

I. Composante pratique: (4 points)

Vous avez les trois solutions suivantes et un solvant (l'eau):

A: 2.25M Tris-HCl

B: 1.2mg/mL Albumine sérique bovine

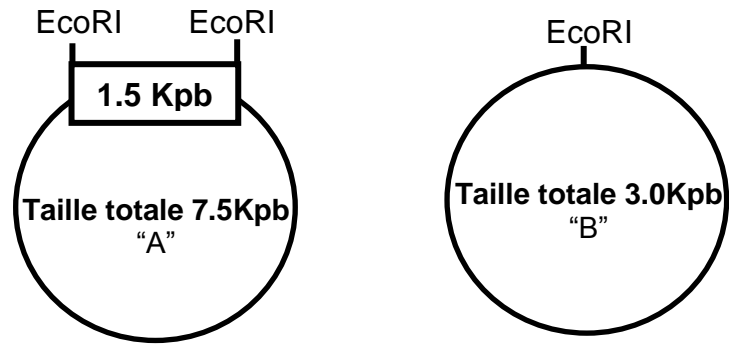
C: 6% (m/v) Bleu de coomassie

Initialement ajouter le volume approprié de 2.25M Tris-HCl à 700 μ L d'eau afin d'obtenir une concentration finale de 150mM Tris-HCL. À cette solution (150mM Tris-HCL) ajouter les volumes requis d'albumine sérique bovine et de bleu de coomassie afin d'obtenir les concentrations finales suivantes: 24 μ g/mL d'albumine sérique bovine et 0.3% (m/v) bleu de coomassie. (**Notez : arrondir tous les volumes au chiffre entier le plus proche. Ex. 12.5 = 13.0**)

II. Calculs: (Indiquer vos réponses à deux chiffres après la décimale; 16 points)

1. Quelle masse d'eau est contenue dans 160 grammes d'une solution de 22.0% (m/v) KCl (Densité de la solution: 1.1 g/mL)?
2. La densité d'une solution de sulfate d'ammonium de 7.50% (m/m), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, est 1.04 g/mL. Quelle masse de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ serait requise pour préparer 750 mL de cette solution?
3. Vous désirez préparer 1.2L d'une solution de NaCl (10% m/v) à partir d'une solution mère de 12% (m/v). Quels volumes d'eau et de la solution mère de NaCl sont requis pour préparer la solution désirée?
4. Vous ajoutez 1mL d'eau à 5mL d'une solution de gentamicine de 0.30% (m/v). Quelle est la concentration en g/L de la solution diluée?
5. 250 μ L d'une solution d'ADN de concentration inconnue sont ajoutés à 100 μ L qui contient 50 μ g d'ADN et 150 μ L d'eau. La concentration d'ADN résultante dans la solution finale était 0.11 μ g/ μ L. Quelle devait être l'absorbance à 260nm de la solution d'ADN de concentration inconnue?
6. Une solution est préparée en mélangeant 100 mL de 2M NaCl, 100 mL de 1M CaCl_2 et 650 mL d'eau. Quel est le rapport molaire de Ca:Cl:Na dans la solution finale?
7. 150mL de solvant est retiré par évaporation de 750 mL d'une solution de chlorure de sodium de 0.50 M. Quel volume d'eau doit être ajouté à la solution évaporée afin d'obtenir une concentration finale de NaCl de 0.25 M?

8. Vous avez deux préparations de plasmides "A" et "B" (illustrés ci-dessous) chacune à une concentration de 100ng/μL. Vous désirez sous-cloner un fragment *EcoRI* de 1.5 Kpb à partir du plasmide "A" dans le site *EcoRI* unique du vecteur "B" de 3.0Kpb.



Compléter le tableau suivant afin d'indiquer les volumes de chacun des ingrédients requis pour la préparation d'un mélange de ligation de 50μL qui contient 50ng du vecteur et une quantité du plasmide A digéré requise pour avoir un rapport d'insertion au vecteur de 3 : 1.

