

BERNARD PERBAL

CLONAGE MOLECULAIRE

**GUIDE
PRATIQUE**

VIGOT

DC 750

Bernard PERBAL

Institut Curie - Section de Biologie
Centre Universitaire
Orsay Cedex, France

*Four Années
et l'Équipe des quatre 5.*

CLONAGE MOLECULAIRE

Guide Pratique

5186 1/4



ÉDITION VIGOT
23, RUE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE - 75006 PARIS

1991

1991
C-9113-4415-2 H.B.2.7

TABLE DES MATIÈRES

Préface.....	VII
Préface de la seconde édition américaine.....	IX
1. ÉQUIPEMENT DE LABORATOIRE.....	1
2. QUELQUES MOTS SUR LA SÉCURITÉ... 4	4
Hottes aspirantes.....	4
Enceintes de sécurité biologique.....	4
Gants.....	5
Lumière ultraviolette.....	5
-Rampes germicides.....	5
Détection de l'ADN par illumination aux UV.....	6
Phénol.....	6
Liquide à scintillation.....	7
Chloroforme.....	7
Alcool isoamylique.....	8
Ether éthylique.....	8
Pyrocarbonate diéthylique.....	8
Méthylmercure.....	8
Plastiques et produits chimiques.....	8
Manipulation des composés marqués au ³² P.....	8
Manipulation de carcinogènes connus ou potentiels.....	9
3. MÉTHODES FONDAMENTALES DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE..... 11	11
Électrophorèse en gel.....	11
Introduction à la théorie de l'électrophorèse.....	11
Électrophorèse en gel SDS : séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire.....	14
Système en tampon continu ou discontinu.....	19
Électrophorèse bidimensionnelle en gel : séparation de mélanges complexes de protéines en plusieurs composants.....	24

<i>Transfert électrophorétique.....</i>	<i>34</i>
<i>Séparation de protéines de faible poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide.....</i>	<i>36</i>
Méthode de séparation par ultracentrifugation préparative.....	40
Centrifugation différentielle.....	40
Centrifugation en gradient de densité.....	40
Choix des rotors.....	41
Culottage.....	42
Séparation isopycniqne (généralement en gradient de chlorure de césium).....	43
Séparations zonales (généralement sur gradients de sucrose).....	43
Filtration sur gel de Séphadex.....	45
Propriétés physiques et chimiques du Séphadex.....	45
Chromatographie par échange d'ions.....	45
Théorie de l'échange d'ions.....	47
Echangeurs d'ions en Sépharose.....	47
Propriétés physiques et chimiques.....	47
Echangeurs d'ions NACS.....	47
Quantification des protéines.....	47
Méthode de LOWRY.....	48
Méthode de BRADFORD.....	48
Choix des tampons.....	51
Autoradiographie.....	54
Choix des conditions correctes d'exposition.....	54
Estimation des temps d'exposition.....	54
Techniques de fluorographie.....	55
Quantification des résultats.....	55
Intensification des autoradiographies.....	55
Constantes physiques des nucléosides et des nucléotides.....	62
Références additionnelles consultées.....	76
Extraction au phénol des acides nucléiques.....	77

