

Travaux dirigés de génie- génétique

Exercice 1 :

Quelle est la fréquence statistique des sites de restriction suivant :

- 1) AGCT pour l'enzyme *AluI*
- 2) GAATTC pour l'enzyme *EcoRI*
- 3) GCGGCCGC pour l'enzyme *NotI*

Dans un gène de 40 000 paires de bases, combien de sites pour chacune des trois enzymes mentionnés ci-dessus doit-on s'attendre à trouver ?

Solution 1 :

Appliquez la formule de calcul de la fréquence

(Séquence de N nucléotides se répète généralement $1/4^N$).

la fréquence de coupure d'un ADN par une enzyme de restriction donnée peut être approchée statistiquement en considérant le nombre de nucléotides de la séquence spécifique reconnue par l'enzyme. Ainsi, par exemple, la séquence **AGCT reconnue par l'enzyme *AluI*** est présente avec une fréquence statistique de paires de bases ($1/4^4$) soit $1/256$.

on aura donc une fréquence de coupure statistique de $1/4^4$, soit 1 coupure tous les 256 nucléotides.

- pour un gène de 40 000 paires de bases, l'enzyme *AluI* présente $40\,000/256$ site de coupure soit 156 site de coupure.

Exercice 2 :

Le site de reconnaissance *EcoRI* est décrit comme suit **G/AA**TTC***:

Quelle est la signification des symboles : [/] et *

solution 02 :

La position à laquelle l'enzyme de restriction coupe est habituellement indiquée par le symbole [/] et les nucléotides méthylés par l'enzyme de modification sont marqués d'un astérisque.

Exercice 3 :

Vous avez les enzymes suivantes

KpnI : 5'GGTAC/C3' ***Acc65I***: 5'G/GTACC3'

BamHI (G / GATCC) ***MboI*** (/ GATC):

Quelle est la relation entre le couple :[*KpnI* , *Acc65I*]

Et le couple [*BamHI*, *MboI*].

Solution 03 :

- Les 2 enzymes KpnI et Acc65I: reconnaissent la même séquence mais la coupent de façon différente par conséquent sont dites néoschizomères.
- Les 2 enzymes **BamHI** et **MboI** génèrent après digestion des fractions aux extrémités cohésives complémentaires, par conséquent sont dites compatibles.

Exercice 4 :

Soient les enzymes de restriction **BamH I**, **Pst I**, **Xho I** et **Mbo I** dont les sites reconnus sont :

BamH I: 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.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

Donnez le type de la coupure pour chaque enzyme ?

Solution 04 :

sites de restriction

5' ATACGG/GATCCGAGCTCTC/GATCGTCTGCA/GAAATTCC 3'

3' TATGCCCTAG/GCTCGAGAGCTAG/CAG/ACGTC TTTAAGG 5'

Rouge pour **BamH I**: coupure décalée

Jaune pour **Pst I** : coupure décalée

Bleu pour **Mbo I** : coupure décalée

l'enzyme Xho I ne possède pas une site de restriction sur ce gène, par conséquent si on traite ce fragment par cette enzyme, il reste intact. (pas de coupure).

Exercice 5 :

Deux fragments d'ADN dont la longueur est de 18 base :

Fragment A : 5'CCCCGTTCTATCACCAGG3'

Fragment B : 5'CCTATATCTACATATTCC3'

Calculer la Tm pour chaque fragment ?

Expliquez l'obtention de deux Tm différentes ?

Si n incube les deux fragments dans milieu réactionnel adéquat, en présence de ligase T4,

Quelle sera la Tm du fragment résultant ? (Après incubation en présence de ligase T4).

