

A- QCM en ligne

B- LE SÉQUENÇAGE DE L'ADN

Étape 1 : Sur papier libre, vous répondrez aux questions posées ci-dessous (4 pages maximum).

Rappel : toute réponse doit être argumentée.

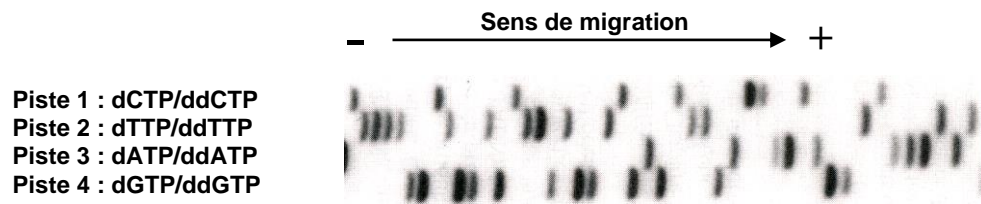
On cherche à déterminer la séquence d'un petit fragment d'ADN en utilisant une réaction enzymatique exploitant les propriétés de l'ADN-polymérase ADN-dépendante purifiée du colibacille.

1- Pour cela on dispose d'une matrice d'ADN linéaire simple brin (dont on cherche à déterminer la séquence), d'une amorce simple brin de vingt nucléotides et des quatre précurseurs dATP, dTTP, dCTP et dGTP. L'amorce est complémentaire aux vingt nucléotides qui se trouvent à l'extrémité 3' du brin matrice. Elle est marquée avec du ^{32}P radioactif à son extrémité 5', pour permettre la détection des fragments d'ADN synthétisés après autoradiographie. On se place dans des conditions expérimentales où l'activité exonucléasique (3'→5') de la polymérase est négligeable. On incube ces réactifs ensemble et on laisse la réaction se dérouler. Quels sont les produits de la réaction ? Faire un schéma légendé.

2 - On remplace maintenant le dATP par un analogue, le ddATP (didésoxyriboadénosine triphosphate) dans lequel le groupement 3'-OH est remplacé par un hydrogène. Comment le ddATP se comporte-t-il dans la réaction de polymérisation ? Quels sont alors les produits de la réaction ? Faire un schéma légendé (Représenter chaque brin d'ADN par une ligne tel que schématisé sur les diapos de cours Chapitre III p.63-64 concernant la réplication de l'ADN dans les cellules, en précisant bien ses extrémités 5' et 3').

3 - On remplace maintenant le dATP par un mélange de dATP et de ddATP dans des proportions relatives de 50 pour 1. Sachant qu'un grand nombre de brin matrice est présent dans chaque tube, quels seront alors les produits de la réaction ?

4 - On réalise maintenant quatre réactions distinctes. Dans chaque réaction, un des précurseurs (dXTP) est remplacé par le mélange dXTP/ddXTP dans des proportions relatives de 50 pour 1. On sépare les produits de la réaction selon leur taille sur un gel d'électrophorèse dans des conditions où les fragments d'ADN sont simple-brin et où les plus petits migrent le plus rapidement vers le pôle « + ». Les conditions de migrations sont telles que deux fragments qui diffèrent d'une base seulement ont des vitesses de migration différentes. Chaque réaction est déposée dans une piste du gel. Le gel est autoradiographié. Le résultat du gel est le suivant :



Donner la séquence du fragment d'ADN qu'on cherche à séquencer en indiquant ses extrémités 5' et 3'.
Justifiez toutes les étapes du raisonnement.