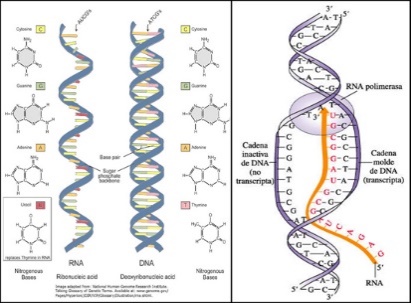
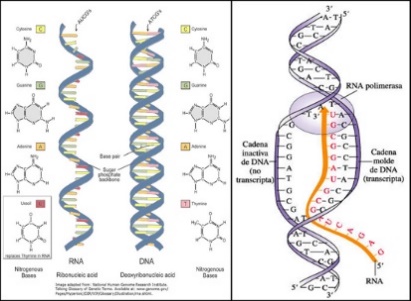
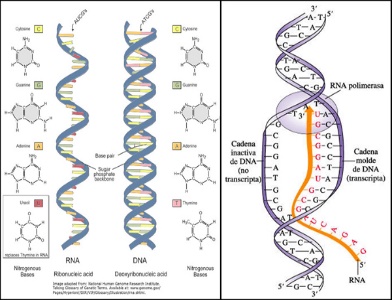
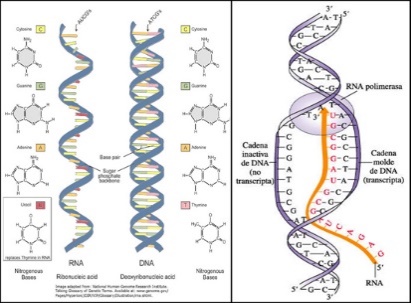
**Clonage d’un gène**

**Origine d’ADN :**

Extraction

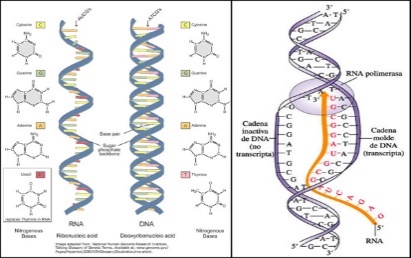


ADN

Endonucléase

**ADN génomique**

Traduction inverse



**ADN synthétique**

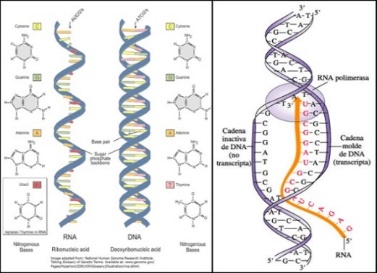
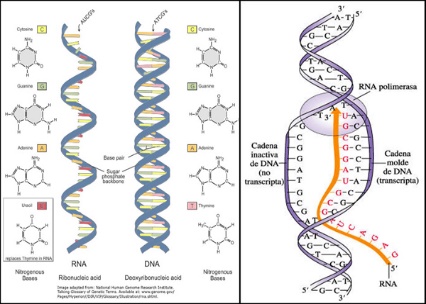
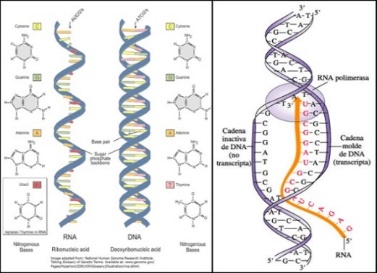
Séquençage

Peptide

Séquençage théorique d’ADN

Extraction

Synthèse



ARNm

**ADN complémentaire**

Transcriptase réverse

ADN monobrin

ADN polymérase

Extraction

**Transfert de l'ADN :**

* Insertion de l’ADN dans un vecteur (plasmide, bactériophage, cosmide)

