

MANIPULATION DE L'ADN

JOUER AVEC LES BRINS

- double → simple : casser les liaisons hydrogène
dénaturation (par chaleur ou agents chimiques)
- simple → double
 1. **hybridation** appariement de deux brins complémentaires
 2. enzymes (**polymérase**) pour compléter un brin (dans la présence de nucléotides à incorporer)

BRINS 2

hybridation : température de fusion (*melting temperature*) — 50% de ADN dénaturé
 T_m dépend de la séquence [G-C plus fort que A-T], et conditions expérimentales (agents chimiques)

approximation par formule de Wallace $T_m = 2\{A, T\} + 4\{C, G\}$ [en Celsius]

polymérase : construit le brin $5' \rightarrow 3'$ à partir d'une région déjà complétementé
(**primer**)

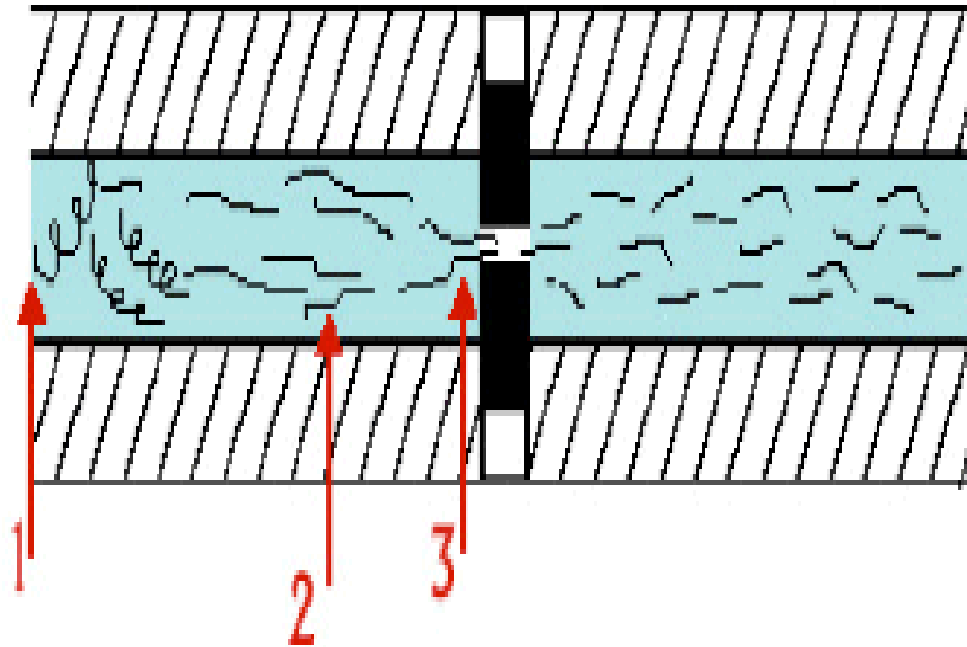
primer aléatoire (tous 6mers) ou sélectionné

COMMENT COUPER L'ADN EN PETITS MORCEAUX ?

1. au hasard (p.e., **sonication** — par ondes de haute fréquence, **cisaillement**/*shearing*)

2. moins hasard (répétable) : **enzymes de restriction**

CISAILLEMENT



cisaillement hydrodynamique : les molécules s'accélèrent en approchant la région étroite : les forces d'allongation brise les molécules

ENZYMES DE RESTRICTION

endonucléase — coupe l'ADN à un site spécifique (4–8 pb typiquement)

Nom	Site
AluI	AG.CT
EcoRI	G.AATTC
HindIII	A.AGCTT
centaines d'autres...	

