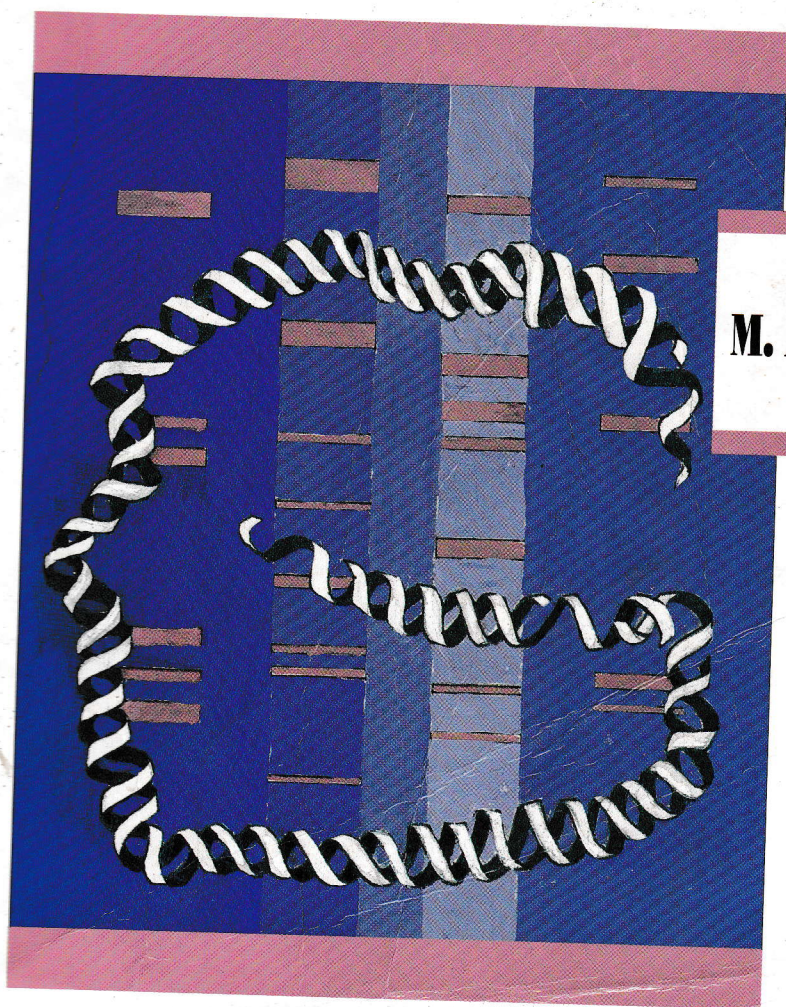


BIOSCIENCES ET TECHNIQUES
collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

BIOTECHNOLOGIES

Génie génétique



**D. Loncle
M. Amaudric
C. Jacoty**

doin

BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Génie génétique

Cet ouvrage achève, après les ouvrages de *Génie fermentaire* et de *Génie enzymatique* déjà parus, une série conçue pour couvrir les trois principaux domaines des biotechnologies.

La mise en œuvre pratique de techniques appliquées dans les bio-industries procède d'une interrelation fréquente entre ces trois familles de procédés. La dimension professionnelle de la formation des techniciens supérieurs intègre logiquement ces trois volets techniques.

S'appuyant sur leur expérience, les auteurs ont réalisé un livre très complet sur le sujet. Sa vocation est utilitaire, tant par son contenu que par sa présentation. La structuration des chapitres permet de s'y retrouver rapidement.

Destiné, en premier lieu, aux étudiants se préparant aux métiers des bio-industries (production ou recherche), ce livre met à leur disposition de nombreux détails techniques et savoir-faire leur permettant de réaliser dans le cadre de leur formation des manipulations "réelles". Il contient également une présentation théorique des procédés complexes du génie génétique avec une ouverture sur les techniques les plus récentes.

Des rappels, compléments et exercices résolus complètent les protocoles et les conseils. Comme dans les deux autres ouvrages, toutes les manipulations présentées ont été réellement testées avec des groupes d'étudiants et sont opérationnelles.

La structure de ce livre suit une logique de progression et de difficulté dans la connaissance et la mise en œuvre pratique.

Les thèmes suivants sont abordés :

ADN, propriétés, extraction, purification, quantification ; électrophorèse et digestion de l'ADN ; introduction d'un ADN vecteur dans une cellule hôte ; sondes nucléiques et techniques de transfert ; exemple de clonage d'un gène ; synthèse et séquençage de l'ADN.

Adapté à un enseignement destiné à des étudiants de niveau Bac + 2 (DUT, BTS, voire licence) ce document rendra certainement de nombreux services à ses utilisateurs qu'ils soient professeurs ou élèves.