Solution 05

Fragment A : 5'CCCCGTTCTATCACCAGG3' (n<20)

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) = 2 \times (7) + 4(11) = 14 + 44 = 58 \text{ }^\circ\text{C}$$

Fragment B : 5'CCTATATCTACATATTCC3' (n<20)

$$T_m' = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) = 2 \times (12) + 4(6) = 24 + 24 = 48 \text{ }^\circ\text{C}$$

La différence entre les T_m et T_m' est attribuable à la différence en pourcentage de bases

En effet, **l'augmentation de la proportion en GC augmente la T_m .**

Il y a 3 liaisons H entre les bases G et C et 2 entre les bases A et T. Donc plus la proportion en GC est importante, plus T_m sera élevée. Les régions riches en AT qui sont les premières à fondre puis celles riches en GC.

Le fragment A contient plus CG (11 couples CG) par rapport le fragment B (6 couples CG), ce qui explique que T_m pour Le fragment A est supérieur à T_m' pour le fragment B

- Après incubation en présence de ligase T4
- $T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) \times (1 + [(N-20) / 20])$.

Exercice 6 :

Classer les molécules d'ADN bicaténaire A, B et C par ordre croissant de leur température de fusion. Il s'agit de molécules constituées de la répétition des séquences suivantes :

ADN A : AAGTTCTCTGAA

ADN B : GGACCTCTCAGG

ADN C : AGTCGTCAATGC

Exercice 7 : avec réponse

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.

La séquence

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

Soit si l'on respecte les conventions d'écriture : le brin complémentaire sera :

5' GGAATTTCTGCAGACGATCGAGAGCTCGGATCCCGTAT 3'

2) Donner le brin complémentaire d'ARN

L'uracile remplace la thymine

3' UAUGCCCUAGGCUCGAGAGCUAGCAGACGUCUUUAAGG 5'

Soit

5' GGAAUUUCUGCAGACGAUCGAGAGCUCGGAUCCCGUAU 3'

3) Sur une représentation détaillée de l'enchaînement de deux nucléotides d'un brin d'ADN « du site *BamH I* » dont les bases seront représentées par les lettres correspondantes, indiquer (à l'aide d'une flèche) quelle liaison est rompue sous l'action de l'enzyme *BamH I* (5' G/GATCC3').

3'



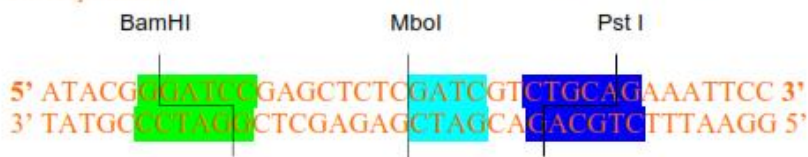
4) Soient les enzymes de restriction *BamH I*, *Pst I*, *Xho I* et *Mbo I* dont les sites reconnus sont :

BamH I : 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'

en surligné, les sites reconnus respectivement par les enzymes avec en noir, la coupure correspondante



BamH I : 5' G/GATCC 3'
 3' CCTAG/G 5'

Pst I : 5' CTGCA/G 3'
 3' G/ACGTC 5'

Xho I : 5' C/TCGAG 3'
 3' GAGCT/C 5'

Xho I ne reconnaît pas de site sur ce fragment d'ADN donc n'aura pas d'action (attention à l'orientation du fragment d'ADN)

Mbo I : 5' /GATC 3'
 3' /CTAG 5'

5) Pour chaque enzyme, écrire les séquences des extrémités des molécules d'ADN digérées et préciser le type d'extrémités obtenu.

5'

Pour BamH I (terminaisons à bouts collants)

Fragment 1 :

5' ATACGG

3' TATGCCCTAG

Fragment 2 :

GATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

GCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

Pour Pst I (terminaisons à bouts collants)

Fragment 1 :

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCA

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAG

Fragment 2 :

GAAATTCC 3'

ACGTCTTTAAGG 5'

Pour Mbo I (terminaisons à bouts francs)

Fragment 1 :

5' ATACGGGATCCGAGCTCTC

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAG

Fragment 2 :

GATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

CTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

6) 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'

Les brins dissociés (dénaturés) d'ADN de chaque espèce vont se réapparier (se renaturer) avec leur séquence complémentaire sans mélange d'ADN des deux espèces. L'appariement des bases complémentaires est le plus stable énergétiquement.