ER 2

site d'un ER est un palindrôme : le complément inverse a la même séquence



sticky ends

⇒ hybridation d'amorces compatibles (d'origines différentes)

+ enzyme de **ligase** pour les liaisons covalentes

ER 3

Site reconnu et point de clivage

Nom	Site
KasI	G.GCGCC
NarI	GG.CGCC
EheI	GGC.GCC
BbeI	GGCGC.C
HaeII	RGCGC.Y

$(R = \{A, G\}, Y = \{C, T\})$

KasI – BbeI sont *isoschisomeres*)

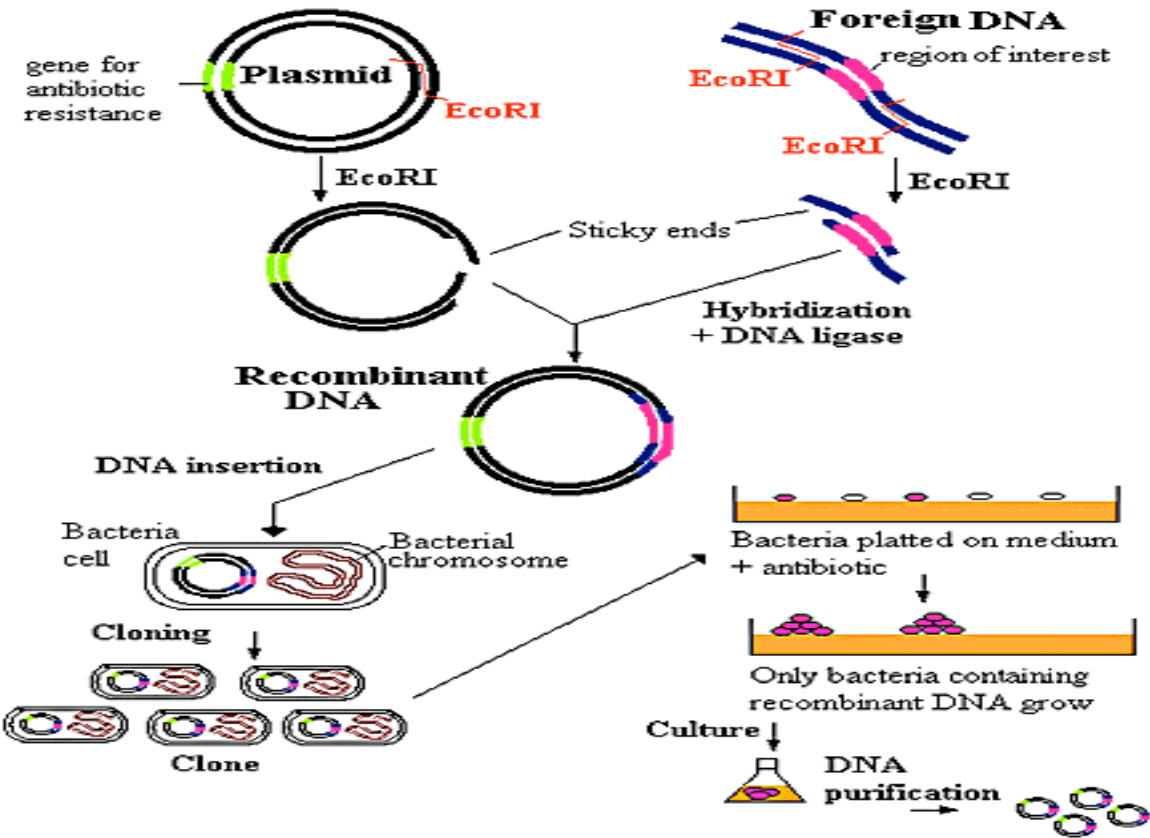
HaeII et BbeI sont *compatibles* : v. sticky end GGCGC

CLONAGE : IDÉE

Pour créer des copies de fragments d'ADN (amplification *in vivo*)

1. fragments d'ADN (après coupure par ER)
2. insertion dans **vecteur** d'une cellule hôte (bactérienne ou virale)
3. culture et purification