1. **Insertion simple**
2. **Insertion par addition des homopolymères** : ce sont des séquences identiques de nucléotides rajouté à l’ADN pour rendre les extrémités cohésives et ou compatible
3. **Par addition de linker :** dans le cas ou mon ADN à insérer ne possède pas de site de restriction ou il possède plusieurs sites, dans le dernier cas, on fait un méthylation avant l’ajout du linker (pour avoir l’intégralité du fragment à insérer)

**Récepteur microbien**

**Propriétés :**

* Les souches réceptrices doivent être de bon récepteur pour l’ADN donneur,
* Elles doivent être bien connues au point de vue génétique.
* De préférence qu’elles ne soient pas pathogènes.
* Elles doivent se cultiver facilement, être robustes et peu exigeantes avec des bons paramètres de développement (vitesse, rendement).

**Analyses des clones obtenus :**

**Sélection des souches recombinées**

**Mise en évidence de la présence du vecteur (voir cours plasmide).**

* + Basé sur la résistance aux antibiotiques pour les plasmides
  + Basé sur la formation de plage ou plaque de lyse pour les bactériophages

**Mise en évidence de la présence de l’ADN donneurs (voir cours plasmide)**

* + Basé la résistance aux antibiotiques pour les plasmides
  + Basé sur la coloration des colonies ou de la plage de lyse (gène lac Z) pour les plasmides et les bactériophages.

**Sélection des souches recombinés contenant une séquence spécifique :**

* **Méthode biochimique :**

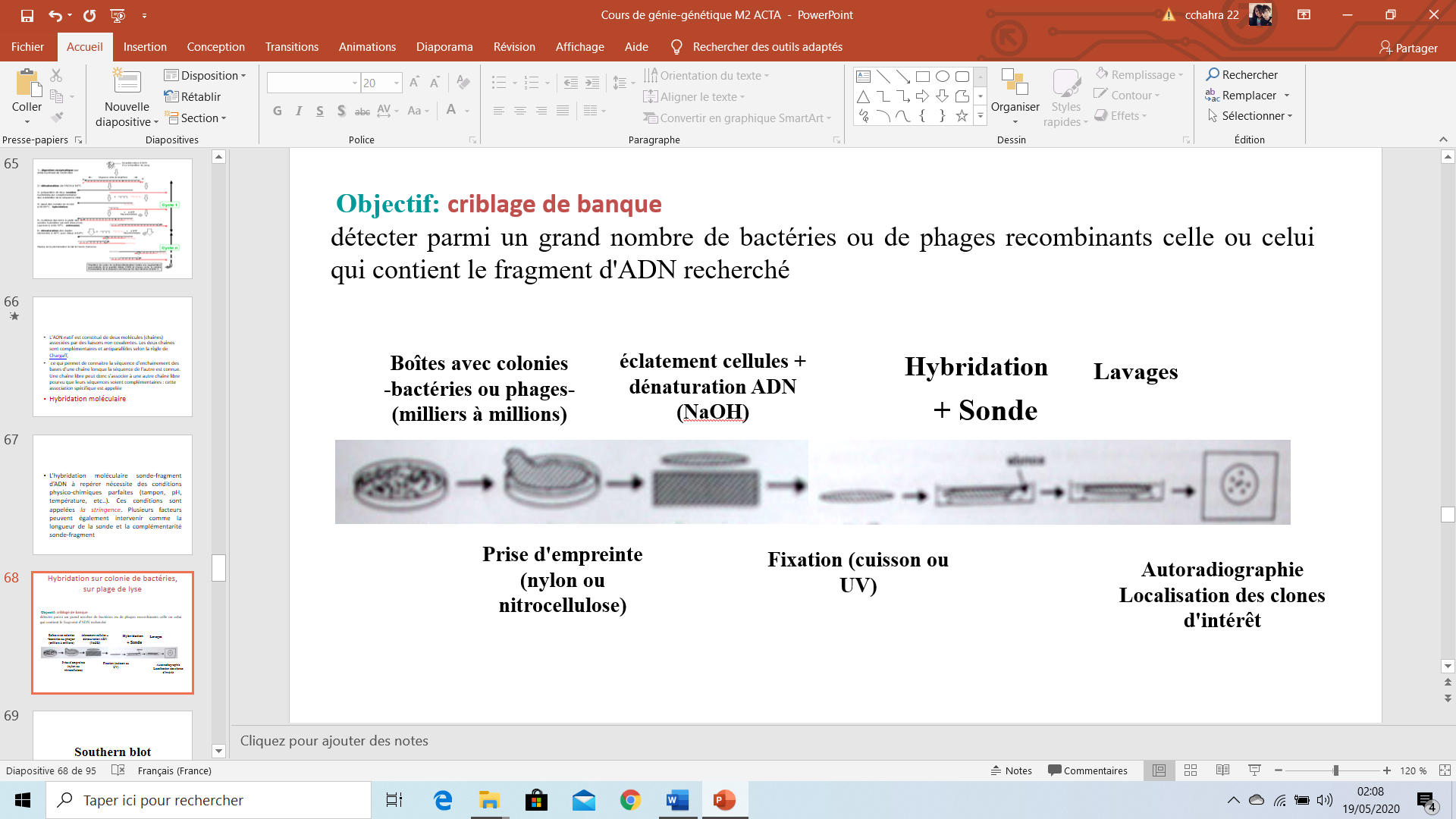
Utilisé lorsque la séquence est capable d’annuler un défaut métabolique de la souche réceptrice, ex : une auxotrophie, il faut utiliser un milieu minimum pour sélectionner les souches intéressantes.