8) 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 ?

8'

3' -ACGTCTTT- 5'
5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTC TGCAGAAATTCC 3'

En vert, site reconnu par l'amorce

En turquoise, l'amorce

La DNA polymerase permet l'ajout d'un dNTP (nucléotides triphosphates) à l'extrémité hydroxyle en 3' de l'ADN :

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTT- 5'
5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTC TGCAGAAATTCC 3'

En rose, séquence obtenue après élongation

Exercice 8 :

- Le site de coupure de l'enzyme de restriction *Ava* III est : ATG/CAT

- Le site de coupure de l'enzyme de restriction *Nsi* I est : ATGCA/T

Quels sont les doubles brins obtenus après action de chacun des deux enzymes sur l'ADN suivant dont la séquence de l'un des 2 brins est :

5'-GCGAACCATGCATTGTAAGA-3'

Ces deux enzymes sont -elles des neoschizomère ? Isoschizomères? Justifiez votre réponse.

Exercice 9 :

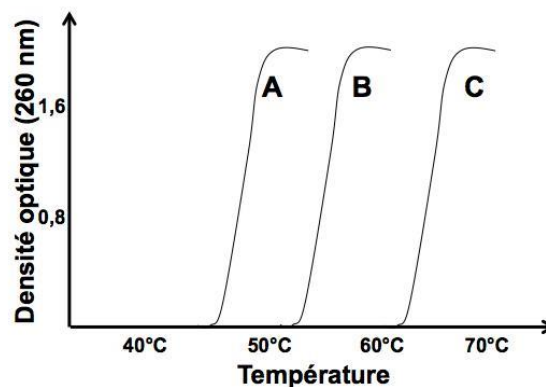
Un ADN linéaire de 1000 paires de bases (48% GC) est dénaturé par la chaleur dans trois conditions expérimentales différentes :

i) absence de formamide et 0,002 M NaCl

ii) absence de formamide et 0,01 M NaCl

iii) 10% formamide et 0,002 M NaCl

La dénaturation est suivie par une mesure de la densité optique à 260 nm. Les résultats sont montrés dans la figure 1



Pour chaque condition expérimentale, donnez l'identité de la courbe correspondante. Justifiez très brièvement votre réponse

Exercice 10 :

Un fragment d'ADN est coupé d'une part par *Hind* III, d'autre part par *Sma* I, puis conjointement par les deux enzymes. Les fragments obtenus sont les suivants :

Hind III : 2.5 kb et 5.0 kb

Sma I : 2.0 kb et 5.5 kb

Hind III + *Sma* I : 2.5 kb, 2.0 kb et 3.0 kb

a) dessinez la carte de restriction (On appelle carte de restriction la position des sites de restriction d'une enzyme sur la séquence d'ADN digéré)

Exercice 11 :

Un fragment d'ADN est coupé d'une part par *Kpn* I, d'autre part par *Bam*H I, puis conjointement par les deux enzymes. Les fragments obtenus sont les suivants :

Kpn I: 7 kb

*Bam*HI: 4+3

Kpn I+ *Bam*HI: 3+1

-Quelle est la taille de ce fragment d'AND ?

- Dessinez la carte de restriction ?

Exercice 12 :

Un fragment d'ADN est coupé d'une part par *Kpn* I, d'autre part par *Eco*RI, puis conjointement par les deux enzymes. Les fragments obtenus sont les suivants :

Kpn I: 7 kb

*Eco*RI: 5+2

Kpn I+ *Eco*RI: 4+2+1

-Quelle est la taille de ce fragment d'AND ?

- Dessinez la carte de restriction ?

