

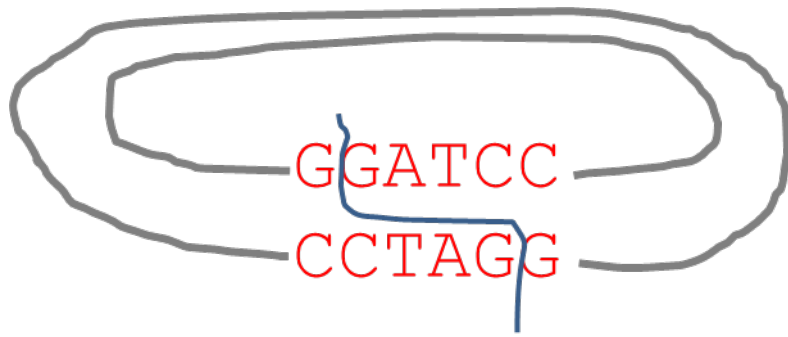
Nota Bene: DO NOT LEARN THE RECOGNITION SEQUENCES OF RESTRICTION ENZYMES. If there are any questions that involve such an enzyme in the exam, you will be given its cleavage site, using the notation in these questions.

Nota Bene: NE PAS APPRENDRE LES SÉQUENCES DE RECONNAISSANCE DES ENZYMES DE RESTRICTION. S'il y a des questions qui impliquent une telle enzyme dans l'examen, vous recevrez son site de clivage, en utilisant la notation dans ces questions.

(introduction)

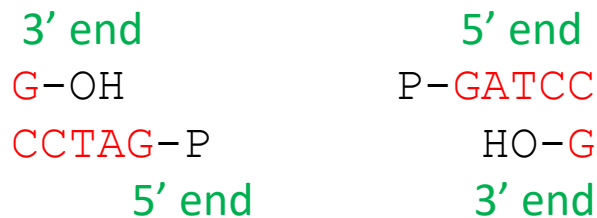
First, a few words about restriction enzymes

Tout d'abord, quelques mots sur les enzymes de restriction



Le cercle gris représente un ADN circulaire qui contient un seul site de reconnaissance BamH1. La ligne indiquait la position de la coupe sur les deux brins. La coupe génère un morceau d'ADN linéaire avec une extrémité 5' et une extrémité 3' sur chaque brin.

BamHI coupe entre 2 résidus G dans chaque brin de la séquence de reconnaissance G/GATCC. Après la coupure de la liaison entre les nucléotides (voir la polymérisation des acides nucléiques dans les molécules de la vie), nous avons

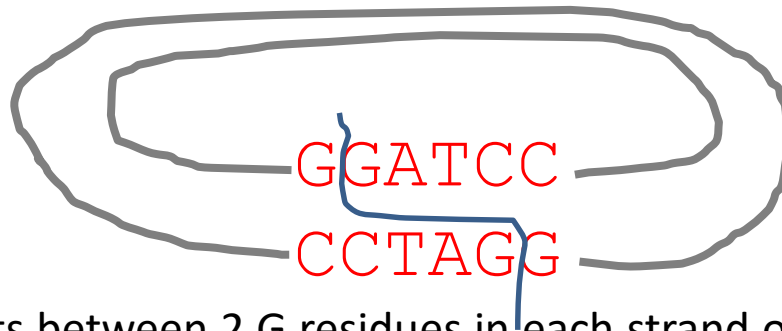


La coupure par BamH1 génère une extrémité simple brin de 4 nt, une extrémité dite «collante» (Sticky end). Les extrémités collantes avec une séquence identique (lue dans le sens 5' à 3') peuvent s'apparier.

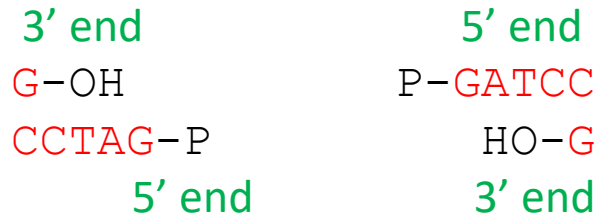
L'ADN ligase peut rejoindre une extrémité collante correctement appariée s'il y a un phosphate 5' et 3' OH disponibles, et de l'ATP est fourni dans la réaction. L'ADN ligase peut également rejoindre les extrémités de l'ADN, sans région simple brin, mais elle est moins efficace.

