

M1 Biotechnologies : TD Stratégie de Clonage

Le but de ce TD est de vous faire réfléchir sur une stratégie de Clonage (anciennement réalisée en TP). Cette stratégie, n'est pas forcément la meilleure, chaque « cloneur » ayant ses habitudes et sa manière de travailler.

Clonage de la Green Fluorescent Protein (GFP) dans le vecteur d'expression pTATHA

Stratégie générale

Le projet de recherche auquel vous participez dans ce TD concerne l'étude d'un peptide perméant le peptide TAT. Ce peptide de 11 Acides Aminés est issu de la protéine TAT du virus HIV. Ce peptide lorsqu'il est en fusion avec une protéine permet à celle-ci de pénétrer dans les cellules, par diffusion à travers la membrane plasmique sans intervention de transporteur.

Afin de produire une protéine chimère TAT-GFP pour mesurer la vitesse de pénétration à l'intérieur des cellules que permet le peptide TAT, vous allez sous cloner la GFP (ou Green Fluorescent Protein) dans un vecteur d'expression : le vecteur pTAT-HA qui nous a été fourni par le laboratoire du Dr Dowdy (Nagahara, et coll. Nature medicine 1999 : 4, 1449-1452) Ce vecteur pTAT-HA dont la carte est donnée en annexe a été construit par ce laboratoire à partir du vecteur pRSET (commercialisé par Invitrogen) qui permet l'expression de protéines recombinantes dans un système procaryote sous le contrôle d'un promoteur T7.

La première étape de ce sous clonage consiste à obtenir l'ADNc de la GFP de manière à pouvoir le cloner dans pTAT-HA en respectant le cadre de lecture pour obtenir le peptide TAT en fusion avec la GFP. L'ADNc de la GFP est amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides (amorces GFPs et GFPas) dont la séquence vous est donnée en annexe, en utilisant le plasmide pGFP_{UV} comme matrice (plasmide commercialisé par Clontech).

Le produit PCR est ensuite sous cloné dans un plasmide intermédiaire pGEMTeasy par le système TA-Cloning (kit de clonage des fragments PCR commercialisé par la société Proméga). Le plasmide pGEMTeasy-GFP obtenu est amplifié.

Dans une deuxième étape, l'ADNc de la GFP sera récupéré par digestion à partir du plasmide pGEMTeasy-GFP par les enzymes KpnI et EcoRI et après purification pourra être sous cloné dans le vecteur d'expression pTATHA.

Question :

Faire un schéma récapitulatif de la stratégie de clonage

Nous allons maintenant reprendre les différentes étapes, et utiliser les différents documents donnés en annexe pour analyser cette stratégie.

1° étape : obtention de l'insert GFP

Quel est l'intérêt d'utiliser le système du TA-Cloning pour cloner un fragment PCR ?

Retrouvez la position des amorces sur la séquence de la GFP, et retrouver la phase du cadre de lecture par rapport à la GFP et par rapport au vecteur de clonage.

Pourquoi n'utilise t'on pas directement les sites présents sur le vecteur pGFP_{UV} ?

Comment vont être sélectionnées les bactéries contenant le vecteur recombinant pGEMTeasy-GFP ? Ces bactéries seront elles fluorescentes ?

2° étape : Digestion de pGEMTeasyGFP et du vecteur pTAT-HA

Après digestion des deux vecteurs par les enzymes KpnI et EcoRI, il est nécessaire de purifier les fragments d'intérêt, pourquoi ? Si oui comment réalisez vous cette purification ?

Avant de lancer la ligation entre l'insert et le vecteur linéarisé, il est nécessaire de vérifier la qualité et d'estimer la quantité d'ADN (vecteur linéarisé et insert) digéré et purifié. Cette vérification se fait par migration en gel d'agarose. Par comparaison avec une quantité connue de marqueur, la quantité d'ADN sera déterminée sur le gel et sera ensuite étendue à la concentration de chaque élution. Imaginez le type d'image que vous pourriez obtenir après coloration d'un gel au BET

3° étape : ligation

Pour que la ligation se fasse dans des conditions optimales, il faut mélanger dix fois plus d'extrémités d'insert que d'extrémités de vecteur.

Calculez la quantité d'insert et de vecteur linéarisé à mélanger dans le cas où vous avez obtenu une concentration de 15ng/μl pour l'insert et 40ng/μl pour le vecteur linéarisé.

Lors d'une ligation, deux tubes témoins sont réalisés, le premier correspondant au témoin de ligation ne contenant pas d'insert, le deuxième correspondant au témoin de ligation contenant que l'insert, et le troisième ne contenant pas de ligase. A quoi servent ces témoins ?

