

GÉNIE GÉNÉTIQUE

Série-04

Exercice 01: Soit un ADN monocaténaire qu'on veut déterminer sa séquence nucléotidique primaire. Par hybridation moléculaire, on fixe sur l'extrémité 3' une courte amorce complémentaire marquée au ^{32}P . On réalise 4 réactions indépendantes de polymérisation. Les 4 réactions contiennent les éléments suivants :

- ADN monocaténaire avec une amorce fixée,
- dATP, dTTP, dCTP, dGTP,
- DNA polymérase I,
- L'un des 4 didésoxyribonucléotides triphosphate (ddXTP : ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP).

1. Pourquoi utilise-t-on une amorce dont l'extrémité porte une fonction hydroxyle libre ?

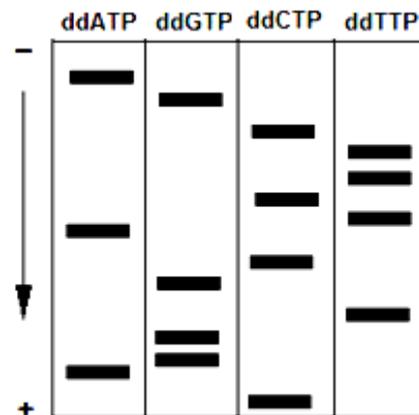
2. Sachant que la polymérase utilisée reconnaît également les ddXTP comme substrat, quelle sera la conséquence de l'incorporation dans la chaîne d'ADN néosynthétisée, de ddXTP donné à la place d'un dXTP correspondant ?

Les 4 réactions sont réalisées simultanément. Le milieu réactionnel est chauffé ensuite à 100°C , refroidi rapidement puis soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (gel de séquençage). Après migration, le gel est analysé par autoradiographie.

3a. Quel est le but de traitement thermique du milieu réactionnel ?

3b. Après autoradiographie, quelles sont les chaînes nucléotidiques qui seront visualisées.

3c. A partir de l'autoradiogramme, déduisez une partie de la séquence nucléotidique primaire correspondant à l'ADN monocaténaire de départ

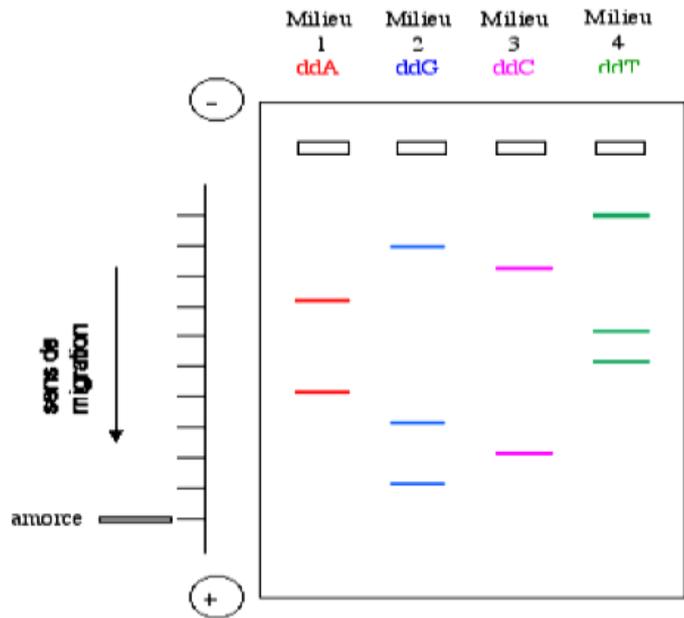


Exercice 02: On dispose d'un brin d'ADN à séquencer, d'une amorce, d'ADN polymérase, des quatre désoxyribonucléotides (dXTP) et d'un jeu des différents didésoxyribonucléotides (ddXTP). L'amorce est radiomarquée par du ^{32}P . L'ADN matriciel à séquencer ACGTAATCGC---- comporte, à son extrémité 3', une séquence supplémentaire (représentée ici par un segment de droite en pointillé) sur laquelle l'amorce va s'hybrider, créant ainsi le site d'initiation de l'ADN polymérase.

