

# COURS VECTEURS DE CLONAGE

## 1. Propriétés attendues

Pouvoir se répliquer dans la bactérie : posséder une origine de réplication bactérienne fortement amplifiable : petite taille car la réplication est plus courte posséder des sites de restriction permettant d'introduire le fragment d'ADN à cloner.

2 marqueurs :

- **marqueur de transformation** : permet de faire la différence entre les bactéries transformées (ayant reçu le vecteur) et les autres.

- **marqueur de recombinaison** : différencier entre les bactéries ayant reçu le vecteur seul de celles ayant reçu le vecteur recombinant (cad avec l'ADN d'intérêt).

3 types de vecteur bactérien : plasmidiques (plasmide), viraux (bactériophage), phagemides ou cosmides (phage + plasmide, artificiels)

## 2. Plasmides

Molécules d'ADN bicaténaire circulaire, extrachromosomique, capables de se répliquer indépendamment de la cellule hôte, transmissibles à la descendance de façon stable.

Ils sont facultatifs : ne portent pas d'informations génétiques nécessaires à la bactérie mais peuvent apporter des avantages sélectifs (résistance aux ATBs).

Les activités biologiques apportées par les plasmides naturels concernent 3 domaines principaux : la résistance aux ATBs et métaux lourds, le pouvoir pathogène, le métabolisme. La taille des plasmides naturels varie entre 1 et 400 kpb selon le plasmide, le nombre de copies de plasmide par bactérie varie (1 à 20).

En pratique, les plasmides utilisés en laboratoire comme vecteur de clonage sont tous des plasmides artificiels créés à partir de plasmides naturels auxquels certaines séquences ont été ajoutées (marqueurs de sélection, par exemple).

2 exemples:

### **Première génération : pBR322 (poly)**

Origine de réplication : *colE1* (origine de réplication d'un plasmide de *E. coli*)

2 gènes de résistance : ampicilline et tétracycline qui peuvent servir l'un et l'autre de marqueur de recombinaison ou de marqueur de transformation

Exemple : On clone au niveau du site *EcoRV* : marqueur de transfo est Amp et marqueur de rec est Têt.

Raisonnement inverse si on clone au site *PstI*.

Comment faire la sélection ? en 2 étapes : repiquage nécessaire sur une boîte + Amp puis sur une boîte Amp + Têt. Celles qui ne poussent pas sur Amp + Têt sont celles qui ont intégré un plasmide recombinant.

### **Seconde génération : pUCIS (poly)**

Origine de réplication *colE1*

Amp, marqueur de transformation

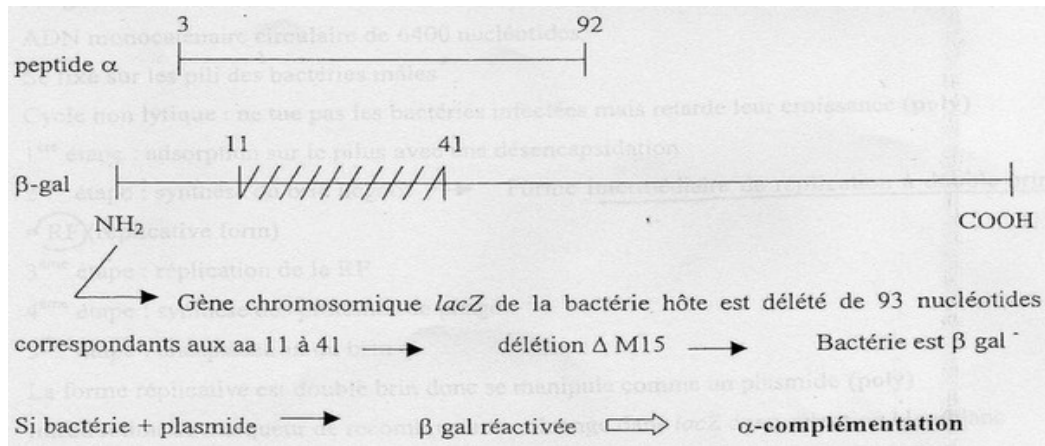
*lacZ* : sites de restriction, marqueur de recombinaison

Introduction d'un gène dans *lacZ*, plus de synthèse de la bêtagalactosidase. Or cette enzyme clive un composé chromogène le X-gal qui est incolore en X + gai qui est bleu.

