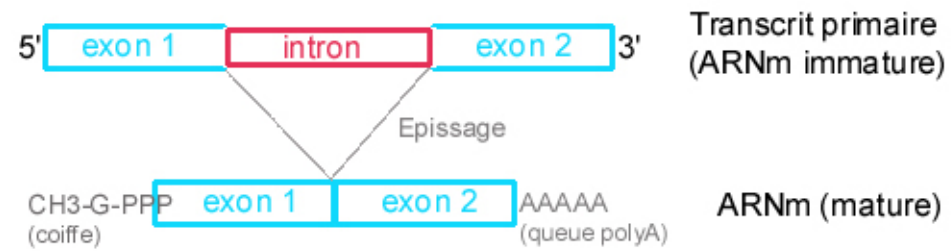


Travaux dirigés de Biologie Moléculaire

9

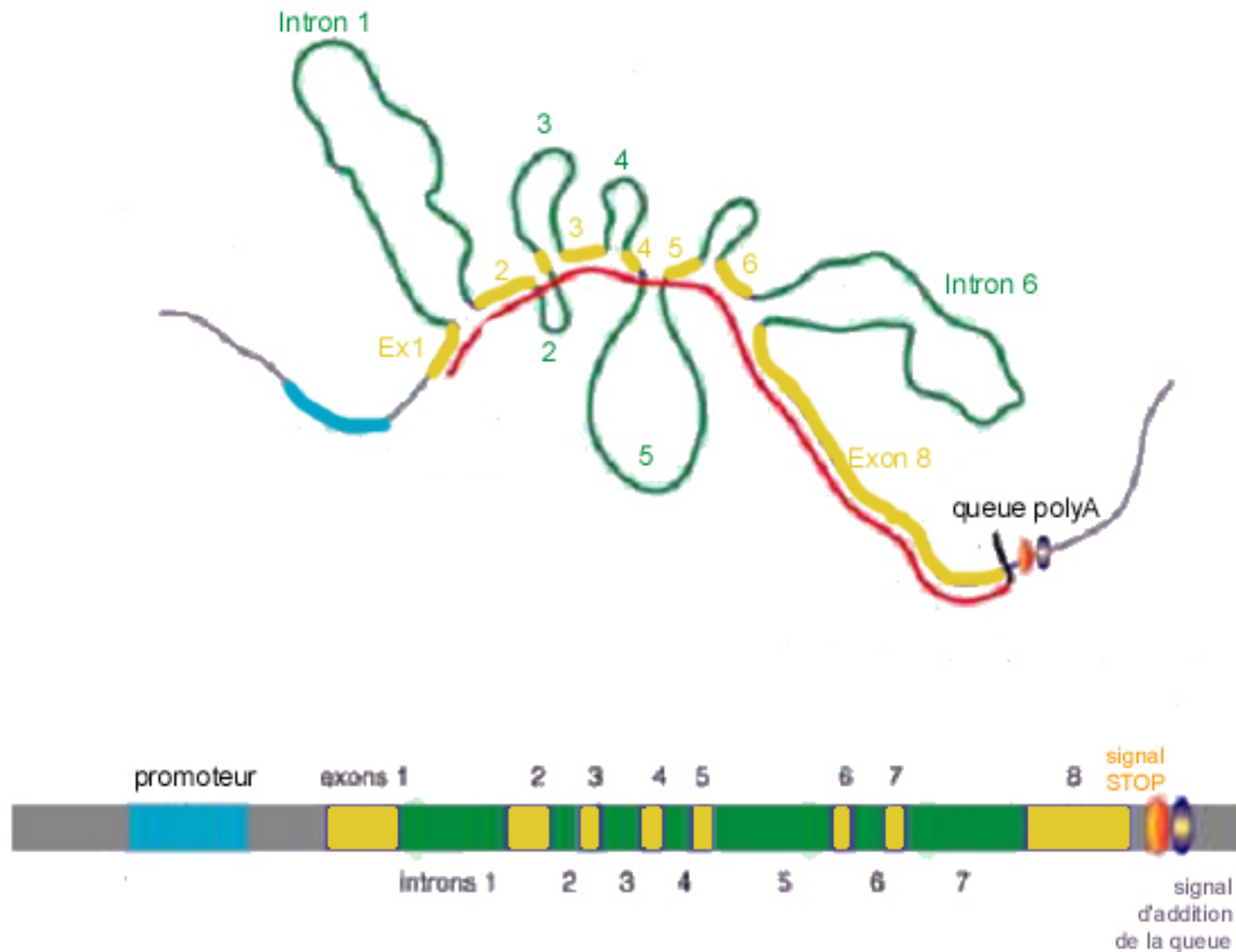
semaine 11

Exercice 25

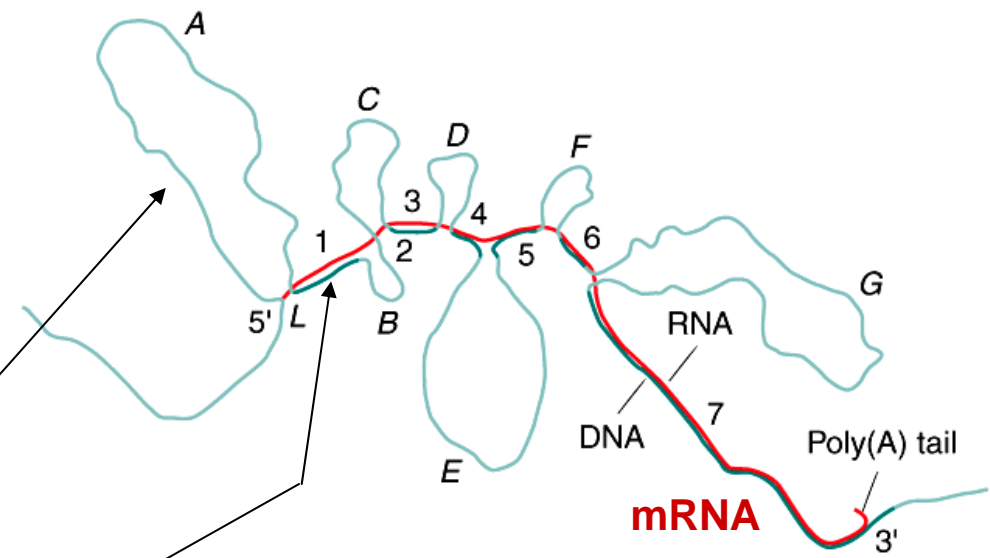
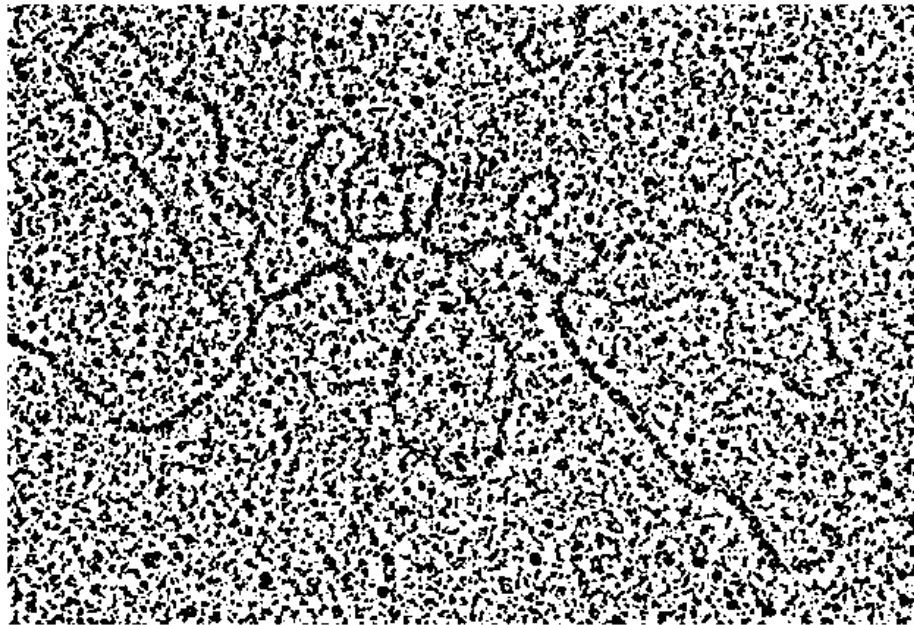


Exercice 25

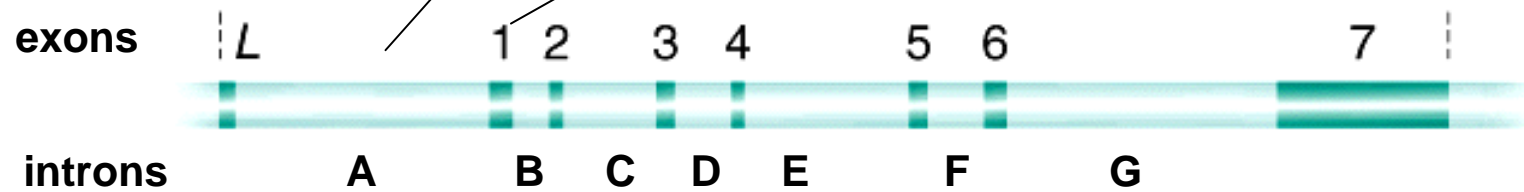
Gène de l'ovalbumine de poule



Exercice 25 : exon/intron



(b)



Exercice 26

