

SESSION 2015

**CAPET
CONCOURS EXTERNE
ET CAFEP**

**Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE**

SECONDE ÉPREUVE

Durée : 5 heures

Le dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Dans le cas où un(e) candidat(e) repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il (elle) le signale très lisiblement sur sa copie, propose la correction et poursuit l'épreuve en conséquence.

De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, il vous est demandé de la (ou les) mentionner explicitement.

NB : La copie que vous rendrez ne devra, conformément au principe d'anonymat, comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé comporte notamment la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de signer ou de l'identifier.

Tournez la page S.V.P.

LA RECHERCHE ET LA PRODUCTION D'ADN POLYMERASES PERFORMANTES

Les polymérases thermorésistantes sont d'usage courant dans les laboratoires d'analyses et de recherche. L'utilisation de ces enzymes requiert le contrôle de nombreux paramètres pour assurer la qualité des résultats obtenus. Parmi ces paramètres, l'efficacité de la réplication est l'un des plus importants.

Dans une première partie, en vous appuyant sur les documents fournis, vous exposerez les stratégies développées pour trouver, produire et caractériser des ADN polymérases efficaces. Vous vous attacherez notamment à présenter les principales technologies utilisées.

Dans une seconde partie, dans le cadre d'un enseignement de biotechnologies en classe de terminale STL vous présenterez une démarche pédagogique sur les applications des outils de biologie moléculaire. Vous utiliserez, tout ou partie des documents présentés en justifiant vos choix. Vous construirez un ou des supports utiles au travail avec les élèves.

Extrait du Bulletin officiel n°8 du 13 octobre 2011

Enseignement de biotechnologies de la série sciences et technologies de laboratoire – classe terminale

Outils essentiels de la biologie moléculaire

| Objectifs de formation et supports théoriques | Compétences transversales et technologiques |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Enzymes : polymérases, enzymes de restriction• Polymérisation des acides nucléiques et amplification en chaîne par polymérisation (ACP ou PCR)• Vecteurs d'amplification ou d'expression <p>Marqueur de sélection, origine de réplication, promoteur, site de clonage multiple, gène rapporteur, gène d'intérêt</p> <p>Seules les notions nécessaires à la compréhension de la technique d'amplification de l'ADN seront abordées (ADN matrice, amorce, enzymes, nucléotides).</p> <p>Le rôle des deux types de vecteurs sera présenté par une comparaison des éléments constitutifs des deux types de vecteurs.</p> | <p>Réaliser une électrophorèse en gel d'agarose</p> <p>Réaliser une amplification d'un fragment d'ADN</p> |

DOCUMENT 1 : Utilisation et mise au point d'ADN polymérase

La technologie de l'ADN recombinant est basée sur l'utilisation d'outils moléculaires capables de couper, réparer, copier, ligaturer des fragments d'ADN *in vitro*. La révolution moléculaire de ces trente dernières années repose sur ces outils et ainsi que celle de la génomique, initialement basée sur le séquençage à haut débit de fragments d'ADN de plus ou moins grande taille. L'apport essentiel des enzymes des thermophiles est lié au problème de l'amplification (ou multiplication) des fragments d'ADN *in vitro* à partir de faibles quantités, incompatibles avec un séquençage direct ou une analyse. L'invention d'une méthode d'amplification de gène *in vitro* par le chimiste Kary Mullis au début des années 80, basée sur une recette simple (prendre des fragments d'ADN, les séparer en chauffant de manière à obtenir des fragments simples brins, et fabriquer leur complémentaire à l'aide d'une ADN polymérase et d'amorces, et recommencer le cycle autant de fois que nécessaire) va fournir une réponse simple et efficace à ce problème. La clé du système réside dans l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, capable de supporter les nombreux cycles de montée en température jusqu'à 94°C, indispensable pour dénaturer l'ADN double brin. Cette enzyme sera d'abord extraite d'une bactérie thermophile isolée par Brock, *Thermus aquaticus*. Elle permettra la généralisation de cette technique. Les limites de l'enzyme et en particulier le nombre d'erreurs faites en copiant le brin matrice ont d'une part, incité à en améliorer les performances par les outils de l'ingénierie protéique et encouragé d'autre part la recherche d'ADN polymérase plus performantes.