Ingrédient	Volume (μL)
Plasmide "A" digéré avec <i>EcoRI</i>	
50ng du plasmide "B" digéré avec <i>EcoRI</i>	
Tampon de ligation 5X	10
Ligase d'ADN de T4	1
Eau	

III. Bio-informatique (1.0 point/question)

1. Quelle est la chance que le gène identifié par Blast en utilisant la séquence de requête suivante représente un faux positif?

GCTGATTGTTTGATCCCGATTGAACAAAAGCTGCCGTAGGCATTTTGGGCTCTCGATTGAATCC
AAGTTCCCAACCCATTTTCCAAAAAGTTTGAAAACGTCTCGGGAACCTGGACTT

2. Combien de sites de restriction *AluI* et *HpaII* est-ce qu'il y a dans la séquence avec le numéro d'accèsion FJ230967?
3. Quelles **deux** des amorces suivantes permettraient l'amplification d'au moins 200pb de la séquence avec le numéro d'accèsion FJ230967? Quelle serait la taille de l'amplicon?

(a) **GAATTCGACGTTCCGGACAGCGTGAC**

(b) **TACAGGGTGGAGCAAGCTTGGCAGG**

(c) **TAGCCGAACCTGCCAAGCTTGCTAG**

(d) **AACCCATAGCCGAACCTGCCAAGCT**

4. Une paire d'amorces a été utilisée pour amplifier la séquence complète avec le numéro d'accèsion FJ230967. L'amorce "forward" inclut un site de restriction *XbaI* et l'amorce "reverse" inclut un site de restriction *SmaI*. L'amplicon digéré avec *XbaI-SmaI* a ensuite été clone dans pUC19 digéré avec *XbaI* et *SmaI*. Des fragments de quelles tailles seraient attendus après une digestion complète du plasmide recombinant avec *HindIII*?
5. Obtenir le complément inverse de la séquence qui correspond au numéro d'accèsion FJ230967. Obtenir le complément de la séquence résultante. Maintenant, obtenir l'inverse de la dernière séquence obtenue. Indiquer les premières six bases de la séquence finale.

IV. Théorie (1.0 point/question)

1. Vous désirez amplifier une partie de la séquence simple brin suivante en utilisant les amorces indiquées ci-dessous. Combien de copies de l'amplicon double brin, délimité par les séquences des amorces, auriez-vous après 10 cycles si vous commencez avec 100 copies de la matrice originale?

5'-TCGTTTGGAAAACGTTAATATCATCATTTGGCATGACGATTGCAGGATACTTTCAGCCA-3'

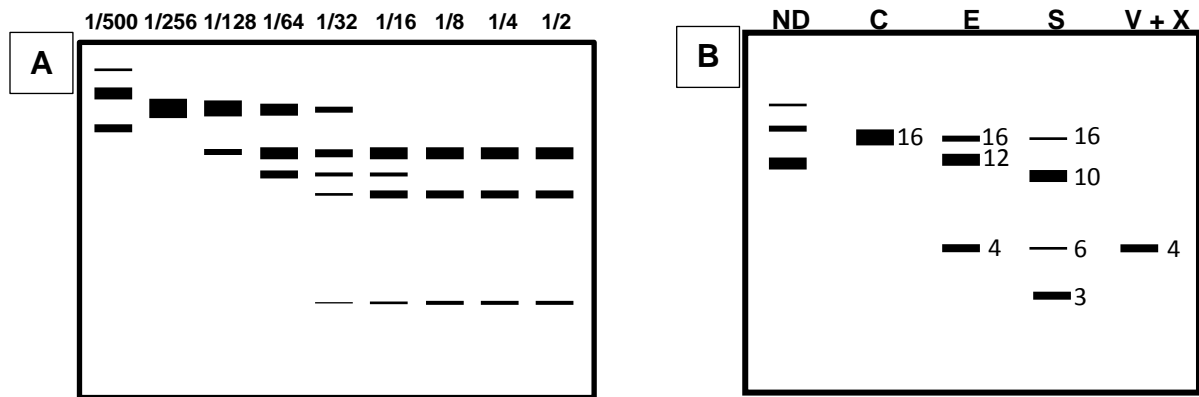
Amorces: 5'-TCGTTTGGAAAACG-3' et 5'-ATCCTGCAATCGTC-3'

