**Module : Biologie moléculaire**

**Niveau : Master 2**

**Spécialité : Biochimie**

**TD.05**

**PCR**

**Exercice 1 :**

On veut étudier un codant gène codant une protéine humaine synthétisée exclusivement par le foie. La séquence la plus fréquente de ce gène dans la population générale est la suivante :

**5’ ACT AAG GCA AAA TTC CGA GAG GCC CTA GAA GAT ACA CGA 3’**

La première étape de l’étude consiste à amplifie ce segment par PCR.

**1-** Peut-on utiliser indifféremment l’ADN extrait de cellules sanguines, de la peau, du foie ou d’autres tissus pour cette étude ?

**2-** Décrire brièvement les différents ingrédients requis et le principe de base de la méthode de PCR

**3-** Décrivez en une phrase chacune des 3 étapes qui se répètent à chaque cycle de PCR

**4-** Quels paramètres influent sur le choix des températures à utiliser ?

**Exercice 2 :**

Dans le laboratoire de biologie moléculaire on se propose d’analyser le profil de migration d’un ADN plasmidique coupé (ou non) par une endonucléase, dont le site de restriction se trouve dans la région du plasmide contenant le polylinker. A cette fin, deux tubes Eppendorf distinct ont été préparés ; chacun contenant un mélange réactionnel de 10µl, composé comme suit :

**Tube 1 :** 1%g d’ADN ; 5unités d’enzyme de restriction ; 1 µl de tampon 10X ; compléter à 10µl avec l’eau utrapure

**Tube 2 :** 1µg d’ADN ; 1µl de tampon 10X ; compléter à 10µl avec l’eau ultrapure.

On rajout dans chaque tube 10µl d’une solution(S) dont la composition est la suivante : TAE 1X ; Glycérol 40% ; Bleu de Bromophénol.

Simultanément, un gel d’agarose (1%) conetant 5µl de Bromure d’Ethédium a été préparé par fusion/solidification dans un tampon TEA (1X). 10µl de mélange final ont été déposé dans les puits formés dans le gel. Le gel a été soumis à un champ électrique de 80V/30min, dans TEA1x.

**Le résultat obtenu est présenté dans la figure 1.**

**Questions :**

**A**. Donner le nom de la technique utilisée dans cette expérience et préciser son rôle.

……………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………

**B.** Donner le nom de la solution (S), et préciser le rôle du Glycérol et du Bleu de bromophénol et TEA (1x).

S :………………………………………………………………………………………………

Glycérol :………………………………………………………………………………………

Bleu de bromophénol : ……………………………………………………………………….

TEA :…………………………………………………………………………………………..

**C.** Quel est le rôle de Bromure d’éthidium qui a été rajouté dans le gel ?

…………………………………………………………………………………………………



**D.** Légender la figure 1

M : ………………………………………………………………………………………………

1 et 2 :…………………………………………………………………………………………...

3 et 4 :...........................................................................................................................................

**E.** Donner un titre à la Figure 1

**F.** Quel est le nombre de site(s) de restriction sur le plasmide ?

**G.** Estimer le poids moléculaire du plasmide