

Production d'une enzyme capable de participer à la production de biocarburant de 2^o génération

Présentation de l'activité

Nous avons identifié le gène codant pour une enzyme (une cellulase appartenant à la bactérie *Pseudomonas stutzeri*) utile dans la fabrication de biocarburant de 2^o génération. Nous voulons maintenant faire produire cette enzyme en grande quantité par une bactérie dont la culture est facile : *E.coli*. Nous devons passer par 2 étapes :

Étape 1 : Faire pénétrer le gène de la cellulase dans un vecteur de clonage (ici un plasmide) et vérifier que l'insertion a bien eu lieu.

Étape 2 : Faire pénétrer le plasmide dans la bactérie *E. coli* puis vérifier que la bactérie *E.coli* a bien intégré le plasmide.

1) Faire pénétrer le gène de la cellulase dans un vecteur de clonage

1.1) choisir le vecteur de clonage

Le vecteur de clonage est le plasmide p-Caln (document 1).

Q1. A partir de l'analyse conjointe des documents 1 et 2 et de l'animation « les vecteurs de clonage », déterminer les rôles des séquences suivantes du plasmide p-Caln :

ori	LacO	LacI	Ampicillin
-----	------	------	------------



Retour au laboratoire : On extrait l'ADN de la bactérie *Pseudomonas stutzeri* et on récupère une séquence nucléotidique dans laquelle se trouve le gène de la cellulase.

1.2) Insertion du gène dans le vecteur de clonage

Nous disposons du gène de la cellulase et du vecteur de clonage : le plasmide p-Caln. Comment insérer le gène dans le plasmide ? On doit dans un premier temps ouvrir le plasmide.



Cette étape fait intervenir une enzyme de restriction (cf. document 4).

TRAAM

T1. Ouvrir le fichier « p-Caln.txt » qui contient la séquence nucléotidique du plasmide p-Caln. Identifier les sites de restriction présents à l'aide du logiciel SMS (fiche technique 1).

Il va falloir choisir avec quelle enzyme de restriction couper le plasmide.

Q2. Cocher les bonnes réponses parmi la liste de propositions suivantes :

L'enzyme de restriction choisie pour découper le gène de la cellulase :

<input type="checkbox"/>	Doit couper 1 fois au milieu de gène
<input type="checkbox"/>	Doit couper 2 fois : 1 fois à chaque extrémité du gène
<input type="checkbox"/>	Doit couper 2 fois : peu importe à quels endroits

L'enzyme de restriction choisie pour découper le plasmide :

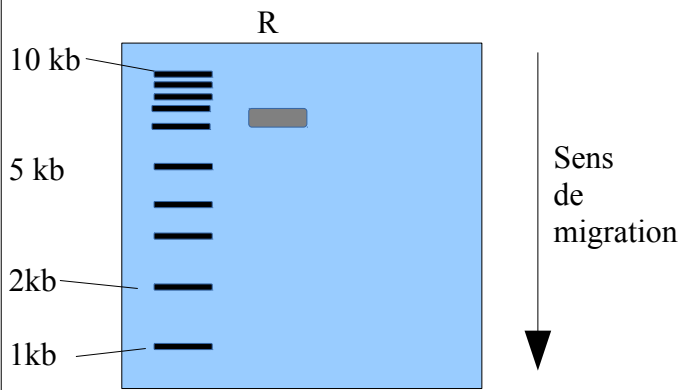
<input type="checkbox"/>	Doit couper le plasmide 1 fois au niveau du MCS
<input type="checkbox"/>	Doit couper le plasmide 2 fois
<input type="checkbox"/>	Peu importe

Pour faciliter l'insertion du gène de la cellulase dans le plasmide, l'enzyme de restriction choisie :

<input type="checkbox"/>	Peut être différente pour le plasmide et pour le gène
<input type="checkbox"/>	Doit être la même pour le plasmide et le gène + laisser des extrémités collantes
<input type="checkbox"/>	Doit être la même pour le plasmide et le gène + laisser des extrémités franches
<input type="checkbox"/>	Peu importe

T2. A partir de l'analyse du résultat de la T1, vérifier que l'enzyme EcoRI correspond bien aux critères définis ci-dessus. Vous penserez à vérifier (avec le logiciel SMS) que EcoRI ne coupe pas le gène de la cellulase (fichier « gene_cellulase.txt ») en son milieu.

Retour au laboratoire : On fait agir EcoRI pour découper le gène de la cellulase puis le plasmide. On les mets ensemble dans des conditions favorables à l'association des deux. On dépose le résultat (R) sur un gel d'agarose afin de réaliser une électrophorèse. Un marqueur de taille est déposé en parallèle.



Q3. A l'aide de vos précédentes recherches et des informations apportées par le dossier technique, déterminer la taille du gène de la cellulase et du plasmide puis démontrer que l'insertion du gène dans le plasmide a bien eu lieu dans le résultat R.

2) Faire pénétrer le plasmide dans la bactérie E.coli

On souhaite faire pénétrer le plasmide (dans lequel est maintenant inséré le gène de la cellulase) dans la bactérie E. coli.

Retour au laboratoire : Une suspension de E.coli est mise en présence d'une solution de plasmide. Grâce à un choc thermique, on déstabilise la membrane bactérienne, ce qui permet à un certain nombre de plasmides de pénétrer dans des bactéries.

On doit alors distinguer les bactéries ayant intégré le plasmide de celles qui ne l'ont pas. Le document 5 présente la composition d'un milieu de culture qui permet la croissance de E.coli.

Q4. A l'aide de l'analyse des documents 1 et 5, déterminer l'élément qu'il faut ajouter au bouillon nutritif pour ne permettre que la croissance des bactéries qui ont intégré le plasmide. Visionner à nouveau l'animation « les vecteurs de clonage » si nécessaire.

Q5. Toujours à l'aide de l'analyse des documents 1 et 5, déterminer l'élément qu'il faut rajouter dans le milieu pour que la bactérie synthétise la cellulase.