Southern blot => Transfert d'ADN depuis un gel, puis immobilisation sur une membrane et hybridation avec une sonde

Hybridation : Formation de **duplex** entre séquences **monocaténares complémentaires** entre un acide nucléique à tester et une sonde

Dénaturation de l'ADN immobilisé : brins monocaténares

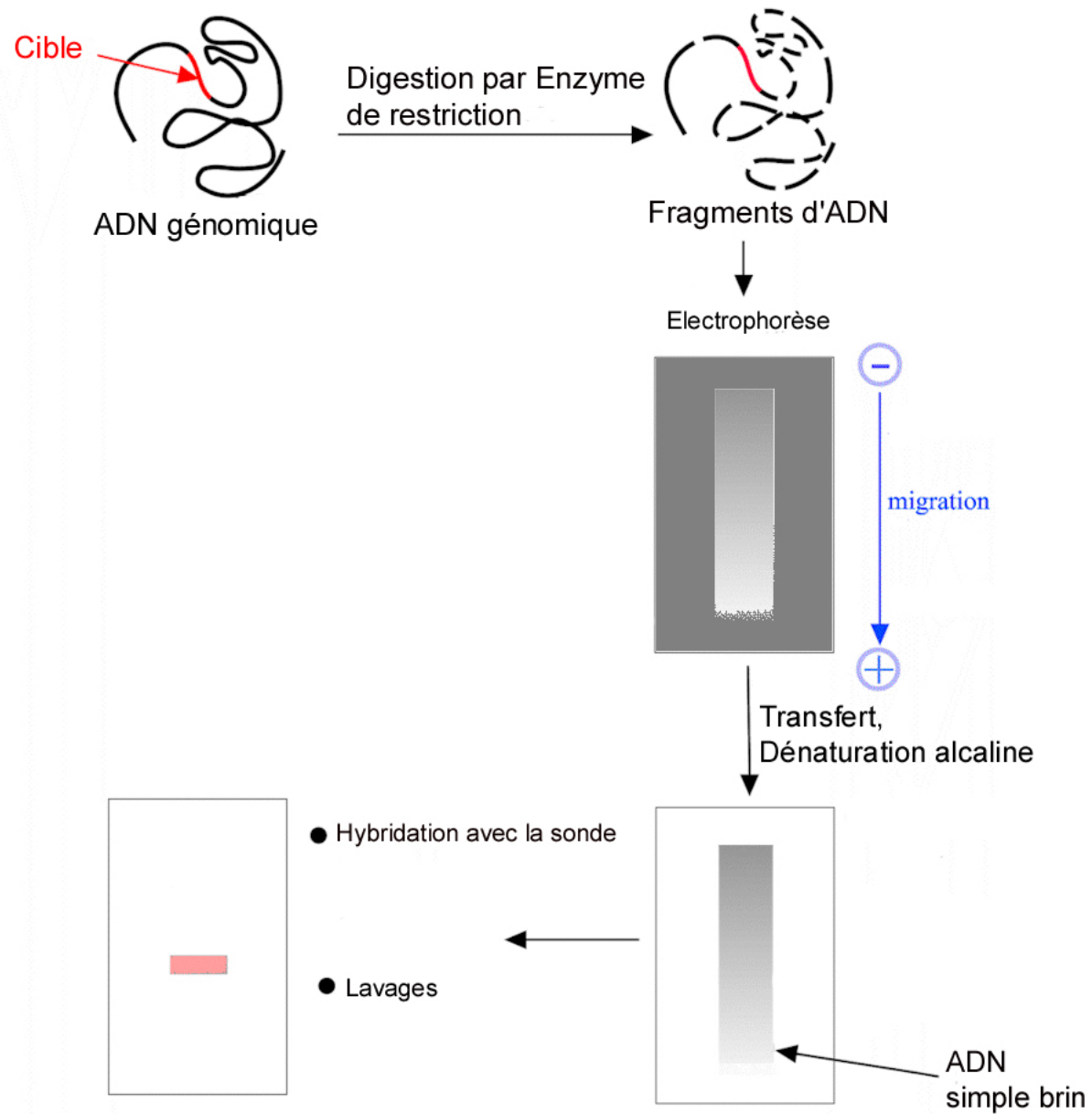
Après migration, le gel d'agarose est trempé en bain alcalin (NaCl + NaOH)

