

Chapitre 8 : suite résolution de problèmes

Les corrections seront proposées en SEPI BMOL2

Dr J. Fauré

Problème n°1

Problème n°1

Enoncé

L'ADN polymérase I d'une souche mutée de bactérie *Escherichia coli* est isolée. La mutation touche directement l'ADN polymérase I de cette souche et est thermosensible, c'est-à-dire qu'à une température dite « permissive » elle n'affecte pas l'activité de la protéine, alors qu'à la température dite « restrictive » elle bloque cette activité. Pour trouver l'activité affectée par la mutation, plusieurs expériences sont réalisées

Problème n°1

Enoncé

Première expérience:

L'ADN polymérase mutée est mise en incubation avec :

- un tampon approprié
- les 4 désoxynucléotides (dNTPs), le dATP étant marqué par un phosphore radioactif
- un fragment A d'ADN (partiellement double brin) dont la séquence est:

5' ACGTTCGTCG

3' TCGAAGCAGCATAGGATAGCGTATAGGCATAGCTAGCTTAGATCG

Question 1: L'objectif du mélange réactionnel est de marquer radioactivement l'ADN synthétisé. Réalisez un schéma simple du dATP radioactif utilisé dans l'expérience pour montrer la position du phosphate marqué.

La base peut être symbolisée par son (ses) cycle(s), le sucre par un cycle carboné et les groupements phosphates par des P majuscules

Problème n°1

Enoncé

Première expérience (suite):

Après incubation de 30 minutes aux 2 températures indiquées, la radioactivité incorporée dans le produit de la réaction est mesurée, les valeurs sont reportées dans le tableau suivant :

	Incubation à 30 °C	Incubation à 37 °C
Pas de polymérase	30	28
Polymérase sauvage	45 000	46 000
Polymérase mutée	44 000	43 000

Tableau 1 : les valeurs du tableau représentent l'incorporation de radioactivité dans le produit en cpm (désintégrations détectées par minute)

Question 2: Quelle activité enzymatique mesure-t-on avec cette expérience ?

Question 3: Interprétez les résultats du tableau 1

Problème n°1

Enoncé

Seconde expérience :

L'ADN polymérase mutée est mise en incubation avec :

- un tampon approprié
- les 4 désoxynucléotides non marqués (dNTPs),
- un fragment B d'ADN (partiellement double brin) dont la séquence est:

5' ACGTTCGTCG

3' TCGAAGCAGCATAGGATAGCGTATAGGCATAGCTAGCTTAGATCG

Le nucléotide **G** est marqué radioactivement dans le fragment B

Problème n°1

Enoncé

Seconde expérience (suite):

Après incubation de 30 minutes aux 2 températures indiquées, avec ou sans dNTP, la radioactivité présente dans le milieu réactionnel est mesurée, les valeurs étant reportées dans le tableau suivant :

	Incubation à 30 °C <u>avec les 4 dNTP</u>	Incubation à 37 °C <u>avec les 4 dNTP</u>	Incubation à 30 °C <u>sans les 4 dNTP</u>	Incubation à 37 °C <u>sans les 4 dNTP</u>
Pas de polymérase	30	29	31	28
Polymérase sauvage	29	29	10 000	9 500
Polymérase mutée	31	32	11 000	400

Tableau 2 : les valeurs du tableau représentent les mesures de radioactivité dans le milieu réactionnel après incubation , en cpm (désintégrations détectées par minute)

Question 4: Quelle est la raison de la présence de radioactivité dans le milieu sous certaines conditions?

Question 5: Quelle est la température restrictive pour l'ADN polymérase

Question 6: A partir des deux expériences présentées , concluez concernant l'impact de la mutation sur l'ADN polymérase

Problème n°2

Problème n°2

Enoncé:

Le gène *OTC* présent sur le chromosome X code une enzyme du cycle de l'urée.

