

Université Mohamed Khider-Biskra
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Module-Génie Génétique
Série 01

Exercice 01 : La séquence d'un ADN bicaténaire, correspondant à un gène, est partiellement reportée ci-dessous.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

1. Ecrire la séquence et l'orientation du second brin de ce fragment.
2. Donner le brin complémentaire d'ARN.
3. Soient les enzymes de restriction et leurs sites de reconnaissance : *Bam*HI : 5' G/GATCC 3' ; *Pst* I : 5' CTGCA/G 3' ; *Xho* I : 5' C/TCGAG 3' ; *Mbo* I : 5' /GATC 3'. Recopier la séquence de l'ADN et encadrer les sites de restriction en indiquant la position des coupures.
4. Pour chaque enzyme, écrire les séquences, les extrémités des molécules d'ADN digérées et préciser le type d'extrémités obtenu.
5. On mélange ce brin d'ADN apparié avec son brin complémentaire à un autre fragment d'ADN double brin. La solution est portée à une température supérieure à leurs T_m respectives, puis refroidie. Que peut-on attendre?
6. Voici la séquence d'une amorce (ou *primer*) : 5'TTTCTGCA 3'. Où cette amorce se fixera-t-elle sur la séquence d'ADN ? Quelle séquence obtiendra-t-on après élongation par la DNA-polymérase ?

Exercice 02 : La digestion d'un plasmide recombinant (pBM1) contenant le gène M par les deux enzymes de restriction Bam HI et Eco RI a donné les fragments indiqués dans le tableau présenté ci-dessous.

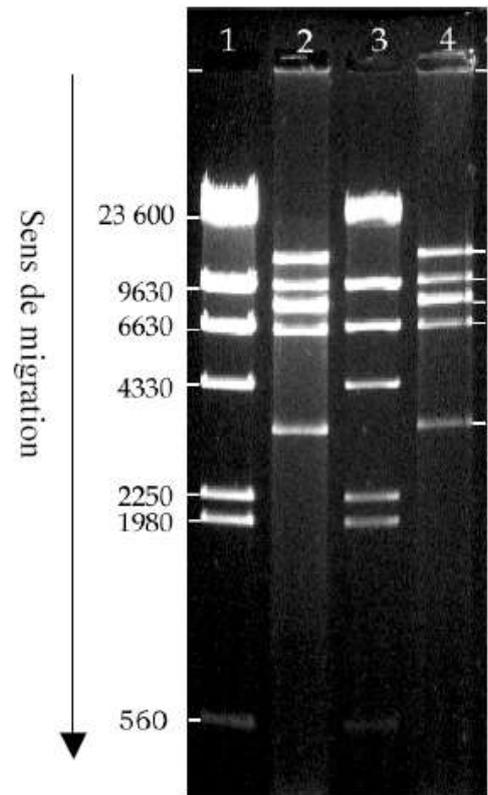
- Donnez la carte de restriction de ce plasmide.

Enzyme	Taille des fragments obtenus (kpb)				
Eco RI	8	6			
Bam HI	5.5	4.5	4		
Eco RI+Bam HI	4	3.5	3	2.5	1

Exercice 03

L'ADN d'un cosmide recombinant de 48,6 kpb a été hydrolysé par l'enzyme de restriction Sal I. Cet ADN est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (pistes 2 et 4). Un marqueur de taille (l'ADN du phage lambda hydrolysé par l'enzyme de restriction Hind III) est déposé dans les puits 1 et 3. Ce marqueur de taille est un mélange équimolaire de fragments d'ADN de tailles connues. La quantité d'ADN total déposée dans les puits 1 et 2 est le double de celle des puits 3 et 4. Après coloration par le bromure d'éthidium, l'image suivante est obtenue.