L'une des réponses sera fournie en prospectant les propriétés d'un groupe d'archées hyperthermophiles, celui des Thermococcales auquel appartiennent les genres *Pyrococcus* et *Thermococcus* principalement issues des sources hydrothermales. *P. abyssi* et de nombreux *Thermococcus* ont ainsi été isolés de sources hydrothermales profondes et leurs ADN polymérase possèdent une thermostabilité supérieure à celle des *Thermococcus* et surtout, présentent une fidélité de 2 à 10 fois supérieure. Ces enzymes sont en conséquence recommandées pour les applications nécessitant de limiter au maximum la probabilité d'erreurs, comme dans le cas de diagnostic de maladies génétiques.

http://wwz.ifremer.fr/grands_fonds/Les-enjeux/Les-applications/Ressources-biologiques/La-biotechnologie/Les-enzymes Dernière modification le : **Vendredi 24 Février 2012**

La PCR continue à faire l'objet de développements au sein de la recherche académique. Alors que la longueur des séquences amplifiées ne pouvait initialement dépasser 3 à 4 kb, cette limite a par exemple été repoussée en 1994 après les travaux de Wayne Barnes de l'université de Washington Saint Louis. L'ADN polymérase du mélange réactionnel est remplacée par un mélange de deux ADN polymérase thermostables, l'une dénuée d'activité correctrice d'erreurs, et l'autre possédant cette fonction. Le mélange de ces deux polymérase permet d'amplifier des fragments jusqu'à des tailles de 40 kb avec une fidélité médiane entre celles des deux polymérase.

Deux voies sont utilisées par les chercheurs. La biodiversité naturelle des extrêmophiles est toujours considérée comme un gisement non épuisé. En France, l'IFREMER a privilégié jusqu'à présent cette voie avec la constitution d'une collection de quelque deux cent cinquante isolats thermophiles et hyperthermophiles, obtenus au cours de différentes campagnes sur les sources hydrothermales des dorsales médio-océaniques en divers sites du Globe. De cette collection, deux polymérase ont déjà été commercialisées. De plus, la plasticité des ADN polymérase obtenues est exploitée en procédant à des mutations judicieusement réparties. Ces ADN polymérase modifiées peuvent ainsi présenter des thermostabilités différentes, des affinités variables ou des fidélités améliorées.

<http://www.larecherche.fr/savoirs/dossier/biologie-moleculaire-colonisee-enzyme>

DOCUMENT 2 : Purification originelle de la Taq polymérase

A stable deoxyribonucleic acid (DNA) polymerase (EC 2.7.7.7) with a temperature optimum of 80°C has been purified from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. The enzyme is free from phosphomonoesterase, phosphodiesterase, and single-stranded exonuclease activities. Maximal activity of the enzyme requires all four deoxyribonucleotides and activated calf thymus DNA. In this communication the purification and characterization of a thermophilic polymerase will be discussed in relation to what is known about DNA polymerases from mesophilic microorganisms.

Culture medium

Cells were grown in a defined mineral salts medium containing 0,3% glutamic acid (which served as both a carbon and nitrogen source), which was supplemented with biotin and thiamin (0,1 mg/liter each) and nicotinic acid (0,05 mg/liter). The salts included in 1 liter of medium were: nitrilotriacetic acid, 100 mg; CaSO₄ 2H₂O, 60 mg; MgSO₄ 7H₂O, 100 mg; NaCl, 8 mg; KNO₃, 103 mg; NaNO₃, 689 mg; ZnSO₄, 5 mg; H₃BO₃, 5 mg; CuSO₄, 0,16 mg; NaMoO₄ 2H₂O, 0,25 mg; CoCl₂, 0,4 mg; FeCl₃, 0,28 mg; MnSO₄ H₂O, 22 mg; and Na₂HPO₄, 110 mg. The pH of the medium was adjusted to 8,0 with NaOH.

Growth conditions

Cells were grown initially in 500-mL Erlenmeyer flasks at 75°C in a New Brunswick water bath shaker. When the cultures reached a density of approximately 170 Klett units, 1 liter of these cells was transferred to 16-liter carboys, which were placed in hot-air incubators. In place of shaking, sterile air was bubbled through the cultures, and the temperature was maintained at 75°C. The cells were allowed to grow for 20 h before they were collected with a Sharples continuous-flow centrifuge.

DNA polymerase assays

Duplicate DNA polymerase assays were carried out in disposable glass test tubes. The reaction mixture (125 µL) contained: tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-hydrochloride (pH 8,0), 25 mM; 2-mercaptoethanol, 1 mM; MgCl₂, 10 mM; KCl, 25 mM; deoxyadenosine 5'-triphosphate (dATP), deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP), deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP), and ³H-labeled thymidine 5'-triphosphate ([³H]dTTP; specific activity, 38,8 mCi/mmol), each 0,15 mM; and activated calf thymus DNA, 12,5 g. After 30 min of incubation at 80°C in sealed tubes, the assay was stopped by chilling the tubes in an ice bath for a few minutes. Samples of 100 µL were then pipetted onto 25-mm Schleicher and Schuell filter paper disks and immediately dropped into ice-cold 10% trichloroacetic acid containing 0,1 M sodium pyrophosphate for at least 1 h. This was followed by two changes of 5% trichloroacetic acid. The first change contained 0,1 M sodium pyrophosphate. Finally, the disks were run through 30-min washes in etherethanol (1:1 vol/vol), ether-ethanol (3:1 vol/vol), and ether. The disks were air dried, and the amount of [³H]dTTP incorporated into an acid-insoluble product was measured in a Packard scintillation spectrometer with a 5% counting efficiency for ³H under these experimental conditions. One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme that will incorporate 10 nmol of [³H] dTTP into acid-insoluble material at 80°C in 30 min.