Considérons la séquence de ce gène comportant une partie du promoteur et les deux premiers exons :

- les désoxy-ribonucléotides appartenant aux exons sont indiqués en caractères majuscule
- le triplet ATG correspondant au codon initiateur de la traduction est souligné

5' gtgacagtaaaatattatgaaaaatgaggaggccaggcaataaaagagtcaggattcagc
ggtagctggcataaagtcaaatgctccacaccctgccgttatcttaaccAGGGG
ACTTAGACTGAGAACGCTGAAGGGTGAATTACCTTGCTCCCTCACTGC
AACTGAACGAATCGTCCTTACACAATTAAAAGAAGATGCTGTTAATC
TGAGGATCCTGTTAACAAATGCAGCTTTAGAAATGGTCACAACTTCAT
GGTCGAAATTTCGtaagtgtggtcagagacttgggttgatttaggaatcatggat
gcataaaaactatattctgcagtaaggcctttatggctttctgaaatacatattccctttaa
atcttttag**GTGTGGACAACC**ACTACAAAATAAGTGCAGCTGAAGGGC
CGTGACCTCTCACTCTAAAAACTTACCGGAGAAGAAATTAAATATA
TGCTATGGCTATCAGCAGCTCTGAAATTAGGATAAAACAGAAAGGAG
AGgtatgtacatttttacgttccattactaccagtcccttttaaaggcagcctt 3'

La taille des exons est :

exon 1 = 167pb (position c.-90 à c.77) ;

exon 2= 139 pb (position c.78 à c.216).

Problème n°2

Question 1: déterminer la séquence de 2 amores de 10 nucléotides situées dans l'exon 2 qui permettraient une amplification complète par PCR de cet exon.

Question 2: déterminer la séquence d'une amorce permettant d'obtenir directement la séquence du brin - (moins) de l'exon 1.

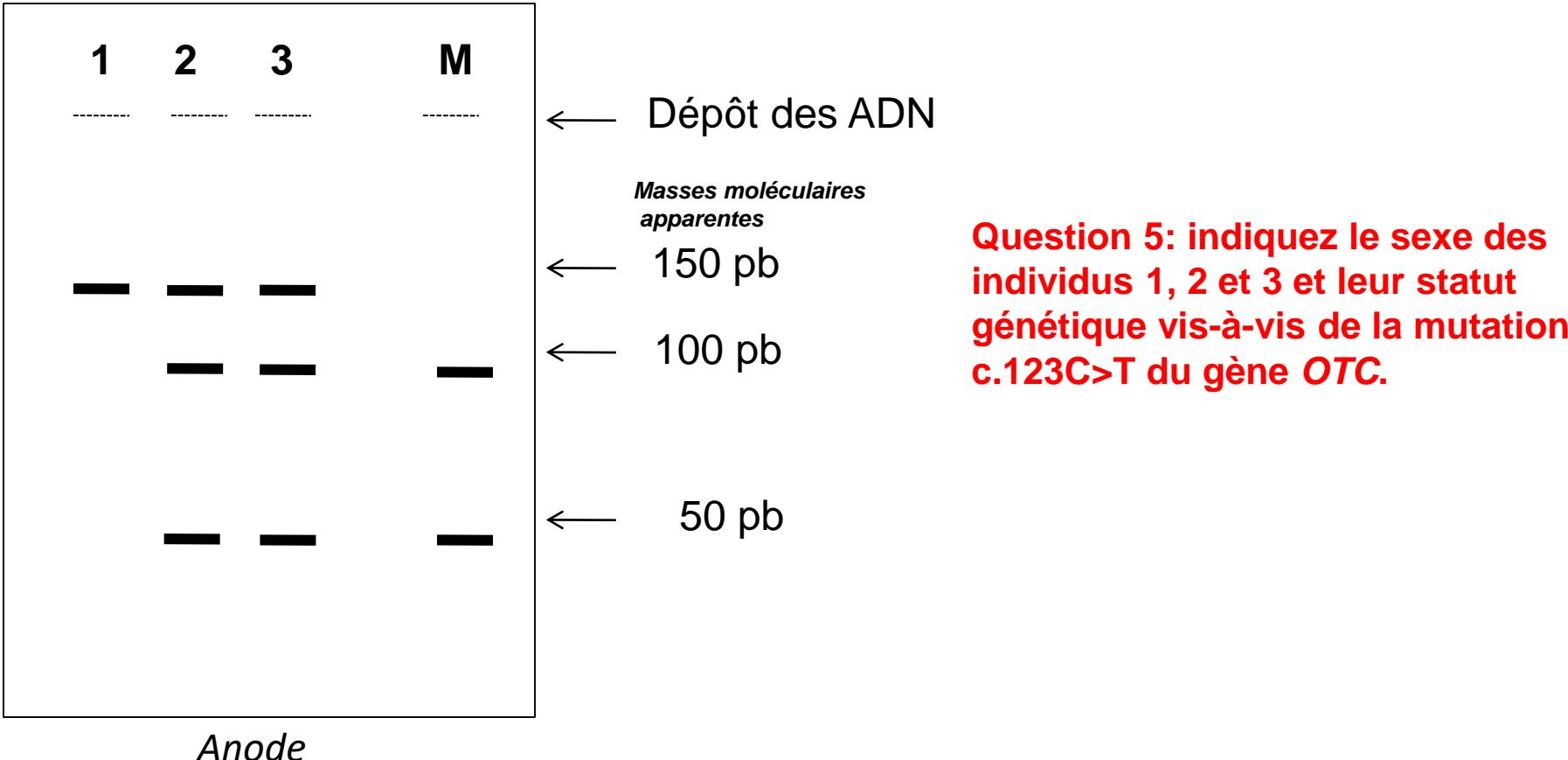
Question 3: déterminer la conséquence d'une mutation c.80G>A