1. À l'aide des valeurs du tableau I, tracer la courbe étalon :
Log taille (pb) = f (distance de migration).
2. À partir de cette courbe, déduire la taille des fragments issus de la digestion par l'enzyme de restriction Sal I de l'ADN du cosmide recombinant (pistes 2 et 4).
3. La somme des tailles des fragments obtenus vous semble-t-elle en accord avec la taille attendue de 48,6 kpb ?
4. Le bromure d'éthidium s'intercale entre les bases de l'ADN de manière uniforme sur une molécule d'ADN linéaire. Étudiez attentivement la photo du profil de restriction, que remarquez-vous? Qu'en déduisez-vous ?



Phage lambda digéré par Hind III « pistes 1 et 3 »		ADN cosmique digéré par Sal I « pistes 2 et 4 »	
Migration « cm »	Taille « pb »	Migration « cm »	Taille « pb »
2.3	23600	2.8	
3.2	9630	3.2	
4.1	6630	3.6	
5.4	4330	4.1	
8.2	2250	6.5	
8.8	1980		
14.7	560		

Corrigé type

Exercice 01

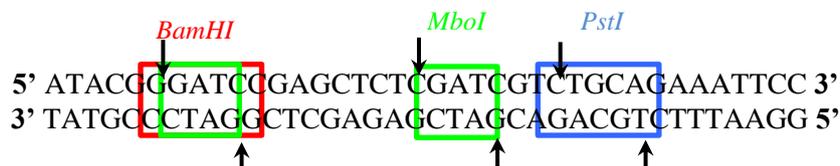
R1. La séquence et l'orientation du second brin :

3'TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5', selon la convention d'écriture :
5'GGAATTTCTGCAGACGATCGAGAGCTCGGATCCCGTAT 3'

R2. Le brin complémentaire d'ARN : le brin anti-sens est le brin matrice, et le brin donné dans l'exercice c'est le brin sens (son extrémité 5' écrite à gauche), donc le brin complémentaire d'ARN est : 3' UAUGCCCUAGGCUCGAGAGCUAGCAGACGUCUUUAAGG 5'

Soit : 5' GGAAUUUCUGCAGACGAUCGAGAGCUCGGAUCCCGUAU 3'

R3. On rappelle que les enzymes de restriction sont des endonucléases à clivage spécifique, qui reconnaissent des séquences spécifiques (4 à 15 pb) dans la double hélice d'ADN usuellement de type palindromique. Le clivage des deux brins du duplex se fait dans des endroits très spécifiques (sites de reconnaissances) par hydrolyse de la liaison phosphodiester, conduisant à la formation des fragments de restriction.

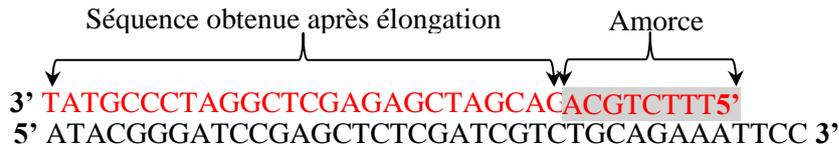


R4. La réponse de cette question est résumée dans le tableau ci-dessous :

Enzymes	Séquences (fragments) obtenus	Type d'extrémité
<i>BamHI</i>	5' ATACGGG3' 5' GATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3' 3' TATGCCCTAGG5' 3'GCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'	2 fragments : extrémité cohésive (à bout collant).
<i>PstI</i>	5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGT3' 5'TGCAGAAATTCC 3' 3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGT5' 3'CTTTAAGG 5'	2 fragments : extrémité cohésive (à bout collant).
<i>Xho I</i>	N'a pas un site de reconnaissance sur cette séquence, donc elle n'aura pas d'action.	/
<i>MboI</i>	5' ATACGG3' 5'GATCCGAGCTCTC3' 5'GATCGTCTGCAGAAATTCC 3' 3' TATGCCCTAGG5' 3'GCTCGAGAGCTA5' 3'GCAGACGTCTTTAAGG 5'	3 fragments : extrémité cohésive (à bout collant).

