

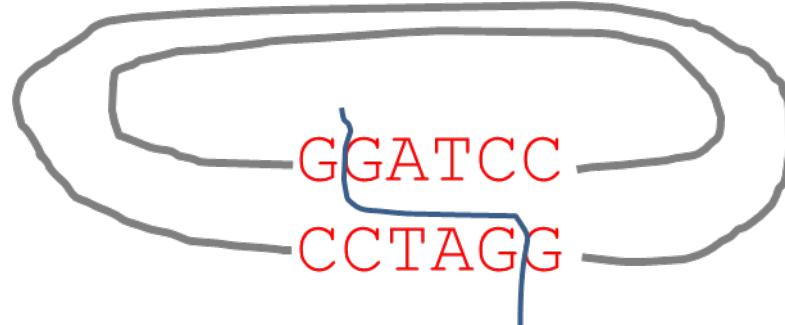
Nota Bene: DO NOT LEARN THE RECOGNITION SEQUENCES OF RESTRICTION ENZYMES. If there are any questions that involve such an enzyme in the exam, you will be given its cleavage site, using the notation in these questions.

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.

(intro)

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

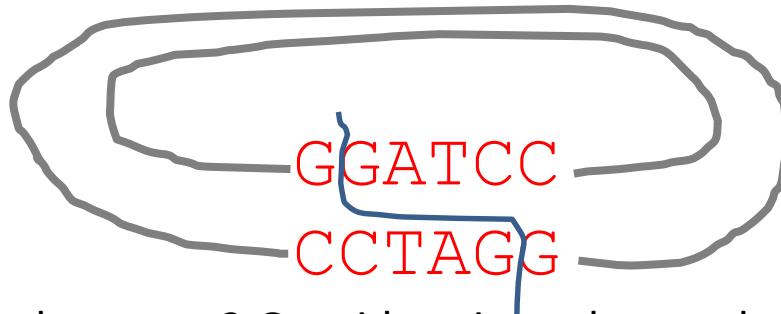
3' end		5' end
G-OH	P-	GATCC
CCTAG-P		HO-G
5' end		3' end

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.

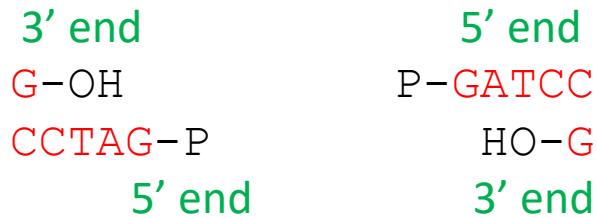
L'ADN ligase peut rejoindre une extrémité collante correctement appariée s'il y a un phosphate 5' et 3' OH disponibles, et de l'ATP est fourni dans la réaction. L'ADN ligase peut également rejoindre les extrémités de l'ADN, sans région simple brin, mais elle est moins efficace.

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 H1, and therefore be ligated to a DNA fragment generated by BamH1.

(Q1)

La/Lesquelle(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. **False. In E.coli, dam is involved in controlling replication origin sequestration and in strand recognition during repair.**

(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. **False: E.coli does not cap or polyadenylate. This is how miRNA precursors are made in eukaryotic cells.**

(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. **True**

(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. **True**

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
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.

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

Not1 GC/GGCCGC

4 base sequence is $(\frac{1}{4})^4 = 1/256$ bases so no of sites is: 3906

6 base sequence is $(\frac{1}{4})^6 = 1/4096$ bases so no of sites is: 244

8 base sequence is $(\frac{1}{4})^8 = 1/65536$ bases so no of sites is: 15

(Q4) La bactérie E. coli type RR exprime l'enzyme de restriction Eco RII, qui reconnaît la séquence NN/GGACNN 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 morceux par Hind III.

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

(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 méthyitant 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/GGACNN 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 morceux par Hind III.

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

The *E. coli* RR cells express a methylase that blocks EcoRII cleavage by methylating its recognition sequence.

The cells have no Hind III methylase so the E.coli genome is rapidly digested when the expression of Hind III is induced.

(5)

Un fragment d'ADN est généré en coupant un morceau d'ADN circulaire à l'aide de l'endonucléase 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'endonucléase de restriction Bgl II (A/GATCT). L'un de ces fragments est purifié et ligaturé au fragment d'ADN généré par la coupe 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 BgIII. 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 digérée 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.