Toute «extrémité collante» qui a la séquence GATC peut s'apparier à une extrémité collante générée par Bam H1, et peuvent être attachés de manière covalente (ligaturés)

The circle is a DNA fragment cut with Bam. The fragment is a circle with one recognition site for Bam HI.



BamHI cuts between 2 G residues in each strand of the recognition sequence G/GATCC. After cutting of the bond between nucleotides (see polymerisation of nucleic acids in molecules of life lecture) you have



This generates a 4 nt single stranded end, a so-called **sticky end**. Sticky ends with an identical sequence (read in the 5' to 3' direction) can pair with each other.

DNA ligase can rejoin a correctly paired sticky end if there is a 5' phosphate and 3' OH available, and ATP is provided in the reaction. DNA ligase can also join “blunt ends”, with no single stranded region, but it is less efficient.

Any “sticky end” that has the sequence GATC can pair to a sticky end generated by Bam HI, and therefore be ligated to a DNA fragment generated by BamHI.

(Q1)

La/Lesquelles(s) des affirmations suivantes est / est vraie au sujet du systèmes de défense bactérienne CRISPR.

(1.1) La méthylation par la méthylase dam est un marqueur qui indique aux endonucléases cas1 / 2 où cliver l'ADN entrant

(1.2) Le réseau CRISPR est transcrit par l'ARN polymérase II, puis coiffé et polyadénylé, avant d'être traité pour fabriquer des ARN guides pour cibler l'ADN "étranger" que la cellule a rencontré précédemment.

(1.3) cas9, qui a été modifiée pour être incapable de cliver l'ADN, peut être utilisé pour réguler l'activité d'autres gènes en ciblant un régulateur transcriptionnel sur le site où il est lié.

(1.4) La matrice CRISPR (crispr array) contient de courts fragments d'ADN provenant d'ADN étranger, flanqués de séquences répétées. Ces dernières indiquent où traiter l'ARN fabriqué à partir du réseau CRISPR pour produire des ARN guides individuels.

Restriction Enzymes et al

(Q2)

Dans un génome de 1 Mb, avec 25% de A et une distribution égale des bases dans tout le génome, combien de fois les enzymes suivantes devraient-elles le cliver (nombre au plus proche)?

La spécificité de chaque enzyme est présentée sous la forme d'un simple brin: la barre indique le site de clivage.

Eco R1	G/AATTC	
Sma1	GGG/CCC	
Sau3A	N/GATCN	(N = A, C, G, ou T)
Not1	GC/GGCCGC	

(Q3) Pour chaque système de restriction de type II, il existe une enzyme de restriction, qui coupe l'ADN, et une ADN méthylase, qui reconnaît la même séquence, en méthylant les résidus C ou A pour empêcher le clivage. Cela protège l'ADN de l'hôte. Vrai faux.

(Q4)

La bactérie *E. coli* type RR exprime l'enzyme de restriction Eco RII, qui reconnaît la séquence NN/GGACCNN ou NN/GGTCCNN. Vous introduisez dans *E. Coli* (typeRR) un plasmide (minichromosome circulaire qui porte des gènes qu'on veut introduire dans une cellule dans le labo) qui exprime l'enzyme de restriction HindIII de la bactérie *Hemophilus influenzae* (souche D). La séquence reconnue par HindIII est A/AGCTT. Le gène est exprimé à partir d'un promoteur régulé (vous décidez si l'expression du gène est induit ou pas). L'introduction initiale du plasmide dans la souche *E. coli* RR est effectuée dans des conditions où le promoteur n'est pas induit. Lorsque le promoteur est induit, toutes les cellules sont tuées rapidement, parce que leur génome est coupé en morceaux par Hind III.

Expliquez pourquoi HindIII mais pas EcoRII arrive à digérer le génome de *E.coli* (type RR).