Si expression bêtagal : colonie bleue.

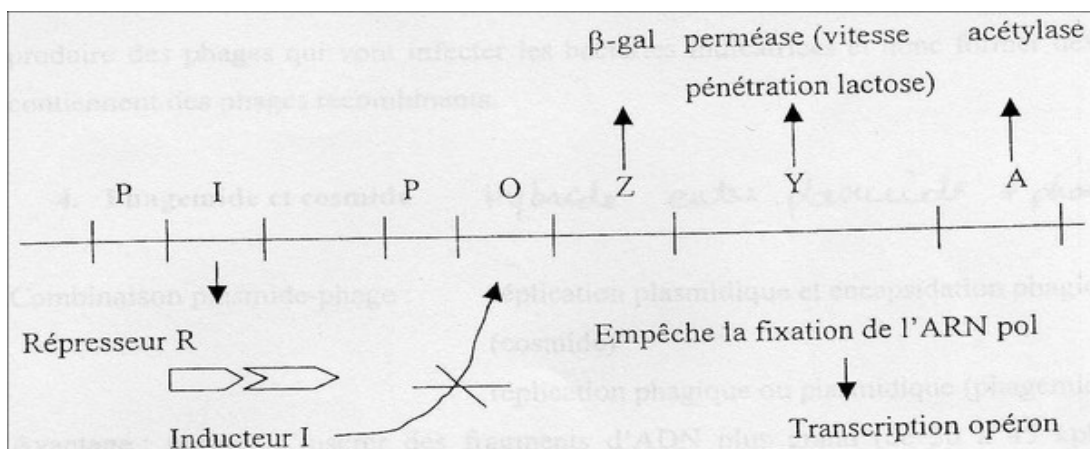
Si pas expression : colonie blanche.

En fait, ce plasmide ne porte pas tout le gène *lacZ* mais seulement le peptide alpha (*lacZ $\alpha$* ).



### Système inductible

Gène *lacZ* appartient à l'opéron lactose.



Lactose : inducteur et substrat.

IPTG : inducteur gratuit car n'est pas hydrolysé par la  $\beta$ galactosidase.

Colonies blanches : recombinantes,  $\beta$ gal.

Colonies bleues : non recombinantes,  $\beta$ gal.

### **3. Bactériophages : l'exemple du M13 (poly)**

Phage de *E. coli* - ADN monocaténaire circulaire de 6400 nucléotides. Se fixe sur les pili des bactéries mâles.

Cycle non lytique : ne tue pas les bactéries infectées mais retarde leur croissance (poly)

1<sup>ère</sup> étape : adsorption sur le pilus avec une désencapsidation

2<sup>ème</sup> étape : synthèse du brin négatif → Forme intermédiaire de réplication à double brin (replicative form "RF")

3<sup>ème</sup> étape : réplication de la RF

4<sup>ème</sup> étape : synthèse des protéines de phage

5<sup>ème</sup> étape : encapsidation du brin +.

La forme répliquative est double brin donc se manipule comme un plasmide (poly)

Introduction de marqueur de recombinaison : clonage dans *lacZ* donc sélection bleu/blanc

Marqueur de transformation : plaque d'inhibition de croissance.

En pratique : boîtes LB + bactéries transformées + bactéries indicatrices (*E. coli* non transformées).

Bactéries indicatrices forment un tapis. Les bactéries transformées vont produire des phages qui vont infecter les bactéries indicatrices et donc former des trous qui contiennent des phages recombinants.