- (a) 102400 copies
(b) 51200 copies
(c) 25600 copies
(d) 12800 copies
2. TBLASTn vous permet de faire une recherche d'une...?
- (a) Une base de données de protéines avec une requête nucléotidique traduite.
(b) Une base de données de nucléotides traduits avec une requête protéique.
(c) Une base de données de nucléotides traduits avec une requête nucléotidique.
(d) Une base de données de protéines avec une requête protéique.
3. Complétez les blancs dans la séquence suivante afin de générer un palindrome qui représente un site de restriction potentiel. (Notez: chaque blanc représente un seul nucléotide)
- 5' T___CT___GT ___
4. L'enzyme *Frall* clive les palindromes de la séquence Y[▼]NATNR. Combien de différents palindromes sont clivés par *Frall*? (Y= T ou C, R = A ou G)
5. La vitesse à laquelle l'ADN migre au travers d'un gel d'agarose est déterminée par:
- (a) La taille moléculaire de l'ADN et la concentration d'agarose.
(b) La conformation de l'ADN et le voltage appliqué.
(c) La longueur du gel d'agarose et la négativité de l'ADN.
(d) A et B
(e) A et C

V. Problèmes: Répondre à 2 des 3 problèmes suivants (5 points/problème)

1. **Panneau A: Calibration d'une nouvelle enzyme de restriction: *Bral*.** L'activité de restriction d'une préparation de l'enzyme *Bral* a été évaluée avec des mélanges réactionnels qui contenaient 1µg d'un plasmide d'ADN et 1µL de dilutions en séries de facteurs 2 de la préparation enzymatique. Toutes les réactions ont été incubées pour une durée d'une heure sous les conditions appropriées puis séparées sur un gel.

Panneau B: Analyse de restriction d'un plasmide recombinant. La première voie représente le plasmide recombinant non digéré (ND). Les voies 2-4 représentent le plasmide recombinant digéré avec *ClaI* (C), *EcoRV* (E) et *SphI* (S) respectivement. La dernière voie représente le vecteur seulement digéré avec *XbaI*. Les tailles des fragments en kilopaires de base sont indiquées à côté de chaque bande.



- (a) D'après les résultats du panneau A, quelle est la concentration de l'enzyme *Bral* dans la préparation non diluée en unités/µL?
- (b) D'après le panneau B, le plasmide recombinant possède une insertion d'ADN d'une taille de ____ Kpb insérée dans le site de restriction _____ du vecteur.
- (c) D'après le panneau B, quelles tailles de fragments représentent des produits intermédiaires résultants d'une digestion partielle?
- (d) Combien de site demeurent à être digérés dans les produits intermédiaires identifiés en (c)? Indiquer les tailles des produits intermédiaires et le nombre de coupures qui demeurent à être digéré en parenthèses. (ex. 7Kb (3))
- (e) Combien de fois est-ce que *EcoRV* coupe le fragment *ClaI*?

2. Vous avez cloné votre gène favori, TGIF, dans un plasmide pNIM circulaire bactérien. Vous identifiez deux recombinants qui possèdent le gène TGIF inséré dans PNIM, plasmides X et Y. Vous digérez les trois plasmides (pNIM, plasmide X et plasmide Y) avec *EcoRI*, *BamHI*, ou les deux enzymes de restriction ensemble. Toutes les digestions étaient complètes et ont donné les résultats suivants:

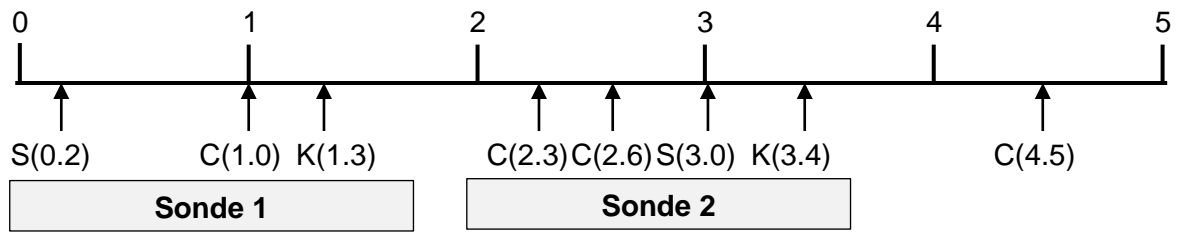
pNIM			Plasmide X			Plasmide Y		
EcoRI	BamHI	les deux	EcoRI	BamHI	both	EcoRI	BamHI	les deux
7.0 kb	4.0 kb	4.0 kb	7.0 kb	4.0 kb	4.0 kb	7.0 kb	4.0 kb	4.0 kb
	3.0 kb	2.0 kb	1.0 kb	2.8 kb	2.0 kb	1.0 kb	2.2 kb	2.0 kb
		1.0 kb		1.2 kb	1.0 kb		1.8 kb	1.0 kb
					0.8 kb			0.8 kb
					0.2 kb			0.2 kb

- (a) Sur les gabarits fournis, dessiner des cartes de restriction possibles de plasmides X et Y qui sont en accord avec les résultats présentés. Vos cartes doivent indiquer lequel des sites de restrictions sont dans le vecteur (ligne fine) et les sites de restriction qui sont dans l'insertion (trait plus épais) ainsi que les distances relatives entre les sites de restrictions. Sous les gabarits, indiquez la taille de l'insertion et le site d'insertion dans le vecteur.
- (b) Un fragment linéaire d'ADN a été digéré avec des enzymes A, B et C. Le tableau suivant indique les tailles des fragments obtenus après des digestions complètes.

Enzymes	Tailles des fragments (Kpb)
A	11, 6, et 5
B	14 et 8
C	16 et 6
A + B	8, 6, 5, et 3
A + C	11, 5, et 1
B + C	8 et 6

Dessinez une carte de restriction sur le gabarit fourni qui serait en accord avec le patron de fragments obtenue. Indiquer la distance relative entre chacun des sites de restriction. Notez que la position du site de restriction C est indiquée.

3. Vous cloné et séquencé un gène de 5 Kpb obtenu à partir du génome du poisson-zèbre. Une analyse avec NEB cutter a généré la carte suivante:



Les lettres S, C et K représentent les sites de restriction *SpeI*, *ClaI* et *KpnI*, respectivement, et les chiffres entre parenthèses représentent les positions sur la carte à partir de l'origine en Kpb.

- (a) Pour vérifier la carte générée par informatique, vous isolé l'ADN génomique du poisson-zèbre, effectuer des digestions de restriction, séparée sur un gel, et ensuite faite une hybridation du gel avec les deux sondes indiquées ci-dessus. Les tailles des bandes observées sur l'hybridation Southern sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Enzyme	Sonde 1	Sonde 2
<i>ClaI</i>	1.3 et 6	1.3 et 2.2
<i>KpnI</i>	2.1	2.1 et 8.0
<i>SpeI</i>	5.2	8.0

Ces résultats indiquent que la carte générée par informatique est erronée. Quel (s) site (s) de restriction sur la carte informatique est (sont) erroné (s)? Indiquez le (les) site (s) et sa (ses) position (s) entre parenthèses.

- (b) La (les) bande (s) de quelle (s) taille (s) observée (s) sur le Southern était (ent) inattendue (s)?
- (c) Pour confirmer l'erreur, vous souhaitez répéter l'hybridation Southern sur une digestion double de l'ADN génomique. Une digestion double avec quelles enzymes permettrait de confirmer l'erreur? Indiquez la sonde qui serait utilisée et la (les) taille (s) de bande attendue (s) si le (les) site (s) est (sont) vraiment erroné (s).