Exercice 13 :

Un fragment d'ADN est coupé d'une part par *Xba*I, d'autre part par *Eco*RI, puis conjointement par les deux enzymes. Les fragments obtenus sont les suivants :

*Xba*I: 1,8kb + 1,2 kb

*Eco*RI: 1,6kb +1,4kb

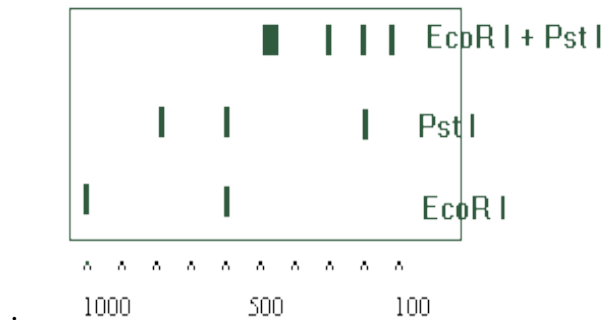
*Eco*RI + *Xba*I: 1kb+0,8kb+0,4kb

-Quelle est la taille de ce fragment d'AND ?

- Dessinez la carte de restriction ?

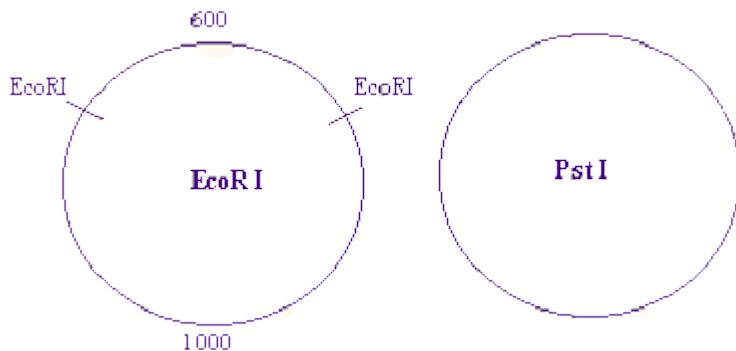
Exercice 14 :

On opère une digestion de restriction d'un ADN plasmidique circulaire de 1.6 kb par 2 enzymes EcoR I et Pst I. Le profil électrophorétique obtenu est le suivant :



1- Déterminer la taille des fragments de restriction observés

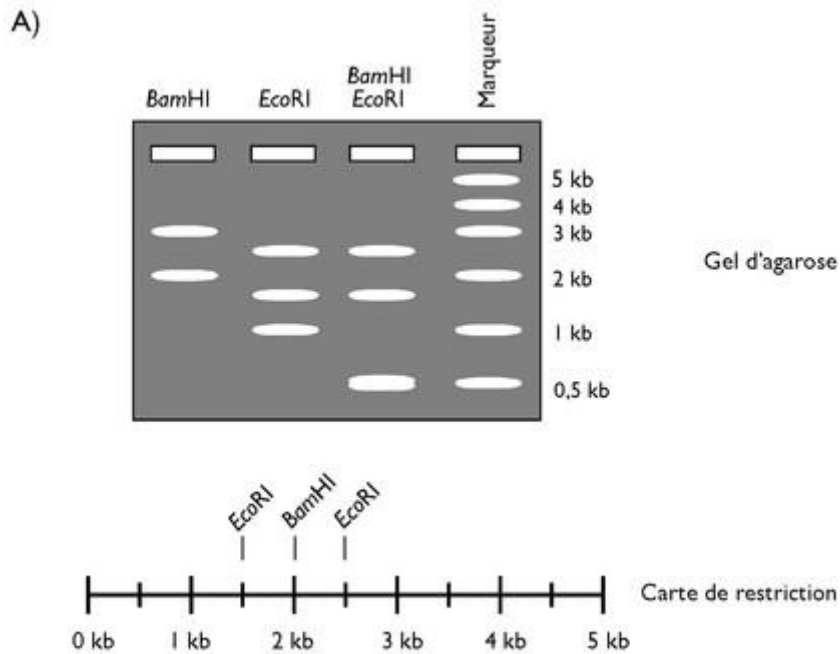
2- La carte de restriction EcoR I de l'ADN plasmidique est figurée ci-dessous. Construire une carte possible pour l'enzyme Pst I, puis une carte de restriction finale (EcoR I + Pst I)