TABLE 1. Summary of the purification procedure^a

| Fraction | Vol (ml) | Total polymerase activity (U) | Total protein (mg) | Yield of activity (%) | Sp act (U/mg) | Purification (fold) |
|------------------|----------|-------------------------------|--------------------|-----------------------|---------------|---------------------|
| Crude | 176 | 2,080 | 975.0 | | 2.13 | |
| DEAE-Sephadex | 210 | 4,613 | 197.5 | 221 | 23.3 | 10.9 |
| Phosphocellulose | 132 | 1,900 | 16.0 | 91 | 118.7 | 55.7 |
| DNA-cellulose | 63 | 685 | | 33 | | |

Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*

J. Bacteriol. 1976, 127(3):1550. A Chien, D B Edgar and J M Trela

DOCUMENT 3 : Première utilisation d'une Taq polymérase recombinante

Bacteria and Plasmids

T. aquaticus strain YT-1, was used as a source to isolate the thermostable DNA polymerase gene. *E. coli* strain DH5alpha was used as the host for overexpression of the enzyme. The cloning vector pUC19 was obtained from New England Biolabs.

Construction of the Expression Vector

The cloning of the pTAQ expression vector is similar to that described previously with the use of the more common pUC19 vector in place of the no longer available pTTQ19 expression vector. Briefly, genomic DNA was isolated from *T. aquaticus* and used as a template to amplify the Taq DNA polymerase gene by Polymerase Chain Reaction (PCR).

The amino terminal primer was

5'-CACGAATTCGGGGATGCTGCC-CCTCTTTGAGCCCAAG,

creating a unique underlined EcoRI restriction cut site.

The carboxyl terminal primer was

5'-GTGAGATCTATCACTCCTTGGCGGAGAGCCAGTC

creating the unique underlined BglII restriction cut site. The resulting amplification product was digested with EcoRI and BglII and cloned into pUC19 digested with EcoRI and BamHI. This resulted in a fusion that provides the initiator methionine of the vector, replacing the first two amino acids encoded by the native enzyme (Met-Arg-...) with Met-Asn-Ser. This vector was designated pTAQ and transformed into DH5alpha by Hanahan's method for bacterial transformation.

Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*
Biotechniques 19:780 – 784 (November 1995) Urvi J. Desai and Patrick K Pfaffle »

DOCUMENT 4 : Évaluation de la sensibilité des polymérase à des inhibiteurs

Les analyses de biologie clinique utilisant la PCR sur échantillon brut présentent une baisse de sensibilité et des résultats faux négatifs en raison de la présence d'inhibiteurs dans les échantillons. Les inhibiteurs recensés sont l'hémoglobine/hème, l'ADN leucocytaire, certains IgG ainsi que la plupart des anticoagulants tels l'EDTA, le citrate de sodium et l'héparine. La purification de l'ADN cible est dès lors souvent préconisée avant la PCR. Pour surmonter ces difficultés et simplifier les protocoles, les auteurs ont mis au point un mélange réactionnel (PEC) et ont étudié les résultats de PCR en présence de polymérase mutées : OmniTaq et Omni Klentaq et en présence de polymérase classiques au sein d'échantillons bruts de plasma, sérum et sang total.

Matériel et méthode

ADN génomique : L'ADN est extrait de sang total, plasma, sérum ou surnageant de cultures cellulaires avec un kit d'extraction QIAamp

