

Génétique

**Réf :
512 084**

Français – p 1

Version : 1106

Kit de biotechnologie des plasmides



1. Instructions

Ce kit vous fournit des molécules et des liaisons pour construire un modèle de plasmide comprenant 18 nucléotides, 1 simulacre de protéine de fluorescence, et 1 gène de résistance à l'ampicilline. Des éléments supplémentaires sont également inclus dans le but de vous permettre de construire un gène étranger pouvant être inséré dans le plasmide.

Mise en garde : Ce kit renferme de petites pièces qui pourraient engendrer des risques respiratoires. Il faut mettre en garde les élèves contre le fait de porter ces pièces à la bouche.

2. Composition du kit

Ce kit contient :

- 68 sucres à 3 chevilles de couleur pourpre
- 68 phosphates à 2 chevilles de couleur jaune
- 10 molécules diverses à 2 chevilles de couleur rouge
- 22 adénines à 3 chevilles de couleur rouge
- 22 thymine à 3 chevilles de couleur noire
- 17 cytosines à 4 chevilles de couleur verte
- 17 guanines à 4 chevilles de couleur argentée
- 110 liaisons covalentes transparentes
- 92 liaisons covalentes noires
- 6 liaisons covalentes rouges (pour le gène de résistance à l'ampicilline [amp^r])
- 6 liaisons covalentes vertes (pour le gène de la protéine d'un vert fluorescent [GFP])
- 74 liaisons hydrogène longues et blanches
- 5 feuilles des enzymes de restriction
- 1 liste de contrôle

Les plasmides existent à l'état naturel chez certaines bactéries et quelques rares types de cellules eucaryotes.

Il arrive que ces petits morceaux d'ADN doubles brins se répliquent de façon autonome et parfois portent des gènes importants pour la survie de la cellule qui les contient (par exemple résistance antibiotique).

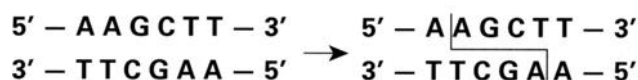
L'ADN d'un plasmide a la forme d'un anneau, et est composé de 1.000-20.000 paires de nucléotides.

Un nucléotide d'ADN est composé d'un sucre (désoxyribose), d'un phosphate, et d'une des bases azotées suivantes : Adénine, Thymine, Cytosine ou Guanine.

Une des caractéristiques importantes de l'ADN, y compris le type d'ADN trouvé dans les plasmides, est que des enzymes appelées endonucléases de restriction (ou enzymes de restriction) sont capables de reconnaître la séquence des bases dans un segment spécifique (appelé un site de reconnaissance) d'une séquence quelconque de la molécule d'ADN et de couper le site de manière à laisser le double brin avec des extrémités non-alignées.

Par exemple, l'enzyme de restriction HindIII coupe son site de reconnaissance de la manière indiquée par la flèche sur la droite de la Figure 1.

Figure 1



Les extrémités non-alignées sont dénommées extrémités cohésives, en raison de la facilité avec laquelle elles sont capables de s'attacher de nouveau, ou de reformer un anneau. Pour former un anneau avec un autre fragment d'ADN, une extrémité cohésive doit avoir une complémentarité de bases avec l'extrémité avec laquelle elle va être raboutée.

Une fois que les bases sont appariées et qu'elles forment des liaisons hydrogène, une enzyme appelée ADN ligase établira des liaisons sucre-phosphate dans la chaîne d'ADN (c'est-à-dire, l'enzyme forme des liaisons phosphodiester 5'-3'). Après ligature, la cassure dans l'ADN sera complètement réparée, comme l'indique la flèche sur la gauche de la Figure 1.

Il n'est pas nécessaire que les extrémités cohésives qui sont fusionnées ensemble, aient la même origine.

Toutefois, il faut qu'elles aient été coupées par la même enzyme de restriction, c'est-à-dire qu'un ADN d'origine humaine peut être associé à un ADN d'origine bactérienne à condition que leurs extrémités cohésives aient été coupées par la même enzyme (voir Figure 2).



Si les molécules d'ADN d'origines différentes ont été coupées par 2 enzymes différentes, l'appariement des bases complémentaires ne se fera pas, et les extrémités cohésives ne seront pas appariées et scellées de façon constante comme indiqué sur la Figure 3.



L'utilisation du principe fondamental décrit ci-dessus, associée à certaines techniques complémentaires, permet désormais d'introduire une copie d'ADN modifié spécifiquement préparée, issue d'un gène humain dans un plasmide.

