

## Le génome et son expression

### 1. Réplication et transcription de l'ADN (25 points)

#### 1.1. La réplication (9 points)

En s'aidant d'un schéma commenté, résumer la succession des événements marquant la croissance des molécules d'ADN à la fourche de réplication : préciser en particulier le nom des enzymes impliquées ainsi que leurs rôles respectifs.

Décrire la finition des brins d'un chromosome bactérien et celle d'un chromosome eucaryote.

#### 1.2. La transcription (11 points)

##### a) Initiation de la transcription

Nommer en précisant leurs rôles, tous les facteurs nécessaires pour cette étape. Décrire la structure d'un et le rôle d'un promoteur et du terminateur. Définir brin sens et antisens.

##### b) Régulation de la transcription

Chez les bactéries, la régulation transcriptionnelle est particulièrement efficace en raison de la brièveté de la demi vie de l'ARNm : l'opéron lactose est un exemple de ce type de contrôle.

Définir : opéron, monocistronique, polycistronique, induction, répression catabolique.

En s'aidant du document n°1 décrire :

- comment la cellule annule la répression en présence de lactose ?
- comment la levée de la répression ne peut s'annuler en présence de glucose et malgré la présence de lactose ?

#### 1.3. Expression des gènes (5 points)

Le brin antisens d'un segment d'ADN bicaténaire contient la séquence :

AGCCTACTAGGTTAGCATGCATGC

a) Quelle séquence d'ARNm donne la transcription de ce brin ?

b) A l'aide du document n°2, écrire la séquence peptidique codée par le transcrit obtenu en a)

### 2. Diagnostic bactérien par PCR (25 points)

Le document n°3 présente une méthode alternative de détection de *Vibrio cholerae* dans l'eau et les aliments lors d'épidémie. L'intérêt majeur est le gain de temps fondamental par rapport aux méthodes classiques afin de mettre en place rapidement un traitement efficace auprès des populations atteintes.

2.1. Quelle séquence amplifie – t – on afin de réaliser ce diagnostic ? Justifier la réponse. Préciser la taille de la séquence recherchée.

2.2. Réaliser un organigramme simplifié des différentes phases de cette recherche. Préciser les témoins nécessaires à la validation de la méthode.

#### 2.3. Préparation de la PCR (12 points)

a) Définir cet acronyme.

b) Rappeler les grandes étapes d'une PCR. Expliquer comment on amplifie spécifiquement la séquence d'intérêt en fin de processus.

c) A partir du document, dégager quelques précautions techniques nécessaires au bon déroulement de l'amplification.

#### 3.4. Analyse pratique (6 points)

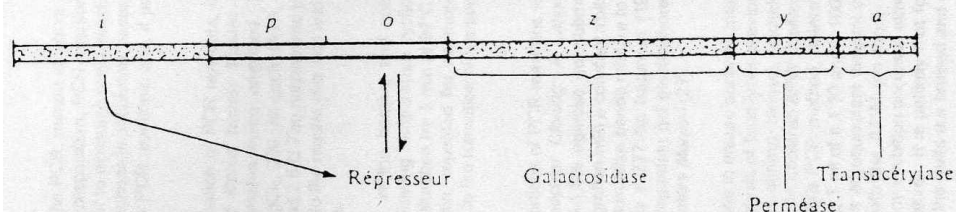
a) On peut estimer le  $T_m$  d'une amorce par la relation suivante :  $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{C}+\text{G})$

Calculer pour chaque amorce son  $T_m$ . Que représente cette valeur ? Justifier alors la température d'hybridation (primer annealing) utilisée dans le programme du thermocycleur.

b) A l'aide des données fournies dans le document n°3 :

- calculer les volumes des différents composants d'un tube de PCR pour un volume final de 100  $\mu\text{L}$ ,
- calculer la quantité d'Agarose, de tampon TBE et de BET afin de préparer un gel de 150 mL à 1,5 % pour analyser les produits de PCR.

## Document n°1



Opéron lactose d'*E. coli*. Abréviations : *i*=gène du répresseur; *p*=promoteur; *o*=opérateur; *z*=gène de la β-galactosidase; *y*=gène de la perméase; *a*=gène de la transacétylase. Le produit du gène *i* est le répresseur.