le code génétique										
	Deuxième lettre									
	U	C	A	G						
Première lettre (côté 5')	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
		GUА	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G
codon d'initiation					codon de terminaison					

Problème n°2

Enoncé

Chez un garçon, on identifie une mutation hétérozygote c.123C>T. Afin de rechercher cette mutation chez la sœur du patient et chez leur parents, vous amplifiez leurs ADN par PCR à l'aide du couple d'amorce que vous avez identifié (Question 1). La consultation des bases de données indiquent que l'enzyme de restriction *DpnI* est spécifique de la séquence 5' GATC créé par la mutation c.123C>T. Après PCR, le produit d'amplification est digéré par *DpnI* et les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse (schéma du gel ci-dessous: M= garçon atteint de la maladie)

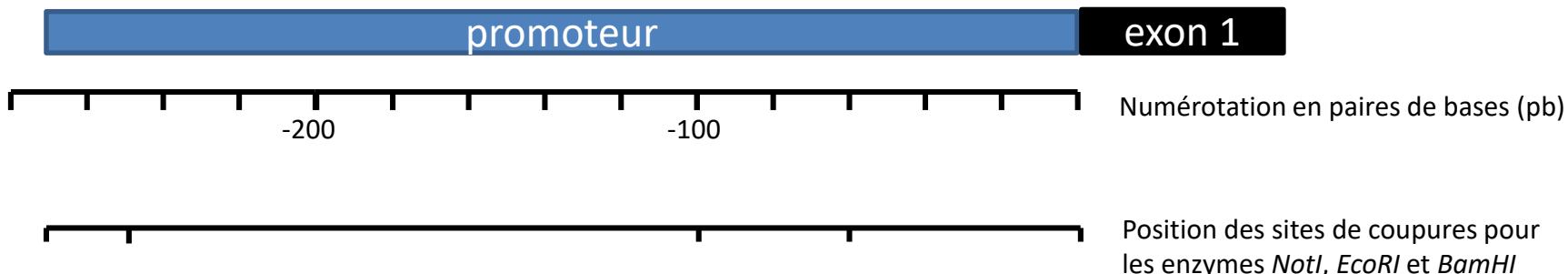


Problème n°3

Problème n°3

Enoncé

Vous disposez de la séquence du promoteur (schéma ci-dessous) du gène *ABC* sur laquelle une analyse bio-informatique indique la présence de 2 éléments *cis*-régulateurs répondant aux facteurs NFkB et C/EBP β

