

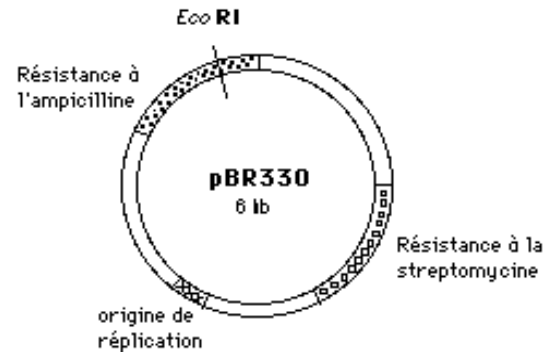
Université Mohamed Khider-Biskra
 Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
 Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Module de Génie Génétique
Série 02

Exercice 01

Dans le but d'étudier la fonctionnalité d'un gène chez les souris, un clonage est réalisé au site Eco RI du vecteur plasmidique pBR330 et le fragment Eco RI-Eco RI d'ADN génomique de souris portant le gène d'intérêt.

Proposez un protocole de clonage et indiquez comment vous sélectionnez les clones recombinants ?

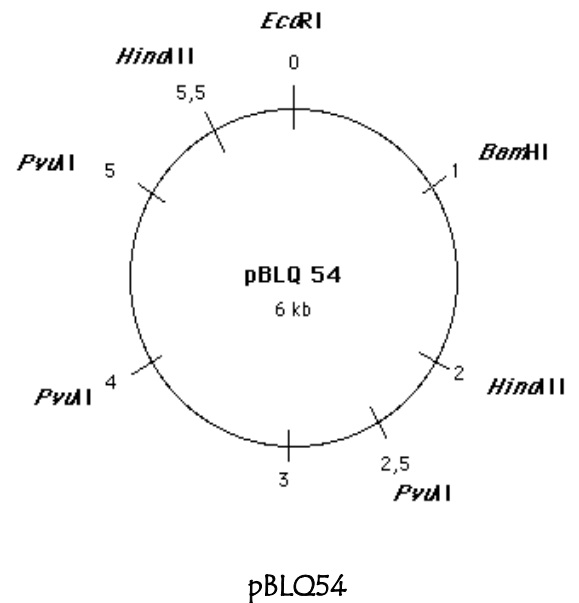


Exercice 2

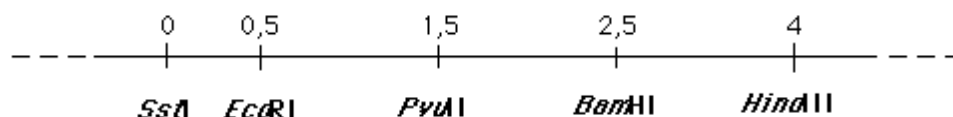
On clone un fragment d'ADN génomique Eco RI-Bam HI de 2 kb d'*Arabidopsis thaliana* aux sites Eco RI et Bam HI du plasmide pBLQ54. On appellera pARABIDO le plasmide recombinant obtenu à l'issue du clonage.

1. Présentez un schéma du plasmide pARABIDO et positionnez les sites de restriction sur ce schéma.

2. Pour contrôler le résultat du clonage, une analyse par restriction de pARABIDO est réalisée en utilisant les enzymes de restriction Hind III et Pvu II séparément puis en réalisant une électrophorèse en gel d'agarose. Schématisez ce que l'on doit observer à l'issue de l'électrophorèse pour les deux digestions enzymatiques en indiquant les tailles des différentes bandes obtenues.