<i>Préparation du phénol pour l'extraction d'acides nucléiques</i>	77	<i>Souches hôtes et stabilité des cosmides</i>	408
<i>Extraction des acides nucléiques</i>	78	<i>Emballage des cosmides in vivo</i>	408
<i>Précipitation à l'éthanol de petites quantités d'acides nucléiques</i>	80	<i>Sélection par recombinaison</i>	410
4. ENZYMES DE MODIFICATION EN CLONAGE MOLÉCULAIRE	83	<i>Autres vecteurs de clonage</i>	412
ADN ligase du bactériophage T4	83	<i>Vecteurs procaryotes</i>	412
ADN ligase d' <i>E. Coli</i>	85	<i>Vecteurs de clonage dans la levure</i>	413
ADN polymérase du bactériophage T4	85	<i>Vecteurs de plantes</i>	414
ADN polymérase d' <i>E. Coli</i>	87	<i>Vecteurs viraux</i>	415
ADN polymérase modifiée du bactériophage T7	88	<i>Vecteurs de clonage d'origine commerciale</i>	417
Phosphatase alcaline	89	7. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DES ADN VECTEURS ET DES FRAGMENTS D'ADN À CLONER	435
Polynucléotide kinase du bactériophage T4	89	<i>Isolement de l'ADN plasmidique par centrifugation en gradient de chlorure de césium</i>	435
Désoxynucléotidyl-transférase terminale	90	<i>Technique d'isolement rapide de l'ADN plasmidique</i>	443
Exonucléase III	92	<i>Élimination de l'ARN des préparations d'ADN</i>	446
Nucléases Bal 31	92	<i>Isolement et séparation des acides nucléiques par centrifugation isopycnique en CsTFA</i>	448
Exonucléase VII	93	<i>Purification des fragments de restriction d'ADN, de l'ADN plasmidique et de l'ADN chromosomique par chromatographie sur gel de Séphacryl</i>	452
Pyrophosphatase acide du tabac	94	<i>Préparation de stocks de phages λ et d'ADN</i>	453
Ribonucléase H	94	<i>Purification de l'ADN de haut poids moléculaire à partir de cellules eucaryotes</i>	464
Ribonucléase Phy I	94	8. DIGESTION DE L'ADN PAR LES ENDONUCLÉASES DE RESTRICTION	466
Ribonucléase CL3	94	<i>Unités enzymatiques</i>	466
Ribonucléase de <i>Cereus</i>	94	<i>Conditions d'une activité enzymatique optimale</i>	466
Ribonucléase Phy M	95	<i>Digestion de l'ADN par plusieurs endonucléases de restriction</i>	470
Ribonucléase U2	95	<i>Stabilité de l'activité des endonucléases de restriction pendant les digestions prolongées</i>	475
Ribonucléase T1	95	<i>Digestion partielle de l'ADN par des endonucléases de restriction</i>	476
Ribonucléase T2	95	<i>Incubation en présence de bromure d'éthidium</i>	477
Déoxyribonucléase I	95	9. SÉPARATION DES FRAGMENTS D'ADN PAR ÉLECTROPHORÈSE	480
Nucléase S1	95	<i>Gels d'agarose</i>	480
Nucléase Mung Bean	96	<i>Concentration du gel</i>	480
Topo-isomérase I	96	<i>Préparation de la solution d'agarose</i>	480
Topo-isomérase II (ADN gyrase)	97	<i>Supports de gel pour électrophorèse horizontale</i>	480
Guanylyl transférase du virus de la vaccine	97	<i>Peignes</i>	484
Polyadénylate polymérase d' <i>E. Coli</i>	97	<i>Gels d'agarose verticaux</i>	484
Transcriptase inverse	98	<i>Séparation de fragments d'ADN par électrophorèse en champ pulsé et inversé</i>	487
ARN polymérase du bactériophage SP6	100		
ARN polymérase du bactériophage T7	100		
Méthylases	100		
Liste de certaines enzymes de modification commercialisées	106		
5. ENDONUCLÉASES DE RESTRICTION	110		
6. VECTEURS POUR LE CLONAGE MOLÉCULAIRE	339		
Vecteurs plasmidiques	339		
Vecteurs dérivés de bactériophages	372		
Vecteurs de type insertion	378		
Limitations des différents systèmes de vecteurs	380		
Vecteurs cosmidiqes	403		
Utilisation des cosmides comme véhicules de clonage	403		
Vecteurs cosmidiqes	407		