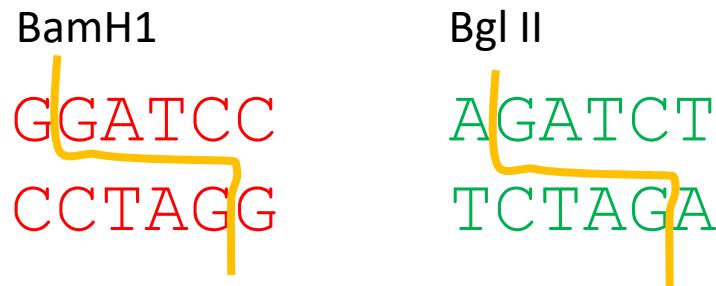
A second piece of DNA is generated by cutting a larger piece of circular DNA into fragments with the restriction endonuclease Bgl II (A/GATCT). One of these is purified and ligated to the DNA fragment generated by cutting with Bam HI, above.

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 BgIII 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?

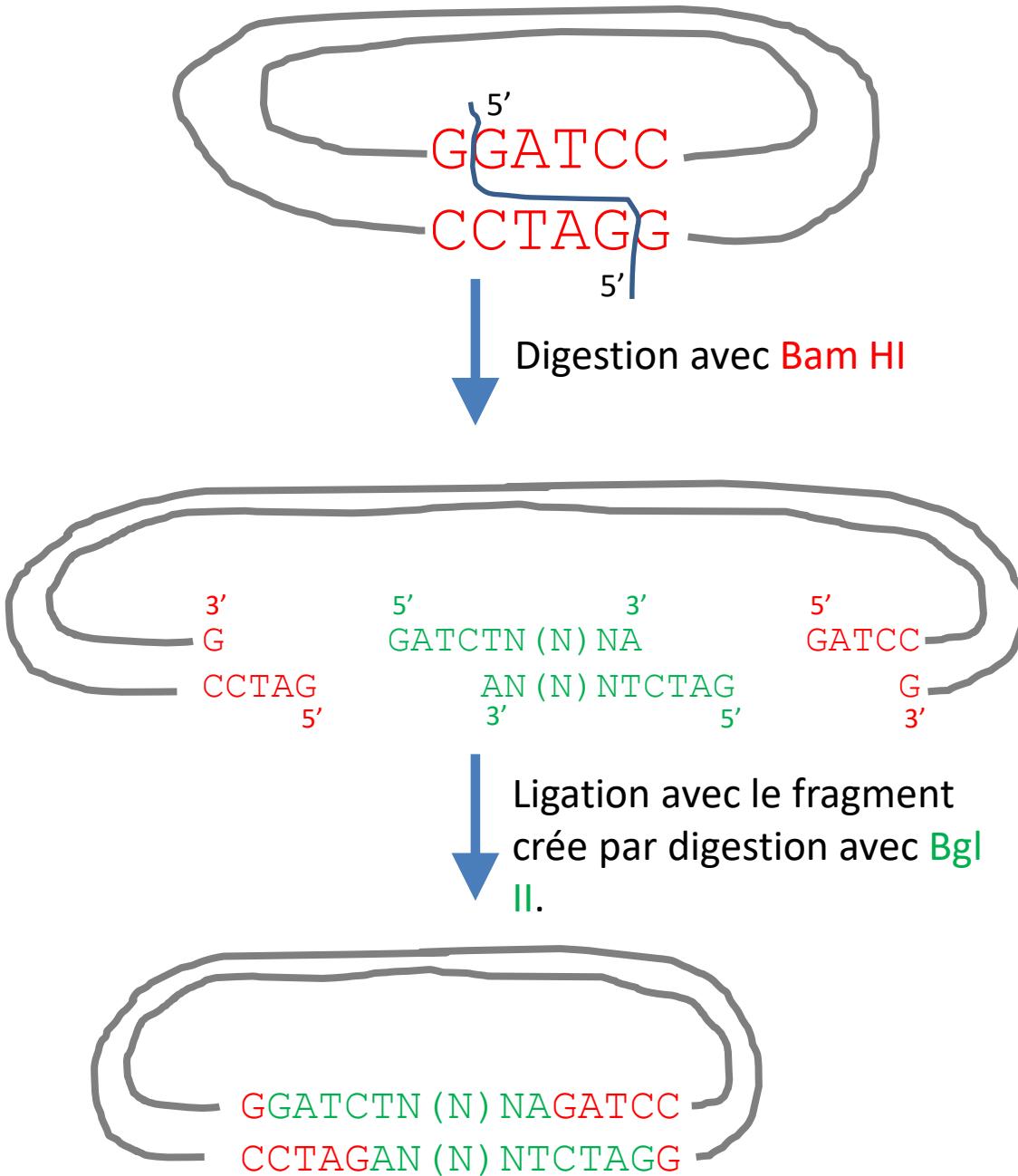
and the answer is... et la réponse est ...