CLONAGE



Cloning into a plasmid

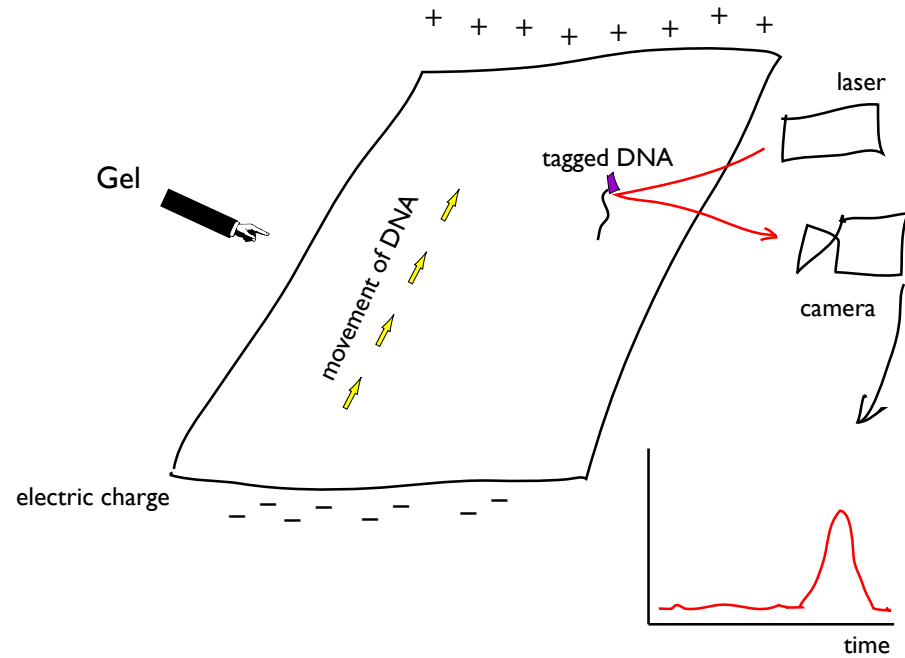
Lodish et al. *Molecular Cell Biology*, 4th ed., W. H. Freeman 1999; [Access Excellence](#)

VECTEURS

Vecteur	Hôte	Taille d'insert ($\times 1000$ pb)
M13	<i>E. coli</i>	1–4
Plasmid	<i>E. coli</i>	1–5
Phage λ	<i>E. coli</i>	2–25
Cosmid	<i>E. coli</i>	35–45
BAC	<i>E. coli</i>	50–300
YAC	<i>S. cerevisiae</i>	100–2000