* **Méthode immunologique :**

Utilisé lorsque la séquence à cloner a des propriétés antigéniques, et que les anticorps correspondants sont disponibles

* La méthode de de Broome et Gilbert (radioimmunoassay sandwich *in situ*) :
* Absorber les anticorps sur une feuille de plastique.
* Appliquer cette dernière sur une réplique, les colonies de réplique sont préalablement lysées.
* La feuille porte des traces d’antigène sur les sites correspondant aux bonnes colonies.
* Traitement avec l’anticorps radioactif, suivie d’une autoradiographie permet de localiser les clones transformés sur la boite d’isolement.
  + **Méthode utilisant l’hybridation des acides nucléique :**
* Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse.

Détecter parmi un grand nombre de bactéries ou de phages recombinants celle ou celui qui contient le fragment d'ADN recherché.



* Southern blot (voir cours Southern blot)
* Nothern blot
* **Technique HART** (Hybrid ARrested Translation) :

C’est une technique qui est utilisée pour identifier le produit de traduction codé par un gène cloné.

**Principe de la méthode :**

L’ADN extrait d’un clone est dénaturé puis mis en contact avec l’ensemble des ARN messagers provenant de l’organisme donneur (la source de l’ADN), après hybridation, le mélange est ajouté à un système de traduction, (Ce sont des extraits de cellules, généralement préparés à partir de graines de blé en germination ou de cellules de réticulocytes de lapin, qui sont tous deux exceptionnellement actifs dans la synthèse des protéines. Les extraits contiennent des ribosomes, des ARNt et toutes les autres molécules nécessaires à la synthèse des protéines). L'échantillon d'ARNm est ajouté au système de traduction sans cellule, avec un mélange des 20 acides aminés trouvés dans les protéines.

Seuls les ARN messager non hybridé sont traduit en protéines.

* Si la **protéine correspondante à l’ADN souhaité est présente**, cela signifie que l’ARNm correspondant a été traduit, c’est à dire **absence du gène d’intérêt**.
* Si **la protéine correspondante à l’ADN souhaité est absente**, cela signifie que la synthèse est bloquée par l’hybridation ARNm/ADN, c’est-à-dire **présence du gène d’intérêt.**

La mise en évidence de la protéine se fait par immunologie ou par radiographie après marquage d’un acide aminé.