

Clonage d'expression

MAJ fiche avec Ronéo 5. partie sur le clonage d'expression.

1-Introduction :

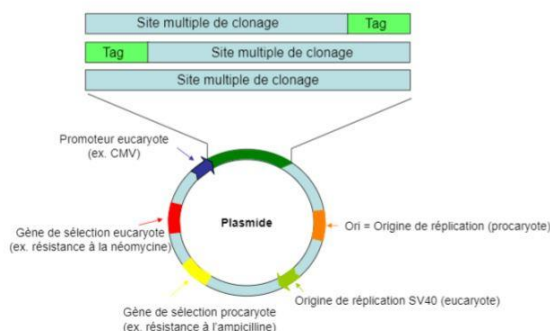
Le clonage d'expression est une technique permettant de déterminer la pathogénicité/ les conséquences d'un variant (=d'une mutation), **identifié par NGS ou PCR+Sanger**

Pour tout variant identifié par NGS ou PCR+Sanger, on peut étudier la localisation (**sur le bon organe**) ou la conformation de la protéine produite.

Pour cela, on surexprime l'expression de la protéine normale(wild type=WT et mutée) dans 2 modèles/cellules et on observe les conséquences.

2-Chez les Eucaryotes :

- On part de l'ARNm
- On effectue une **reverse transcriptase** (passage d'un ARN vers son ADN d'origine)
- On amplifie l'ADN par PCR
- On insert l'ADN dans un **plasmide** (le plasmide permet de faire entrer l'ADN dans la cellule et permet à celui-ci d'être exprimé).



Pour qu'un plasmide permette à l'ADN de s'exprimer dans une cellule EUCARYOTE, il doit contenir :

- une origine de réplication procaryote (car le plasmide subit une étape intermédiaire dans une bactérie)
- une origine de réplication eucaryote (**pour que l'ADN recombinant soit exprimé dans la cellule eucaryote**)
- un gène de sélection procaryote (pour conférer aux bactérie ayant ingéré le plasmide une

résistance/ un caractère particulier et reconnaissable) → résistance à l'**ampicilline**.

- un gène de sélection eucaryote → résistance à la **néomycine**.
- un **polylinker** (site multiple de clonages, là où l'adn s'insère après ouverture du plasmide par une enzyme)
- des tags/étiquettes : fragment ajoutés au début ou fin du fragment pour reconnaître la protéine (peptide **fluorescent** ou reconnu par des **Anticorps**)
- Un **promoteur** eucaryote pour l'expression du gène
- +++Un ADN+son tag =**protéine de fusion**+++
- **attention:l'ajout du tag ne doit pas modifier l'expression ou la conformation de la protéine...**
- Le tag doit être placé après ATG (AUG c'est pour l'ARN) codon initiateur, ou avant le codon stop pour être transcrit et traduit. Les nucléotides sont ajoutés par triplets.(Pour ne pas décaler le cadre de lecture)**
- >Les tags ajoutés en 5' débutent par un ATG et on supprime l'ATG de la protéine.
- De même les tags ajoutés en 3' se terminent par un codon stop et on retire le codon stop de la protéine.

+++L'expression d'un ADN dans une cellule

PROCARYOTE=TRANSFORMATION+++

+++L'expression d'un ADN dans une cellule

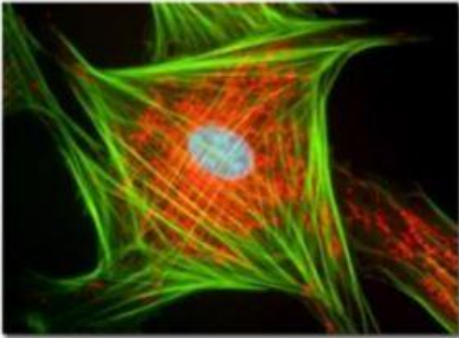
EUCARYOTE=TRANSFECTION+++

L'ADN recombinant (ADN+plasmide) est transfecté dans les cellules avec :

- Des réactifs chimiques: **Le Phosphate de Calcium+++** (L'ADN est mélangé avec une solution de chlorure de calcium, puis on ajoute un tampon phosphate. Il se forme ainsi un précipité de phosphate de calcium autour de l'ADN formant des « cristaux » qui seront endocyté ou phagocyté par la cellule et permettent à l'ADN de rejoindre le noyau.). **Egalement DEAE, Dextran, Liposome**
- Electroporation** (choc électrique)
- Microinjection**
- Virus (infection)**

Les protéines de fusion peuvent être étudiées via leur fluorescence ou la fluorescence de leur anticorps . **En microscopie Confocale (type de Microscopie optique) on obtient ce genre d'images :**

Clonage d'expression



Fin ! (Avec une photo de fluorescence au microscope parce que c'est beau!!)