

Expression génétique : du gène à la protéine

Florian JOURDA
Benjamin KIEFFER

Mai 2003

1 But des expériences

Nous allons cloner le gène eucaryote de la dihydrofolate réductase (DHFR) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et l'exprimer chez la bactérie *E. coli* afin d'obtenir une grande quantité de cette protéine pour pouvoir l'étudier.

2 Amplification par PCR du gène de la DHFR

Nous voulons obtenir de grande quantités du fragment d'ADN codant pour la DHFR. Pour cela nous procédons à une PCR (*polymerase chain reaction*) à partir de l'ADN génomique de *Saccharomyces cerevisiae*.

Préparation du mélange de réaction pour 100 μ L

- 1 μ L d'ADN génomique de *Saccharomyces cerevisiae*
- 2 μ L amorce sens (DHFR-5' Sac1) 50pmol/ μ L
- 2 μ L amorce anti-sens (DHFR-3' Sal) 50pmol/ μ L
- 2 μ L Taq pol 5 U/ μ L
- 0.2 μ L Pfu ADN-polymérase (pour la correction des erreurs de réplication)
- 1 μ L dATP 20 mM
- 1 μ L dCTP 20 mM
- 1 μ L dGTP 20 mM
- 1 μ L dTTP 20 mM
- 10 μ L de tampon PCR
- 78.8 μ L d'eau

avec le programme de PCR suivant :

- 4 min à 94° (dénaturation initiale)
- 30 cycles d'amplification : 20 sec à 94° (dénaturation), 30 sec à 55° (hybridation des amorces sur l'ADN), 1 min à 72° (élongation)
- 10 min à 72° (achèvement de la réaction : terminaison de l'élongation des produits en cours) - arrêt de la réaction 4° (arrêt de l'activité enzymatique)

On purifie ensuite les produits de la PCR de tous les contaminants avec le "QIAquick PCR Purification Kit" de chez Qiagen par centrifugation à travers une résine capable de lier les longs fragments d'ADN selon la force ionique. On élimine d'abord les protéines, les nucléotides et une partie des amorces inutilisées dans le *flow-through* avec un tampon PB, puis le reste des amorces avec le tampon PE. On récupère enfin le produit de la PCR dans le *flow-through* avec le tampon EB.

D'après les séquences de l'ADN génomique de la levure et des séquences des amorces on peut prédire la nature des fragments d'ADN produits par la PCR :

```

Sac1      CCGAGCTCGATGGCTGGAGGAAAGATTCCTATTGTAGGAA
Nde       GGAATTCCATATGGCTGGAGGAAAGATTCCTATTGTAGGAA
5'        ...AACTACGAGCATGGCTGGAGGAAAGATTCCTATTGTAGGAATTGT...
          |790           |800           |810           |820           |830
3'        ...TTGATGCTCGTACCGACCTCCTTTCTAAGGATAACATCCTTAACA...

5'        ...AATTC ACTCTATACAATCGTAAATGAAACCTCTCCGCCCGTATAT...
          |1410           |1420           |1430           |1440           |1450
3'        ...TTAAGTGAGATATGTTAGCATTTACTTTGGAGAGGCCGGGCATATA...
Sal       AAGTGAGATATGTTAGCATTTACTTTGGAGCAGCTGCGCA

```

Ainsi parmi les produits de la PCR avec les amorces *DHFR* – 5'*Sac1* et *DHFR* – 3'*Sal*, l'espèce majoritaire sera (les nucléotides différentes de l'ADN génomique sont en violet):

```

5'        CCGAGCTCGATGGCTG...TAAATGAAACCTCGTACGCGT
          |(790)           |(800)           |(1430)           |(1440)           |(1450)
3'        TGATGCAGCTACCGAC...ATTTACTTTGGAGCAGCTGCGCA

```

Ce fragment mesure donc 661 paires de bases. On montre de même que le produit majoritaire de la PCR avec l'amorce *Nde* fait quant à lui 662 pb. Nous analysons ensuite le produit de la PCR par électrophorèse sur gel

d'agarose. Nous avons un échantillon avec amorce *Sac1* (colonne 2), et 2 échantillons avec amorce *Nde* (colonnes 3 et 4). Les échantillons comprennent $3\mu\text{L}$ de produit de PCR, $5\mu\text{L}$ d'eau et $2\mu\text{L}$ de mélange d'application avec notamment du bleu de bromophénol pour visualiser la migration (à la vitesse d'un fragment d'ADN de 300 pb) et du glycérol afin de densifier les échantillon pour qu'ils restent au fond des cavités. La première colonne est utilisée pour mettre le marqueur étalon pour les tailles.

Le gel contient du bromure d'éthidium (BET) qui possède la propriété de s'intercaler entre les paires de bases de la double hélice d'ADN. Dans ce milieu hydrophobe et sous irradiation UV, une lumière fluorescente 300 fois plus forte est émise. On peut ainsi révéler le gel et visualiser assez précisément le nombre de pb des échantillon.

On constate d'une part qu'un des deux échantillons avec amorce *Nde* ne contenait pas d'ADN, ce qui est le résultat d'erreur de manipulation, et d'autre part que les deux autres échantillons contenaient bien des fragments d'ADN long d'un peu moins de 700 pb, ce qui est en accord avec nos prévisions.

3 Les plasmides dans le clonage