**D. Loncle
M. Amaudric
C. Jacoty**



ISBN : 2-7040-0692-X

SOMMAIRE

1^{re} partie : L'ADN : propriétés ; extraction, purification, quantification

Chapitre 1 : L'ADN chromosomique	3
<i>Rappels théoriques</i>	5
1. L'ADN génomique et sa structure	
2. Extraction de l'ADN chromosomique	
3. Quantification de l'ADN	
<i>Manipulation 1 : Extraction de l'ADN bactérien</i>	
<i>Détermination de la masse d'ADN par cellule</i>	13
<i>Manipulation 2 : Extraction de l'ADN de splénocytes de rat</i>	
<i>Détermination du rapport massique ADN/protéines</i>	
<i>et de la quantité d'ADN par cellule</i>	23
<i>Annexes techniques</i>	33
1. Déprotéinisation et concentration de l'ADN	
2. Extraction d'ADN à partir de sang total sans phénol-chloroforme	
3. Extraction rapide d'ADN de levure	
4. Exemple d'extraction d'ADN végétal	
5. Dosage fluorimétrique de l'ADN en présence de BET	
6. Etude de la dénaturation thermique de l'ADN	
Chapitre 2 : L'ADN plasmidique	39
<i>Rappels théoriques</i>	41
1. Les plasmides	
2. Extraction et purification	
<i>Manipulation 3 : Minipréparation de plasmide pBR322 par lyse alcaline</i>	51
<i>Manipulation 4 : Obtention d'une quantité importante de plasmide purifié</i>	
<i>Comparaison de deux méthodes</i>	63

Annexes techniques	77
1. Minipréparation de plasmide (pUC18) par lyse par ébullition	
2. Protocole simple de minipréparation	
3. Maxipréparation de gros plasmides avec lyse douce	
Chapitre 3 : L'ADN phagique	81
Rappels théoriques	83
1. Le phage lambda et ses dérivés	
2. Le phage M13 et ses dérivés	
Manipulation 5A : Culture de phages lambda en milieu semi-solide Titration des phages et préparation de stocks phagiques	89
Manipulation 5B : Extraction de l'ADN du phage lambda à partir d'une culture en milieu semi-solide	99

2^e partie : Electrophorèse et digestion de l'ADN

Chapitre 4 : Electrophorèse en gel d'agarose	109
Rappels théoriques	111
1. L'agarose	
2. Le matériel d'électrophorèse	
3. Les facteurs de la migration électrophorétique	
4. Suivi de la migration et révélation	
5. Etalonnage d'un gel	
Manipulation 6 : Détermination de la taille d'un fragment d'ADN Technologie du gel d'agarose	119
Manipulation 7 : Estimation sur gel d'agarose d'une masse d'ADN plasmidique	129
Annexes techniques	135
1. Décontamination et destruction du BET	
2. Photographie des gels d'agarose	
3. Electrophorèse d'ADN en gel de polyacrylamide	
Chapitre 5 : Digestion par les endonucléases de restriction	141
Rappels théoriques	143
1. Présentation des endonucléases de restriction	
2. Endonucléases de restriction : outils indispensables de la technologie de l'ADN	
3. Conditions d'activité des endonucléases de restriction	
4. Technologie des endonucléases de restriction	
Manipulation 8 : Hydrolyse de l'ADN du phage lambda Analyse des fragments de restriction par électrophorèse ...	159
Manipulation 9 : Réalisation d'une carte de restriction de pBR322 pour EcoR I, Bgl I, Hinc II	167

Annexes techniques	175
1. Réalisation d'un marqueur de taille pour électrophorèse sur gel d'agarose : ADN du phage lambda hydrolysé par Hind III et EcoR I	
2. Hydrolyse partielle de l'ADN du phage lambda par une endonucléase de restriction : Hind III	

Chapitre 6 : Elution de l'ADN d'un gel d'agarose	179
---	-----

Rappels théoriques	181
1. Electroélution	
2. Elution par solubilisation de l'agarose et adsorption de l'ADN	
3. Autres procédés d'élution	

Annexes techniques	183
1. Electroélution sur feuille de DEAE-cellulose	
2. Elution par le procédé GENECLEAN	
3. Technique du "tube troué"	

3^e partie : Introduction d'un ADN vecteur dans une cellule hôte

Chapitre 7 : Transformation d'E.coli par un plasmide	191
---	-----

Rappels théoriques	193
1. Transformation chimique	
2. Electrotransformation	

Manipulation 10 : Transformation d'E.coli par le plasmide pBR322	
Réalisation et étude de la méthode au chlorure de calcium	199

