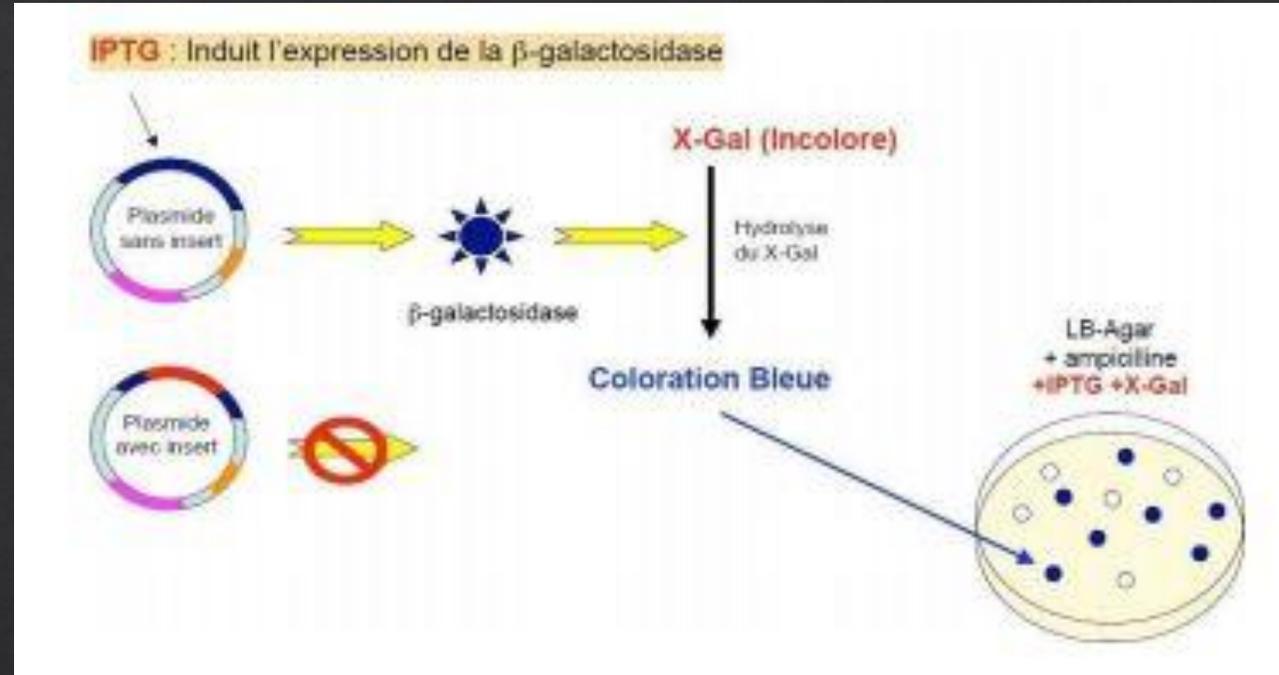
ajout séquence cplmt plasmide avant PCR.
 T4 DNA ligase+ATP+ions divalents

Extrémités combinées:

Nucléase S1 : activité 5'-3' exonucléasique

Klenow (+dntps) : activité 5'-3' polymérase

->mb compétente par chaleur ou électricité.



Sélection antibiotique (Ampicilline)
Sélection blanc bleu (β galactosidase + X-gal + Iptg)

On récupère l'ADN des bactéries pour le séquencer.

-on récupère les bactéries par centrifugation.

-Mise en suspension des bactéries dans tampon :

NaOH :Lyse des protéines

SDS :détergent pour la paroi bactérienne

RNAases :pour l'ARN bactérien

-Neutralisation lyse alcaline par acétate d potassium

-Précip des protéine/ADN bactérien +centrifugation

-Précipitation ADNp+éthanol et NaCl-> culot

-carte de restriction + migration électrophorétique

FIN!