**Université Mohamed Khider -Biskra-**

**Faculté des Sciences Exactes et des SNV. Département des SNV**

**TD n° 6**

**Exercice 1:**

On souhaite étudier la fonctionnalité d’un gène M d’une bactérie. Pour cela, on essaie de cloner au site  Eco RI du vecteur plasmidique pBR330 (voir schéma) un fragment EcoRI- Eco RI d'ADN génomique de la bactérie d’intérêt :



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

2. Un des plasmides recombinants contenant le gène M (appelé pBM1) est digéré par les enzymes de restriction : Bam HI et  Eco RI.

Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium, on obtient les profils de restriction suivants:



a. quel est le rôle du bromure d'éthidium ?

b. Donnez la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1.

**Exercice 1**

**1. Préparation de l'insert :**

* **Extraction d'ADN génomique** : On extrait l'ADN génomique de la bactérie contenant le gène M à l'aide de techniques standards (lyse des cellules, purification de l'ADN).
* **Digestion partielle avec EcoRI** : L'ADN génomique est digéré par l'enzyme de restriction EcoRI pour obtenir des fragments de taille variable.
* **Purification des fragments** : Les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis récupérés par extraction du gel. la plage de taille est choisie par rapport a la compatibilité avec la capacité du vecteur plasmidique.

**2. Préparation du vecteur (pBR330) :**

* **Digestion complète avec EcoRI** : Le plasmide pBR330 est coupé au niveau de ses sites de restriction EcoRI pour créer des extrémités cohésives compatibles avec l'insert.
* **Déphosphorylation des extrémités** : Les extrémités 5' du vecteur sont déphosphorylées à l'aide d'une phosphatase alcaline pour empêcher l’auto-ligation du plasmide (c'est-à-dire la fermeture du vecteur sans insérer d'ADN génomique).

**3. Clonage :**

* **Ligature** : Les fragments génomiques contenant le gène M sont mélangés au vecteur préparé en présence d'une ADN ligase, ce qui permet l'insertion du fragment d’ADN dans le plasmide.
* **Transformation** : Le plasmide recombinant est introduit dans des cellules *E. coli* compétentes (par choc thermique ou électroporation).

**4. Sélection des clones recombinants :**

* **Sélection sur milieu contenant de la streptomycine** : Le plasmide pBR330 confère une résistance à la streptomycine. Seules les cellules ayant reçu le plasmide (recombinant ou non) poussent sur ce milieu.
* **Sélection différenciée sur milieu à l'ampicilline** : Certaines colonies sont repiquées sur milieu contenant de l’ampicilline. Si l'insert est correctement inséré dans le site EcoRI, il perturbe le gène de résistance à l’ampicilline. Par conséquent, seules les colonies ayant un plasmide sans ADN inséré peuvent pousser.
* **Identification du gène M (hybridation moléculaire)** :
	+ Les colonies recombinantes sont transférées sur un filtre.
	+ Une sonde moléculaire spécifique du gène M est utilisée pour effectuer une hybridation sur colonies.
	+ Les clones contenant le gène M seront identifiés grâce au signal généré par la sonde.
1. **Sans insertion d'ADN** :
Si le plasmide est ligaturé sans insérer de fragment d'ADN (vecteur vide), le gène de résistance à l'ampicilline **reste intact**. Les cellules contenant ce plasmide peuvent donc croître sur un milieu contenant de l’ampicilline.
2. **Avec insertion d'ADN (recombinant)** :
Si un fragment d'ADN est inséré dans le site EcoRI, il **interrompt** la séquence du gène de résistance à l'ampicilline. Le gène ne peut plus produire la protéine conférant cette résistance. Par conséquent, les cellules contenant un plasmide recombinant **ne poussent pas** sur un milieu avec de l’ampicilline.
3. **Analyse des profils de restriction** :
a. **Rôle du bromure d'éthidium** :
Le bromure d'éthidium est un agent intercalant qui se lie à l’ADN double brin. Sous lumière UV, il fluoresce, permettant la visualisation des fragments d’ADN après électrophorèse.

b. **Carte de restriction du plasmide recombinant pBM1** :

Bcor

4

2,5

5,5

Bcor

Eor

4,5

Bcor

3

3,5

Eor

1