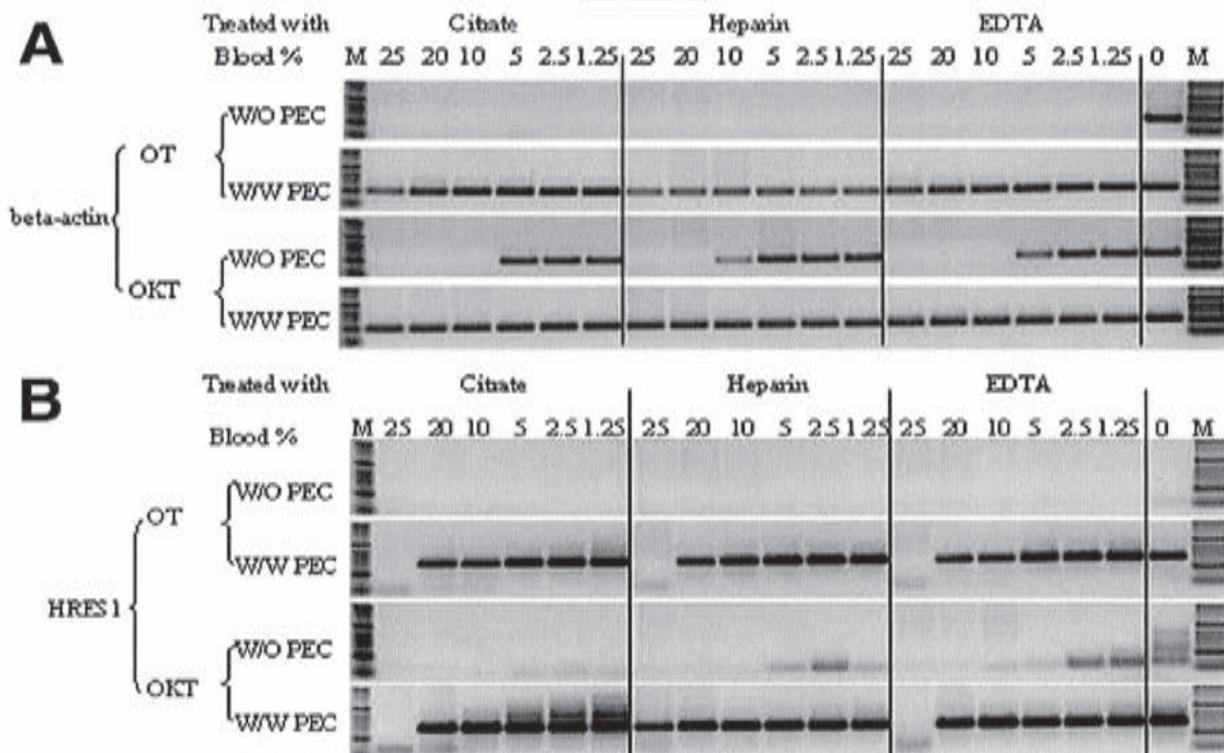
Mélange réactionnel traditionnel : 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3 (OT) ou 9.2 (OKT), 16 mmol/L ammonium sulfate, 0.1% (v/v) Tween20, et 2.5 mmol/L (OT) ou 3.5 mmol/L (OKT) chlorure de magnésium. 2 U de OT ou OKT, 0.2 µmol de chaque amorce, et 200 µmol des dNTP

Mélange réactionnel PEC : milieu traditionnel + L-Carnitine, D-(+) tréhalose anhydre, bétaïne, Nonidet P-40

Echantillons : Les échantillons d'un même donneur de sang (recueillis sur EDTA (4,6 mmol/L), héparine (21,3 U/mL) ou citrate de sodium (0,38%)) ou de sérum ont été aliquotés et conservés à - 70°C. Avant PCR, les échantillons ont été décongelés et homogénéisés.

Taq DNA Polymerases : OmniTaq (OT), Omni Klentaq (OKT), Taq polymérase commerciales : FastStart Taq, HotStarTaqPlus, AmpliTaq Gold, JumpStart Taq, et Taq DNA polymérase.

Résultats



Electrophorèses sur gel d'agarose à 1,5 % :

Deux cibles : Gène de l'actine (A) (300 bp) et gène HRES 1(B) (488 pb) ont été amplifiées à partir de différentes préparations (1,25 à 25 % du volume de PCR total) d'échantillons de sang recueillis sur citrate, héparine ou EDTA par OT ou OKT en absence (W/O) ou en présence (W/W) de PEC. Le contrôle positif contenait 4 ng d'ADN (0).

Traduit et adapté d'après *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 5

Milko B. Kermekchiev¹, Lyubka I. Kirilova, Erika E. Vail and Wayne M. Barnes

DOCUMENT 5 : Performances lors de la PCR de Tag polymerases modifiées

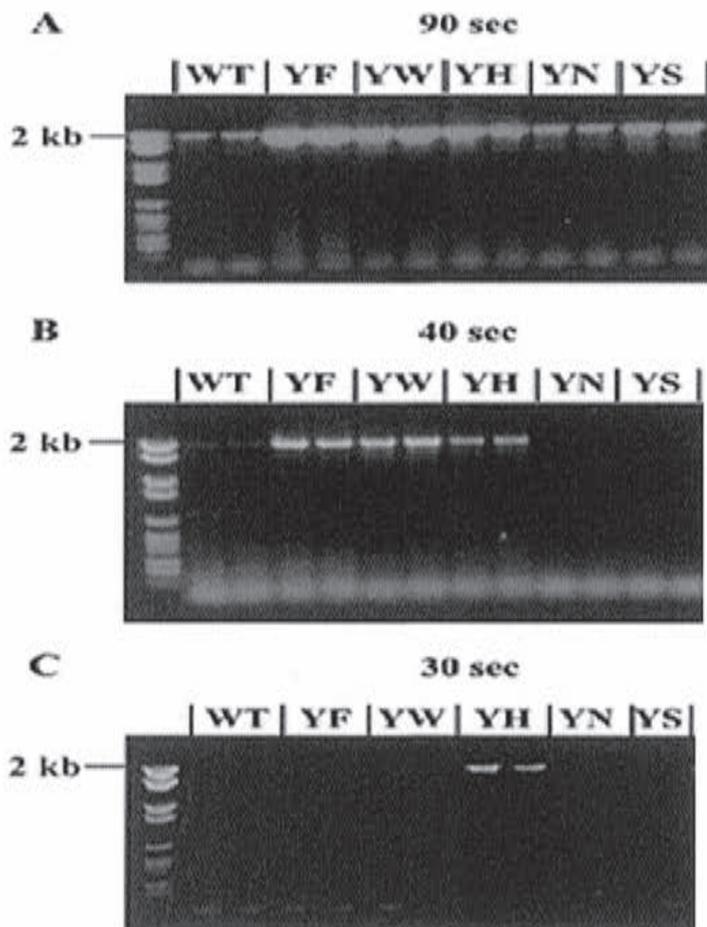
Cette étude porte sur les effets de mutations de l'ADN polymérase de type B de *Thermococcus aggregans*, une archaebactérie. Cette polymérase « Tag pol » a deux activités catalytiques ; une activité polymérase et une activité exonucléase, sa température optimale est de 80°C et elle peut réaliser la PCR.