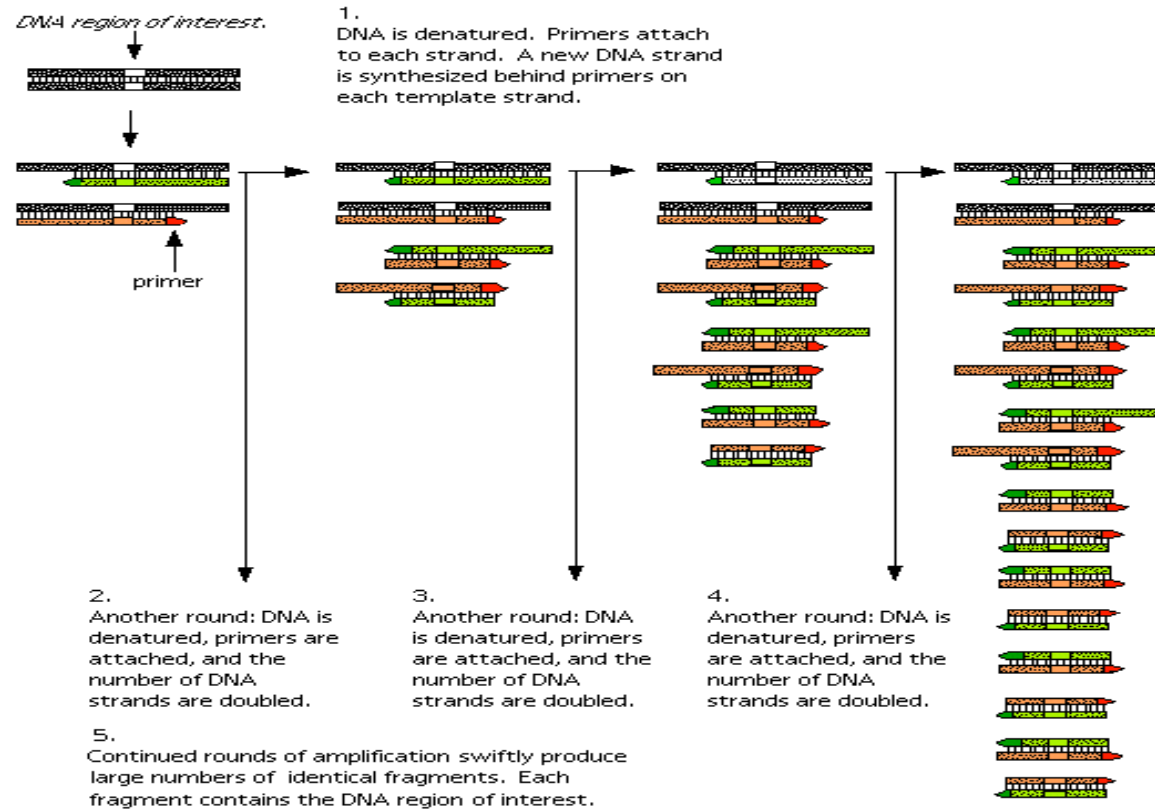
ELECTROPHORÈSE

mesure la taille d'un fragment ADN

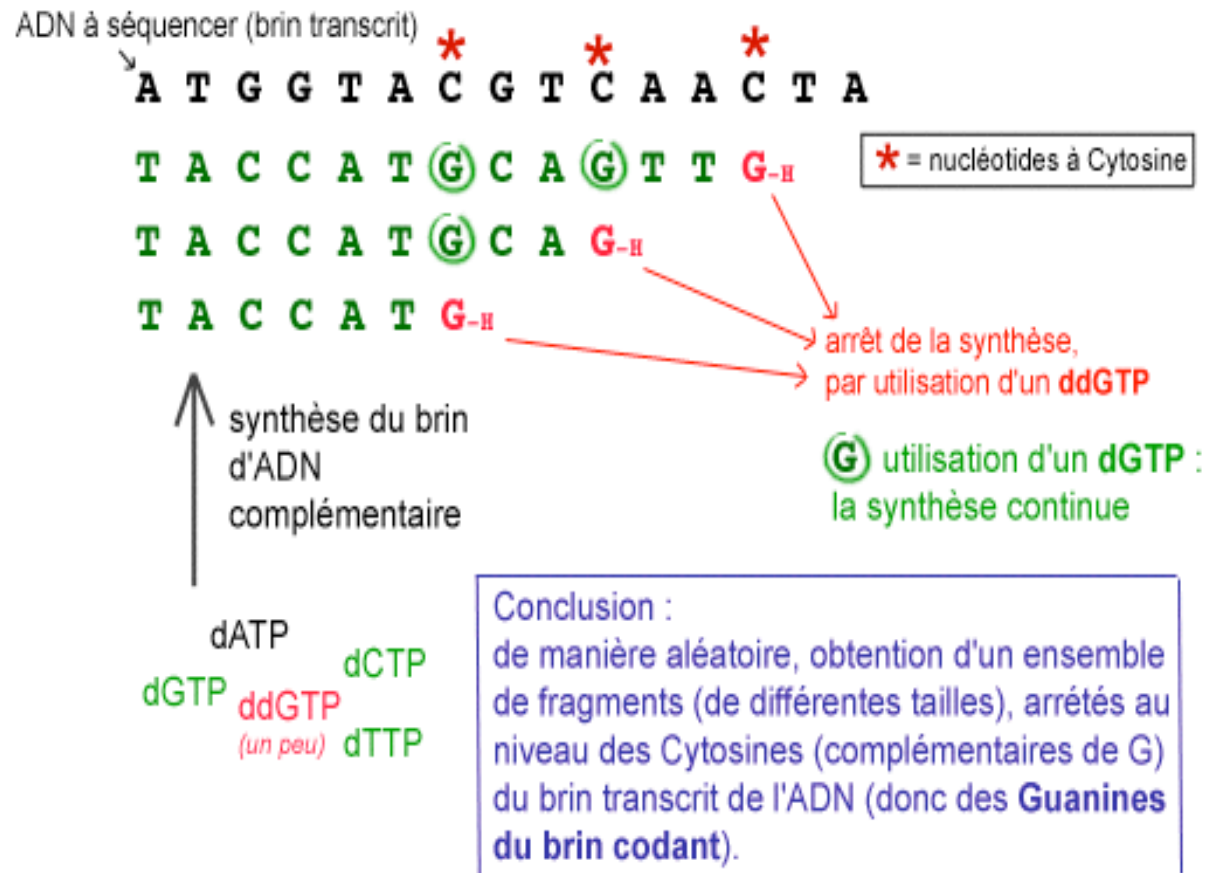


POLYMERASE CHAIN REACTION

POLYMERASE CHAIN REACTION