Q5 The BamH1 and Bgl II sticky ends can be religated (both are GATC), but the different adjacent nucleotides mean that neither enzyme can recut afterwards (see following slide)

Les extrémités collantes BamH1 et Bgl II peuvent être religaturées (les deux sont GATC), mais les différents nucléotides adjacents signifient que ni BamH1, ni Bgl II peut recouper par la suite (voir le diapositive suivante).

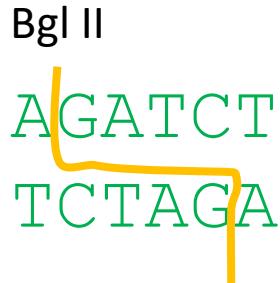
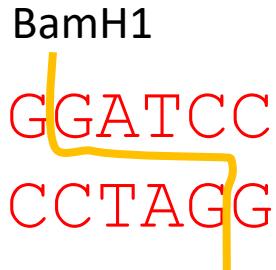


Let's look in more detail



The red circle represents a circular DNA which contains a single BamH1 recognition site. The line indicated the position of the cut on the two strands. The cut generates a linear piece of DNA with a 5' end and a 3' end. The sites are shown on the diagrams. You add to it a piece of DNA generated by Bgl II (green) A/GATCT. The DNA fragments can anneal via their sticky ends, and DNA ligase joins them together. The result is shown below.

Le cercle rouge représente un ADN circulaire qui contient un seul site de reconnaissance BamH1. La ligne indique 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'. Les sites sont représentés sur les schémas. Vous y ajoutez un morceau d'ADN généré par Bgl II (vert) A/GATCT. Les fragments d'ADN peuvent s'apparier via leurs extrémités collantes (GATC), et l'ADN ligase les relie ensemble. Le résultat est illustré ci-dessous.



After joining fragments made with BamH1 and Bgl II, we have

Après avoir joint des fragments réalisés avec BamH1 et Bgl II, nous avons

GGATCT
CCTAGA

This sequence cannot be recognised by either of the two enzymes. The central 4 nucleotides are the same but the adjacent ones are different.

Cette séquence ne peut être reconnue par aucune des deux enzymes.
Les 4 nucléotides centraux sont les mêmes mais les adjacents sont différents.

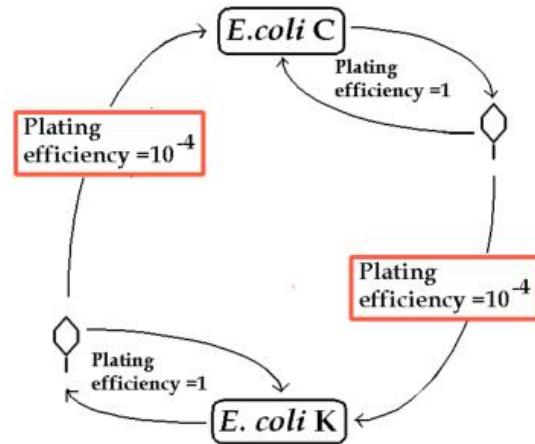
Q6 is there to make you think...for the answer, think in terms of restriction-modifications systems.....

And Q7 is a harder version of question 5 (in case you found it too easy – do it at your leisure....)

