



LES OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE EN BIOTECHNOLOGIES



Travaux des Actions Académiques Mutualisées

Niveau

- Terminale STL, Biotechnologies

Thème du programme

- Enzymes : polymérase, enzymes de restriction
- Vecteurs d'amplification et d'expression

Situations pédagogiques

- Séance TD d'environ 1 heure qui précède deux autres séances :
- TP "Analyse électrophorétique d'ADN plasmidique avant et après digestion enzymatique"
- TD "Clonage moléculaire et transgène"

Liens internet

- http://higher.ed.mcgraw-hill.com/sites/0072495855/student_view0/
- http://stwww.weizmann.ac.il/g-bio/geneengine/animeng/Restriction_EN.swf
- http://www.wehi.edu.au/education/wehitv/restriction_enzyme_ecor1/
- <http://j-f-m.pagesperso-orange.fr/>

Compétences B2i

- **Domaine 1** : s'approprier un environnement informatique de travail
- **Domaine 3** : créer, produire, traiter, exploiter des données
- **Domaine 4** : s'informer et se documenter

Matériels TICE

- Un ordinateur avec connexion internet par binôme.

Mots clés

- ADN, plasmide, enzyme de restriction, site de restriction, carte de restriction, DNase, nucléase, exonucléase, endonucléase, palindrome, alignement de séquences



Votre avis nous intéresse, merci de répondre à notre enquête concernant ce scénario.

Elève, cliquer [ici](#).

Professeur, cliquer [ici](#).



Ces activités de génétique moléculaire s'inscrivent dans le cadre d'une séance préparatoire à deux autres activités : un TP « Analyse électrophorétique d'ADN plasmidique avant et après digestion enzymatique » et un TD « Clonage moléculaire et transgénèse ». Les notions de base sur la structure de l'ADN, étudiées en CBSV, doivent être préalablement maîtrisées par les élèves. Ce travail peut être consécutif ou suivi d'un travail réalisé en ETLV (enseignement technologique en langue vivante) afin que les élèves abordent le vocabulaire spécifique de génétique nécessaire à la compréhension des animations.

Activité n°1 : Etude des enzymes de restriction

Objectifs

- Définir une enzyme de restriction.
- Expliquer le mode d'action d'une enzyme de restriction.
- Comprendre une réaction de restriction.

Durée conseillée

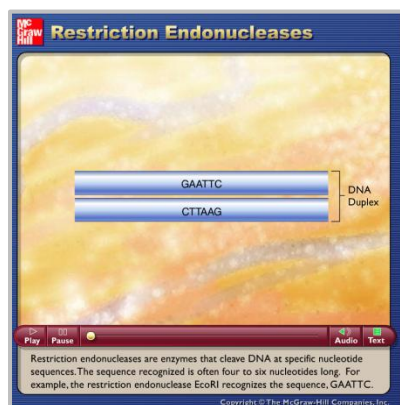
- 30 minutes

Consignes

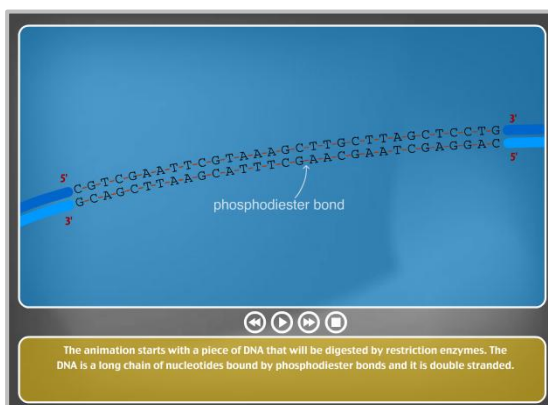
- Répondre aux questions à l'aide des animations.



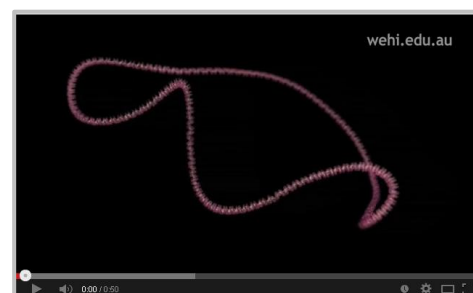
Ressources pédagogiques



Animation n°1
(Cliquer sur l'image)



Animation n°2
(Cliquer sur l'image)



Vidéo
(Cliquer sur l'image)



Questions

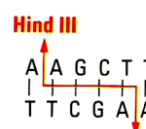
Il existe des enzymes capables d'hydrolyser l'ADN : les désoxyribonucléases (DNase). On distingue notamment les endonucléases et les exonucléases. Les enzymes de restriction sont des enzymes d'origine bactérienne capables de reconnaître spécifiquement certaines séquences de l'ADN au niveau de zones appelées « sites de restriction ». Quand une enzyme reconnaît un site de restriction spécifique, elle coupe le double brin d'ADN. La digestion de l'ADN par une enzyme de restriction libère plusieurs fragments de tailles différentes appelés « fragments de restriction ».

- 1- A quelle catégorie de DNase appartiennent les enzymes de restriction ? Quel type de réaction catalyse-t-elle ?
- 2- Que provoque l'action d'une enzyme de restriction sur de l'ADN plasmidique ?
- 3- A l'aide des animations, retrouver et écrire le site de restriction de l'enzyme *EcoRI*.
- 4- Repérer le site de restriction de l'enzyme *EcoRI* sur le double brin d'ADN présenté ci-dessous.