5 mutations ciblées sur la tyrosine 387 ont été réalisées (« YF » Tyr387 → Phe, « YW » Tyr387 → Trp, « YH » Tyr387 → His, « YN » Tyr387 → Asn et « YS » Tyr387 → Ser)

Toutes les enzymes issues de mutations ont la même solubilité, le même comportement en chromatographie que la Tag polymérase sauvage (« WT »), ce qui indique que les mutations n'entraînent pas de modifications structurales majeures.

Efficacité de la PCR

Une cible de 2 kb est amplifiée en réduisant progressivement le temps d'élongation, les autres paramètres restant constants.



| | K_M pour dNTP (μM) | K_M pour ADN (nM) | v_{max} (fmol dCTP/s) |
|--------|-----------------------------|---------------------|-------------------------|
| Tag WT | 0,3 | 3,5 | 0,11 |
| Tag YF | 0,2 | 5,5 | 0,19 |
| Tag YS | 0,56 | 2,6 | 0,02 |
| Tag YH | 0,22 | 5,3 | 0,24 |

Fidélité

La fidélité des Tag polymérases est évaluée selon le procédé décrit par Frey et Suppmann. Elle est exprimée par comparaison à celle de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* ($f = 1,3 \cdot 10^{-5}$)

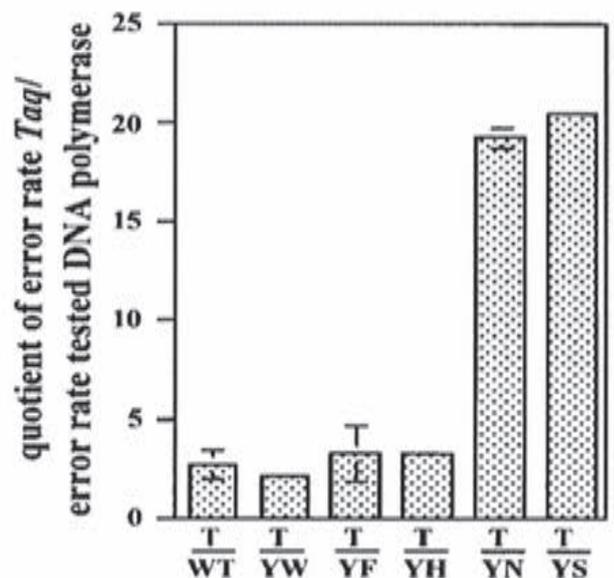
Le quotient est donné par l'équation suivante :

$$\frac{\text{Taux d'erreur de l'enzyme testée}}{\text{Taux erreur de la taq}}$$

Taux d'erreur de l'enzyme testée

adapté d'après PCR performance of the B-type DNA polymerase from the thermophilic euryarchaeon *Thermococcus aggregans* improved by mutations in the Y-GG/A motif.

Nucleic Acids Research, 2000, Vol.28



DOCUMENT 6a : Evaluation de la fidélité de polymérase thermostables

L'ensemble des documents 6 présente la méthodologie générale, les outils biotechnologiques utilisés et les résultats.

