

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

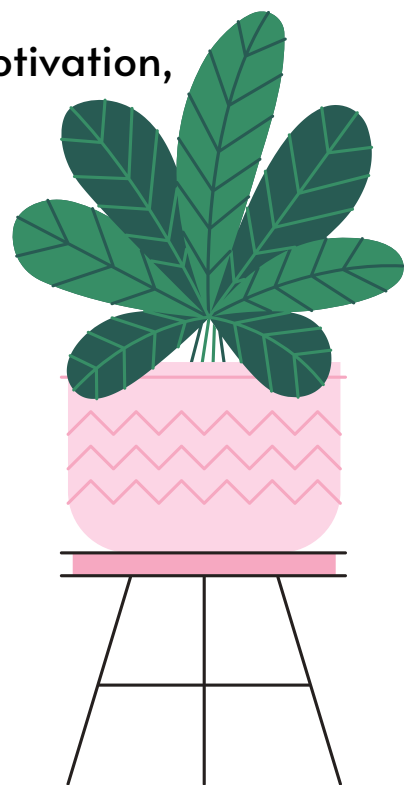
- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage



L2 - "BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENETIQUE 1"

1^{ère} épreuve-Biologie Moléculaire
(note/20 ; durée : 1h)
Lundi 24 octobre 2011

Exercices (durée conseillée : 40 min)

1^{ère} partie :

Un chercheur vient d'identifier un nouveau gène chez *E. coli*. Afin de vérifier la présence de ce gène dans d'autres espèces bactériennes, de l'ADN génomique de ces différentes espèces est analysé par *Southern blot*. L'ADN génomique d'*E. coli* est utilisé comme témoin positif.

La sonde utilisée pour cette expérience est isolée et amplifiée par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) à partir d'ADN génomique de l'espèce témoin *E. coli*. Les séquences des extrémités de la sonde à amplifier sont présentées dans la figure 1. Les amorces oligonucléotidiques utilisées (20 nucléotides) sont préalablement radiomarquées à leur extrémité 5'.

Q1- A partir de la séquence ADN présentée dans la figure 1, donnez la séquence du couple d'amorces pour amplifier par PCR la totalité de la séquence indiquée figure 1.

5'CCTAGGACTGGCTTATAGTG3' et 5'TCTGTGAACGTGTACCTATC3'

Q2- Décrivez la méthode permettant de radiomarquer ces oligonucléotides à leur extrémité 5' ? Vous préciserez le nom et la fonction de(s) enzyme(s) ainsi que les réactifs nécessaires.

1) phosphatase (alcaline) pour déphosphoryler l'extrémité 5' du fragment PCR

2) Phosphorylation des extrémités 5' avec la PolyNucléotide Kinase (PNK) en présence d'ATP γ [32P]

La PCR est réalisée et le fragment d'ADN ainsi amplifié est utilisé comme sonde pour des expériences d'hybridation en *Southern Blot*. Après hybridation, la membrane est incubée dans différentes solutions de lavages puis autoradiographiée, un signal est obtenu, mais il est très faible, y compris pour l'ADN génomique d'*E. coli* (témoin positif).

Q3- Rappelez les principales étapes du *Southern Blot*.

Extraction de l'ADN

Hydrolyse de l'ADN par action d'une ou plusieurs enzymes de restriction

Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose en conditions natives

Dénaturation par traitement alcalin

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Hybridation avec sonde radiomarquée

Autoradiographie, révélation selon le marquage de la sonde

Q4- Le chercheur souhaite modifier les conditions expérimentales des lavages afin d'obtenir un signal plus fort, quel(s) paramètre(s) ce chercheur peut-il modifier et comment doit-il le(s) faire varier ? Justifiez votre réponse.

Le signal existe, mais il est trop faible. Il faut des conditions moins stringentes.

Abaisser la T° de lavage car plus la température est basse par rapport au Tm et plus les appariements sont favorisés

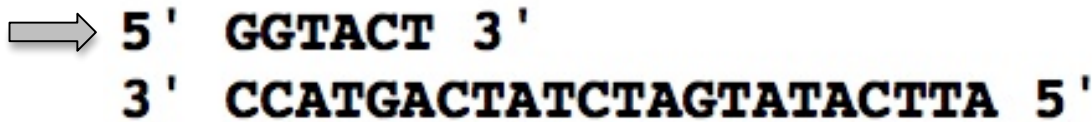
et/ou

Augmenter la concentration en sels car les sels neutralisent les charges négatives portées par les groupements phosphate permettant de diminuer les répulsions électrostatiques entre les brins et donc de favoriser les appariements

Figure 1 : Séquences des extrémités du fragment d'ADN à amplifier pour la préparation de la sonde (seul le brin sens a été représenté, orientation 5'-3'). Les tirets indiquent la présence d'une séquence d'ADN non définie.

2^{ème} partie :

La matrice décrite ci-dessous est utilisée dans un milieu réactionnel contenant le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I et une solution tampon (pH 7,4) contenant des cations mono- et bivalents (6 tubes identiques numérotés de 1 à 6 sont préparés en parallèle).



Les nucléotides libres indiqués dans le tableau suivant sont ajoutés, en quantités équimolaires (équivalentes), dans chacun des 6 tubes qui sont alors incubés pendant 10 minutes à 37°C (cf. *tableau*).

Tube N°1	Aucun
Tube N°2	dCTP
Tube N°3	ddGTP + dATP
Tube N°4	dCTP + dATP + dTTP + dGTP
Tube N°5	dATP + dTTP + dGTP + ddCTP
Tube N°6	dCTP + dATP + dTTP + dGTP + ddCTP

Tableau: Nucléotides ajoutés dans chacun des six tubes

Q1- Rappelez les activités enzymatiques du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I.

Polymérisation 5'→3' et exonucléase 3'→5'.

Q2- Pour chaque mélange, donnez le nombre total de fragments d'ADN obtenus. Indiquez la séquence du brin signalé par la flèche pour chacun de ces fragments.

Tube N°1	0 fragment : le brin indiqué d'une flèche est entièrement hydrolysé
Tube N°2	1 fragment 5'GGTAC3'
Tube N°3	1 fragment 5'GGTACTG3'
Tube N°4	1 fragment 5'GGTACTGATAGATCATATGAAT3'
Tube N°5	1 fragment 5'GGTACTGATAGATC3'
Tube N°6	2 fragments 5'GGTACTGATAGATC3' 5'GGTACTGATAGATCATATGAAT3'