Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Génétique Moléculaire et Appliquée

3ème Année Licence Biochimie Année universitaire 2019-2020

TD N°5 DE GENIE GENETIQUE

Exercice 01 :

Proposez par un schéma une stratégie d'insertion d'un ADNc double brin au site *PstI* situé sur le gène de la résistance à l'ampicilline de pBR322.

1/Comment opère-t-on pour libérer ultérieurement la séquence insérée de PBR322 ?

2/En quoi l'insertion au site *PstI* est-elle particulièrement utile ?

(Site *PstI* : CTGCA/G)

Exercice 02 :

Vous disposez d'un brin d'ADN à séquencer (matrice), d'une amorce, d'ADN polymérase, des quatre 2'-désoxyribonucléotides (dXTP) et d'un jeu des différents 2',3'-didésoxyribonucléotides (ddXTP). L'amorce est radiomarquée par du phosphore radioactif 32P.

L'ADN matriciel à séquencer **ACGTAATCGC**------- comporte, à son extrémité 3', une séquence supplémentaire (représentée ici par un segment de droite en pointillé) sur laquelle l'amorce va s'hybrider, créant ainsi le site d'initiation de l'ADN polymérase.

1/Indiquez le rôle du didésoxyribonucléotide.

2/Compléter un tableau en indiquant la composition des différents milieux réactionnels et, pour chaque milieu, le type et la taille des fragments synthétisés

3/Schématisez le résultat de la migration des produits obtenus pour chaque mélange réactionnel.

4/Reporter, à droite, la séquence du brin synthétisé puis la séquence recherchée, en indiquant le sens de lecture des séquences établies.

Exercice 03 :

Un fragment de restriction d'ADN coupé par l'enzyme *Kpn* mesure 5100 pb et contient le X. Par hybridation après transfert avec une sonde X on démontre qu'après digestion par *EcoRI* de ce fragment, deux sous fragments (de 2500 et de 800pb) s'hybrident avec cette sonde, alors qu'à la suite de sa digestion par *BamHI*, deux autres sous fragments radioactifs (de 1900 et de 3000pb) sont produits.

Sachant qu'au niveau de l'ADN complémentaire du X les deux premiers sites *BamHI* et *EcoRI* sont distants de 76 pb.

1/Montrer que la comparaison des cartes de restriction des deux clones ADNg et ADNc permet d'établir l'existence d'un intron dans la séquence de ce gène et de mesurer sa longueur.