**Université Mohamed Khider -Biskra-**

**Faculté des Sciences Exactes et des SNV**

**Département des SNV**

**TD n° 4**

**Exercice 1:**

La séquence d’un ADN bicaténaire, correspondant à un gène, est partiellement reportée ci-contre : **5’** ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC **3’**

1. Ecrire la séquence et l’orientation du second brin de ce fragment.
2. 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 d’ADN et encadrer les sites de restriction en indiquant la position des coupures.
3. Pour chaque enzyme, écrire les séquences des extrémités des molécules d’ADN digérées et préciser le type d’extrémités obtenu.
4. 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 ?

**Exercice 2:**

Un gène de 10 kb a subi une mutation au niveau d’un seul nucléotide : remplacement d’une cytosine par une guanine. On cherche à identifier la mutation en soumettant le gène normal et le gène muté à l’action d’une série d’endonucléases de restriction (indépendamment). Après électrophorèse en gel d’agarose, on obtient les résultats suivants exprimés en kb

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Enzyme utilisée | Spécificité | Gène normal | Gène muté |
| EcoR I | G **↓** AATTC | 7,4 + 2,6 | 7,4 + 2,6 |
| Bgl II | A **↓** GATCT | 10 | 10 |
| Pst I | CTGCA **↓** G | 6 + 4 | 10 |
| Sac I | G **↓** AGCTC | 10 | 6 + 4 |

1. Quelles sont vos conclusions en ce qui concerne l’effet de chaque enzyme sur chaque gène ?

2. A la lumière de ces conclusions, reconstituez une séquence de quelques nucléotides en précisant le siège de la mutation ?

**Exercice 3:**

La séquence d’une partie du gène de la β globine humaine est présentée ci-dessous, elle comprend le promoteur, l’exon 1 et une partie de l’intron 1.

Sur cette séquence de 315 pb, le n° 100 (A) correspond au début de la transcription, de 150 à 153 est l’ATG initiateur de la traduction et le n° 241 est le G de la fin de l’exon 1.

On veut amplifier par PCR le fragment commençant à 36 et se terminant à 302 suivant la numérotation indiquée au dessus du brin codant 5’ → 3’.

1. Quelles amorces seront utilisées?

2. Quels sont les différents constituants nécessaires à la réaction de PCR?

3. Quelles sont les différentes étapes d’une réaction de PCR? A quoi servent-elles?

4. Comment peut-on mettre en évidence le produit de PCR?

5. Quelle est la taille attendue pour le produit de PCR?



**Exercice 4:**

L’hématochromatose est une maladie caractérisée par une surcharge en fer dans le corps. Dans sa forme génétique, la maladie est autosomique récessif due à deux types de mutation dans un gène HFE, la plus fréquente est la mutation Cys282Tyr (transformation de GTGC en GTAC).

Pour savoir si deux enfants A2 et A3 issus d’une famille connue pour cette forme de maladie, sont atteints ou non, vous demander à un laboratoire de biologie moléculaire de faire le diagnostique. 1. Que va faire le laboratoire exactement ? Sachant que ce laboratoire dispose, en plus de plusieurs dispositifs nécessaires aux différentes techniques de :

* Deux amorces qui peuvent se fixer de part et d’autre de ce gène.
* D’une enzyme de restriction *RsaI* qui coupe au niveau de : GT/AC.

2. Le résultat est représenté dans le gel suivant, sachant que A1 représente un témoin sain. Commenter le résultat.