Sonde : ARN ou ADN monocaténaire dont la séquence est complémentaire (totale ou avec un très haut degré d'homologie) avec la séquence à identifier

Pour être repérable, la sonde doit être marquée

- Élément radioactif : P³²
- Marqueur biochimique : « sonde froide »
 - couplage d'un fluorochrome => fluorescence
 - couplage d'une enzyme => addition substrat, couleur!

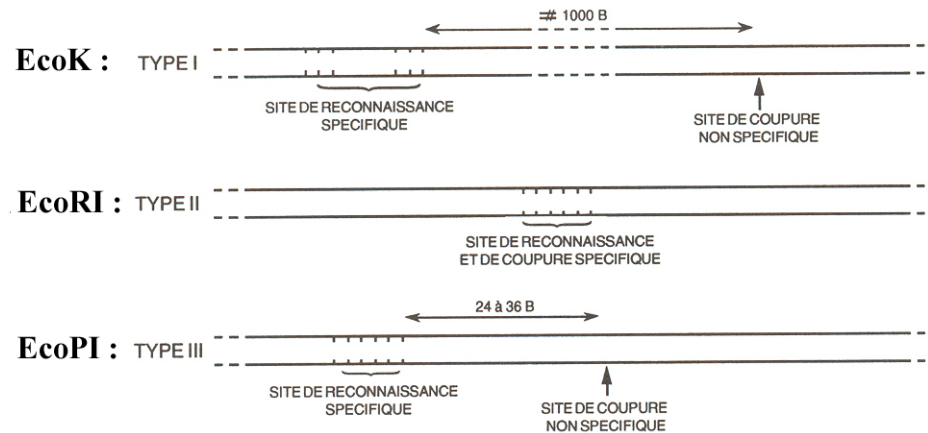
Southern blot



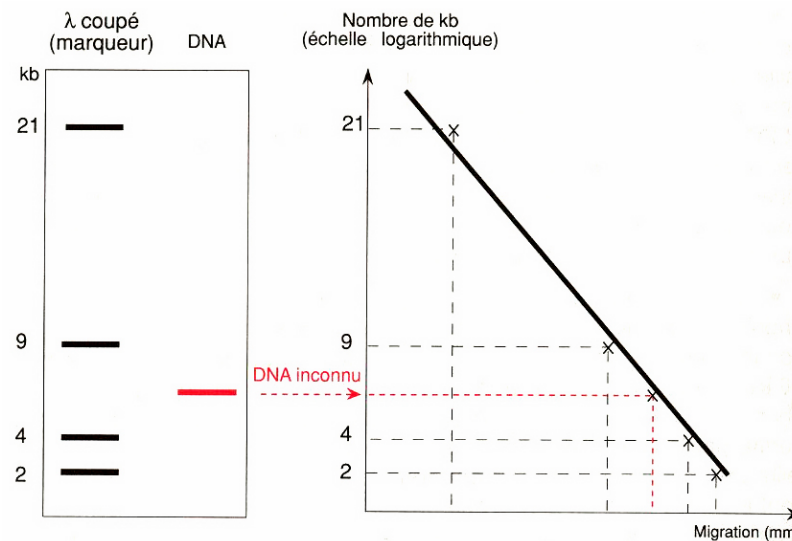
Exercice 26, enzyme de restriction

Endonucléase :

reconnait une séquence nucléotidique spécifique d'ADN double brin



Type d'enzyme utilisée au laboratoire



Exercice 26

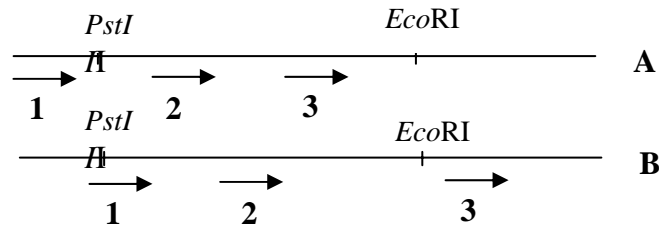


Figure 1 :
 les 3 sondes nucléotidiques 1, 2 et 3.
 A : expérience 1
 B : expérience 2