(Q6)

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

Phage plaques on
a lawn of bacteria

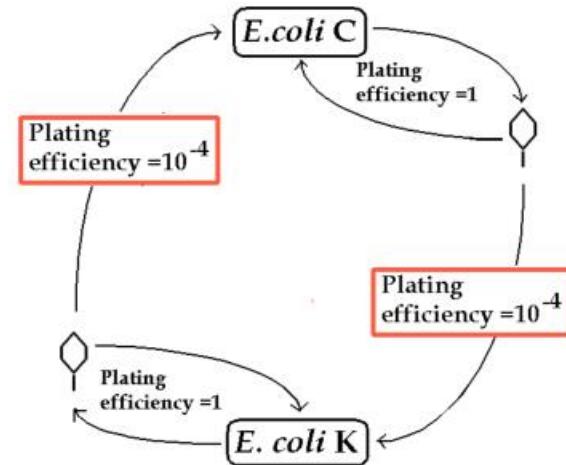


Phage does not absorb to „new” host – **false**
Phage DNA does not enter into „new” host – **false**

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.

(Q6)

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



Phage does not adsorb to „new” host – **false**

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

Les phages produits sur *E. coli* C ont été modifiés par la R-M méthylase de la souche C afin de protéger l’ADN de l’endonucléase de restriction de la souche C. Le système K de souche K a une spécificité de séquence différente. Ainsi, les phages fabriqués en C ne sont pas protégés et les injections d’ADN ne doivent pas aboutir à une infection productive car l’ADN introduit est dégradé. Cependant, le génome des phages qui échappent à la dégradation a été méthylique par l’hôte K et est donc protégé en cas de réinfection de K. Ils ne sont pas porteurs de méthylation du C et sont donc sensibles au système RM de C si ils sont utilisés pour infecter *E. coli* C

Voici comment la restriction - modification a été découverte.

(Q7)

A piece of DNA is created by cut with the restriction endonuclease BamH1 (G/GATCC).
A second piece of DNA is created by cutting with the Enzyme BglII (A/GATCT).
A third piece of DNA is created by cutting with AvrII (C/CTAGG).
A fourth piece of DNA is created cutting with Sau3A (N/GATCN)
Which of these enzyme ends can pair with another to permit ligation. Of those which can be religated, which can be recut after ligation, and with which enzyme?

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

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

Un troisième morceau d'ADN est créé en coupant avec AvrII (C/CTAGG).

Un quatrième morceau d'ADN est créé en coupant avec Sau3A (N/GATCN)

Laquelle de ces extrémités d'ADN peut s'apparier avec une autre pour permettre la ligature. De ceux qui peuvent être religaturés, qui peuvent être recoupés après ligature, et avec quelle enzyme?

and the answer is... et la réponse est ...

	religate?	Recut afterwards?			
		BamH1	Bgl II	Sau3A	AvrII
BamH1-Bam H1	✓	YES 100%	NO	YES 100%	NO
BamH1-Bgl II	✓	NO	NO	YES 100%	NO
BamH1-Avr II	X				
BamH1-Sau3A	✓	YES 25%*	NO	YES 100%	NO
Bgl II-Bgl II	✓	NO	YES 100%	YES 100%	NO
Bgl II-Avr II	X				
Bgl II-Sau3A	✓	NO	YES 25% **	YES 100%	NO
Avr II-Avr II	✓	NO	NO	NO	YES
Avr II-Sau3A	X				
Sau3A-Sau3A	✓	YES ≈6%***	YES ≈6%***	YES 100%	NO

The AvrII end cannot pair with GATC, so no ligation is possible, except with DNA cut with Avr II

The BamH1 and Bgl II sticky ends can be religated (both are GATC), but the different adjacent nucleotides mean that neither enzyme can recut afterwards (see following slides. In the case of Sau3A ligated to a BamH1, or Bgl II end,

*Sau3A fragments followed by C will recut if put into a Bam site (25% of possible fragments); see next slides

**Sau3A fragments followed by T will recut if put into a BglII site (25% of possible fragments); see explanation for BamH1

***see next slides

L'extrémité AvrII ne peut pas s'apparier avec GATC, donc aucune ligature n'est possible avec les extrémités générées par les autres enzymes, sauf avec l'ADN coupé avec Avr II

Les extrémités collantes BamH1 et Bgl II peuvent être religaturées (les deux sont GATC), mais les différents nucléotides adjacents signifient que ni BamH1, ni Bgl II peut recouper par la suite (voir les diapositives suivantes).

Dans le cas de Sau3A ligaturé à une extrémité BamH1 ou Bgl II,

* Les fragments Sau3A suivis de C recouperont s'ils sont placés dans un site Bam (25% des fragments possibles)

** Les fragments Sau3A suivis de T recouperont s'ils sont placés dans un site BglII (25% des fragments possibles)

*** see next slides

and the answer is... et la réponse est ...