Exercice 15 :

Un fragment d'ADN est coupé d'une part par *Bam* HI, d'autre part par *EcoR* I, puis conjointement par les deux enzymes. Le profil électrophorétique obtenu est le suivant (ci -dessous)

Dessinez la carte de restriction ?



Exercice 16 :

Un fragment d'ADN

1. coupé par l'enzyme *EcoRI* donne un fragment de 8Kb, un de 4 Kb et un de 3 Kb
2. coupé par l'enzyme *SmaI* donne un fragment de 9 Kb et un de 6 Kb3.
3. coupé par les deux enzymes *EcoRI* et *SmaI* produit un fragment de 6 Kb, un de 4 Kb, un de 3 Kb et un de 2Kb.

A) Choisir votre réponse par ce qui suit :

1. la digestion par l'enzyme *EcoRI* produit des fragments d'ADN à bouts francs ?
2. la taille des fragments d'ADN digérés est évaluée par électrophorèse ?
3. lors d'une électrophorèse, les fragments d'ADN les plus longs migrent les plus vite ?
4. les fragments d'ADN deviennent fluorescents lorsqu'ils sont illuminés par des rayons UV ?

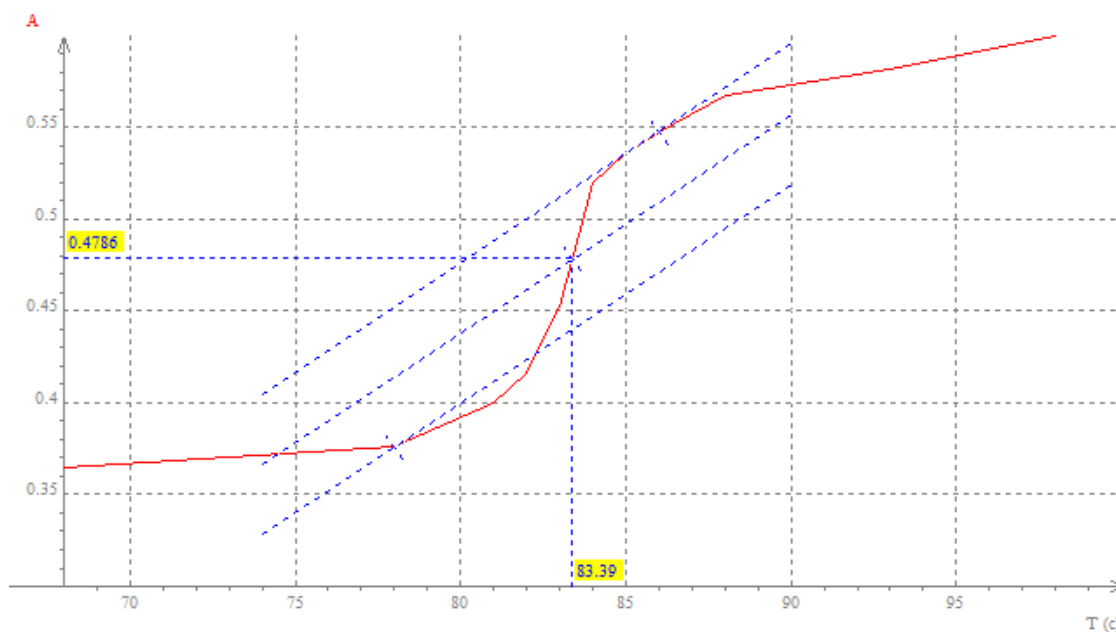
B) Dessinez la carte de restriction par les deux enzymes *EcoRI* et *SmaI* ?