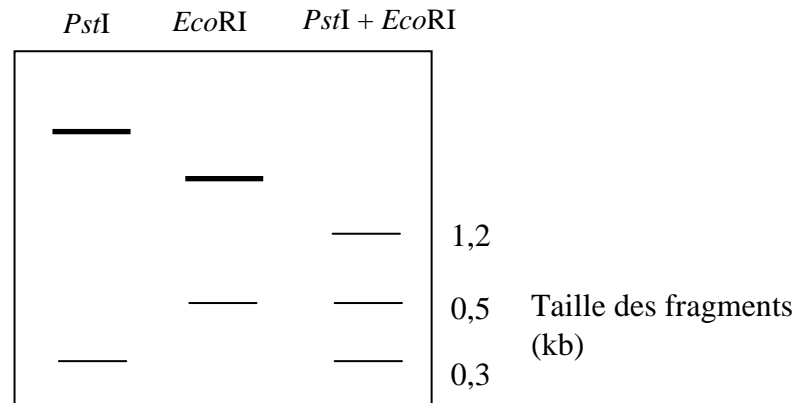
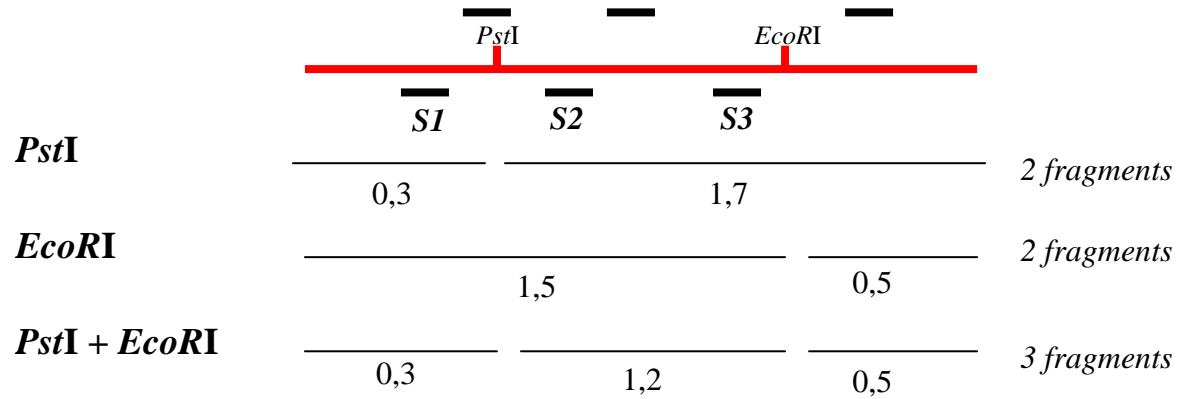
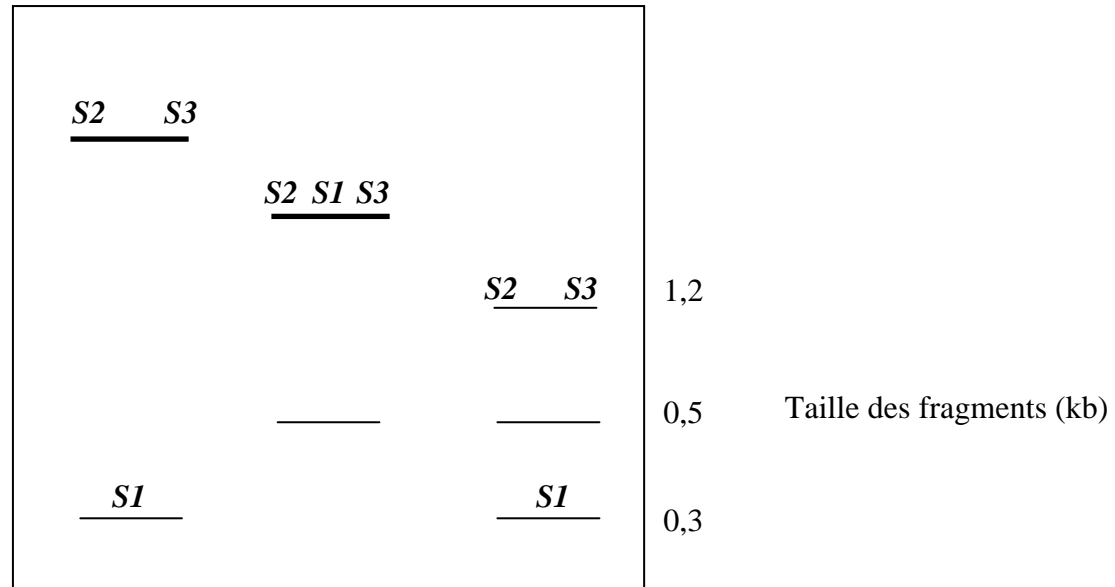


Figure 2 :
 Fragments obtenus par révélation au bromure d'éthidium après électrophorèse sur gel d'agarose et transfert sur nylon.