The AvrII end cannot pair with GATC, so no ligation is possible, except with DNA cut with Avr II
The BamH1 and Bgl II sticky ends can be religated (both are GATC), but the different adjacent nucleotides mean that neither enzyme can recut afterwards (see following slides. In the case of Sau3A ligated to a BamH1, or Bgl II end,

*Sau3A fragments followed by C will recut if put into a Bam site (25% of possible fragments);
see next slides

**Sau3A fragments followed by T will recut if put into a BgIII site (25% of possible fragments);
see explanation for BamH1

***see next slides

L'extrémité AvrII ne peut pas s'apparier avec GATC, donc aucune ligature n'est possible avec les extrémités générées par les autres enzymes, sauf avec l'ADN coupé avec Avr II

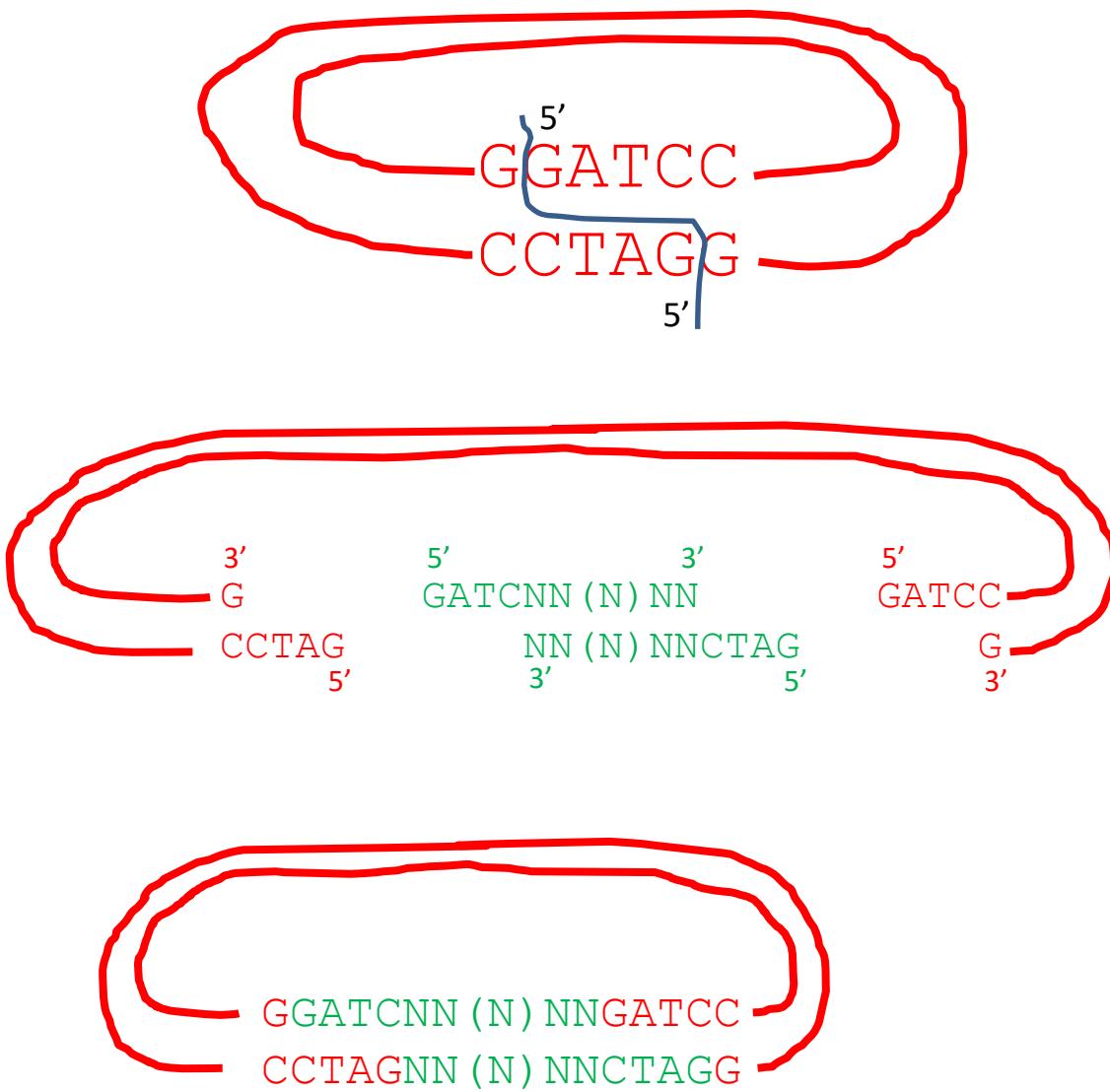
Les extrémités collantes BamH1 et Bgl II peuvent être religaturées (les deux sont GATC), mais les différents nucléotides adjacents signifient que ni BamH1, ni Bgl II peut recouper par la suite (voir les diapositives suivantes).