L'ADN humain aura des sites de restriction à ses deux extrémités qui sont complémentaires du même site de restriction du plasmide.

Le plasmide, doté du gène étranger inséré, peut alors être incubé dans une culture bactérienne, comme *E. coli*, dont les cellules capteront le plasmide recombinant (en partie humain, en partie bactérien).

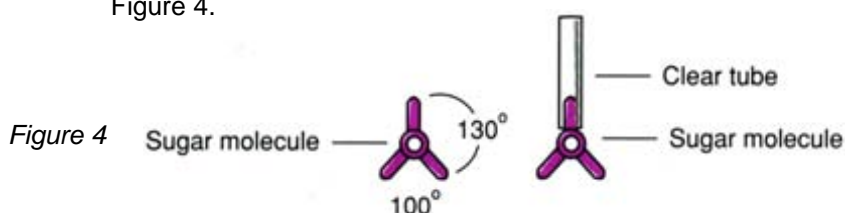
Il est facile de localiser les cellules qui ont prélevé l'ADN recombinant sur une boîte de culture en utilisant comme marqueurs de sélection des gènes de résistance à un antibiotique ou des gènes codant la synthèse de la protéine fluorescente verte.

Des cellules d'*E. coli* génétiquement modifiées servent à synthétiser quelques protéines codées par des gènes humains.

Par exemple, l'humuline, l'insuline qui permet de traiter certains sujets diabétiques, est produite à l'aide de la technique de génie génétique décrit ci-dessus.

Étape 1 : Construction d'un Nucléotide

Assemblez un nucléotide en plaçant une liaison transparente sur la cheville de la molécule de sucre de couleur pourpre qui est située au sommet de l'angle de 130° et qui est la plus éloignée des 2 autres chevilles, comme indiqué sur la Figure 4.



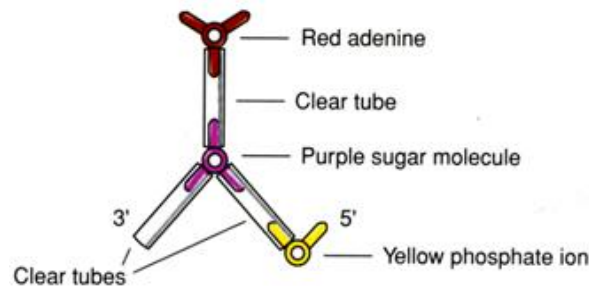
Ensuite, insérez une cheville d'une adénine de couleur rouge dans la liaison que vous venez de placer sur la molécule de sucre.

Pour achever le nucléotide, placez des liaisons transparentes sur les chevilles de la molécule de sucre qui sont les plus proches les unes des autres et placez une cheville de phosphate de couleur jaune dans l'une de ces chevilles.

Le phosphate est désormais situé sur le carbone 5' du nucléotide que vous venez de construire.

Disposez-le de façon à ce qu'il ressemble à celui de la Figure 5.

Figure 5



Votre professeur a-t-il vérifié votre modèle de nucléotide ? [4] ; Indiquez lui l'extrémité 5' [5].

Étape 2 : Construction d'un nucléotide contenant de la Cytosine

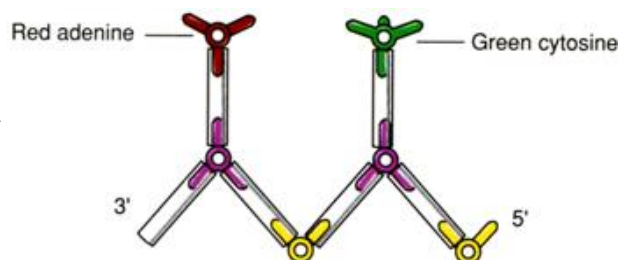
Construisez 1 nucléotide comprenant de la cytosine 5' phosphate à partir d'1 sucre, d'1 phosphate, d'1 cytosine de couleur verte et des liaisons transparentes.

Étape 3 : Construction d'un dinucléotide

Reliez le phosphate jaune du nucléotide comprenant de l'adénine à la liaison 3' du sucre du nucléotide comprenant de la cytosine.

Vous venez de construire un dinucléotide qui doit ressembler à celui représenté sur la Figure 6.