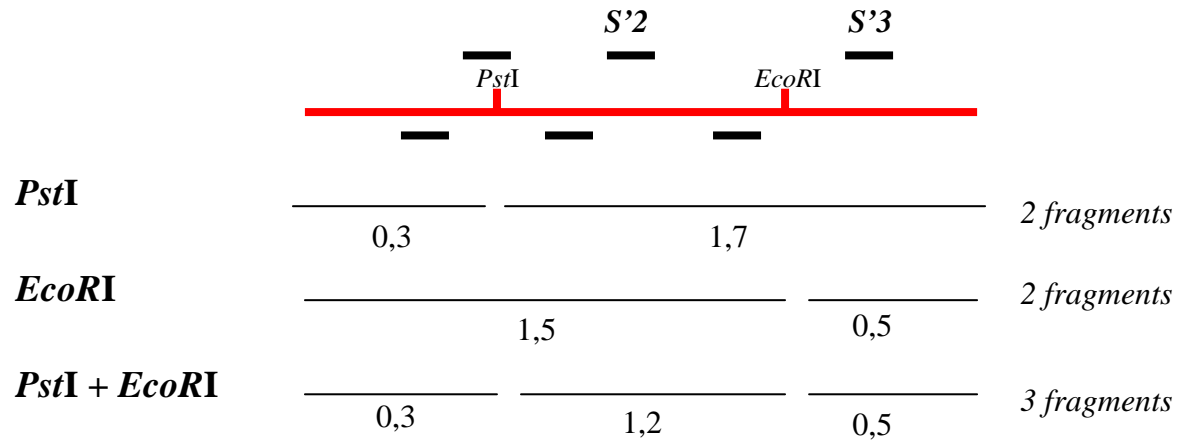
Exercice n°26



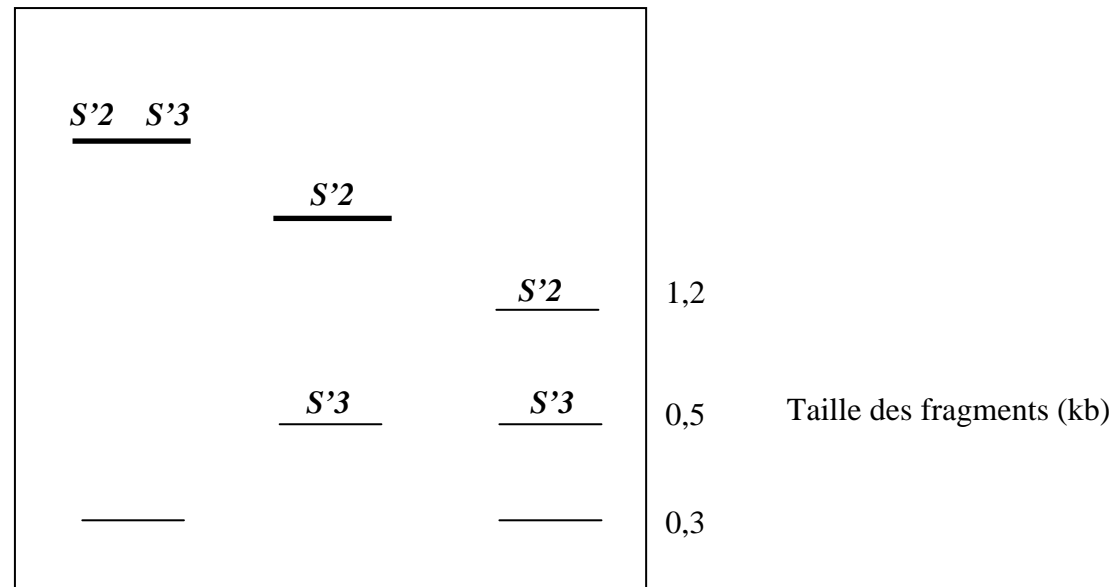
PstI *EcoRI* *PstI + EcoRI*



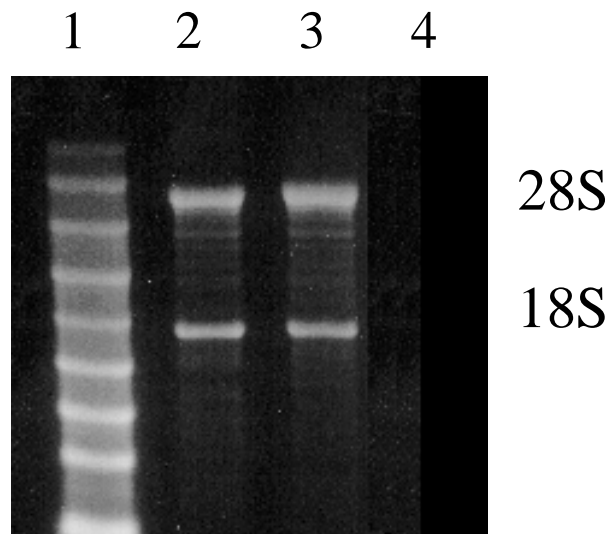
Exercice n°26



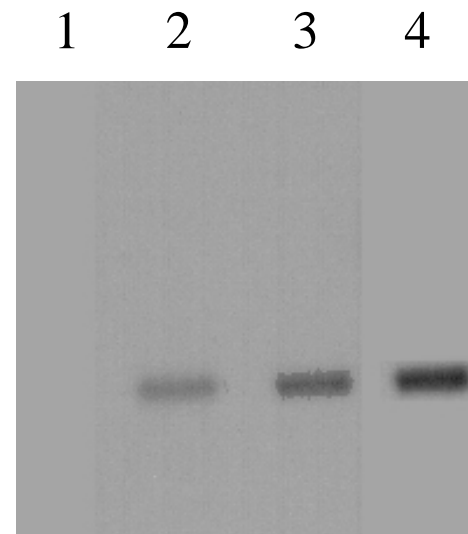
PstI *EcoRI* *PstI + EcoRI*



Exercice n°27



Gel sous UV



Transfert

Exercice n°27 :