Dans le cas de Sau3A ligaturé à une extrémité BamH1 ou Bgl II,

* Les fragments Sau3A suivis de C recouperont s'ils sont placés dans un site Bam (25% des fragments possibles)

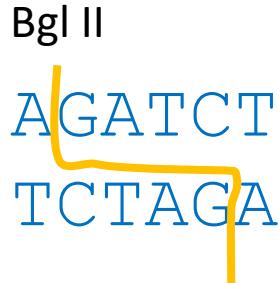
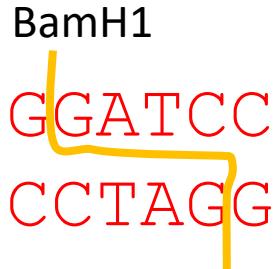
** Les fragments Sau3A suivis de T recouperont s'ils sont placés dans un site BgIII (25% des fragments possibles)

*** see next slides



The red circle represents a circular DNA which contains a single BamH1 recognition site. The line indicated the position of the cut on the two strands. The cut generates a linear piece of DNA with a 5' end and a 3' end. The sites are shown on the diagrams. You add to it a piece of DNA generated by Sau3A (green). The DNA fragments can anneal via their sticky ends, and DNA ligase joins them together. The result is shown below.

Le cercle rouge représente un ADN circulaire qui contient un seul site de reconnaissance BamH1. La ligne indique 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'. Les sites sont représentés sur les schémas. Vous y ajoutez un morceau d'ADN généré par Sau3A (vert). Les fragments d'ADN peuvent recuire via leurs extrémités collantes, et l'ADN ligase les relie ensemble. Le résultat est illustré ci-dessous.



After joining fragments made with BamH1 and Bgl II, we have

Après avoir joint des fragments réalisés avec BamH1 et Bgl II, nous avons

GGATCT
CCTAGA

This sequence cannot be recognised by either of the two enzymes. The central 4 nucleotides are the same but the adjacent ones are different. The sequence can, however still be cut by Sau3A, which recognises N/GATCN

Cette séquence ne peut être reconnue par aucune des deux enzymes. Les 4 nucléotides centraux sont les mêmes mais les adjacents sont différents. La séquence peut cependant être coupée par Sau3A, qui reconnaît N / GATCN

5'
N / GATCN Recognition sequence of Sau3A
NCTAG / N
5'

IF

5'
G / GATCC Recognition sequence of BamH1
CCTAG / G
5'

Is ligated to

GGATCN The ligation of the two fragments will create a BamH1
CCTAGN site IF the nucleotide that follows the Sau3A site is
a C

GGATCC 100% of Sau3A ends can be ligated into a BamH1 site
CCTAGG and 1/4 of products can be recut.

Since the recognition sequence is palindromic, it gives the same result if we reverse the drawing

G / GATCC Recognition sequence of BamH1
CCTAG / G
5' IF

N / GATCN Recognition sequence of Sau3A
NCTAG / N
5'

Is ligated to

NGATCC
NCTAGG

The ligation of the two fragments will create a BamH1 site IF the nucleotide that follows the Sau3A site is a C

GGATCC
CCTAGG

100% of Sau3A ends can be ligated into a BamH1 site and 1/4 of products can be recut.

How can ligating Sau3A fragments create a BamH1 site?

N / GATCN

NCTAG / N

IF

N / GATCC

NCTAG / G

A piece of DNA cut with Sau3A had a C following the GATC
(1/4 of fragments)

Is ligated to

G / GATCN

CCTAG / N

A piece of DNA cut with Sau3A had a G in front the GATC
(1/4 of fragments)

G / GATCC

CCTAG / G

The result will create a BamH1 site

1/4 x 1/4 is 1/16 ≈ 6% of the time