<i>Coloration des fragments d'ADN</i>	489	Utilisation d'adaptateurs pour le clonage	527
<i>Photographie des fragments d'ADN</i>	489	13. LIGATURE	536
Gels de polyacrylamide	490	Théorie	536
Mobilités anormales de fragments de restriction d'ADN en gels de polyacrylamide	490	Pratique	539
<i>Coloration des fragments d'ADN</i>	495	14. PROPAGATION DES MOLÉCULES D'ADN RECOMBINANT	544
Marqueurs de taille pour les fragments d'ADN soumis à une électrophorèse sur gels d'agarose et de polyacrylamide	499	Réduction du bruit de fond de transformation dû à la recircularisation du vecteur. Utilisation de la phosphatase alcaline	544
<i>Gels de polyacrylamide</i>	502	Clonage dans un vecteur portant des extensions polynucléotidiques	547
Quantification des fragments d'ADN en gels d'agarose	502	Conditions d'extension et calculs	551
10. ARRANGEMENT DES FRAGMENTS DE RESTRICTION D'ADN SUR DES CARTES PHYSIQUES	504	Transformation des souches d' <i>E. Coli</i> par l'ADN plasmidique	553
Double digestion des fragments d'ADN	504	Transformation des cellules compétentes après ligature directe en agarose à basse température de fusion	558
<i>Cartographie par digestion complémentaire de fragments d'ADN purifiés</i>	504	15. CARACTÉRISATION DES CLONES RECOMBINANTS	561
Cartographie par digestion partielle d'ADN marqué aux extrémités	506	Purification rapide de l'ADN du plasmide recombinant	561
<i>Marquage des extrémités de l'ADN</i>	506	Analyse directe des plasmides recombinants par électrophorèse verticale sur gel d'agarose	563
<i>Digestion asymétrique de l'ADN marqué</i>	506	Sélection des bactéries recombinantes sur filtres de nitrocellulose	565
<i>Digestion partielle de fragments marqués purifiés</i>	506	Transfert par capillarité des fragments d'ADN sur membrane de nitrocellulose	567
Cartographie des sites de restriction avec Bal 31	506	Transfert électrophorétique de l'ADN sur membranes de nitrocellulose	575
Cartographie par analyse bidimensionnelle d'ADN marqué aux extrémités	507	Préparation et activation des papiers modifiés chimiquement pour le transfert des acides nucléiques	575
11. PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN	509	Transfert de l'ADN sur des membranes de nylon modifiées	581
Purification de fragments d'ADN à partir de gels d'agarose	509	Transfert en spot (Dot-Blot)	583
Purification de fragments d'ADN à partir de gels d'agarose « low melting » (à basse température de fusion)	511	Transfert « en fentes » (Slot-Blot)	585
Purification d'ADN à partir de gels d'agarose ou de polyacrylamide au moyen de papier DEAE	513	Analyse de l'ADN recombinant par hybridation avec des sondes spécifiques ...	585
Elution de l'ADN à partir de gels de polyacrylamide	515	Réhybridation des filtres	590
12. MODIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN À EXTRÉMITÉS COHÉSIVES	517	Hybridation directe d'ADN marqué avec l'ADN sur gel d'agarose	592
Modification des extrémités 3' et 5' par l'ADN polymérase	517	Hybridation histochimique	594
<i>Modification des extrémités cohésives à extension 3'</i>	517	<i>Préparation des tissus</i>	594
<i>Modification des extrémités cohésives à extension 5'</i>	519	<i>Préparation des coupes</i>	594
Digestion de l'ADN par la nucléase BAL 31 ..	519	<i>Marquage des sondes ADNc</i>	595
Addition d'adaptateurs moléculaires aux fragments d'ADN	521	<i>Synthèse des sondes oligonucléotidiques</i>	596
		<i>Conditions de lavage</i>	597
		<i>Autoradiographie</i>	597
		<i>Coloration</i>	597
		<i>Coupes de souris entières</i>	597