Figure 6



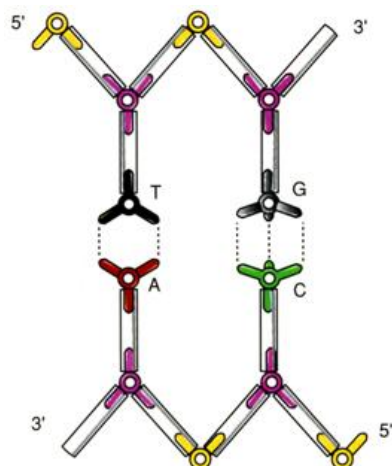
Avez-vous fait contrôler votre modèle de dinucléotide auprès de votre professeur ? [6].

Étape 4 : Construction d'un Duplex d'ADN

Préparez 1 dinucléotide qui est complémentaire de celui que vous avez confectionné à l'étape 3, et assemblez-les en formant des liaisons hydrogène à l'aide des longs tubes blancs.

Ce duplex possède 2 bases appariées (2 paires de bases). Chaque extrémité du duplex a une polarité inverse de celle de l'autre. C'est-à-dire, que les 5' phosphates de 2 dinucléotides sont situées aux extrémités opposées du duplex d'ADN (voir Figure 7).

Figure 7



Placez le duplex de côté afin de l'utiliser ultérieurement.

Avez-vous demandé à votre professeur de vérifier le duplex ? [7].

Étape 5 : Formation des sites de reconnaissance

Votre professeur vous dira lesquels et combien de sites de reconnaissance suivants doivent être construits (voir Figure 8).

Un "W" apparaît dans la séquence reconnue par BstNI, et ce W signifie que la base peut être A ou T.

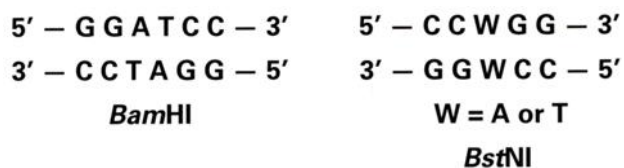
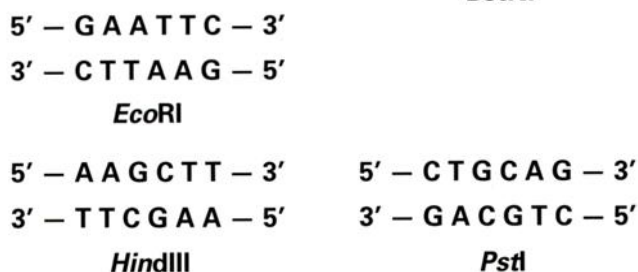


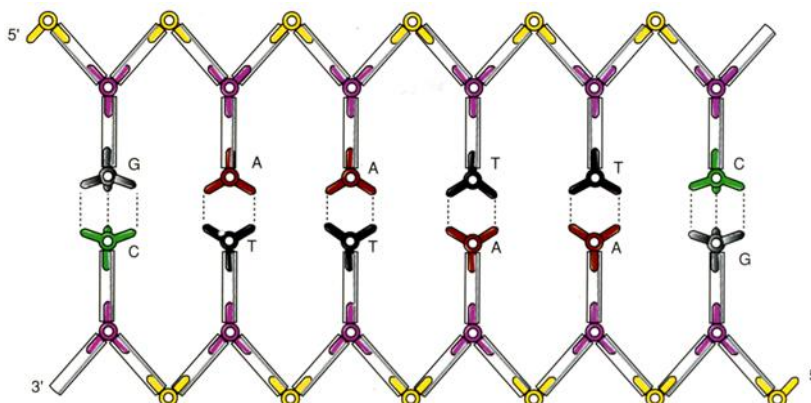
Figure 8



Assurez-vous que si vous choisissez un A pour un W, vous utiliserez T pour l'autre et vice versa.

Assurez-vous que vous avez un phosphate à chaque extrémité 5' de votre modèle comme indiqué sur la Figure 9.