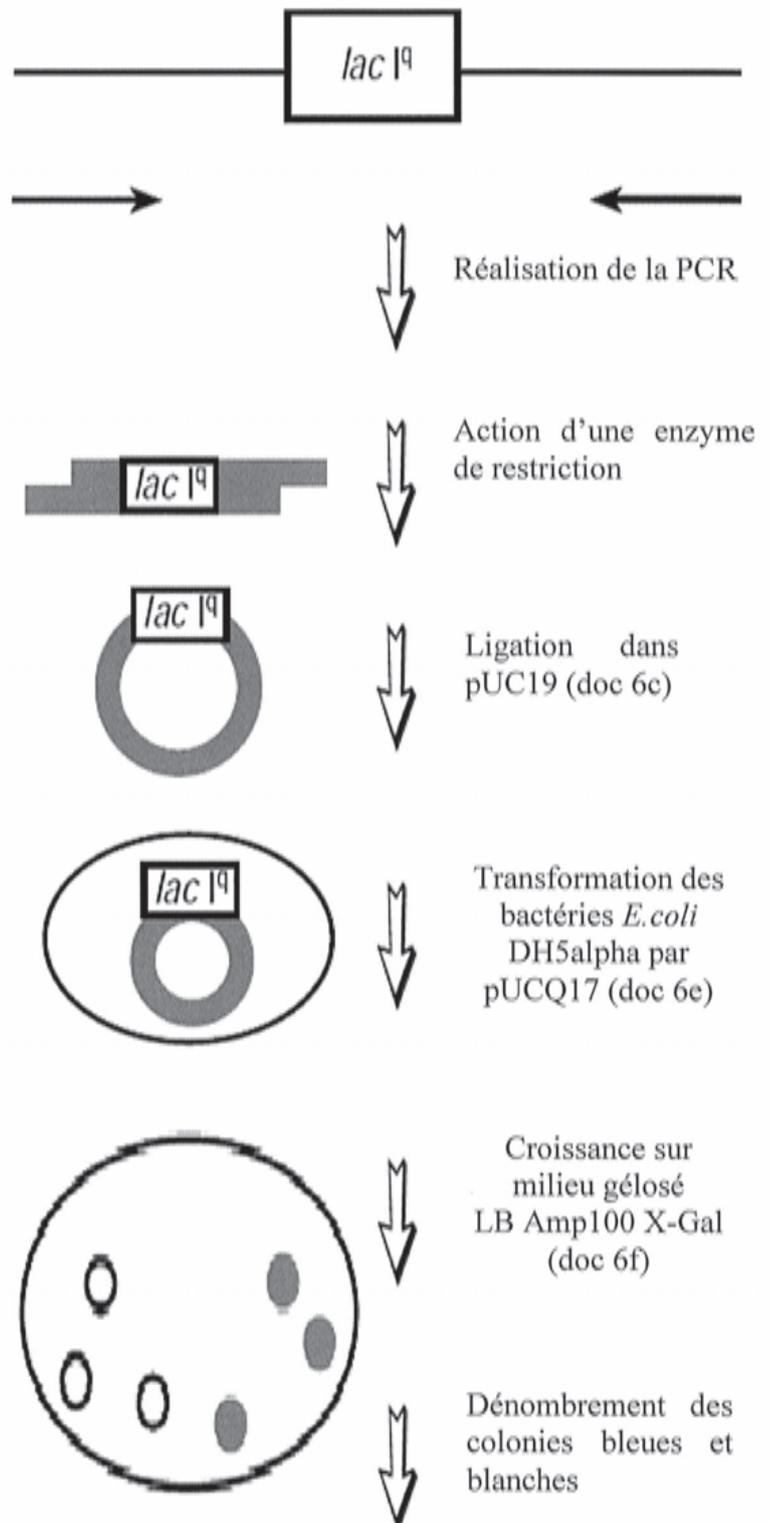
Les polymérase thermostables possèdent une activité de relecture 3' vers 5'. Elles permettent une fidélité plus importante que les polymérase thermostables ne possédant pas cette activité.

Malheureusement ces polymérase thermostables avec fonction de relecture assurent une amplification de moindre importance que les enzymes ne possédant pas cette activité.

Le protocole présenté sur la figure ci-contre permet de mesurer la fidélité et le rendement de différents systèmes de réplication.

Le test de mesure de fidélité est réalisé en utilisant l'allèle *lacI^q* qui représente 1080pb contenant 349 sites identifiés susceptibles de subir une mutation phénotypiquement visible.

Le protocole de PCR utilisé est standard.



BRUNO FREY AND BERNHARD SUPPMANN
Boehringer Mannheim GmbH, Department of
Molecular Biology,
Nonnenwald, D-82372 Penzberg, Germany

Calcul du taux d'erreur f

DOCUMENT 6b : Evaluation de la fidélité de polymérase thermostables

Tableau des résultats

Une culture d'*E. coli* DH5 alpha transformée par les plasmides pUCIQ17 est mise en culture sur gélose LB Amp100 X-Gal. Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies bleues et blanches sont dénombrées. Le taux d'erreur f par paire de base est calculé selon la formule réarrangée de Keohavong and Thilly (Keohavong, P. and Thilly, W. G. (1989) PNAS USA 86:9253.) :

$$f = \frac{-\ln F}{d \times b}$$

F : proportion de colonies blanches (nombre de colonies blanches / nombre total colonies)