SÉQUENÇAGE — MÉTHODE SANGER



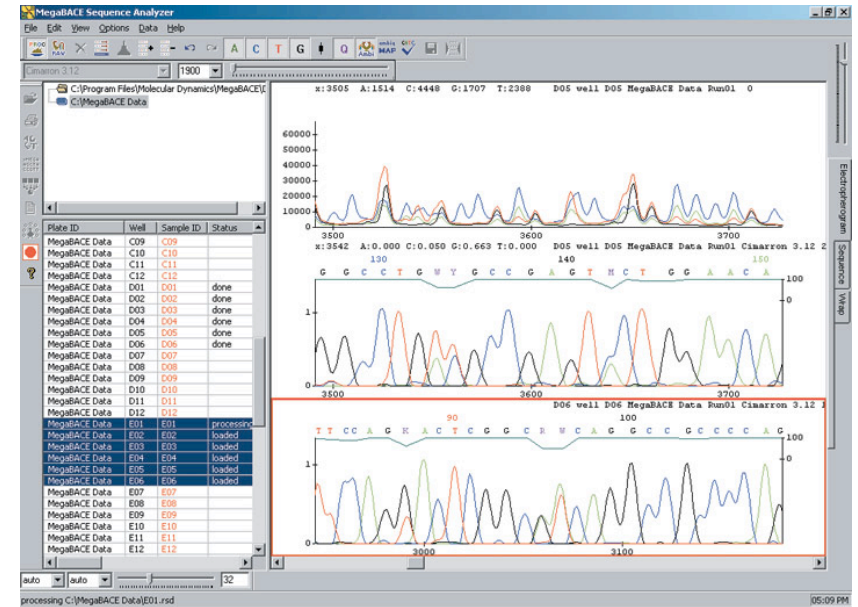
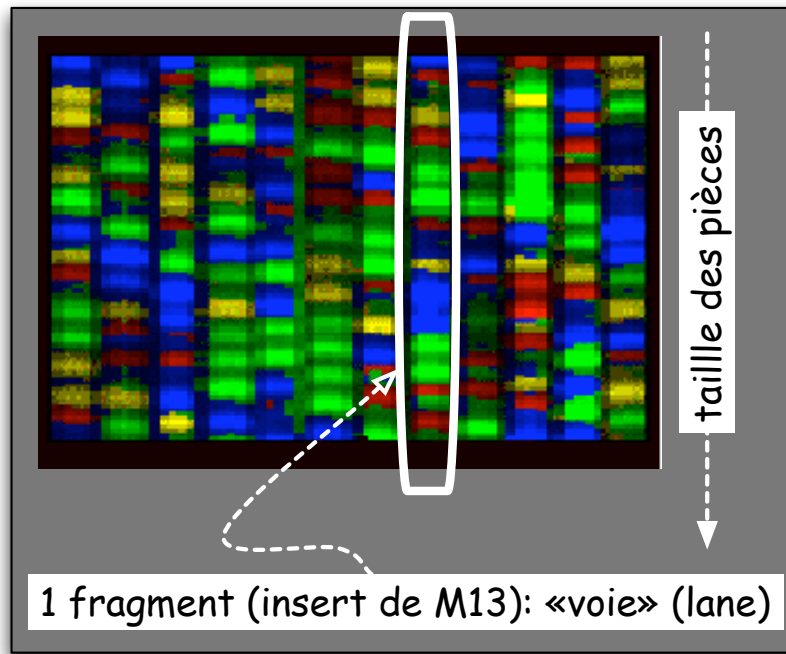
Lodish et al. *Molecular Cell Biology*, 4th ed., W. H. Freeman 1999 ; Delarue et Furelaud, Jussieu