Figure 9

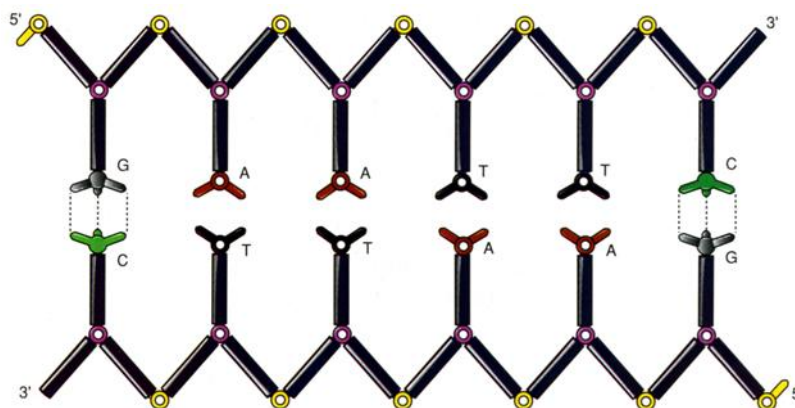


Par la suite, quand vous préparez 1 gène étranger à insérer dans votre plasmide, il vous faudra confectionner 2 copies du site de reconnaissance qui correspondent à la séquence que vous venez de construire.

Utilisez des tubes noirs pour des liaisons covalentes pour les sites de reconnaissance de votre gène étranger.

Votre plasmide ne présentera que des liaisons covalentes transparentes. Etablissez des liaisons hydrogène uniquement sur la première et la dernière paires de base (voir Figure 10).

Figure 10

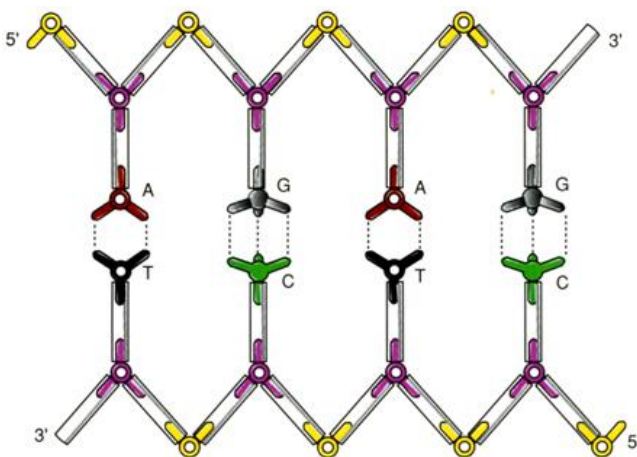


Ensuite, placez de côté ces duplex de 6-paires de bases jusqu'à l'étape 9.

Étape 6 : Construction d'une séquence plasmidique principale

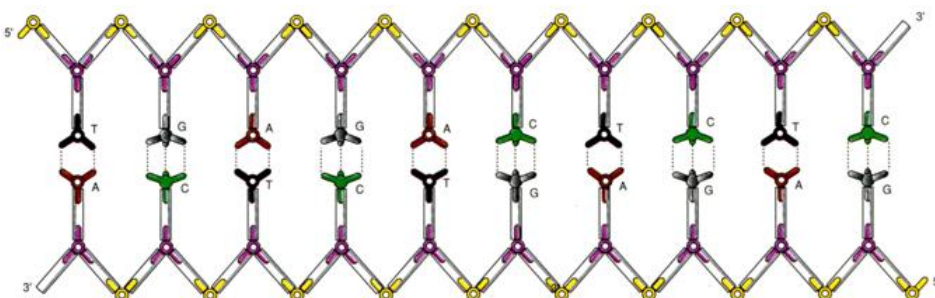
Si vous construisez 2 sites de restriction (plus 1 copie), construisez 1 duplex de 4 paires de bases à l'aide de 2 As, 2 Ts, 2 Cs, et 2 Gs (voir Figure 11).

Figure 11



Si vous ne construisez qu'un seul site de restriction (plus une copie), préparez 1 duplex de 10 paires de bases à l'aide de 5 As, 5 Ts, 5 Cs, et de 5 Gs (voir Figure 12).

Figure 12



Joignez l'ADN composé de 4- ou de 10-paires de bases au duplex de 2-paires de bases que vous avez construit et mis de côté à l'étape 4.

Le court segment d'ADN de 6- ou 12-paires de bases obtenu représentera la majeure partie de votre plasmide, dont la longueur effective est de quelques milliers de paires de bases.

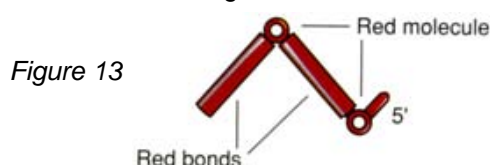
Étape 7 : Construction d'un simulacre de gène de résistance à un antibiotique ou d'un gène de la protéine fluorescente verte

Le gène codant une protéine qui confère la résistance bactérienne à l'ampicilline a une longueur d'environ 300 paires de bases.