(5)

Un fragment d'ADN est généré en coupant un morceau d'ADN circulaire à l'aide de l'endonuclease de restriction BamH1 (G/GATCC). L'ADN original contient une seule copie de la séquence GGATCC. Un deuxième morceau d'ADN est généré en coupant un plus grand morceau d'ADN circulaire en fragments avec l'endonuclease de restriction Bgl II (A/GATCT). L'un de ces fragments est purifié et ligaturé au fragment d'ADN généré par la coupure avec Bam HI, ci-dessus. Admettons que ces deux molécules puissent être reliées ensemble pour former une seule molécule circulaire et que nous puissions examiner cette molécule séparément de l'une ou l'autre des molécules de départ ; admettons également que la grande majorité des molécules reliées contiennent un morceau d'ADN coupé par BamH1 et un morceau d'ADN coupé par BglII. Si cet ADN relié est maintenant digéré à nouveau avec BamH1, quelle fraction des molécules peut être recoupée avec BamH1 ? Si l'ADN est à nouveau digéré avec Bgl II, quelle fraction des molécules peut être recoupée avec Bgl II ?

A fragment of DNA is generated by cutting a piece of circular DNA using the restriction endonuclease BamH1 (G/GATCC). The original DNA contains a single copy of the sequence GGATCC.

A second piece of DNA is generated by cutting a larger piece of circular DNA into fragments with the restriction endonuclease Bgl II (A/GATCT). One of these is purified and ligated to the DNA fragment generated by cutting with Bam HI, above.

Let us assume that these two molecules can be ligated together to form a single, circular molecule, and that we can examine this molecule separately from either of the starting molecules; let us also assume that the vast majority of religated molecules contain one piece of the BamH1 cut DNA joined to one piece of the BglII cut DNA. If this ligated DNA is now digested again with BamH1, what fraction of the molecules can be recut with BamH1? If the DNA is digested again with Bgl II, what fraction of the molecules can be recut with Bgl II?

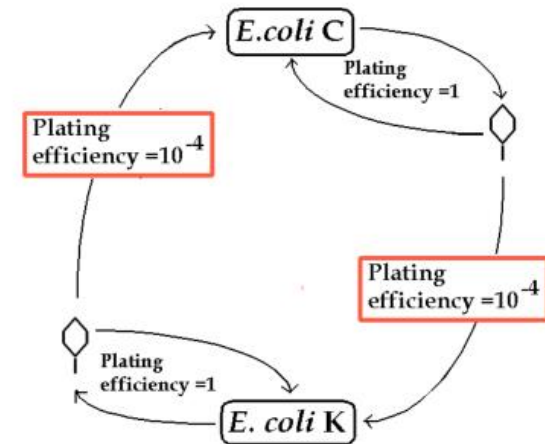
Q6 is there to make you think, perhaps for a minute or two...think in terms of restriction enzymes.....

And Q7 is a harder version of question 5 (in case you found it too easy)

(6)

- *E. coli* K and C strains
- Bacteriophage lambda (λ)
 10^{10} pfu/1ml

Phage plaques on
a lawn of bacteria



Phage does not absorb to „new” host – false
Phage DNA does not enter into „new” host – false

Dans l'expérience présentée ci-dessus, le bactériophage lambda est utilisé pour infecter deux souches de *E. coli*. Lorsque les phages cultivés sur *E. coli* C sont utilisés pour infecter *E. coli* K, l'infection est 10 000 fois moins efficace que chez *E. coli* C. Cependant, les phages ainsi produits infectent *E. coli* K 10000 fois mieux qu'avant, et sont 10000 fois moins efficaces pour infecter *E. coli* C. Les expériences non présentées indiquent que cela n'est pas dû à une incapacité du phage à se fixer à la cellule hôte. L'injection d'ADN dans la cellule hôte se déroule également de manière égale dans les deux hôtes.

Expliquez ces résultats.

(7)

Un morceau d'ADN est coupé avec l'endonucléase de restriction BamH1 (G/GATCC).

Un deuxième morceau d'ADN est coupé avec l'enzyme BglII (A/GATCT).

Un troisième morceau d'ADN est coupé avec de l'AvrII (C/CTAGG).

Un quatrième morceau d'ADN est coupé avec Sau3A (N/GATCN) N = A, C, G, ou T.

Lesquelles de ces extrémités enzymatiques peuvent s'apparier pour permettre la ligation ?

Parmi ceux qui peuvent être reliés, lesquels peuvent être recoupés après la ligation et avec quelle enzyme?