

Contrôle de techniques d'analyse en biologie moléculaire:

Exercice 1 :

1- Compléter la séquence palindromique : **1PT**

A G A T A T C T

T C T A T A G A

2- Si on utilise une enzyme de restriction possédant un site de restriction de 4 bases, qu'elle sera la fréquence de coupure d'un ADN de 2000pb ?

$1/4^n = 1/4^4 = 1/256$ cet enzyme coupe le fragment d'ADN 1 fois chaque 256 PB 0.5 pt

La fréquence de coupure d'un ADN de 2000pb = $2000/256 = 7.81$

Cet enzyme coupe le fragment d'ADN 7 fois 1pt

3- Expliquer la nomenclature des enzymes de restriction suivants : Taq et Eco RI ?

Taq :

T : correspond au genre de la bactérie : *Thermus* 0.5 pt

Aq : correspond à l'espèce de la bactérie : *aquaticus* 0.5 pt

Eco RI : 2pts

E : correspond au genre de la bactérie : *Escherichia*

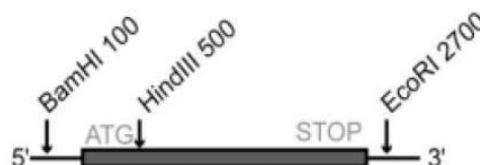
Co : correspond à l'espèce de la bactérie : *coli*

R : correspond à la souche de la bactérie : *Ryb*

I : type d'enzyme (ordre de caractérisation)

Exercice 2 :

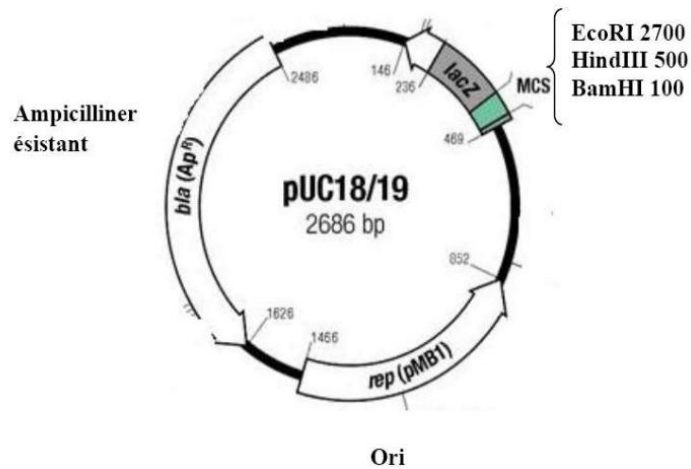
Un fragment d'ADN génomique de 2,8 kpb contient la séquence d'un gène codant une enzyme, représentée dans la figure suivante.



1. A quoi correspond la partie encadrée par le codon ATG et le codon stop ? **la séquence codante (CDS : coding sequence) 0.5pt**

Université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi
M2 Biochimie appliquée

- En vue d'exprimer cette enzyme dans la bactérie *E.coli*, le fragment est cloné dans le vecteur plasmidique pBM203 dont la figure est schématisée ci-après



2. A quoi correspondent les différentes parties représentées dans le vecteur ? **2PTS**

Ori : origine de répllication : leur répllication est indépendante de celle du génome bactérien

Bla (APR) : le plasmide porte un gène qui leur confère un avantage sélectif, une résistance à un antibiotique ampicilline

Lac z : gène de l'opéron lactose qui code la (b-galactosidase). Cette enzyme a pour propriété d'hydrolyser le lactose en glucose et galactose. Un produit non toxique pour la cellule bactérienne est également substrat de la galactosidase : le Xgal (5-bromo-4chloro-3-indonyl- β -D-galactoside), l'hydrolyse de ce dernier en dibromo-5,5-dichloro-4, 4-indigo (de couleur bleu), indique la production de β -galactosidase.

MCS : multiple cloning site : une région avec des sites uniques pour des enzymes de restriction connue *Eco RI*, *BamHI* et *HindIII*. Cette région est appelée aussi " *polylinker* ". Son rôle est de permettre l'insertion du fragment d'ADN étranger

3. Ce vecteur est-il conseillé pour exprimer le gène en question ? Pourquoi ? **1PT**

oui ce vecteur peut exprimer le gène, de taille de 2.8 et le plasmide peut insérer des ADN étranger inférieur à 10KB en plus il contient tous les éléments nécessaire pour son expression comme ORI, gène de sélection une région MCS

4. Proposer un protocole de clonage ? **voir cours 5PTS**

5. Comment on sélectionne les bactéries transformées des non transformées ? **1PTS**

Un système enzymatique appartenant à l'opéron lactose peut être utilisé à la place d'un second antibiotique. L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide pUC 19 aboutit à l'inactivation du gène qui code pour la b-galactosidase. Pour vérifier la présence ou l'absence de l'activité enzymatique b-galactosidase, on utilise un galactoside dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la b-galactosidase, ce composé s'appelle *X-gal*. Pour

pouvoir métaboliser le X-gal, la cellule doit être exposée à un inducteur, cet inducteur est *le IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside)*.

En culture et en présence d'IPTG et de X-gal, les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtres car elles ont perdu la capacité de clivage de l'équivalent coloré du lactose (le X-gal) par la β -galactosidase. Par contre, les bactéries résistantes à l'ampicilline et non transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies bleues. La sélection visuelle des bactéries transformées par les plasmides recombinants est donc possible.

6. Quelle est la taille du vecteur recombinant obtenu ? 1.5PTS

La taille du plasmide+ la taille du gène insérer -200pb= 2686 + (2800-200)= 5286pb= 5,286KB

Exercice 3 :

- Quelle est la différence entre un ddntp et dntp ?

Dans le ddNTP didesoxy, le **groupement 3'-OH** est remplacé par un **hydrogène**. Cette modification empêche la poursuite de la synthèse de l'ADN qui continue normalement sur le 3-OH. En effet, dans le dNTP disoxy, le **groupement 2'-OH** est remplacé par un **hydrogène**

- Comment révèle-t-on tous les fragments d'ADN préalablement séparés sur gel d'agarose? Par le BET : **bromure d'éthidium**. Qui est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à **des rayonnements ultraviolets**, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. 0.5pt
- Comment révèle-t-on un ADN porteur d'une séquence nucléotidique précise ? **Southern Blot** (ou par hybridation sonde sequence nucléotidique recherchée) 1PT
- parmi les étapes de la technique Southern Blot : lavage de la membrane utilisé, expliquer pourquoi ? **pour éliminer les sondes non hybridées et en excès** 1PT