...3'-ATGTATGGTGGTTTTTATAGAATTCGAAATGTAGATGATGATAAGCTTTACGTGAG-5'...
...5'-TACATACCACCAAAAAATATCTTAAGCTTTACATCTACTACTATTCGAAATGCACTC-3'...

- 5- Réaliser la digestion enzymatique de ce même ADN par l'enzyme de restriction *HindIII*.

- 6- Qu'est-ce qu'une séquence palindromique ?



- 7- Quelles sont les étapes pour la mise en place d'une réaction de restriction in vitro ?
- 8- Quelle enzyme est capable d'associer à nouveau deux brins d'ADN préalablement digérés ? Quel type de réaction met-elle en place ? Comment nomme-t-on la liaison ainsi formée ?

Liens :

- http://www.wehi.edu.au/education/wehitv/restriction_enzyme_ecor1/
- <http://highered.mcgraw-hill.com/olcweb/cgi/pluginpop.cgi?it=swf::535::535::/sites/dl/free/0072437316/120078/bio37.swf::Restriction%20Endonucleases>
- http://stwww.weizmann.ac.il/g-bio/geneengine/animeng/Restriction_EN.swf



Activité n°2 : Etude génétique du plasmide *pGlo*

Objectifs

- Utilisation d'un logiciel de génétique moléculaire (Génieien)
- Etude des gènes constitutifs du plasmide *pGlo*
- Etablissement de la carte de restriction du plasmide *pGlo*

Durée conseillée

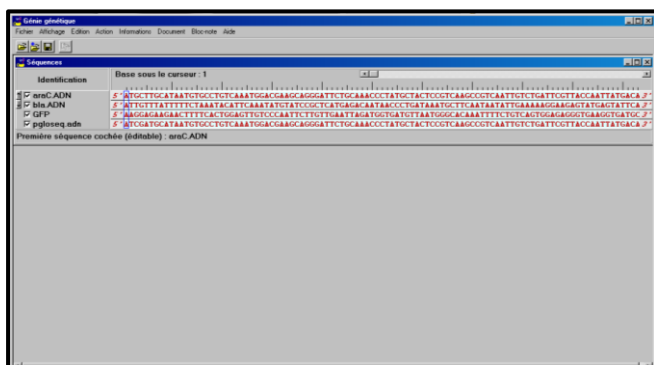
- 30 minutes

Consignes

- Répondre aux questions à partir du logiciel Génieien.



Ressources pédagogiques



Logiciel Génieien
(Cliquer sur l'image)

Quelques fonctionnalités du logiciel Génieien

- Fichier < Charger une séquence < Chercher et ouvrir le plasmide *pGlo*
- Informations
- Action < Alignement < Informations
- Edition < Annotation < Nouvelle < Choisir la séquence à colorer, la couleur et la position de la séquence
- Action < Enzymes de restriction < Afficher toutes les enzymes (tout cocher) < Choisir les enzymes de restriction souhaitées < OK (naviguer ensuite dans la fenêtre afin d'obtenir toutes les informations nécessaire)



Questions

Le logiciel « Géniegen » permet entre autre d'étudier la structure et l'organisation des gènes des plasmides bactériens. Il permet notamment de repérer l'emplacement des gènes par alignement et d'étudier l'action d'une large gamme d'enzymes hydrolytiques comme les enzymes de restriction. On peut ainsi établir une cartographie très précise des gènes d'un plasmide et repérer les différents sites de restriction utiles pour une utilisation en biotechnologie (établissement d'une « carte de restriction »). L'étude portera sur le plasmide « pGlo » qui contient 3 gènes :

- ❶ **AraC** : gène qui code pour la synthèse d'une enzyme responsable de dégradation de l'arabinose,
- ❷ **Bla** : gène qui permet de conférer la résistance à un antibiotique donné,
- ❸ **GFP** : gène qui code pour la synthèse d'une protéine fluorescente.

1- Indiquer la taille du plasmide et des 3 gènes présents au sein du plasmide. Que représentent les séquences d'ADN restantes sur le plasmide ?

2- Réaliser l'alignement de chaque gène (un par un) avec le plasmide « pgloseq.adn ». Noter dans chaque cas, l'emplacement du début et de la fin du gène dans le plasmide.

3- Annoter les 3 gènes sur le plasmide en utilisant des couleurs différentes afin de bien visualiser ces séquences au sein du plasmide. **Montrer votre résultat à l'enseignant !**

4- Réaliser la digestion du plasmide pGlo à l'aide des enzymes de restriction suivantes : *NdeI*, *HindIII*, *EcoRI*.

5- Pour chaque enzyme de restriction, préciser la séquence du site de restriction, sa longueur (en pb), son type de coupure et s'il s'agit d'une séquence palindromique.

Indication : On distingue les coupures à bouts francs et les coupures à bouts cohésifs avec des extrémités débordantes (en 5' ou en 3').

6- Pour chaque enzyme, indiquer le nombre de site de restriction, la localisation précise de chaque site, le nombre et la taille des fragments de restriction obtenus.

7- Ces enzymes coupent-elles le plasmide au niveau des gènes AraC, Bla et GFP ? Justifier.

8- Quelle enzyme peut-on utiliser afin de couper le plasmide en vue d'isoler le gène AraC ? Justifier.

Bilan - Compléter le **schéma bilan** en localisant de manière précise les différents gènes présents sur le plasmide et en indiquant les sites de restriction des enzymes étudiées. Utiliser des couleurs pour chaque gène et légender votre schéma !

Lien :

• <http://j-f-m.pagesperso-orange.fr/>



Schéma bilan : Carte génétique du plasmide *pGlo*