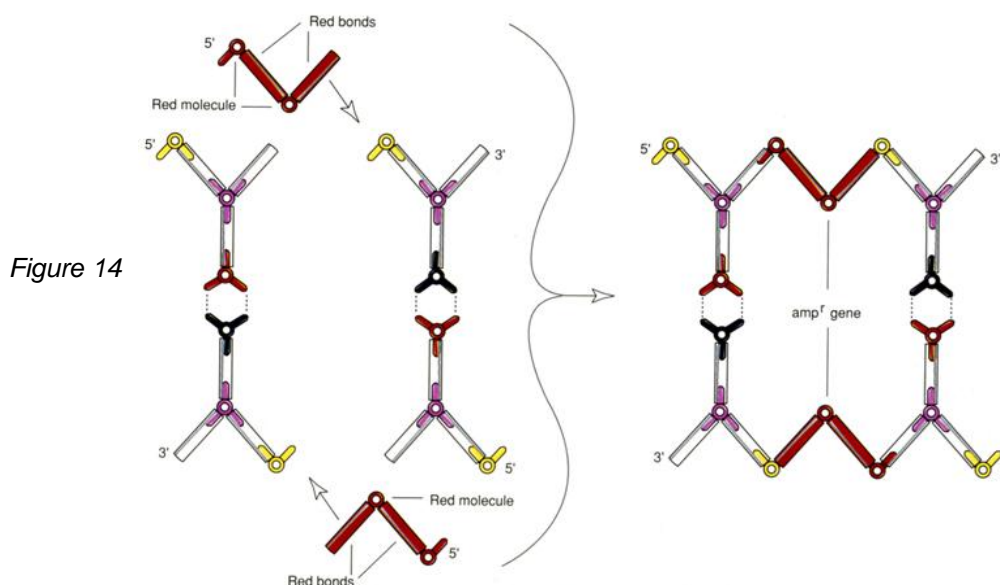
Le gène codant la synthèse de la Protéine Fluorescente Verte (GFP) a une longueur supérieure à 200 paires de bases.

Vous simulerez chacun de ces gènes en vous servant de 4 molécules rouges à 2 chevilles et de 4 tubes colorés.

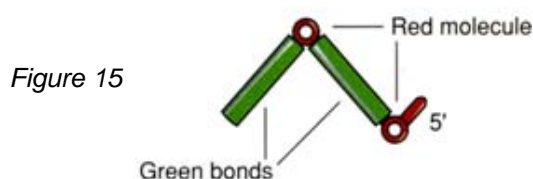
Pour construire une région du gène *amp^r* du plasmide, assemblez 2 exemplaires dupliqués de 2 tubes rouges et 2 molécules rouges comme indiqué sur la Figure 13.



N'insérez pas encore le gène *amp^r* dans votre plasmide. Cependant, quand vous procéderez à l'insertion, à l'étape 8, aidez-vous de la Figure 14.



Pour construire une région du gène GFP du plasmide, assemblez 2 exemplaires dupliqués des 2 tubes verts et 2 molécules rouges comme indiqué sur la Figure 15.



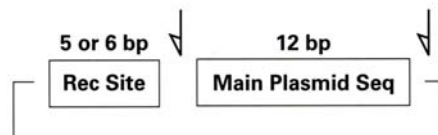
Quand vous insérez le gène GFP dans le plasmide, aidez-vous de la Figure 14.

Étape 8 : Assemblage du Plasmide

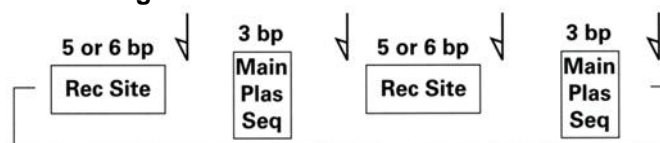
Maintenant vous pouvez associer 1 ou 2 sites de restriction, la séquence de 6- ou de 12-paires de bases, le gène ampr et/ou le gène GFP pour construire un plasmide complet.

Les flèches sur les diagrammes d'assemblage indiquent les positions possibles des gènes ampr et/ou GFP. Votre professeur vous indiquera comment procéder.

