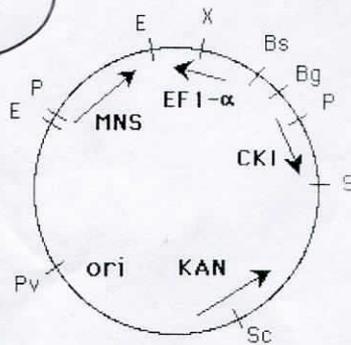


Examen final Expression génique et interactions moléculaires(EGIM)

On a cloné un fragment *Eco* RI-*Sma* I d'ADN génomique de tabac sur lequel se trouvent trois gènes : MNS, EF1- α et CKI. On s'intéresse au seul gène CKI que l'on souhaite sous-cloner. Décrire une stratégie de clonage permettant de disposer uniquement de ce gène dans le vecteur pBLUESCRIPT.

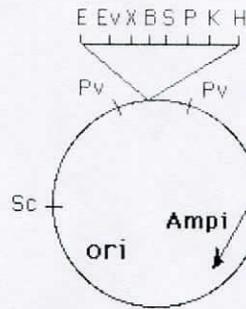
Carte du vecteur pTOB contenant le fragment d'ADN génomique :

SP5



→ Sens de transcription

- E: *Eco*RI, G*AATTC
- X: *Xba*I, A*GATCT
- Bg: *Bgl*II, T*GATCA
- P: *Pst*I, CTGCA*G
- Bs: *Bst*EII, G*GTNACC
- Sc: *Sca*I, AGT*ACT
- S: *Sma*I, CCC*GGG
- Pv: *Pvu*I, CGAT*CG



- H: *Hind*III, A*AGCTT
- B: *Bam*HI, G*GATCC
- Ev: *Eco*RV, GAT*ATC
- K: *Kpn*I, GGTAC*C

pBLUESCRIPT

- Isoler CKI en faisant une digestion du pTOB par les enzymes Bg et S. Electrophorèse et récupération du petit fragment.
- Couper pBlue script avec Bam HI et Sma.
- En effet, Bgl et Bam engendrent des extrémités compatibles.
- Ligation du fragment CKI et pBlue script.
- Transformation de λ Amp^r.
- Récupérer les clones Amp^r (selection)

3pts

II/ Quel avantage majeur fournit le clonage de gènes de mammifères à partir d'ARNm ou de gènes synthétiques par rapport à l'amplification par PCR ou au clonage d'un gène natif ?

L'ARNm ou le gène synthétique ne contiennent que des bons (pas d'introns). Il est donc possible de cloner des vecteurs qui se propagent dans des systèmes procaryotes. PCR nécessite des extrémités -

5pts

III/ Quels sont les éléments que doit avoir un vecteur d'expression pour permettre la production d'une protéine recombinante ?

- Promoteur -
- Séquence RBS -
- Gène rapporteur -

ATG
Signal de terminaison de la transcription

4pts

IV/ Une protéine recombinante produite par une bactérie peut être retrouvée dans des corps d'inclusion cytoplasmique.

1

1. Que signifie corps d'inclusion ? agrégat insoluble.

2. Comment procéder pour récupérer la protéine ?

1) Centrifugation - L'agrégat est ensuite solubilisé dans l'eau. La protéine récupérée doit être renaturée.

V/ Compléter le tableau suivant :

3pts

TAG	Ligand de chromatographie
Maltose Binding prot (MBP)	Maltose
Chitine " (CBP)	Chitine
Glutathion S- trans férase	Glutathion

Bon Courage