Chromatographie d'affinité

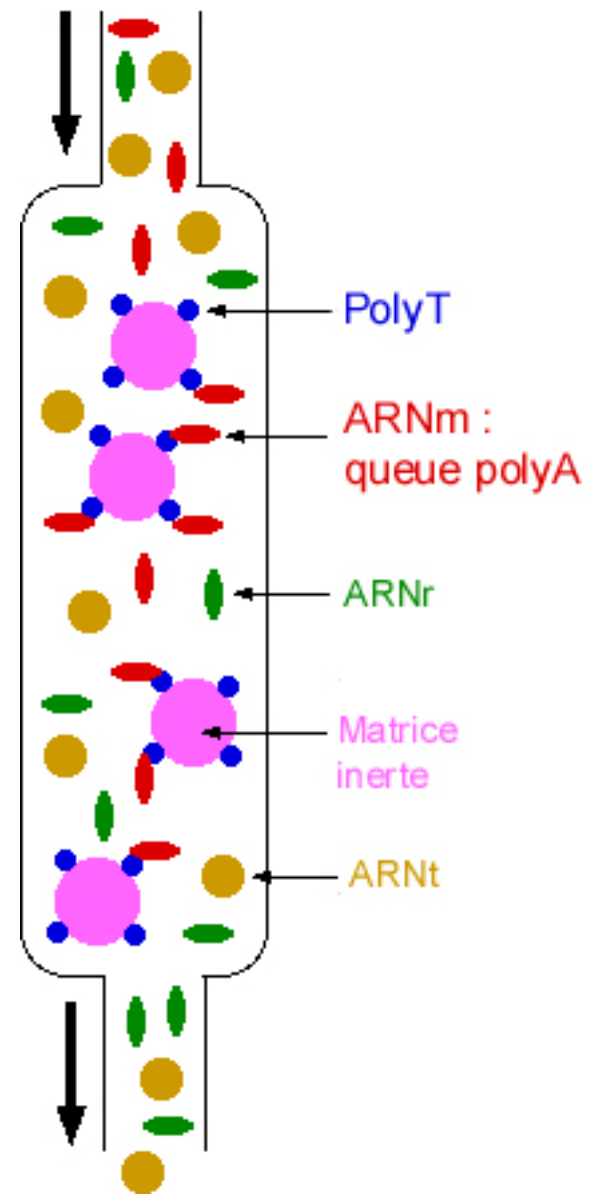


Fig 1B, piste 4 : ARNm

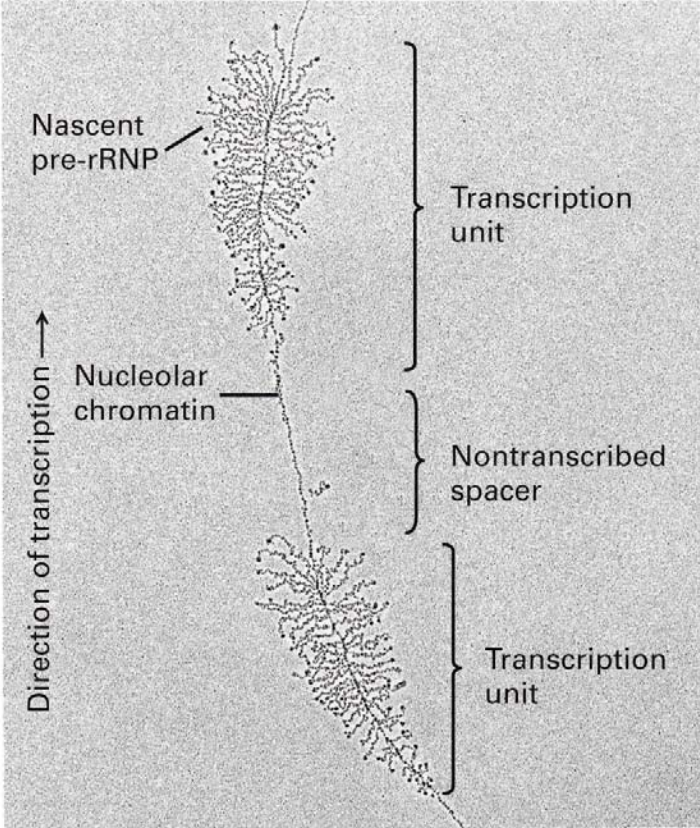
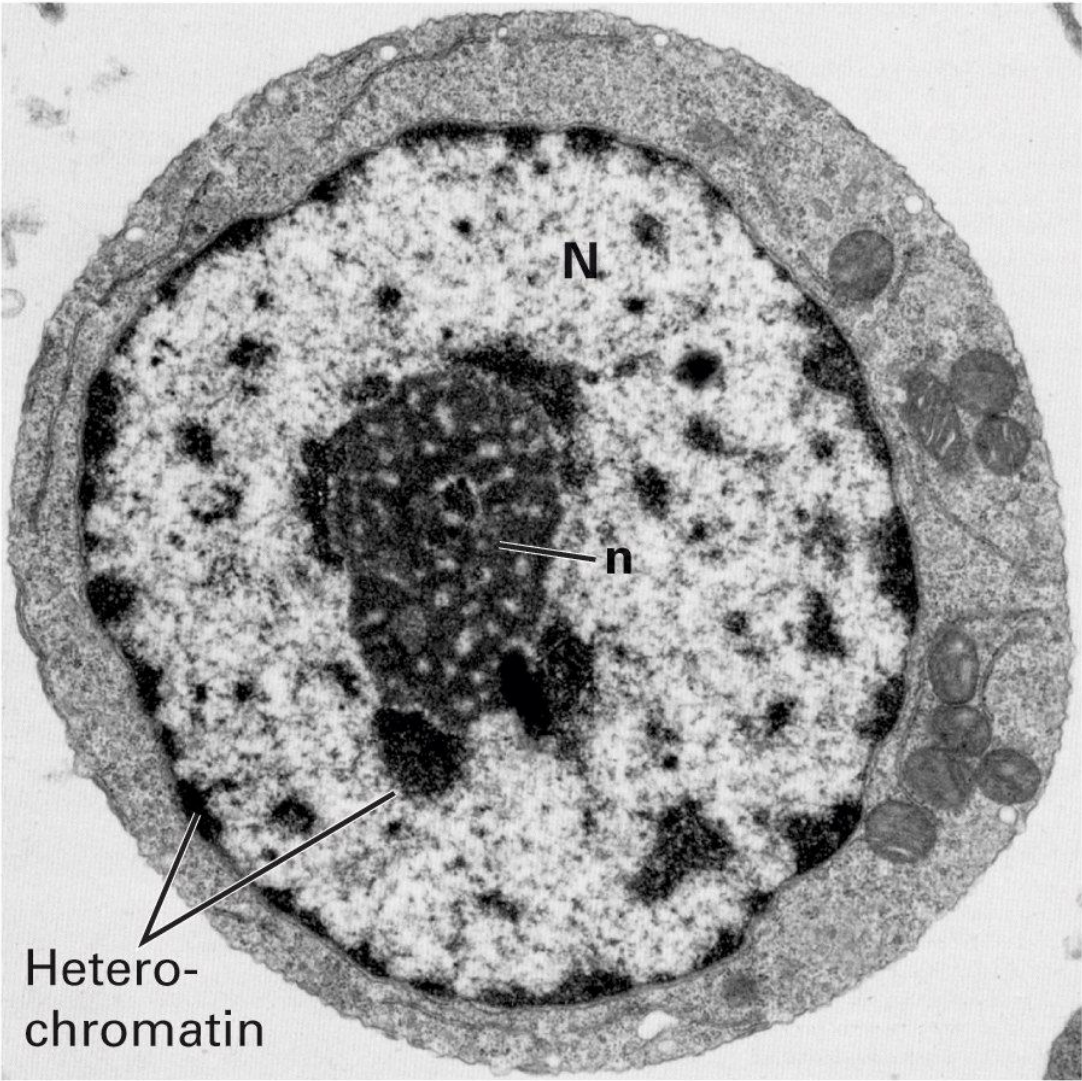
les cellules eucaryotes renferment **3 types d'ARN pol**

Ces ARN Pol, toutes **nucléaires**, diffèrent **selon les ARN qu'elles synthétisent**.

