

# Andrew Tolonen ([atolonen@gmail.com](mailto:atolonen@gmail.com))  
# avril 2013

## L2 microbiologie TD08: méthodes de la microbiologie moléculaire

### Exercice 1: amplification d'un gène d'intérêt par PCR

Vous êtes un médecin qui travaille dans un hôpital où une nouvelle souche de *S. aureus* (souche A) vient d'apparaître. Cette souche est résistante à tous vos antibiotiques, même la vancomycine. Vous avez une hypothèse que la résistance de souche A à la vancomycine est dû au gène *mecA*. Pour tester votre hypothèse, vous souhaitez utiliser la PCR pour examiner si le gène *mecA* est présent dans la souche A qui a infecté vos patients.

1.1 Quels quatre réactifs sont nécessaires pour amplifier le gène *mecA* de la souche A de *S. aureus* par PCR?

1.2 Pourquoi est-il essentiel d'utiliser une polymérase isolée d'une bactérie thermophile (ie *Thermus aquaticus*) ou archée (ie *Pyrococcus furiosus*)?

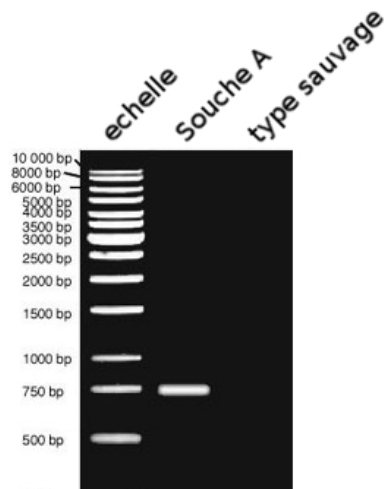
1.3 A partir de la molécule d'ADN illustré ci-dessous, décrivez ce qui se passe à chaque étape d'un cycle de PCR: dénaturation, d'hybridation et d'élongation.



1.4 Avant le PCR, il y a 20 copies du gène dans le tube. Combien des copies du gène est-ce qu'il y aura après 30 cycles de PCR?

1.5 L'électrophorèse est une méthode pour séparer les molécules ADN dans un champ électrique. Pourquoi est-ce que l'ADN migrent vers l'électrode positive?

1.6 Vous déposez le produit PCR sur un gel d'agarose et vous obtenez le résultat suivant par électrophorèse. Le 'type sauvage' est la souche normale qui est sensible à la vancomycine. Comment expliquez-vous ce résultat?



1.7 PCR sert à amplifier une séquence d'ADN spécifique. Ici, nous avons utilisé la PCR pour détecter la présence d'un gène dans une bactérie, mais quelles sont les autres applications des PCR dans notre société?

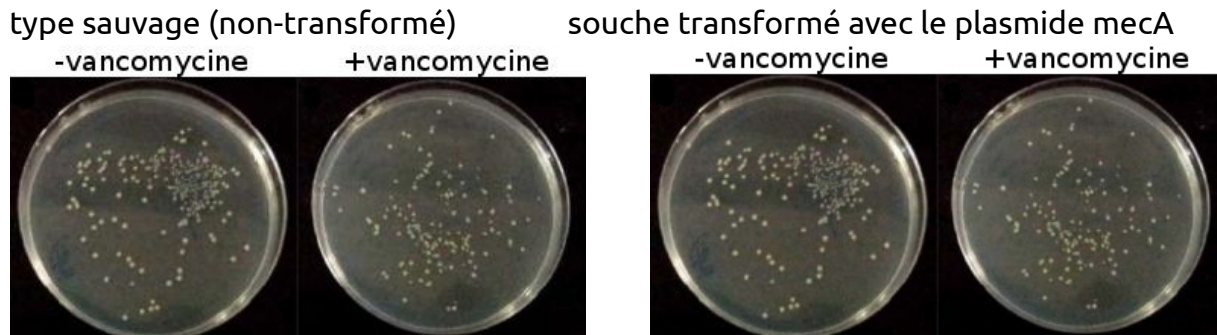
## Exercice 2 clonage des gènes

2.1 Après avoir amplifié le gène *mecA* par PCR, vous voulez l'exprimer chez *E. coli* pour voir si la souche transformée est devenue résistante à la vancomycine. Décrivez les étapes du clonage de *mecA* chez *E.coli*.