#### **4. Phagemide et cosmide**

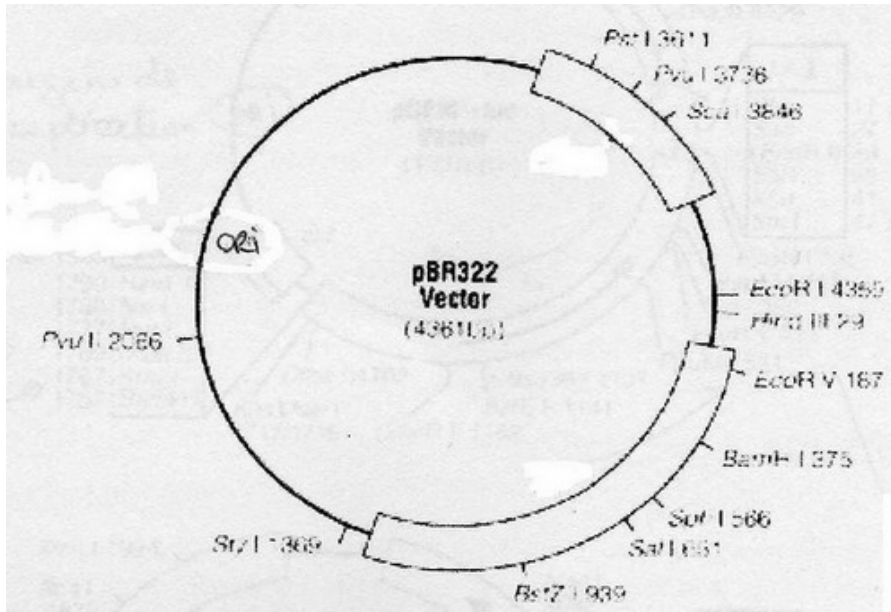
Combinaison plasmide-phage : réplication plasmidique et encapsidation phagique (cosmide) - réplication phagique ou plasmidique (phagemide)

Avantage : permet d'insérer des fragments d'ADN plus grand (de 30 à 45 kpb pour les cosmides)

1 exemple : pBS (poly), phagemide dérivé du pUCIS avec une origine du phage marqueur de transformation : ampicilline marqueur de recombinaison : *lacZ*.

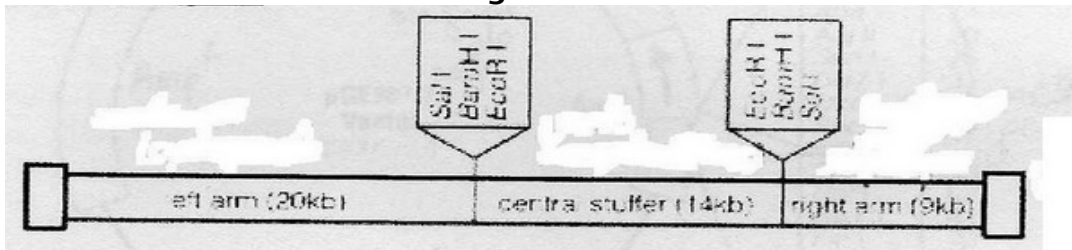
# Quelques vecteurs utilisés en Biologie Moléculaire.

