

## BIOLOGIE MOLECULAIRE DIGESTION ADN ET ELECTROPHORESE

### Digestion et électrophorèse du plasmide pBR 322

#### INTRODUCTION

Le clonage moléculaire est une technique permettant d'insérer un gène dans un plasmide. Ce plasmide sera ensuite intégré dans une bactérie afin que celle-ci produise en grande quantité la protéine désirée.

Cette technique nécessite cependant de bien connaître le plasmide avec lequel on travaille.

Vous serez donc chargé de vérifier l'intégrité du plasmide pBR322 qui sera utilisé en clonage moléculaire.

#### OBJECTIFS DU TP

		NA	EA	A
<b>Objectifs</b>	- Réaliser une digestion enzymatique.			
	- Prévoir la taille des produits de digestion.			
	- Mettre en œuvre une procédure d'électrophorèse d'ADN en gel d'agarose en tenant compte des points critiques.			

#### QUESTIONS PRELIMINAIRES

1. Utiliser le logiciel NebCutter pour réaliser une digestion virtuelle du plasmide pBR322 avec les enzymes EcoRI, BamHI et Pst I.
2. Déterminer la taille des produits de digestion.
3. A l'aide de la fiche technique, réaliser un organigramme présentant la réalisation d'une électrophorèse d'ADN en gel d'agarose.
4. Identifier les points critiques.
5. Quel est l'utilité d'un marqueur de taille ?
- 6.
7. Effectuer une analyse des risques encourus par cette activité expérimentale et préciser les mesures de prévention à appliquer.

#### MODE OPERATOIRE

1. Réaliser une digestion du plasmide pBR322 avec les enzymes de restriction EcoRI, BamHI et PstI :
  - Prélever 3µL de plasmide
  - Ajouter un microlitre de chaque enzyme
  - Ajouter 2 microlitres de tampon de restriction
  - QSP à 20 microlitres avec de l'eau BM
  - Incuber 1 heure à 37 °C
2. Utiliser le document 1 pour préparer un gel d'agarose à 1%.
3. Réaliser une électrophorèse des produits de digestion selon le protocole fourni (fiche technique).

1. Annoter l'électrophorégramme en donnant le titre, le sens de migration, la légende des puits et les conditions de migration.
2. Analyser l'électrophorégramme et conclure.