Assemblage A : = site potentiel d'insertion pour le gène GFP ou le gène ampr



Assemblage B :



Assemblage C :

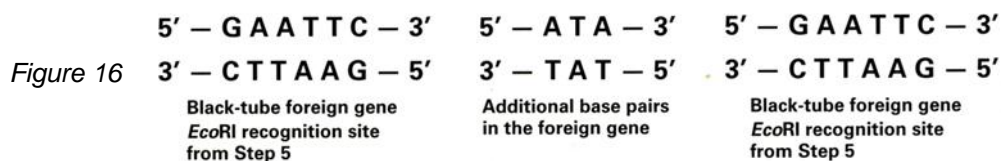
Assemblez un plasmide que vous avez construit ou un plasmide que votre professeur a construit.

Votre professeur a-t-il vérifié votre plasmide ? [10].

Étape 9: Construction d'un gène étranger

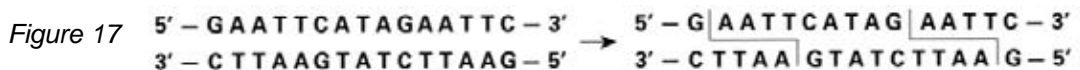
Maintenant vous allez devoir identifier les sites de reconnaissance des gènes étrangers que vous avez construits avec des tubes noirs lors de l'Étape 5 :

Formation des sites de reconnaissance. Placez les 2 sites de reconnaissance des gènes étrangers devant vous. Il vous faut maintenant construire 3 paires de bases supplémentaires à l'aide des tubes noirs. Ces nucléotides additionnels représentent de dix à un millier de paires de bases que l'on pourrait trouver dans 1 gène étranger réel. Utilisez les séquences suivantes :



Combinez ces 3 parties pour former des séquences uniques de 15 paires de bases de « gène étranger ».

Maintenant, servez-vous de la grande feuille correspondante comportant des points colorés qui représente, dans cet exemple, la séquence 5' GAATTC 3' reconnue par l'enzyme de restriction EcoRI. Veuillez noter l'endroit où cette enzyme de restriction « couperait » les paires de bases de votre gène étranger. Scindez votre gène étranger de 15-paires de bases comme si celui-ci était coupé par l'enzyme de restriction. Voir Figure 17.



Étape 10 : Insertion d'un gène étranger dans un plasmide

Placez votre modèle de plasmide sur la feuille en montrant le site de restriction que vous aimeriez couper.

Retournez le modèle plasmidique de manière à ce que le profil de ses bases corresponde et repose sur les points colorés figurant sur le diagramme. En vous servant de la ligne en pointillés comme d'un guide, séparez les bases en désengageant les liaisons hydrogène, séparez ensuite les 2 liaisons phosphodiester. Veillez à laisser les phosphates sur les extrémités 5' des chaînes d'ADN.

Reformez le cercle du plasmide ouvert à l'aide de votre gène étranger en formant des liaisons hydrogène.

Ensuite intervenez à la manière d'une ADN ligase en formant des liaisons phosphodiester 5'– 3' dans la chaîne du plasmide.

3. Service après vente

La garantie est de 2 ans, le matériel doit être retourné dans nos ateliers.
Pour toutes réparations, réglages ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN - SUPPORT TECHNIQUE
Rue Jacques-Monod
BP 1900
27 019 EVREUX CEDEX France

0 825 563 563*

**0,15 €/TTC à partir d'un téléphone fixe*

Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition du Lundi
au Vendredi (8h30 à 17h30)

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge immédiatement votre appel pour vous apporter une réponse adaptée à votre domaine d'expérimentation : Sciences de la Vie et de la Terre, Physique, Chimie, Technologie .

Service gratuit *

0825 563 563 choix n° 3. **

* Hors coût d'appel : 0,15 € ttc / min.
à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour
la France métropolitaine et la Corse.

Pour les Dom-Tom et les EFE,
utilisez le + 33 (0)2 32 29 40 50

Aide en ligne :
www.jeulin.fr

Rubrique FAQ



Rue Jacques-Monod,
Z.I. n° 1, Netreville,
BP 1900, 27019 Evreux cedex,
France

Tél. : + 33 (0) 2 32 29 40 00
Fax : + 33 (0) 2 32 29 43 99
Internet : www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

Phone : + 33 (0) 2 32 29 40 49
Fax : + 33 (0) 2 32 29 43 05
Internet : www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SA capital 3 233 762 € - Siren R.C.S. B 387 901 044 - Siret 387 901 04400017

Direct connection for technical support

A team of experts at your
disposal from Monday
to Friday (opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request immediatly to provide you with the right answers regarding your activity field : Biology, Physics, Chemistry, Technology .

Free service *

+ 33 (0)2 32 29 40 50**

* Call cost not included

** Only for call from foreign countries