1. Résumez brièvement le principe de la méthode en indiquant le rôle du didésoxyribonucléotide.

2. Sur le gel présenté en face, représentez la taille des fragments néosynthétisés dans chaque milieu réactionnel (utiliser l'échelle de taille représentée à gauche du schéma)

3. Reportez, à droite, la séquence du brin synthétisé puis la séquence recherchée, en indiquant le sens de lecture des séquences établies.



Corrigé type

Exercice 01

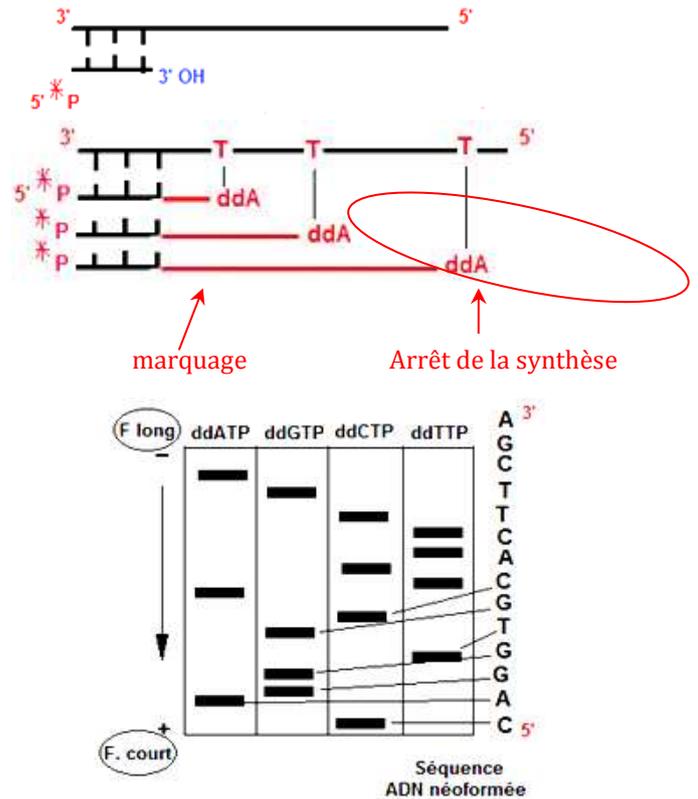
1. Dans le séquençage par la méthode de Sanger, l'amorce (primer) fournit une extrémité 3'OH libre nécessaire pour l'action de la DNA polymérase.

2. Le didésoxynucléotide provoque l'arrêt de l'élongation de l'ADN.

3a. Le but du traitement thermique est la dénaturation de l'ADN bicaténaire (matrice + ADN néoformé). Après chauffage, tous les fragments sont monocaténaires.

3b. Toutes les chaînes nucléotidiques liées à l'amorce sont radioactives (^{32}P) et visualisées par autoradiographie.

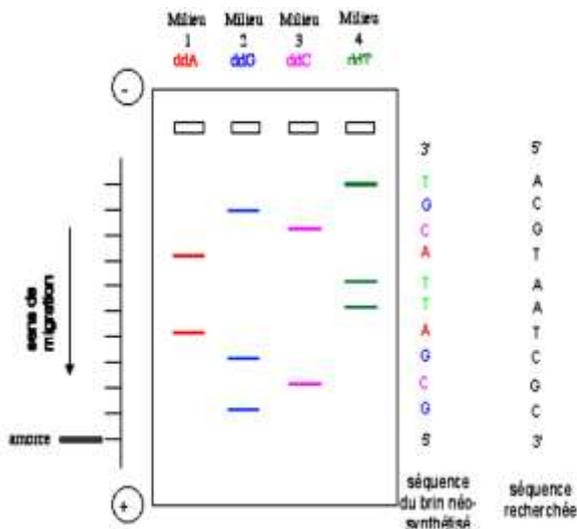
3c. La séquence de l'ADN à séquencer :



Exercice 02

1. Le rôle des ddXTP (fluorescent ou radioactif) dans la méthode utilisée (méthode de Sanger) est de stopper la progression de la synthèse (absence du groupement OH).

2.



NB : Il est possible de repérer les différents oligonucléotides en marquant non pas l'amorce mais les ddXTP ; ceux-ci peuvent être marqués par un atome radioactif (^{32}P) ou par des réactifs fluorescents.

3.

Séquence d'ADN synthétisé : $5' \text{ GCGATTACGT } 3'$

Séquence d'ADN matrice : $5' \text{ ACGTAATCGC } 3'$