<i>Type d'ARN pol</i>	<i>Localisation</i>	<i>ARN synthétisés</i>
Pol I	Nucléole	Précurseurs de la plupart des ARNr
Pol II	Nucléoplasme	Précurseurs des ARNm
Pol III	Nucléoplasme	Précurseurs de l'ARNr 5s ARNt Différents petits ARN nucléaires et cytosoliques

Il existe également des ARN Pol mitochondriales et (chez les plantes) chloroplastiques

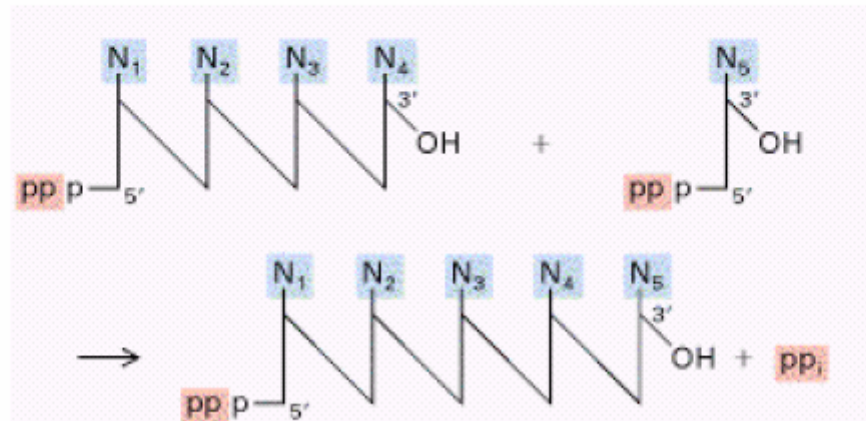
Complément : ARNr et Nucléole



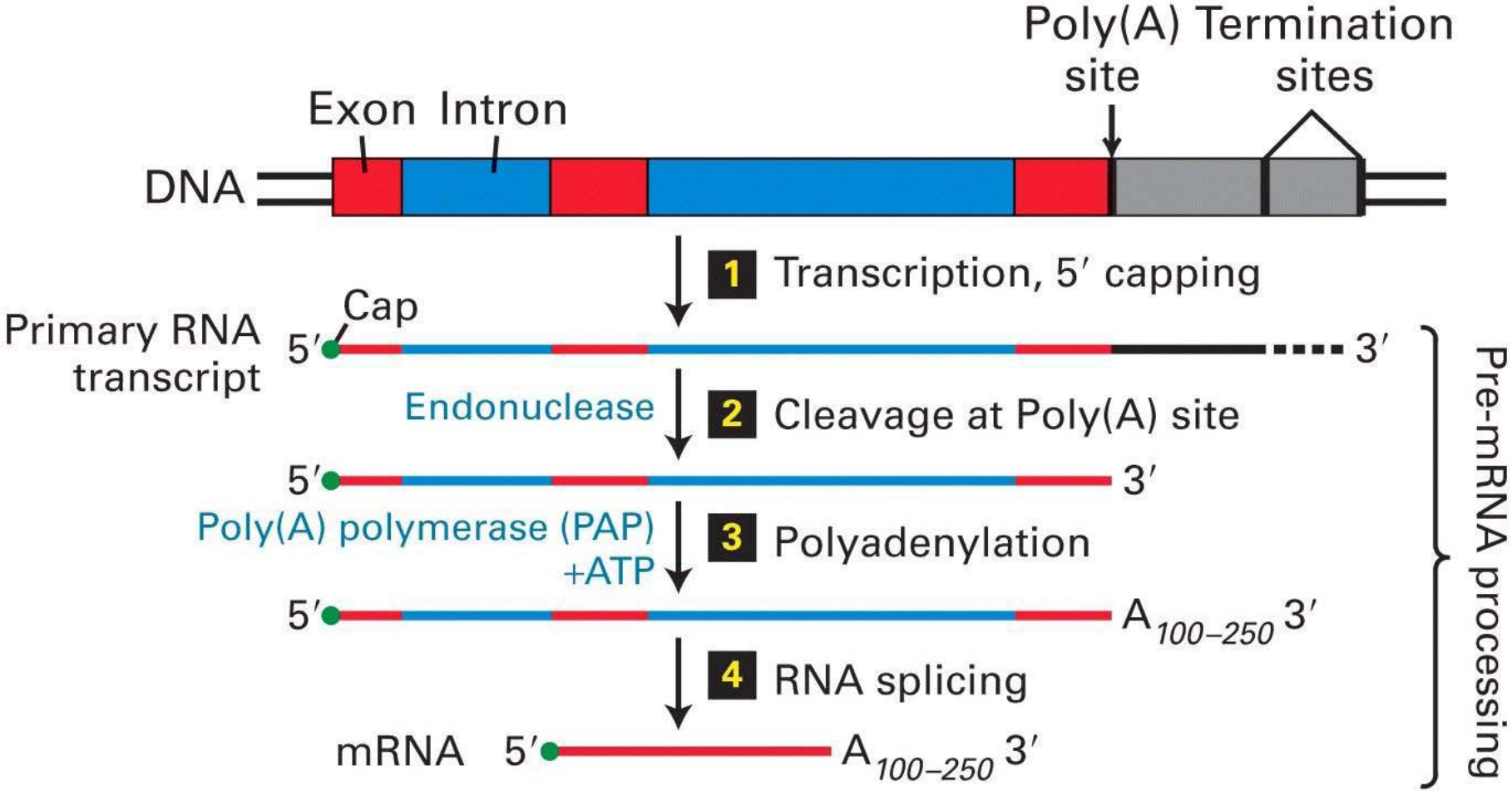
Mécanisme de synthèse : ARN polymérase

L'élongation de la chaîne d'ARN procède par l'addition séquentielle de nucléotides

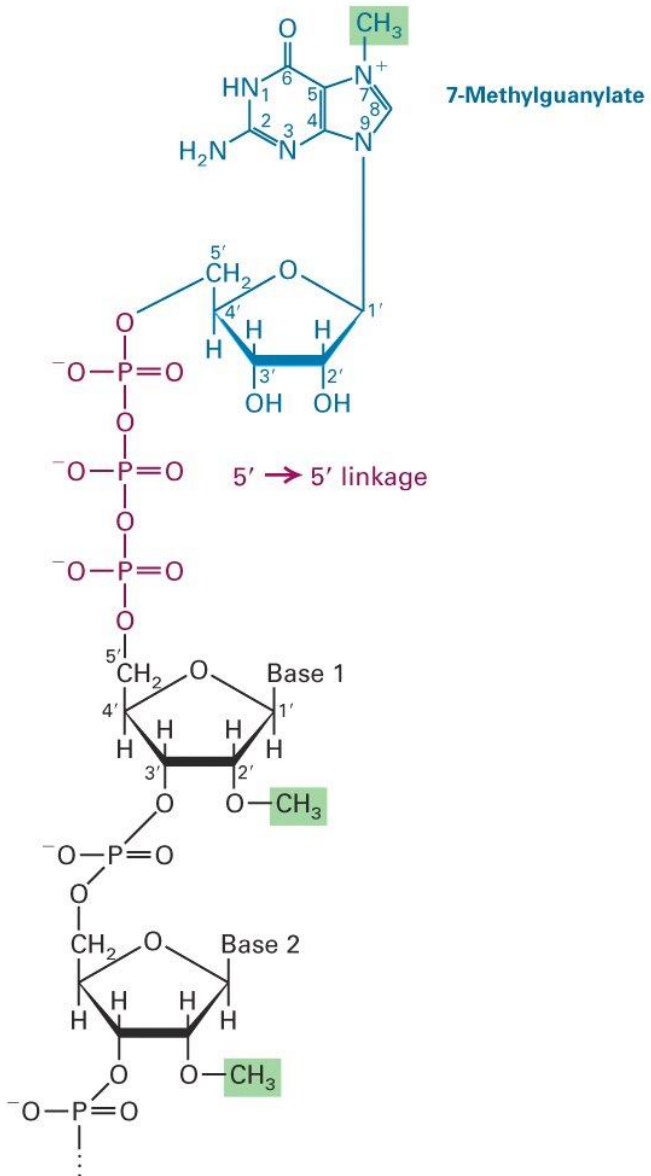
1. L'élongation procède dans la direction 5' → 3'.
2. L'addition d'un nucléotide résulte en la libération d'un groupement pyrophosphate (PPi).