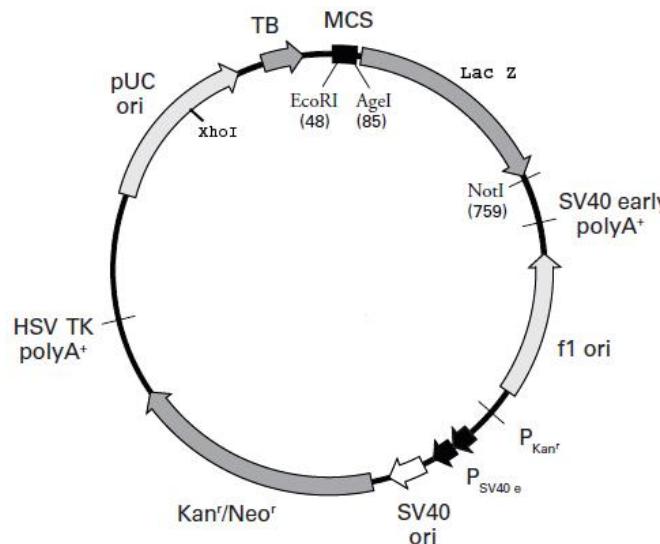


Question 1: quelle est la fonction des facteurs NFkB et C/EBP β ?

Problème n°3

Enoncé

Vous souhaitez mettre en évidence le rôle des facteurs NFkB et C/EBP β sur l'activité du gène *ABC*. Pour cela vous décidez de cloner la séquence promotrice dans un plasmide, directement en amont d'un gène rapporteur dont vous pourrez mesurer l'activité dans des cellules en culture. La carte de ce plasmide dont la taille totale est 2000 paires de bases (pb) est représentée ci-dessous.



La séquence du MCS (position 48 à 85) et de sa partie 5' est indiquée en dessous de la carte.

<u>XbaI</u>	<u>SacI</u>						
<u>BglII</u>	<u>HindIII</u>	<u>EcoRI</u>	<u>PstI</u>	<u>SalI</u>	<u>SacII</u>	<u>ApaI</u>	<u>BamHI</u>
27 AGATCTCGAG	CTCAAGCTTC	GAATTCTGCA	GTCGACGGTA	CCGCGGGCC	GGGATCCACC	GGTC	AgeI
TCTAGAGCTC	GAGTTCGAAG	CTTAAGACGT	CAGCTGCCAT	GGCGCCCGGG	CCCTAGGTGG	CCAG	

Question 2: sur le plasmide, que représente la séquence MCS ?

Problème n°3

Question 3: sur la carte précédente, le gène rapporteur est le gène LacZ , issu de l'opéron lactose. Quelle est l'activité de ce gène et comment peut on la mesurer ?

Enoncé

Pour réaliser le clonage, vous choisissez de couper le plasmide avec l'enzyme *XhoI* pour insérer votre fragment d'ADN (la séquence du promoteur) digéré par la même enzyme. Après l'étape de ligation et de transformation des bactéries, que vous cultivez sur un milieu sélectif, vous n'arrivez pas à récupérer un plasmide contenant votre séquence promotrice.

