

Université de Jijel

Faculté de sciences et de la nature et de la vie

Département de biologie moléculaire et cellulaire

Master 2 biologie moléculaire et cellulaire

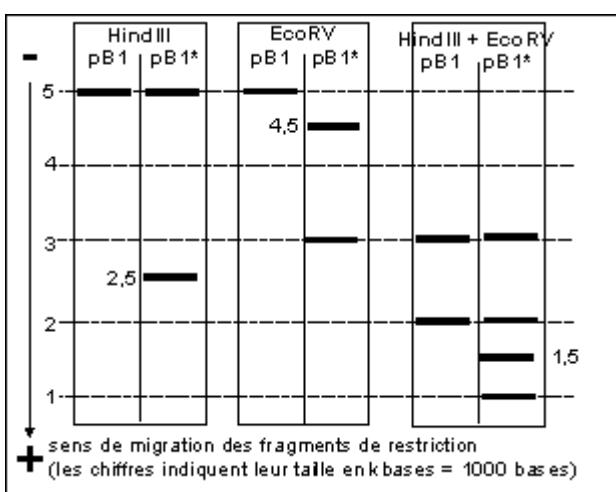
Module de techniques de transgénèse et clonage chez les eucaryotes

Série N°1

Exercice N°1 :

Un plasmide d'une souche bactérienne (B1) circulaire (que l'on nommera pB1) contient un seul site de restriction de l'enzyme HindIII. Ce site est situé dans le gène de résistance à la tétracycline. On coupe le génome de la drosophile à l'aide de la même enzyme de restriction HindIII. On obtient des fragments qui sont insérés (voir génie génétique) dans des vecteurs d'insertion qui sont justement les plasmides pB1 de la même souche bactérienne (B1). Par des techniques appropriés on cible les transformants ayant intégré un fragment d'ADN de la drosophile. On obtient ainsi un ensemble de souches de bactéries B1* transformées dont leur plasmide pB1* a intégré tel ou tel gène drosophilien. C'est ce que l'on appelle une banque d'ADN. En fait il s'agit d'une banque de clones de souches bactériennes B1* (recombinées) dont le plasmide recombiné (pB1*) contient tel ou tel gène de drosophile.

Le clone n°15 contient par exemple un gène de drosophile inséré. On analyse l'ADN de ce plasmide transformé (pB1*) par digestion enzymatique en présence des enzymes de restriction Hind III et/ou EcoRV. Les résultats sont présentés ci-dessous, le témoin étant le plasmide pB1 non recombiné.



Questions:

- 1) Définir un clone et une banque génomique.
- 2) Expliquer l'importance de l'unicité et de la localisation du site de restriction d'Hind III
- 3) Construire la carte de restriction de pB1 et de pB1* du clone 15 pour les deux enzymes de restriction utilisées ici.

Exercice N°2 :

Un expérimentateur dispose des solutions 1, 2 et 3 contenant des plasmides purifiés. Afin de connaître leur concentrations en ADN, il mesure à l'aide d'un spectrophotomètre leur absorbance à 260 et 280 nanomètres, après les avoir diluées au 1/50^e dans de l'eau. Il obtient les valeurs suivantes :

Longueur d'onde (en nm)	260	280
Solution 1	1.2	0.58
Solution 2	1.1	0.55
Solution 3	1.2	0.62

♦ Au vu de ces résultats l'expérimentateur estime la pureté de ces plasmides suffisante, tout en reconnaissant que le plasmide de la solution 1 est le mieux purifié et celui de la solution 3 le moins propre.

♦ *sur quel critère fonde-t-il son jugement ?*

♦ *calculer la concentration en µg de plasmide par µl des solutions 1, 2 et 3.* On suppose qu'une unité d'absorbance correspond à une concentration de 40 µg/ml et que la solution contient comme seul espèce moléculaire le plasmide considéré.

♦ on suppose que le plasmide 1 mesure 3000 paires de bases, le 2, 4500 et le 3, 15000.

Calculer la molarité des solutions 1, 2 et 3 en plasmide supposant que la masse molaire moyenne d'un nucléotide est de 330.

♦ Chacun de ces plasmides est un vecteur d'expression, c'est-à-dire qu'il permet la synthèse d'une protéine spécifique une fois introduit dans la cellule hôte. On souhaite microinjecter dans les cellules eucaryotes en culture 100 molécules de chacun de ces plasmides, séparément, afin d'étudier l'effet de chacune des protéines 1, 2 et 3 sur la physiologie cellulaire. Le microinjecteur utilisé permet l'introduction d'un volume de 1 picolitre de solution de plasmide. Le nombre d'Avogadro est égal à $6.02 \cdot 10^{23}$.

♦ *Quelles dilutions des solutions 1, 2 et 3 doivent-elles être réalisées pour obtenir les solutions à placer dans le microinjecteur ?*