4° étape : Transformation des bactéries

Après ligation, les témoins et la ligation vont être utilisés pour transformer des bactéries chimiocompétentes (Bactéries DH5α). Après transformation, les bactéries sont incubées 1h à 37°C pour l'expression phénotypique du gène de résistance à l'antibiotique de sélection, ensuite étalées sur boîte et incubées la nuit à 37°C.

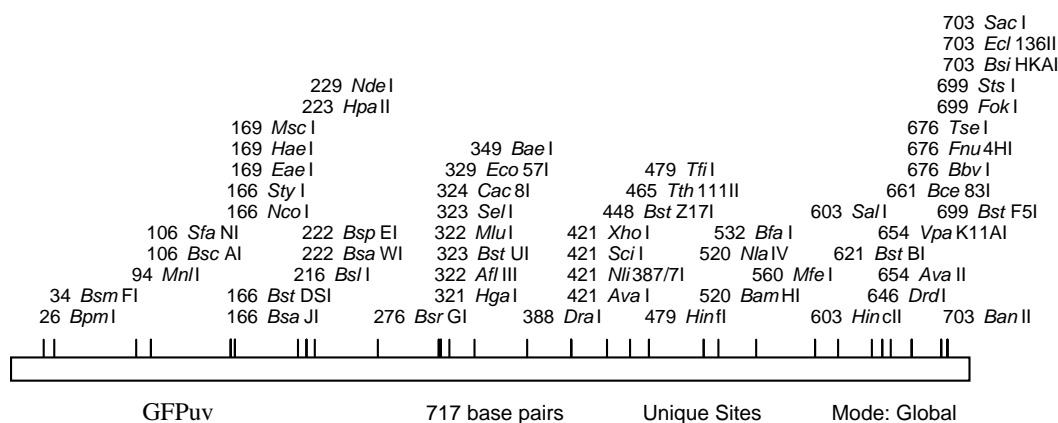
Représentez les résultats que vous attendez à obtenir sur les boîtes, et donnez un représentation schématique des différents vecteurs que vous pouvez obtenir.

Séquence et Carte de restriction de la GFP

GFPuv (717bp)

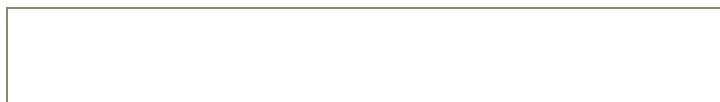
```

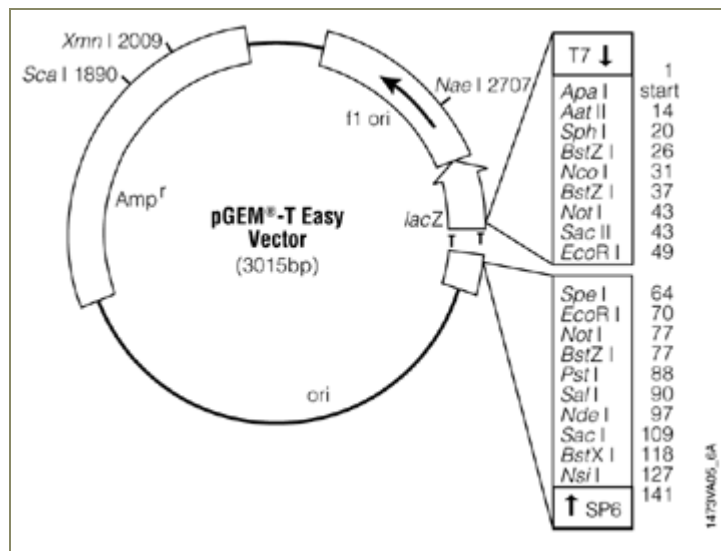
1   ATGAGTAAAG GAGAAGAACT TTTCACTGGA GTTGTCCCAA TTCTTGTTGA
   ATTAGATGGT GATGTTAATG GGCACAAATT TTCTGTCAGT GGAGAGGGTG 100
101 AAGGTGATGC AACATACGGA AAACCTACCC TTAAATTTAT TTGCACTACT
   GGAAAACCTAC CTGTTCCATG GCCAACACTT GTCACTACTT TCTCTTATGG 200
201 TGTTCAATGC TTTTCCCGTT ATCCGGATCA TATGAAACGG CATGACTTTT
   TCAAGAGTGC CATGCCCGAA GGTTATGTAC AGGAACGCAC TATATCTTTC 300
301 AAAGATGACG GGAACACAA GACGCGTGCT GAAGTCAAGT TTGAAGGTGA
   TACCCTTGTT AATCGTATCG AGTTAAAAGG TATTGATTTT AAAGAAGATG 400
401 GAAACATTCT CGGACACAAA CTCGAGTACA ACTATAACTC ACACAATGTA
   TACATCACGG CAGACAAACA AAAGAATGGA ATCAAAGCTA ACTTCAAAT 500
501 TCGCCACAAC ATTGAAGATG GATCCGTTCA ACTAGCAGAC CATTATCAAC
   AAAATACTCC AATTGGCGAT GGCCCTGTCC TTTTACCAGA CAACCATTAC 600
601 CTGTGCACAC AATCTGCCCT TTCGAAAAGAT CCCAACGAAA AGCGTGACCA
   CATGGTCCTT CTTGAGTTTG TAACTGCTGC TGGGATTACA CATGGCATGG 700
701 ATGAGCTCTA CAAATAA 717
  