d : nombre de copies obtenues

b : taille du gène d'intérêt en paire de base

| Système de polymérase | Rendement en ng | d | Colonies bleues | Colonies blanches | Nombre total de colonies | % colonies bleues | f |
|---|-----------------|-----|-----------------|-------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|
| Système « Expand long templat » de la société A (1) | 3000 | 9,2 | 151 | 3066 | 3217 | 4,7 | $1,5 \cdot 10^{-5}$ |
| Système « Expand High fidelity templat » de la société A (1) | 3000 | 9,2 | 73 | 2695 | 2768 | 2,6 | $8,3 \cdot 10^{-6}$ |
| Taq de la société A (3) | 1500 | 8,2 | 167 | 2202 | 2369 | 7,1 | $2,6 \cdot 10^{-5}$ |
| Taq de la société C (3) | 1500 | 8,2 | 148 | 1917 | 2065 | 7,2 | $2,6 \cdot 10^{-5}$ |
| Tth de la société A (3) | 2000 | 8,6 | 280 | 2970 | 3250 | 8,6 | $3,0 \cdot 10^{-5}$ |
| Pwo de la société A (2) | 300 | 5 | 22 | 3447 | 3469 | 0,6 | $3,2 \cdot 10^{-6}$ |
| Taq de la société A (2) | 80 | 3 | 12 | 2245 | 2257 | 0,5 | $3,8 \cdot 10^{-6}$ |
| Taq de la société B (2) | 125 | 3,6 | 90 | 2527 | 2617 | 3,4 | $2,2 \cdot 10^{-5}$ |
| (1) mélange de 2 polymérase : une des 2 possédant une activité correctrice d'erreurs (2) polymérase possédant une activité correctrice d'erreurs (3) polymérase ne possédant pas d'activité correctrice d'erreurs | | | | | | | |

BRUNO FREY AND BERNHARD SUPPMANN

**Boehringer Mannheim GmbH, Department of Molecular Biology,
Nonnenwald,**

D-82372

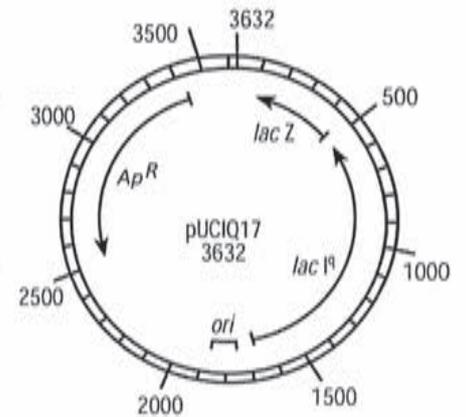
Penzberg,

Germany

DOCUMENT 6c : Le plasmide pUCIQ17 et LacI^q

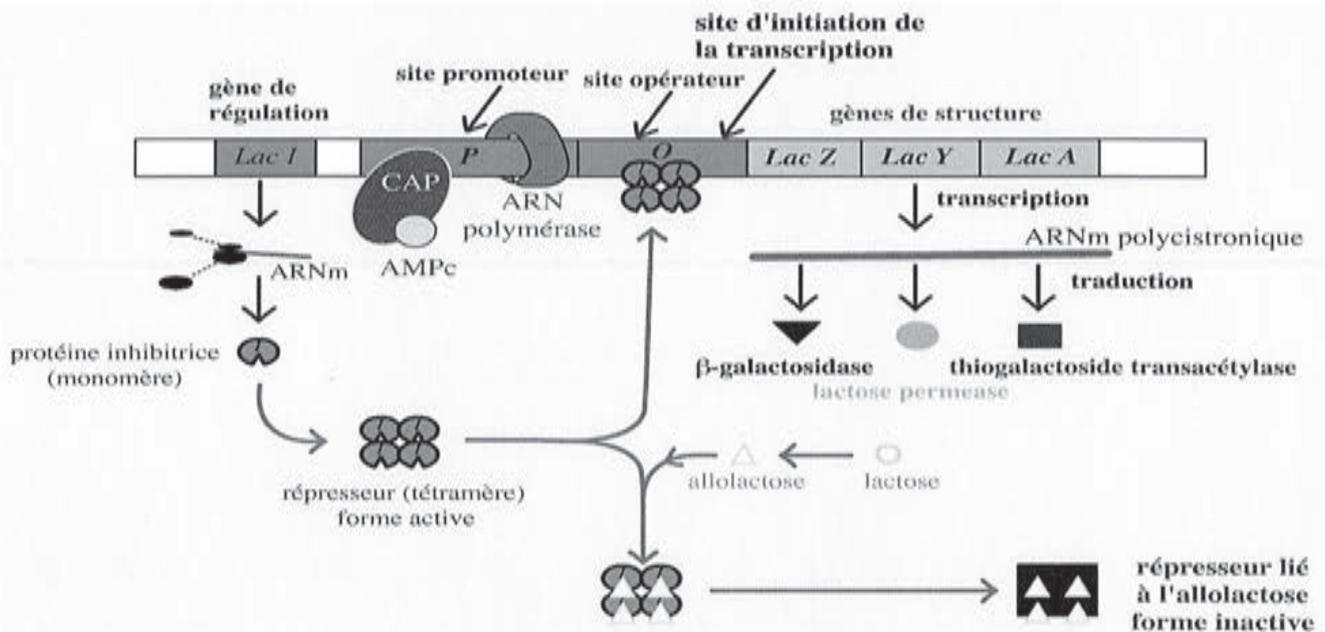
L'allèle lacI^q est inséré dans le plasmide pUC19 pour donner le plasmide pUCIQ17