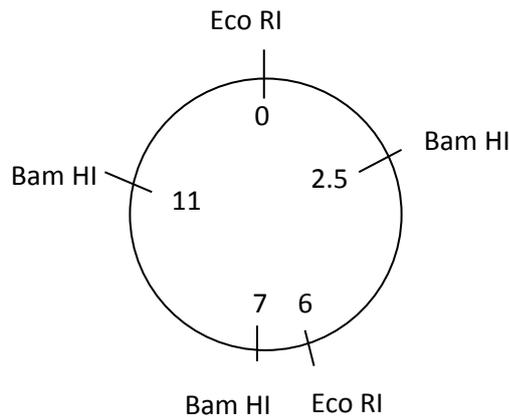
R5. Les brins dissociés (dénaturés suite à la rupture des liaisons d'hydrogène qui unissent les deux brins d'ADN) de chaque type vont se réapparier (se renaturer) avec leur séquence complémentaire **sans mélange** d'ADN des deux types. Si les deux types d'ADN proviennent de la même espèce, la probabilité d'avoir des séquences identiques augmente, et par la suite il y aura une possibilité d'appariement. L'appariement des bases complémentaires est le plus stable énergétiquement.

R6. La position de l'amorce sur le brin d'ADN donné et la polymérisation par la DNA polymérase :



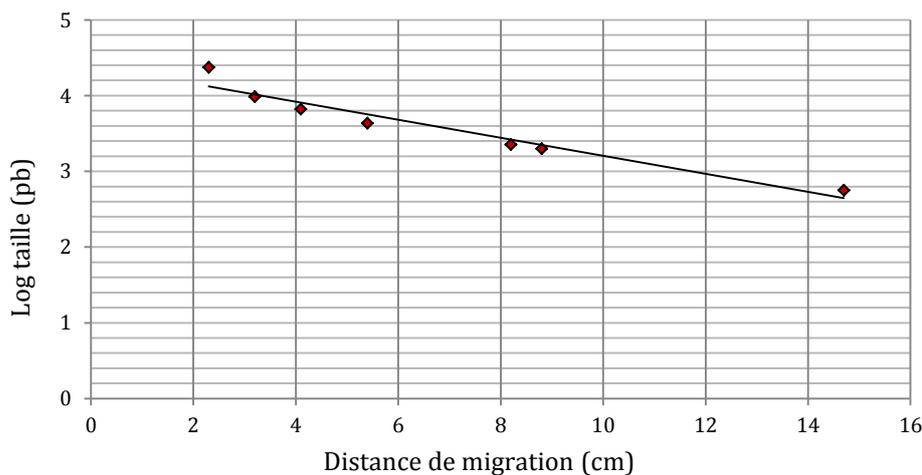
La DNA polymérase assure l'élongation de l'ADN, mais elle ne sait qu'allonger une chaîne préexistante (amorce= *primer*), où elle ajoute à l'extrémité OH de cette chaîne des dNTP (nucléotides triphosphates).

Exercice 2 : la carte de restriction du plasmide pBM1



Exercice 3 :

1. Traçage de la courbe : Log taille (pb) = f (distance de migration)



Courbe d'étalonnage: Log taille des fragments du phage lambda digéré par Hind III en fonction de la distance de migration

2. Détermination de la taille des fragments issus de la digestion du cosmide recombinant par l'enzyme de restriction Sal I :

Migration (cm)	Taille (pb)
2.8	14692
3.2	11434
3.6	9165
4.1	7179
6.5	3021
Somme	45490

3. La somme est plus faible ($45490 < 48600$ pb). Cela peut être dû notamment aux incertitudes qui peuvent être importantes en particulier pour les fragments de grande taille ou à deux bandes très proches qui n'auraient pas été différenciées à la lecture.
4. La fluorescence des bandes 1 et 2 est plus intense que celle des bandes 3 et 4. En parallèle, la quantité d'ADN totale déposée dans les puits 1 et 2 est le double de celle des puits 3 et 4. La lecture du gel permet donc, au travers l'intensité de la fluorescence émise, d'obtenir une information semi-quantitative et de comparer de manière relative les quantités d'ADN au niveau de chaque bande.