```



Vecteur pGEM-T Easy (vecteur utilisé pour le clonage du fragment PCR)

Ce vecteur ne contient pas de site BamHI (séquence complète disponible en TP)





Séquences des amorces pour la PCR de criblage des colonies :

CriblagePCRsens (séquence dans promoteur T7)

5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

CriblagePCR antisens (séquence dans la GFP)

5' TTTGTAGAGCTCATCCATGCC 3'

Vecteur utilisé comme matrice pour amplifier la GFP

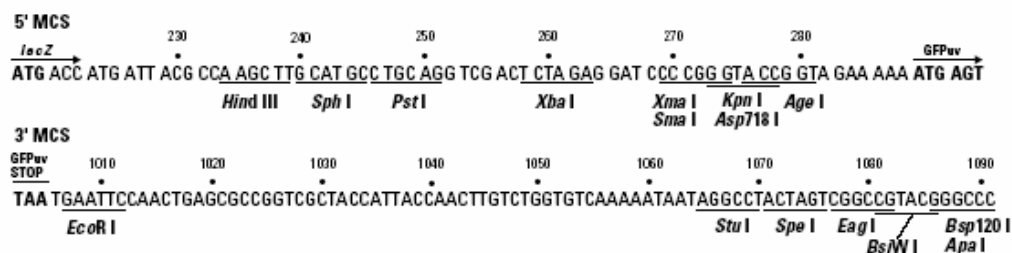
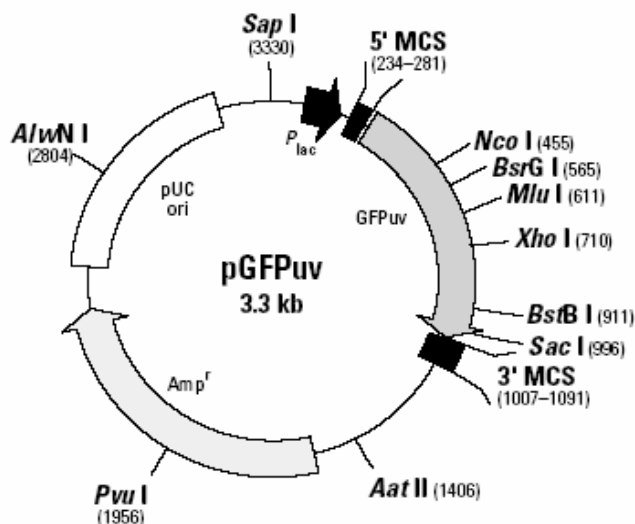
Sites *EcoRI* position 1006 ; *BamHI* position 265 et 809

pGFPuv Vector Information

GenBank Accession #U62636

PT3055-5

Catalog #6079-1



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pGFPuv Vector. Unique restriction sites are in bold.

Description:

pGFPuv carries the "cycle 3" variant of GFP described by Cramer *et al.* (1). This gene was cloned between the two MCSs of the pUC19 derivative pPD16.43 (2). The GFPuv gene can be easily excised from pGFPuv. Alternatively, the GFPuv coding sequence can be amplified by PCR. The GFPuv gene was inserted in frame with the *lacZ* initiation codon from pUC19 so that a β -galactosidase-GFPuv fusion protein is expressed from the *lacZ* promoter in *E. coli*. Note, however, that if you excise the GFPuv coding sequence using a restriction site in the 5' MCS, the resulting fragment will encode the native (i.e., non-fusion) GFPuv protein. The pUC backbone of pGFPuv provides a high copy number origin of replication and ampicillin resistance gene for propagation in *E. coli*.

Vecteur pTAT-HA fourni par le docteur Dowdy

