



## Epreuve de : plasmide et technique de génie génétique

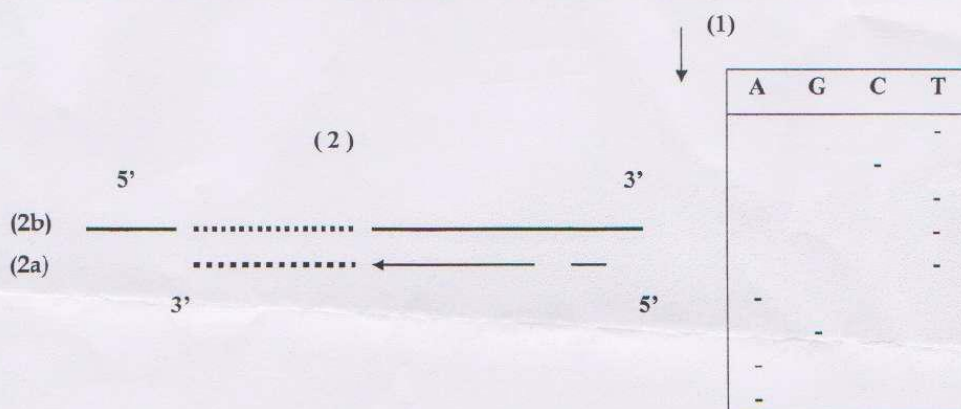
### Question 1 (04pts):

Soit, représenté ci-dessous sur la ligne (2b), un segment d'ADN monobrin, inséré dans le virus M13. Son séquençage est effectué par la technique de Sanger, avec une amorce XY.

- En examinant le schéma (1) représentant une partie de l'autoradiogramme du gel de migration, écrire directement sur le schéma (2) à l'emplacement des points.

En (2a) : la séquence nucléotidique lue directement sur ce schéma du film.

En (2b) : la séquence réelle du segment de l'ADN monobrin correspondant.



### Questions 2 (06 pts):

On souhaite étudier le gène de la souris homologue au gène M du bœuf qui a été cloné dans un autre laboratoire. Pour cela, on essaie de cloner au site *Eco* RI du vecteur plasmidique pBR330 (voir schéma) un fragment *Eco* RI-*Eco* RI d'ADN génomique de souris portant le gène homologue au gène M du bœuf.

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

b- 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:

- Donnez la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1.

c- Un transfert sur membrane de nitrocellulose (Southern blot) est préparé à partir du morceau du gel de la question b correspondant à la double digestion *Eco* RI-*Bam* HI. La membrane est hybridée avec une sonde constituée du plasmide pBR330 marqué au 32P. Parmi les 5 fragments générés lors de la double digestion *Eco* RI-*Bam* HI, à quel(s) fragment(s) s'hybridera la sonde?

### Exercice 3 (10pts):

a- Un fragment d'ADN de 1kb a été fragmenté par 4 enzymes de restriction : *Bam*HI, *Pst* I, *Xho* I et *Mbo* I dont les sites reconnus sont : ***Bam*HI** : 5' G/GATCC 3' ; ***Pst* I** : 5' CTGCA/G 3' ; ***Xho* I** : 5' C/TCGAG 3' ; ***Mbo* I** : 5' /GATC 3'.

- Recopier la séquence de l'ADN et encadrer les sites de restriction des quatre enzymes en indiquant la position des coupures.
- Donner les fragments générés par chaque enzyme.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'  
 3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

- Choisir l'enzyme de ligation correspondante. Justifiez votre réponse.

b- Dans une expérience de biologie moléculaire, on est amené à insérer ce fragment de 1kb dans le plasmide pUC18. Après transfection dans une souche appropriée d'*E.coli* en présence d'ampicilline et de réactifs permettant de mettre en évidence la synthèse de  $\beta$ -galactosidase, on observe des colonies blanches et des colonies bleues.

- A quoi correspondent ces 2 types de colonies ?
- Pourquoi opère-on en présence d'ampicilline ?

c- Vous êtes en train de faire un transfert Southern. Vous vous êtes rendu à l'étape où vous devez mettre le gel dans une solution de NaOH avant de faire le transfert comme tel. Vous êtes très pressés et vous décidez de sauter cette étape de traitement du gel dans le NaOH et vous passez directement au transfert. Lorsque vous faites une hybridation de ce transfert Southern avec une sonde qui normalement devrait s'hybrider vous remarquez qu'il n'y a aucune hybridation. Que c'est-il passé?

### **Sujet 3**

- Donner la taxonomie des Actinomycètes?
- Enumérer les différences physiologique et morphologique des Actinomycètes?
- Comment se fait la division chez les Actinomycètes?
- Est-il possible d'étudier l'antibiogramme chez ces derniers ? si oui comment ?
- Quel est le problème associé aux antibiotiques ?
- Décrivez le test IMViC ?