2.2 Quelles sont les deux façons de préparer les cellules d'*E.coli* pour que l'ADN environnemental puisse facilement entrer dans la cellule?

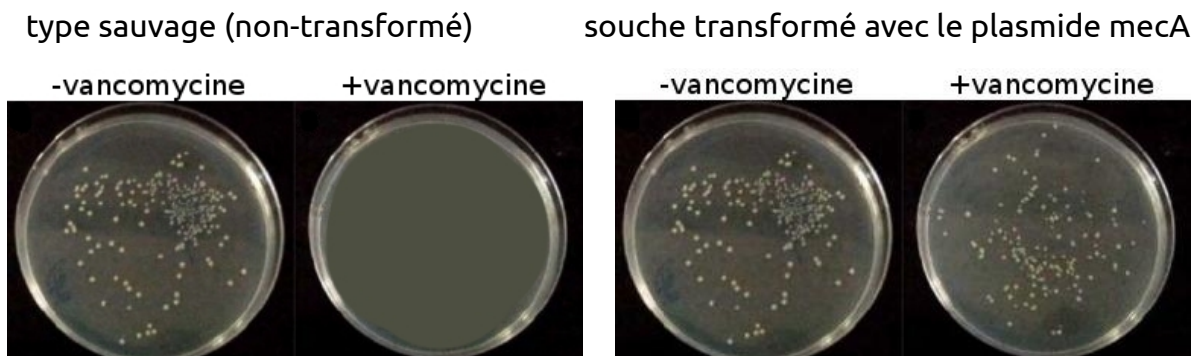
2.3 Une fois que vous avez transformé le plasmide chez *E. coli*, vous étalez les cellules non-transformées (témoin) et celles transformées sur les boîtes de Pétri avec et sans la vancomycine et vous obtenez les résultats suivants. Comment interprétez-vous ces résultats?

### Boîtes de Pétri d'*E. coli*



2.4 Vous isolez le plasmide qui contient *mecA* d'*E. coli* et vous le transformez dans une souche de *S. aureus* qui est sensible à la vancomycine. Comment expliquez-vous les résultats suivants?

### Boîtes de Pétri de *S. aureus*



#####

## Informations Supplémentaires

**PCR** (polymerase chain reaction): amplification d'une séquence spécifique d'ADN

### Reactifs nécessaires

- 1 ADN génomique (template pour la réaction)
- 2 amorces d'ADN qui s'hybrident aux extrémités de la séquence
- 3 polymérase ADN
- 4 nucléotides libres (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

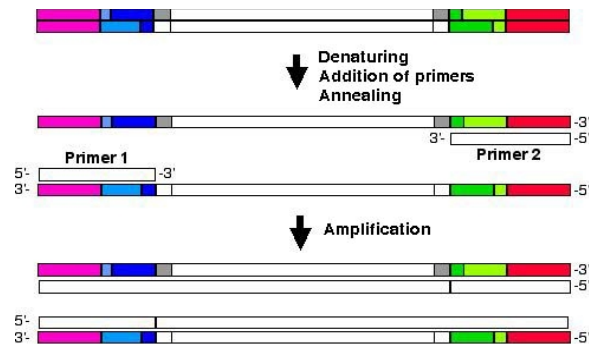
### Programmation de la machine de PCR

30 cycles des 3 étapes:

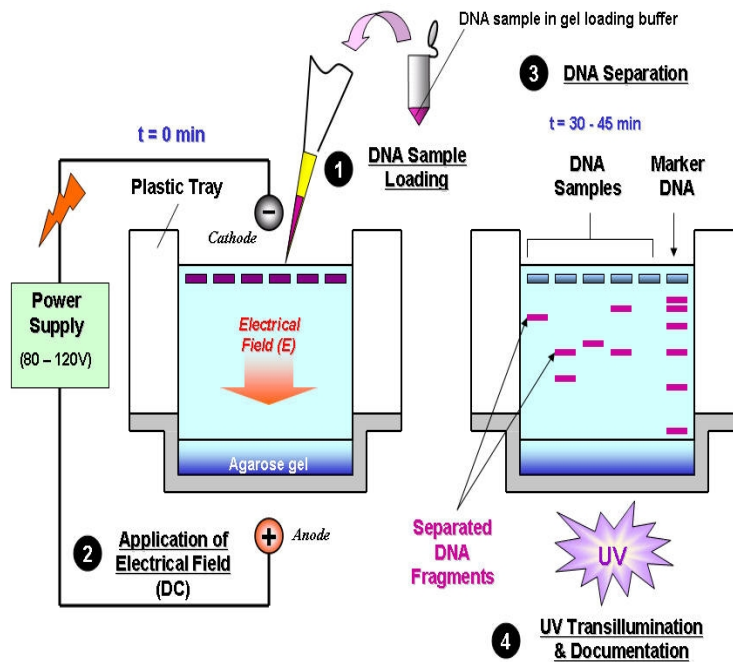
- 95C pour 30 sec (dénaturation d'ADN)
- 55C pour 15 sec (hybridation des amorces)
- 72C pour 1 minute (élongation du second brin par le polymérase)



Le principe de l'amplification par PCR: doublement de la séquence ciblée après chaque cycle

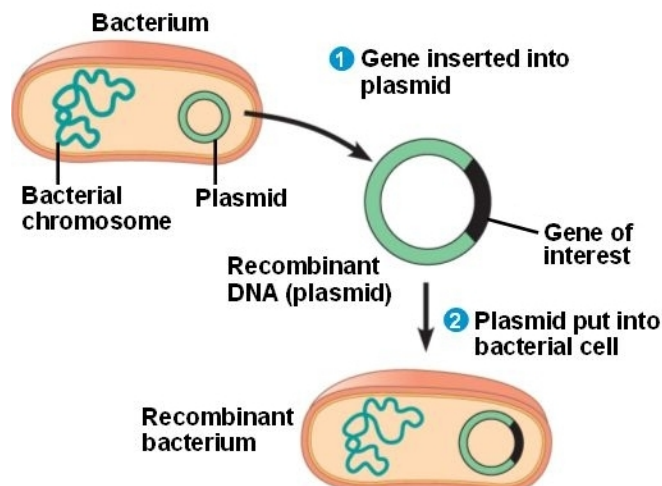


**Electrophorèse d'ADN sur gel:** séparation des molécules d'ADN par taille. Molécules d'ADN (charge négative) sont séparés dans une matrice d'agarose par l'application d'électricité. Molécules plus courtes migrent plus facilement et plus loin dans le gel.



Graphic©ESchmid/2001

**Clonage des gènes:** 'Clonage' veut dire la production des nombreuses copies de la même chose. Le clonage des gènes décrit le processus d'insérer un gène dans un plasmide a fin de produire beaucoup de copies dans une cellule vivante. Une fois que le gene est dans la cellule, le gène s'exprime pour produire la proteine qui est codé par le gène.



### Etapes de clonage de gènes

- 1 Amplification du gène par PCR
- 2 Insertion du gène dans un plasmide
- 3 Transformation (insertion) du plasmide dans une cellule vivante (plus souvent *E. coli*)

**Clonage par enzymes de restriction:** Insertion d'une séquence d'ADN dans un plasmide grace aux enzymes de restriction.

Une enzymes de restriction est une enzyme qui coupe l'ADN à une séquence spécifique (souvent 6 bp). Si un produit de PCR (en jaune ci-dessous) et un plasmide sont coupé par les memes enzymes, on peut coller les 2 molécules avec l'enzyme DNA ligase.