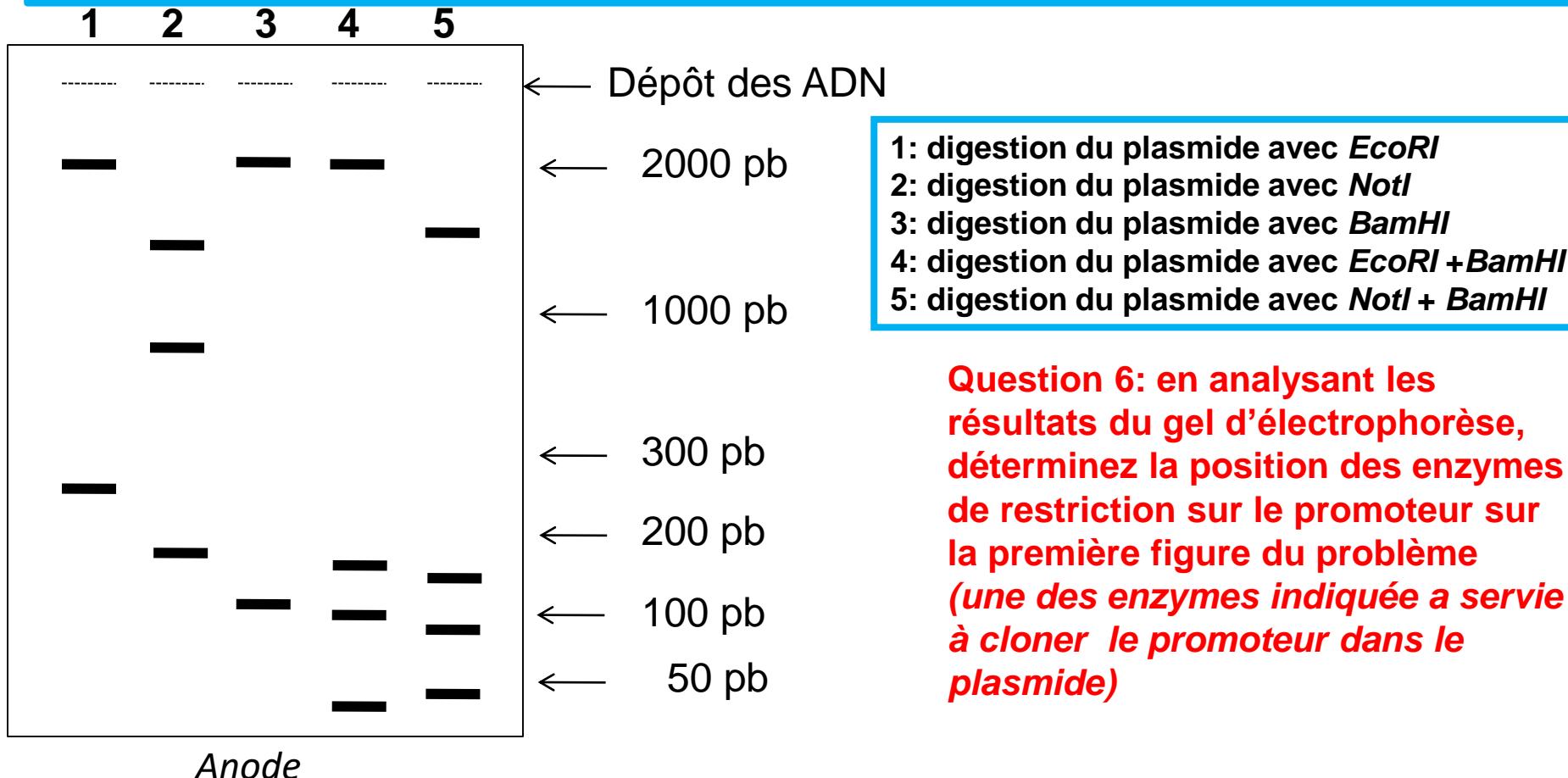
Question 4: la présence de 2 types de séquences est nécessaire à l'obtention de bactéries cultivées sur milieu sélectif comme décrit ci-dessus, lesquelles et ou peuvent elle se trouver sur le plasmide ?

Question 5: en étudiant la carte du plasmide, expliquez l'échec de votre stratégie