16. MARQUAGE DES ACIDES NUCLEIQUES	599	Gels au glyoxal	679
Préparation de sondes radioactives.....	599	Marqueurs de taille pour les ARN soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant	680
Déplacement de coupure	599	Transfert de l'ARN sur nitrocellulose	682
Marquage d'ADN par la méthode de synthèse par remplacement	604	Gels au méthyle mercure	682
Marquage des extrémités de fragments d'ADN	608	Gels au formaldéhyde	683
Méthodes de marquage non radioactif	616	Transfert de l'ARN sur papier DPT ou DBM	683
Synthèse <i>in vitro</i> de ribo-sondes	620	Gels au glyoxal ou au formaldéhyde.....	685
Synthèse de ribo-sondes radio-marquées par les ARN polymérase de SP6, T3 et T7	620	Transfert de l'ARN sur membranes de nylon	685
Synthèse <i>in vitro</i> de ribo-sondes marquées non radioactivées par les ARN polymérase de SP6, T3 et T7	622	Hybridation avec l'ARN polyadénylé immobilisé sur Hybond-mAP.....	686
17. PRÉPARATION DE BANQUES GÉNOMIQUES	627	Cartographie de ARN par digestion des hybrides ARN-ADN.....	691
Etude théorique de la fraction d'une longue chaîne d'ADN pouvant être incorporée dans une banque d'ADN recombinant partiellement digéré.....	627	Cartographie à la nucléase S1 de séquences d'ADN homologues d'espèces d'ARN.....	692
Théorie.....	627	19. CLONAGE DES ADNc	699
Comparaison des estimations	636	Synthèse des ADNc par la transcriptase inverse (reverse transcriptase)	699
Représentation des séquences d'ADN dans les banques d'ADN recombinant préparées par digestion partielle par une enzyme de restriction	638	Clonage de séquences d'ADNc dans des vecteurs plasmidiques.....	702
Annexe	642	Préparation d'une banque d'ADNc dans le vecteur lambda GT11	720
Préparation de banques avec le phage lambda Charon	644	Caractérisation des clones recombinants.....	725
Isolement de l'ADN à cloner.....	644	Congélation directe des colonies bactériennes sur filtres de nitrocellulose ..	727
Préparation des bras de lambda Charon	648	20. SÉQUENÇAGE DE L'ADN	729
Ligature de l'ADN digéré et des bras de lambda Charon	650	Séquençage de l'ADN par coupure spécifique des bases	729
Systèmes d'emballage <i>in vitro</i>	650	Production de grandes quantités de fragments d'un ADN unique	729
Amplification des banques lambda.....	654	Marquage des extrémités des fragments d'ADN.....	729
Efficacité des extraits d'emballage commerciaux.....	655	Séparation des extrémités marquées	730
Paramètres affectant l'efficacité de la réaction d'emballage	657	Réactions de coupure chimique	731
Criblage des banques lambda par hybridation avec des sondes spécifiques ..	657	Techniques détaillées.....	731
18. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DES ESPÈCES D'ARN	663	Méthode de séquençage de Maxam-Gilbert modifiée pour l'utilisation avec des oligodéoxynucléotides	735
Purification d'espèces d'ARN intacts par ultracentrifugation	663	Electrophorèse en gel et autoradiographie....	735
Purification rapide d'ARN pour transfert	665	Clonage d'ADN dans le phage M13 en vue du séquençage.....	737
Préparation d'ARN cytoplasmique de cellules eucaryotes.....	665	Préparation de l'ADN vecteur	737
Isolement d'ARN cytoplasmiques polyadénylés	670	Préparation des fragments d'ADN à insérer ..	745
Isolement d'ARN spécifiques	672	Ligature des fragments d'ADN avec l'ADN du vecteur	745
Gels au formaldéhyde.....	674	Préparation de bactéries compétentes. Transformation.....	746
Gels au méthyle mercure	676	Système rapide de sous-clonage de délétion pour le séquençage	750
		Caractérisation des ADN M13 recombinants	758
		Séquençage de l'ADN recombinant obtenu par clonage dans M13	763