## Document n°2

### Code génétique : correspondance codons-acides aminés

Position 1	Position 2				Position 3
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	(TC)*	(TC)*	A
	Leu	Ser	(TC)*	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	<u>Leu</u>	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	<u>Ser</u>	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met(IC)**	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	<u>Gly</u>	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val(IC)**	Ala	Glu	Gly	G

\* TC = terminaison de chaîne

\*\* IC = initiation de chaîne





C. Procedure for amplification of cholera toxin gene sequences from *V. cholerae* using APW enrichment broth

Food sample preparation and APW enrichment.

**APW enrichment lysate preparation.** Prepare APW washes or blends. Sample and freeze **immediately** (about 1 ml). After enrichment (6-24 h), prepare crude APW lysates for PCR by boiling 1 ml samples in 1.5 ml microcentrifuge tubes for approximately 5 min. Lysates may be used for PCR immediately or stored in a -20°C freezer until use.

**NOTE:** Due to the enormous amplification possible with the PCR, minute levels of contamination can result in false positives. It is recommended that sample preparation, PCR reaction set-up, and PCR product analysis be physically separated from one another to minimize contamination. Minimally, use of aseptic technique in handling all PCR reagents and solutions is absolutely necessary. Use aerosol-resistant pipet tips for preparing samples and reagents for PCR reactions, and, if possible, a separate set of pipettors for analysis of PCR reaction products.

**PCR reaction preparation.** To minimize cross contamination of PCR reagents, it is recommended that master mix solutions be prepared, aliquoted, and stored frozen. Master mixes contain all necessary reagents except *Taq* polymerase and the lysates being amplified. The final reaction contains 10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM each dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; 2 to 5% (v/v) APW lysate; 0.5 μM of each primer and 2.5 U *Taq* polymerase per 100 μl; reaction volumes of 25-100 μl may be used. Add *Taq* polymerase to the master mix and add APW lysate upon distribution to 0.6 ml microcentrifuge tube reaction vessels.

**Temperature cycling.** While there is some variability in the heating and cooling dynamics of thermocyclers from different manufacturers, use of the following temperature cycling regimen should yield efficient amplification of the *ctx* gene fragment: Denaturation for 1 min at 94°C, primer annealing for 1 min at 55°C, and primer extension 72°C for 1 min, repeated for no more than 35 cycles. Increasing the cycle number beyond 35 cycles often leads to the formation of nonspecific amplification products, including primer dimers.

**Agarose gel analysis of PCR products.** Mix 10-20 μl portions of PCR reactions with 6X gel loading buffer (choose one of four common buffers from *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* by Sambrook et al. (27) and load into sample wells of 1.5-1.8% agarose gel submerged in 1X TBE containing 1 μg/ml ethidium bromide. After appropriate migration with a constant voltage of 5-10 V/cm, illuminate the agarose gel with a UV transilluminator and visualize bands relative to molecular weight marker migration. The primers listed above give rise to a 777 bp fragment (19). Take Polaroid photographs of gels to document results. Further details regarding gel electrophoresis analyses may be found in the above-mentioned *Molecular Cloning Laboratory Manual* (27).

**Proper controls.** The need for a number of control reactions to ensure accurate interpretation of PCR results cannot be overemphasized. Minimally, for PCR analysis of food types previously optimized for this method (e.g., vegetable washes, oyster, crab and shrimp blends), include a master mix contamination control containing no lysate and a toxigenic *V. cholerae* APW positive control in **every** analysis. For every **new** food blend to be analyzed by this PCR method, determine the potential inhibitory effects of that food. Minimally, this entails spiking 1 ml of a 1:10 and 1:100 APW food blend **post-enrichment** with about 5 x 10<sup>6</sup> organisms per ml (or an equivalent amount of positive control lysate). A direct comparison of these spiked samples with the APW (no food) lysate containing identical numbers of *ctx*<sup>+</sup> cells, allows one to determine if any inhibition occurs at either of the two food concentrations and prevents the occurrence of false negatives. It is unlikely that food washes (e.g., fruits and vegetables) will inhibit the PCR reaction unless the fruits are bruised and washing releases excessive acidity to the APW wash.

For additional information on this PCR method, contact Walter H. Koch at FDA, CFSAN, Division of Molecular Biological Research and Evaluation, 200 C St., S.W., Washington, DC 20204. Telephone: (202) 205-4172 or (202) 205-5060; FAX: 205-4183; E-Mail: WHK@VAX8.CFSAN.FDA.GOV.