

GÉRARD LUCOTTE

ABC de génie génétique

Initiation aux techniques
de clonage, de séquençage
et d'expression
des gènes eucaryotes

Sommaire

AVANT-PROPOS	13
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES	14
CHAPITRE 1 Généralités	15
CHAPITRE 2 Les enzymes de restriction	19
CHAPITRE 3 Les procédés de ligation	25
Ligation des extrémités cohésives produites après digestion par les enzymes de restriction	26
Utilisation de molécules synthétiques de jonction	29
Utilisation de la méthode d'addition de séquences homopolymériques complémentaires	31
CHAPITRE 4 Les banques génomiques et les vecteurs phagiques	35
Les banques génomiques	35
Biologie du bactériophage λ et des vecteurs qui en sont dérivés	36
<i>λ utilisé comme vecteur</i>	39
<i>La transfection par encapsidation in vitro</i>	42
<i>Les cosmides</i>	44
Cas particulier du phage M13	46
CHAPITRE 5 La biologie des plasmides	49
Propriétés générales	49
Purification de l'ADN plasmidique	51
Les différents types de plasmides	53
<i>Les premiers plasmides utilisés</i>	54
<i>Cas particulier de pBR322</i>	56
<i>Autres types de plasmides</i>	58

La transformation bactérienne	59
Stabilité des clones recombinants	60

CHAPITRE 6

Les banques d'ADN complémentaire

Caractérisation	63
Préparation du messager	63
Préparation de l'ADNc double brin	64
Insertion dans un vecteur	67
Sélection et isolement des colonies transformées contenant la séquence insérée	69

CHAPITRE 7

Cartographie de restriction

Méthode d'hybridation après transfert	77
<i>Structure morcelée des gènes eucaryotes</i>	78
<i>Détection des gènes dupliqués</i>	79
<i>Mise en évidence d'une liaison entre gènes</i>	81
<i>Mise en évidence d'un réarrangement complexe au cours de l'embryogenèse</i>	83
<i>Cas particulier des thalassémies</i>	84
<i>Cas particulier de la détermination de la distance entre la fin d'une séquence codante et un site de restriction</i>	85
<i>Détection des variants individuels</i>	87
Méthode particulière d'hybridation après transfert sur papier DBM	87
<i>Mise en évidence des intermédiaires d'épissage</i>	89

CHAPITRE 8

Cartographie par microscopie électronique

Principe et méthodes	95
<i>Hétéroduplex</i>	95
<i>Boucles R</i>	100
Hybrides ADN-ARN	103

CHAPITRE 9

Les méthodes de séquençage et leurs résultats

Méthode d'analyse des taches	121
Méthode <i>plus et moins</i>	122
Méthode au diméthylsulfate-hydrazine	124

CHAPITRE 10

Hybridation *in situ*

<i>Utilisation des chromosomes géants chez la drosophile</i>	143
--	-----

<i>Mise en évidence d'éléments transposables chez la drosophile</i>	146
<i>Utilisation des techniques d'hybridation cellulaire</i>	148
<i>Détection des séquences uniques</i>	148
 CHAPITRE 11	
Expression des gènes clonés	151
Utilisation du plasmide pBR322	152
<i>Expression de la somatostatine chimiquement synthétisée</i>	152
<i>Expression de l'ovalbumine</i>	156
Insertion au site PstI de pBR322	159
<i>Expression de la proinsuline de rat par clonage au site PstI de pBR322</i>	159
<i>Autres exemples</i>	162
 CHAPITRE 12	
Clonage dans les cellules eucaryotes	167
Clonage en utilisant SV40 comme vecteur	167
<i>Propriétés de SV40</i>	167
<i>Utilisation de SV40 comme vecteur</i>	169
<i>Expression du gène β-globine dans SVGT-5</i>	171
Transformation de cellules en culture	172
Microinjection dans les ovocytes de <i>Xenopus</i>	173
<i>Transcription de gènes de l'ARNr</i>	176
<i>Transcription de gènes de l'ARNt et leur maturation</i>	177
<i>Transcription en ARNm et traduction des messagers produits</i>	178
 BIBLIOGRAPHIE	183
NOTES ET REFERENCES	185
INDEX	189