<i>Réalisation des réactions de séquençage</i>			
« didésoxy » en plaques de microtitration.....	771		
Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	773		
Autoradiographie.....	777		
<i>Interprétation des autoradiographies</i>	782		
Problèmes courants pouvant être rencontrés au cours du séquençage : guide de dépannage.....	782		
Séquençage avec la transcriptase inverse.....	784		
Séquençage direct des fragments d'ADN clonés en plasmides.....	788		
Séquençage de l'ADN simple brin dans les deux directions.....	790		
21. SÉQUENÇAGE DE L'ARN	794		
Séquençage de l'ARN par coupure chimique spécifique.....	794		
<i>Marquage de l'extrémité 3' de l'ARN</i>	794		
Coupure spécifique des bases de l'ARN marqué.....	795		
Séquençage enzymatique de l'ARN.....	801		
<i>Techniques du séquençage enzymatique</i>	802		
<i>Séquençage de l'ARN au moyen de la transcriptase inverse</i>	804		
22. TRAITEMENT INFORMATIQUE DES DONNÉES OBTENUES PAR SÉQUENÇAGE DE L'ADN	807		
Programmes de séquençage.....	808		
Recherche des nucléotides et des séquences de base de l'ADN.....	809		
<i>Fréquences des bases</i>	809		
<i>Cartes de restriction</i>	809		
<i>Séquences consensus</i>	811		
Recherche des structures secondaires.....	812		
Identification des produits putatifs de gènes.....	812		
<i>Structure primaire, poids moléculaire</i>	813		
<i>Digestion protéolytique</i>	814		
<i>Localisation des épitopes antigéniques potentiels</i>	814		
<i>Localisation des structures secondaires</i>	814		
Comparaison des séquences.....	819		
Comparaison des séquences avec l'ensemble des données d'une banque.....	828		
23. MUTAGÈSE LOCALISÉE	842		
Mutagenèse dirigée par oligonucléotides.....	842		
Mutagenèse par insertion d'adaptateurs.....	850		
<i>Mutagenèse par insertion d'adaptateurs</i>	850		
<i>Mutagenèse par adaptateurs TAB</i>	851		
Introduction aléatoire de mutations d'une base unique dans un fragment d'ADN défini.....	866		
<i>Critères à prendre en considération pour la synthèse d'un oligonucléotide mutagénisé</i>	866		
24. MÉTHODES D'ÉTUDE DES INTERACTIONS ADN-PROTÉINES	877		
Analyse des complexes ADN-protéine par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (retardement sur gel).....	877		
Empreinte à la DNase I.....	881		
Localisation des points de contact par la résistance au diméthylsulfate.....	883		
Isolement de complexes ADN-protéine pour l'analyse des empreintes après digestion par la DNase I ou protection contre la méthylation par le DMS.....	886		
25. EXPRESSION IN VITRO DES SÉQUENCES D'ADN CLONÉES	890		
Transcription <i>in vitro</i> des gènes clonés.....	891		
Traduction <i>in vitro</i> d'ARN transcrits à partir de gènes clonés.....	899		
Vecteurs d'expression pour la caractérisation des produits de gènes clonés.....	911		
<i>Expression dans les systèmes procaryotiques</i>	911		
Vecteurs pour les cellules de mammifères.....	919		
Récupération des produits de gènes exprimés sous la forme de protéines de fusion.....	935		
Transfection de cellules eucaryotiques par de l'ADN purifié.....	940		
<i>Transfection des cellules après traitement au DEAE Dextran</i>	940		
Technique de coprécipitation ADN- phosphate de calcium et transfection de monocouches cellulaires.....	941		
Transfection des cellules en suspension par les précipités d'ADN-phosphate de calcium.....	942		
Transfection d'ADN à l'aide de liposomes.....	943		
Transfert d'ADN plasmidique directement de bactéries aux cellules de mammifères.....	944		
Sélection des cellules exprimant l'ADN nouvellement introduit.....	945		
Construction de bibliothèques cosmiques pour transformer les cellules eucaryotiques.....	946		
Détection des polypeptides synthétisés par immunoprécipitation.....	948		
Détection de polypeptides par immuno- transfert (immunoblotting).....	952		
ADDENDUM	955		
Amplification enzymatique <i>in vitro</i> de séquences polynucléotidiques (PCR).....	956		
<i>Principe de la méthode</i>	956		
Déroulement d'un cycle typique d'amplification.....	960		
<i>Choix des amorces</i>	960		
<i>Polymérisation</i>	960		
<i>Calibrage des cycles</i>	962		

TABLE DES MATIÈRES

<i>Analyse des produits amplifiés</i>	962	Précautions à prendre lors des expériences d'amplification de séquences	
<i>Clonage des fragments amplifiés</i>	963	oligonucléotidiques	970
Quelques applications	963	<i>Précautions « matérielles »</i>	970
<i>Clonage</i>	963	<i>Précautions « biologiques »</i>	970
<i>Séquençage</i>	966		
<i>Mutagenèse par altération spécifique des séquences (addition, délétion, substitution)</i>	966	ÉPILOGUE	973
<i>Amplification de séquences ribonucléotidiques</i>	966	INDEX	976