Exercice 17

Un échantillon d'ADN bactérien purifié, en solution de NaCl à $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$ est porté à différentes températures. On mesure l'évolution de l'absorbance à 260 nm en fonction de la température (Θ) en °C. Les résultats expérimentaux obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

(Θ) en °C	68	78	81	82	83	84	85	86	88	93	98
A _{260nm}	0,365	0,376	0,4	0,416	0,452	0,52	0,536	0,548	0,568	0,582	0,6

1- tracer la courbe $A_{260\text{nm}} = f(\Theta)$ et déterminer la température de fusion T_m de cet ADN



La température de fusion déterminée par la méthode des tangentes est de $83,28 \text{ }^\circ\text{C}$

2- commenter l'aspect de la courbe et expliquer le phénomène observé

2 : le passage de l'ADN de la forme double brin à la forme simple brin s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance à 260 nm. Il s'agit du phénomène de l'hyperchromocité consécutif à la rupture des liaisons hydrogène et des forces d'empilement des bases. Les bases démasquées entrent en contact avec le solvant et montrent une augmentation de l'absorbance à 260 nm.

3- quelle serait l'allure de la courbe si l'ADN simple brin était soumis à la même expérience

3- Dans le cas d'un DNA simple brin, il y aurait une faible augmentation de l'augmentation.

La représentation $A_{260} = f(\Theta)$ serait linéaire

4 - préciser sous quelle(s) forme(s) se trouve cet ADN aux températures suivantes T_m , $T_m-5^\circ\text{C}$ et $T_m+5^\circ\text{C}$.

4- à la température T_m , il y 50% de l'ADN sous forme double brin et 50% sous forme simple brin, à $T_m-5^\circ\text{C}$ l'ADN se trouvent essentiellement sous forme double brin et à $T_m+5^\circ\text{C}$ l'ADN se trouvent essentiellement sous forme simple brin

5- comment se comportent les régions riches en A+T lors de la dénaturation thermique par rapport aux régions riches en G+C.

5- les régions riches en A et T s'ouvrent par augmentation de la température avant les régions riches en CG. La rupture des deux liaisons hydrogènes entre A et T nécessite moins d'énergie que la rupture des trois liaisons hydrogènes entre C et G.

6- En déduire le pourcentage de G+C sachant que dans les conditions standards de milieu réactionnel T_m est donnée par la relation suivante : $T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ G+C})$.

6. Pour le calcul du pourcentage de G + C, il suffit de remplacer T_m par la valeur obtenue de $83,28^\circ\text{C}$ dans l'équation donnée dans l'énoncé. La résolution de cette équation donne : $\% \text{ G + C} = 34,1 \%$.

Exercice 18

Un fragment d'ADN est coupé par Bam HI, Pst I, ces enzymes clivent respectivement les séquences suivantes : 5'G/GATCC3' et 5'CTGGA/G3'. Après séparation, les fragments obtenus ont la taille suivante :

Bam HI: 5kb et 10kb

Pst I: 4kb et 11kb

Bam HI et Pst I: 4kb, 5kb et 6kb

1- Quelle technique a été utilisée pour séparer les différents fragments ?

- 2- dessiner la carte de restriction de ce fragment ?
- 3- indiquer les extrémités 5' et 3' des molécules d'ADN clivées soit par Bam HI soit par Pst I :
- 4- comment les extrémités générées soit par Pst I soit par Bam HI seraient- elles modifiées si les molécules clivées étaient incubées en présence d'ADN polymérase et des 4 dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ?
- 5- Après la réaction précédente, pourrait-on toujours joindre les extrémités Bam HI par incubation avec l'ADN ligase de T4 ? pourrait-on toujours joindre les extrémités Pst I.
- 6- Les enzymes Pst I et Bam HI sont-elles compatibles ?

Bon courage

Votre enseignant Dr Baali M^{ed}

drbaalimohamed@hotmail.fr