Annexes techniques	219
1. Méthode rapide de préparation et de transformation de cellules compétentes	
2. Préparation de cellules compétentes et transformation d'après la méthode de Hanahan	
3. Electro-transformation	

Chapitre 8 : Transfection de cellules eucaryotes par un vecteur navette	223
--	-----

Rappels théoriques	225
1. Les vecteurs navettes	
2. Transformation des levures	
3. Transfection des cellules de mammifère par le phosphate de calcium	
4. Autres méthodes de transfection	

Annexes techniques	229
1. Transformation de levures	
2. Transfection de cellules animales	

4^e partie : Sondes nucléiques et techniques de transfert

Chapitre 9 : Les sondes nucléiques et les méthodes de marquage	239
<i>Rappels théoriques</i>	241
1. Les différents types de sondes nucléiques	
2. Stratégies et agents de marquage	
3. Marquage uniforme des sondes de grande taille	
4. Marquage d'extrémité des oligosondes	
5. Les sondes froides	
<i>Manipulation 11 : Réalisation d'une sonde nucléique par marquage non radioactif d'un plasmide</i>	247
<i>Annexe technique</i>	255
Marquage et détection d'ADN biotinylié	
Chapitre 10 : Hybridation et méthodes de transfert	257
<i>Rappels théoriques</i>	259
1. L'hybridation moléculaire	
2. Révélation spécifique sur membrane	
3. Procédés de transfert	
<i>Manipulation 12 : Hybridation sur colonies à l'aide d'une sonde plasmidique non radioactive</i>	265
<i>Annexe technique</i>	273
Transfert d'ADN par capillarité dans la technique de Southern	

5^e partie : Exemples de clonage de gènes

<i>Rappels théoriques</i>	277
1. La démarche du clonage	
2. Procédés de ligature	
3. Banques d'ADN génomique et d'ADN complémentaire	
4. Expression d'un gène cloné	
<i>Objectifs pédagogiques et caractéristiques des clonages présentés</i>	293
Chapitre 11 : Clonages de gènes bactériens avec ligature en masse	295
<i>Manipulation 13 : Sous-clonage du gène xyl E de Pseudomonas putida dans un vecteur d'expression de Escherichia coli</i>	297
<i>Manipulation 14 : Clonage du gène xyl E dans Escherichia coli à partir de l'ADN total de Pseudomonas putida</i>	319
<i>Annexe : Clonage et expression dans Escherichia coli d'une β-galactosidase thermostable de Bacillus stearothermophilus</i>	329

Chapitre 12 : Clonage de gènes bactériens avec isolement préalable de l'insert	335
Manipulation 15 : Recombinaison de gènes de résistance à des antibiotiques	337
Manipulation 16 : Construction du plasmide pColA9	345

6^e partie : Synthèse et séquençage de l'ADN

Chapitre 13 : Synthèse d'oligonucléotides	365
Rappels théoriques	367
1. Principe de la synthèse	
2. Purification et contrôle de pureté	
3. Utilisations des oligonucléotides de synthèse	
Annexe technique	371
La voie de synthèse par la méthode des phosphites	
Chapitre 14 : Séquençage de l'ADN	375
Rappels théoriques	377
1. Principe et étapes de la méthode de Sanger	
2. Variantes et améliorations techniques	
3. Vecteurs de séquençage	
4. Stratégies de séquençage	
5. Séquençage automatisé	
6. La méthode de Maxam et Gilbert	
Annexe technique	385
Réalisation et lecture d'un gel de séquence	
Chapitre 15 : Analyse informatique de séquences	387
Rappels théoriques	389
1. Traitements de séquences	
2. Outils logiciels	
Annexe technique	391
Exemples d'analyse d'ADN plasmidiques sur microordinateur	
Chapitre 16 : Amplification sélective in vitro (PCR)	401
Rappels théoriques	403
1. Principe	
2. Aspects techniques de mise en œuvre	
3. Intérêt et applications	
Manipulation 17 : Amplification sélective d'une séquence de l'ADN du phage lambda	407

<i>Annexes techniques</i>	417
1. Amplification d'un fragment du gène de l'apolipoprotéine B et mise en évidence d'un polymorphisme de restriction	
2. Amplification d'un fragment du gène de la β -globine contenant le codon muté dans l'hémoglobine S	
Chapitre 17 : Mutagenèse dirigée in vitro	423
<i>Rappels théoriques</i>	425
1. Intérêt de la mutagenèse dirigée <i>in vitro</i>	
2. Principe de base	
<i>Annexe technique</i>	427
Utilisation d'un Kit de mutagenèse dirigée	
Appendice	429
Liste des fournisseurs	439