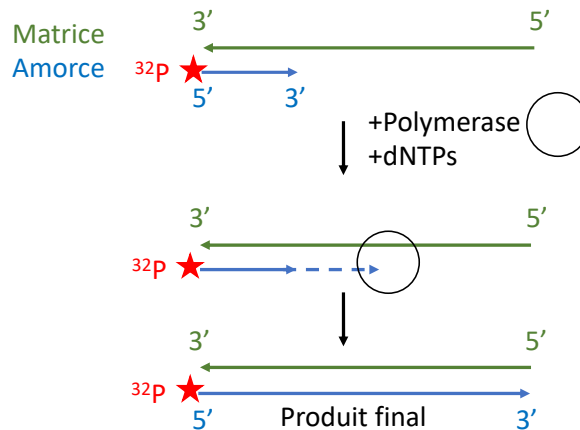


B- LE SÉQUENÇAGE DE L'ADN

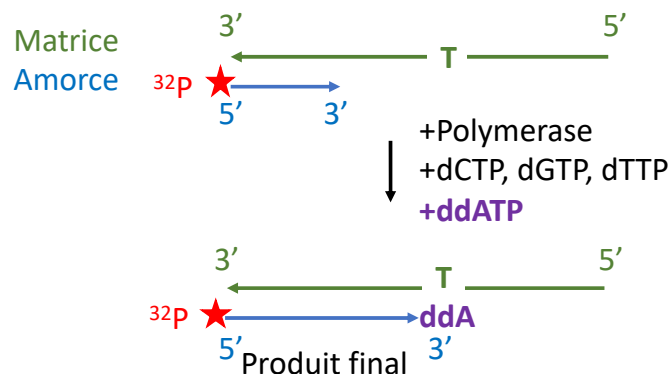
1- ... On incube ces réactifs ensemble et on laisse la réaction se dérouler. Quels sont les produits de la réaction ? Faire un schéma légendé.



L'amorce s'hybride au fragment à séquencer (« template », ou matrice) en orientation antiparallèle et complémentaire. L'ADN polymérase ajoute progressivement des nucléotides à l'extrémité 3' de l'amorce, de façon complémentaire à la séquence de la matrice. En effet, toutes les conditions sont réunies pour la polymérisation avec la présence : d'ADN polymérase, d'un brin matriciel, d'une amorce hybridée et de dNTPs. A la fin de la réaction, on aura donc un ADN double brin comme sur le schéma, dont un des deux brins est marqué radioactivement.

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.

Dans la réaction de polymérisation, le ddATP pourra être incorporé par la polymérase, mais aucun autre nucléotide ne pourra être ajouté après lui, car il n'a pas de groupement 3'OH pour réagir avec un groupement 5'Phosphate du nucléotide suivant. Donc, le ddATP va être incorporé quand la polymérase rencontre le premier T sur le brin à séquencer, et la polymérisation s'arrêtera juste après. On obtient une molécule partiellement répliquée.

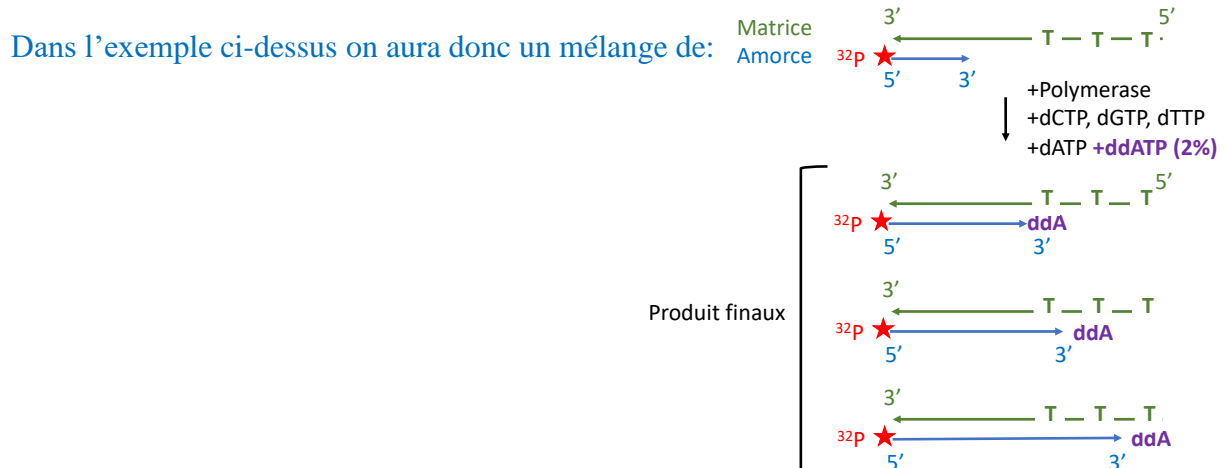


3 - On remplace maintenant le dATP par un mélange de dATP et de ddATP dans des proportions relatives de 50 pour 1. Sachant qu'un grand nombre de brin matrice est présent dans chaque tube, quels seront les produits de la réaction ?

A chaque fois que la polymérase rencontre un T sur le brin matrice à séquencer, elle a :

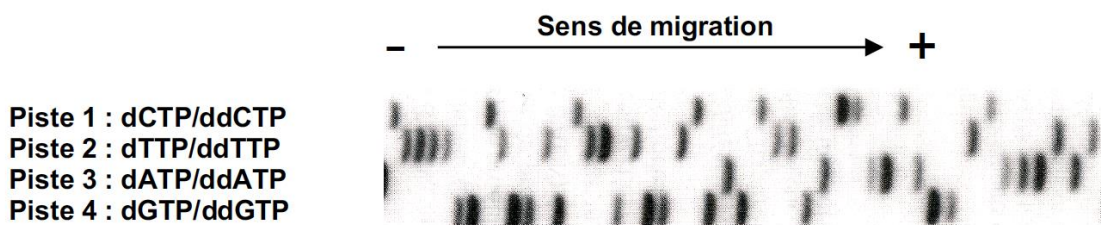
- 49 chances sur 50 d'incorporer un dATP et de continuer la réaction

- 1 chance sur 50 d'incorporer un ddATP et d'arrêter la réaction.



NB : le tube contient un grand nombre de brins matrices séquencés en parallèle (des milliards). Tous les arrêts possibles sont donc réalisés.

4- Donner la séquence du fragment d'ADN séquencé en indiquant ses extrémités 5' et 3'. Justifiez toutes les étapes du raisonnement.



Sur ce gel, on détecte les molécules radioactives. Le brin matrice n'est pas détecté. Les molécules les plus courtes migrent plus rapidement vers le pôle + (on peut les séparer au nucléotide près). Une bande noire dans une piste donnée montre que la polymérisation s'est arrêtée à cet endroit. Il y avait donc le nucléotide complémentaire dans la matrice. Par exemple, la bande noire la plus à droite est dans la piste « dGTP/ddGTP », donc le premier nucléotide polymérisé (après l'amorce) est un G.

On peut lire de la droite vers la gauche la séquence qui a été polymérisée :

5' GTATAAACTGGACAACCAAGTTCGAGCTGGTGTTCGTGGTCGGTTCGTTTCA 3'

On en déduit la séquence recherchée (antiparallèle et complémentaire, 5' écrit à gauche selon les conventions habituelles) = **la séquence de la matrice** :

5' TGAAAACCGACCACGAACACCAGCTCGAACTGGTTGTCCAGTTTATAC 3'

[Cette technique de séquençage repose sur le principe dit des "terminateurs de chaînes"].