SÉQUENÇAGE AUTOMATIQUE

→ marqueurs fluorescents, multiplexage, capillaires, cycleurs thermiques

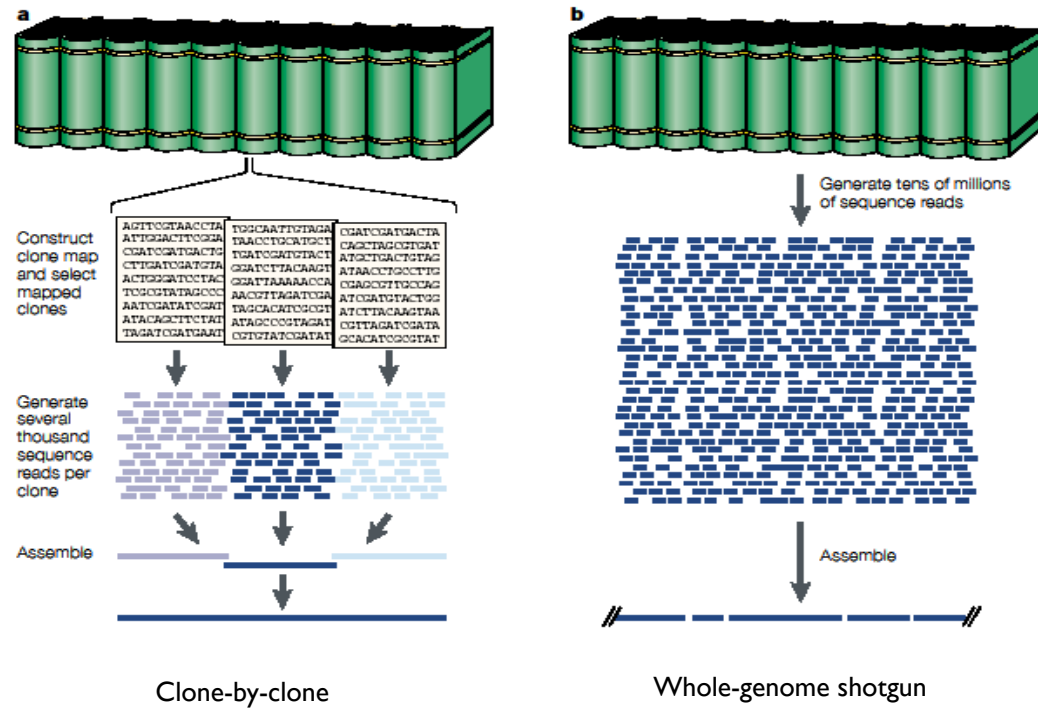
tailles jusqu'à 1000 pb (typiquement 600 pb en Sanger ; 100pb en pyroséquençage)

ELECTROPHORÈSE EN SÉQUENÇAGE



<http://www.megabace.com/>

SÉQUENÇAGE D'UN GÉNOME



E. Green. Nature Reviews Genetics 2:573 (2001)

APPROCHE HIÉRARCHIQUE