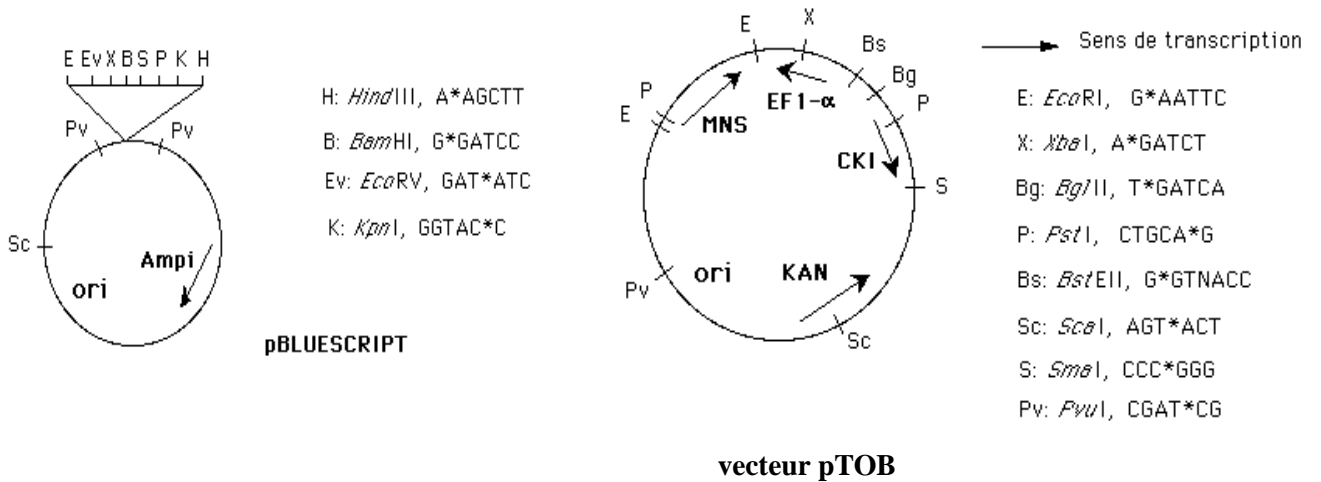


Région de l'ADN génomique d'*A. thaliana* contenant le fragment EcoRI-BamHI de 2 kb:



Exercice 3

Un fragment Eco RI-Sma I d'ADN génomique de tabac est cloné. Sachant que sur ce fragment se trouvent trois gènes: MNS, EF1-alpha et CKI et notre étude s'intéresse au seul gène EF1-alpha que l'on souhaite sous-cloner. Décrivez une stratégie de clonage permettant de disposer uniquement de ce gène dans le vecteur pBLUESCRIPT.



Corrigé type

Exercice 01

Protocol de clonage

Préparation de l'insert: Extraction d'ADN génomique de souris. Digestion partielle de cet ADN par l'enzyme de restriction Eco RI, de manière à générer des fragments de 5 à 10 kb. Electrophorèse préparative pour purifier sur gel les fragments de 5 à 10 kb.

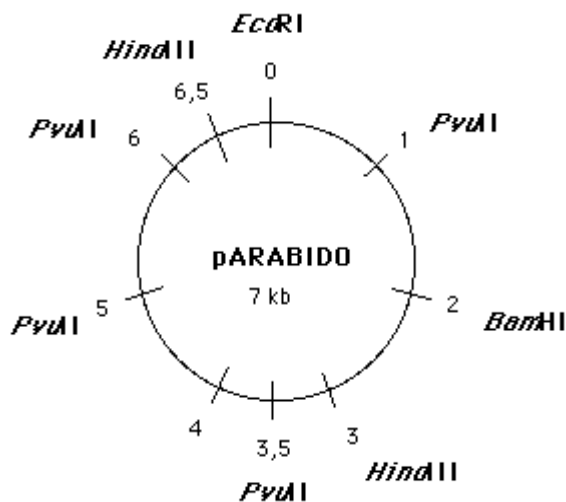
Préparation du vecteur: Digestion complète de pBR330 par Eco RI. Déphosphorylation des extrémités par phosphatase alcaline qui empêche la réalisation d'ADN circulaire.

Clonage: ligature des inserts et des vecteurs. Transformation de cellules d'*E. coli*. **Recommencer les étapes précédentes jusqu'à avoir 10 e+6 colonies transformées indépendantes.**

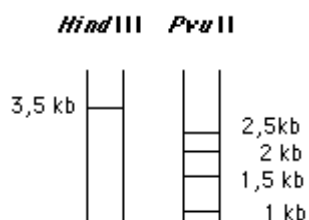
Sélection: sélection des colonies transformées sur milieu contenant de la streptomycine. Pour estimer le taux de colonies qui ont reçu un plasmide contenant de l'ADN génomique de souris, repiquage d'environ 500 colonies sur milieu contenant de l'ampicilline: seule les colonies qui ont reçu un plasmide ne contenant pas d'ADN génomique de souris poussent.

Exercice 02

1. plasmide recombinant



2.



Exercice 03

1. On réalise une digestion totale du plasmide portant l'ADN génomique par les enzymes de restriction Eco RI et Bgl II.
2. On réalise une digestion totale de pBLUESCRIPT par les enzymes Eco RI et Bam HI. Bgl II et Bam HI sont des enzymes qui libèrent des extrémités cohésives (donc compatibles).
3. On mélange les produits de digestion des deux plasmides avec une ligase.
4. On transforme ensuite des cellules d'*E. coli* avec le résultat de la ligature, puis on sélectionne les clones recombinants sur un milieu contenant de l'ampicilline.
5. On extrait ensuite l'ADN plasmidique des clones obtenus pour vérifier qu'ils contiennent bien le plasmide recombinant désiré: cette vérification se fait en réalisant une carte de restriction des ADN extraits.