L'allèle LacI^q est un mutant du répresseur LacI souvent utilisé pour moduler l'expression de la β -galactosidase. Le répresseur produit par l'allèle LacI^q fixe plus fortement le site opérateur que l'allèle sauvage. L'expression du gène LacZ est diminuée d'un facteur 10 par rapport au répresseur sauvage LacI.



DOCUMENT 6d : L'opéron lactose

Avec l'étude de l'opéron lactose, François Jacob, Jacques Monod et André Lwoff ont été les premiers scientifiques à décrire un système de régulation de la transcription des gènes. Ils proposent l'existence de deux classes de gènes qu'ils différencient par leur fonction : les gènes structuraux et les gènes régulateurs. C'est à partir de ces travaux qu'est né le concept de la régulation génique. (Prix Nobel de physiologie et médecine en 1965).



DOCUMENT 6e : Escherichia coli DH5 alpha

Escherichia coli DH5 alpha est une souche portant plusieurs modifications par rapport à la souche *E. coli* de référence. Cette souche est très utilisée pour les protocoles de transformation car elle montre une grande compétence et un taux de transformation très élevé.

Son génotype est le suivant :

dlacZ DeltaM15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1

Les caractéristiques génotypiques utiles pour l'utilisation du plasmide pUCIQ17 sont :

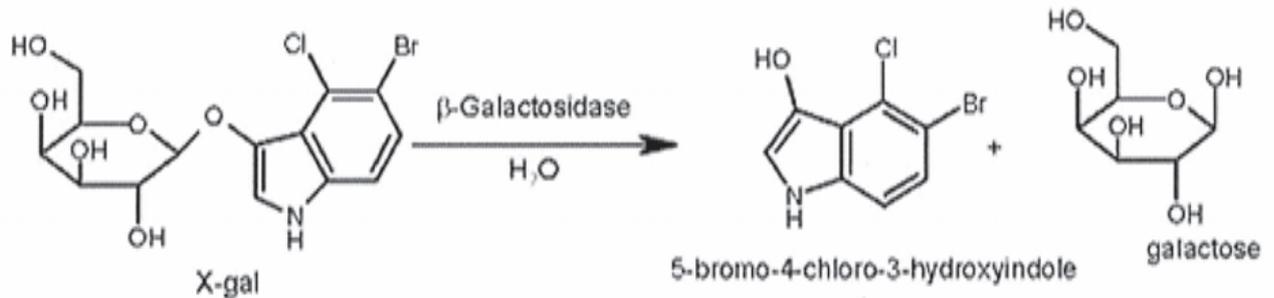
- lacZDelta M15 : mutation du gène LacZ le rendant inactif.
- recA1 : mutation réduisant les recombinaisons homologues.
- endA1 : mutation réduisant l'activité de l'endonucléase digérant les plasmides
- hsdR17 (rK-mK+) : mutation réduisant l'activité de l'enzyme de restriction EcoK.

DOCUMENT 6f : X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside

X-Gal est un substrat chromogène de la β -galactosidase. En présence de cette enzyme, X-Gal est hydrolysé et rapporte un précipité bleu. X-Gal est conçu pour l'identification et le choix de bactéries produisant des β -galactosidase (bactéries lac⁺) ; elles produisent les colonies bleues sur le milieu agar.

Une solution courante (100 mg/ml) est préparée par dissolution de X-Gal dans le diméthylformamide et devrait être stockée à -20 °C et être protégée contre la lumière.

La stérilisation n'est pas habituellement exigée. X-Gal est souvent employé avec IPTG.



| | |
|------------------------------------|--------------|
| Aspect (TLC) | Min 99 % |
| Rotation spécifique | - 62 ± 2 ° |
| Eau | Max 0,2 % |
| DNase, RNase, activité de protéase | Non détectés |

| | |
|--|------------|
| CAS [7240-90-6] | |
| 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-, -D-Galactopyranoside | |
| S : 22-24/25 | M : 408,64 |
| $C_{14}H_{15}BrClNO_6$ | |

Conditions de stockage : A conserver à froid : -15 ° et -22 °C

Références :

Lojda, Z. et al. *Enzyme Histochemistry : A Laboratory Manual*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. (1979).

Sambrook J., et al., *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ed., 1.86, B.14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).