Problème n°3

Enoncé

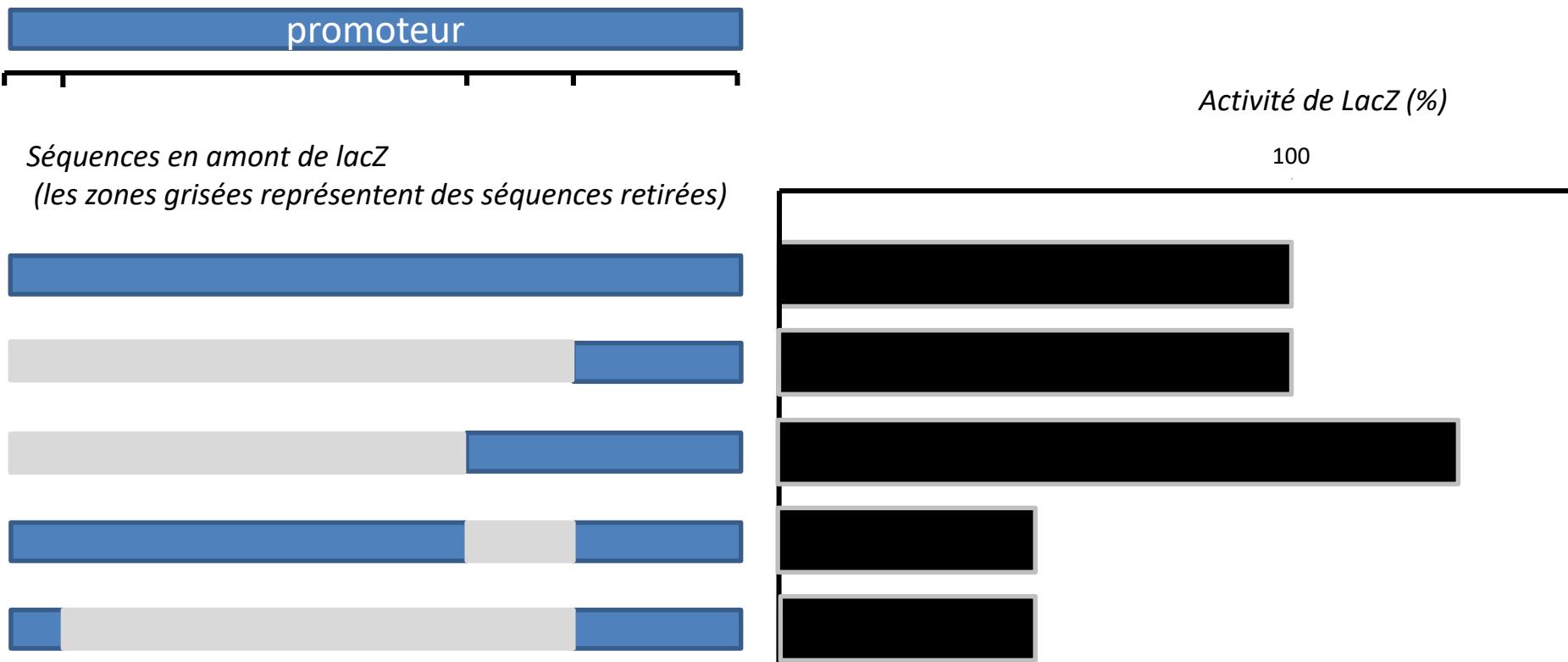
Vous avez changé votre stratégie et réussi à produire un plasmide recombinant contenant le promoteur que vous voulez étudier devant le gène LacZ (c'est-à-dire inséré quelque part dans le MCS). Vous voulez également produire d'autres plasmides contenant des séquences tronquées du promoteur grâce à des digestions avec des enzymes de restriction du plasmide que vous venez de construire. Le résultat de la digestion du plasmide avec les enzymes listées ci-dessous est visualisé sur un gel d'électrophorèse



Problème n°3

Enoncé

Vous avez produits plusieurs plasmides avec des versions tronquées du promoteur. Dans des conditions expérimentales équivalentes, l'activité de LacZ est mesuré pour chacune des séquences du promoteur insérée (figure ci-dessous)



Question 6: à l'aide des données ci-dessus, indiquez quelles sont les fonctions possibles des facteurs NFkB et C/EBP β et leurs sites d'interaction sur le promoteur

Mentions légales

L'ensemble de ce document relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle. Tous les droits de reproduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Ce document est interdit à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées à l'Université Grenoble Alpes (UGA).

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits à l'Université Grenoble Alpes (UGA), et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.