## 1. Le premier plasmide utilisé pBR322

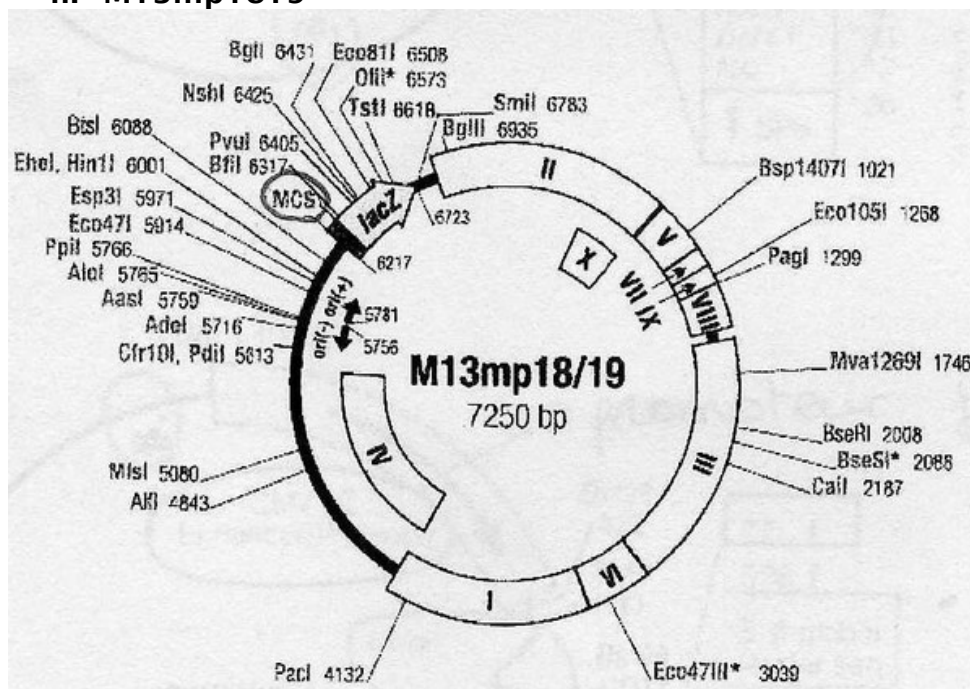


## 2. Les phages vecteurs

### i. Le cosmide Lambda gt11

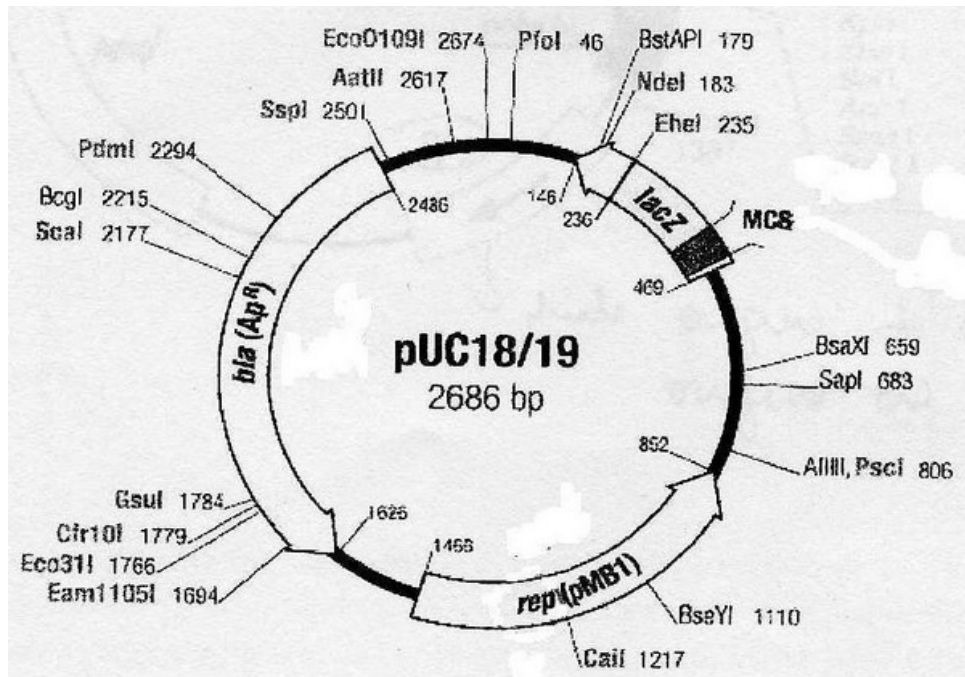


### ii. M13mp18/19

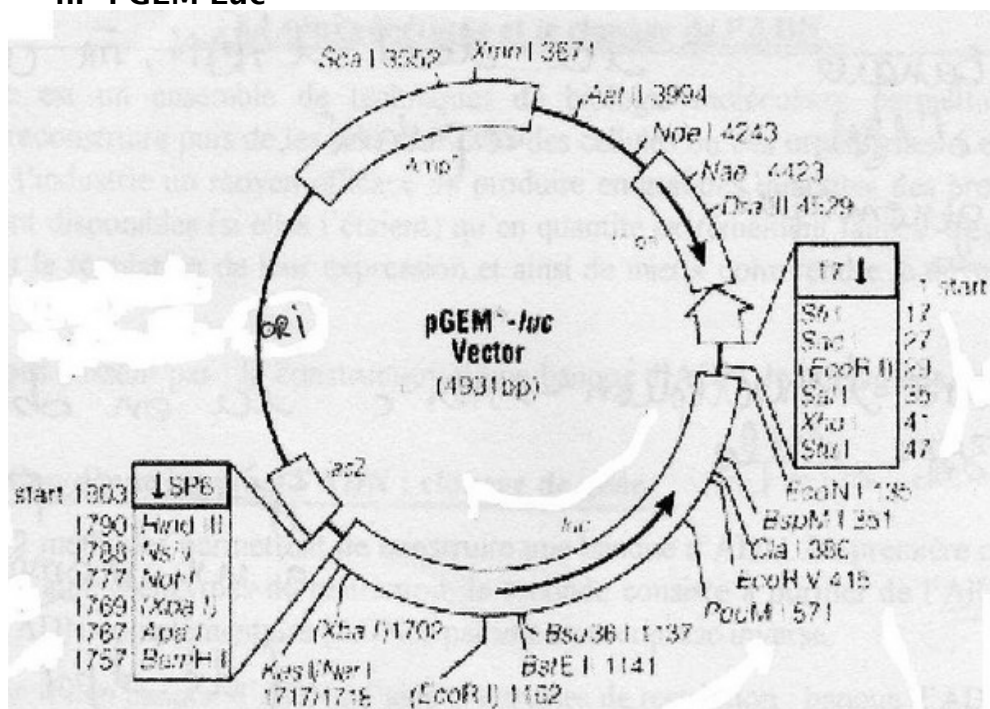


### 3. Les phagemides

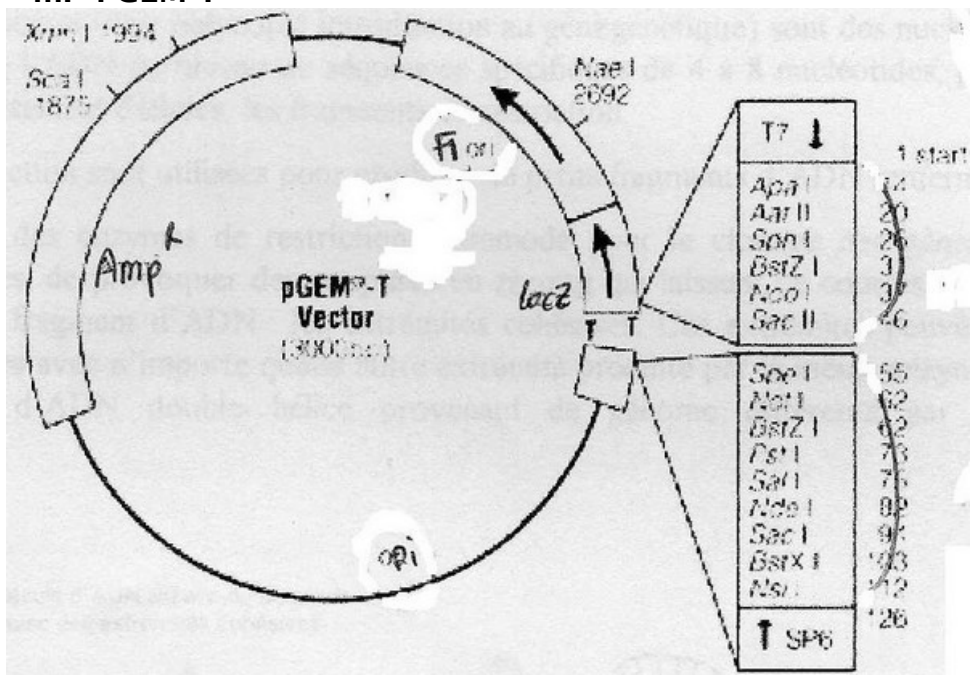
#### i. PUC 18-19



#### ii. PGEM-Luc



### iii. PGEM-T



### iv. PCMVNT