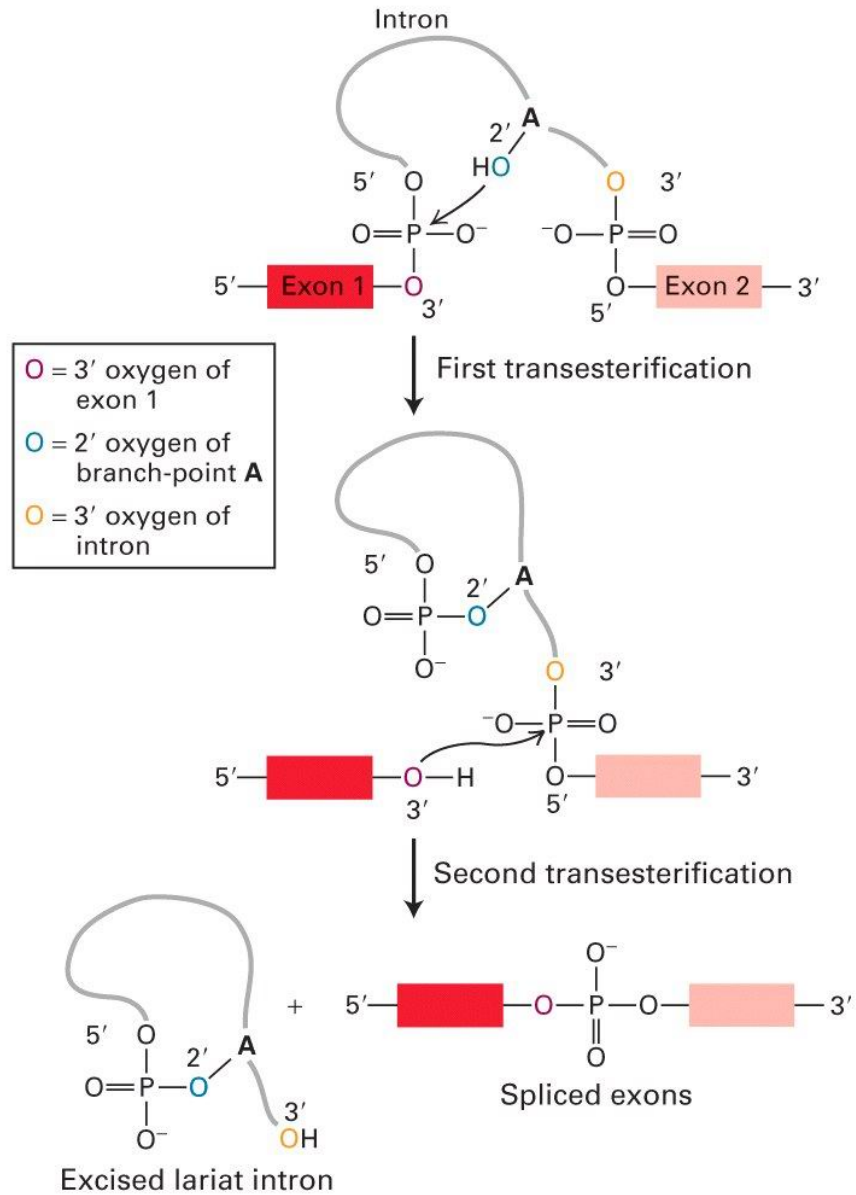
Modifications post-transcriptionnelles



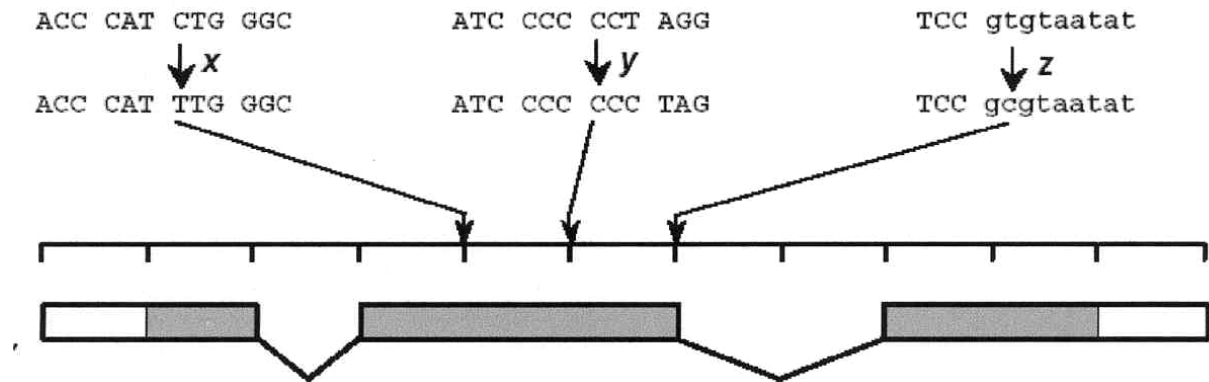
Coiffe en 5'



Epissage des introns : trans-esterification



Exercice 28



Type de mutations?

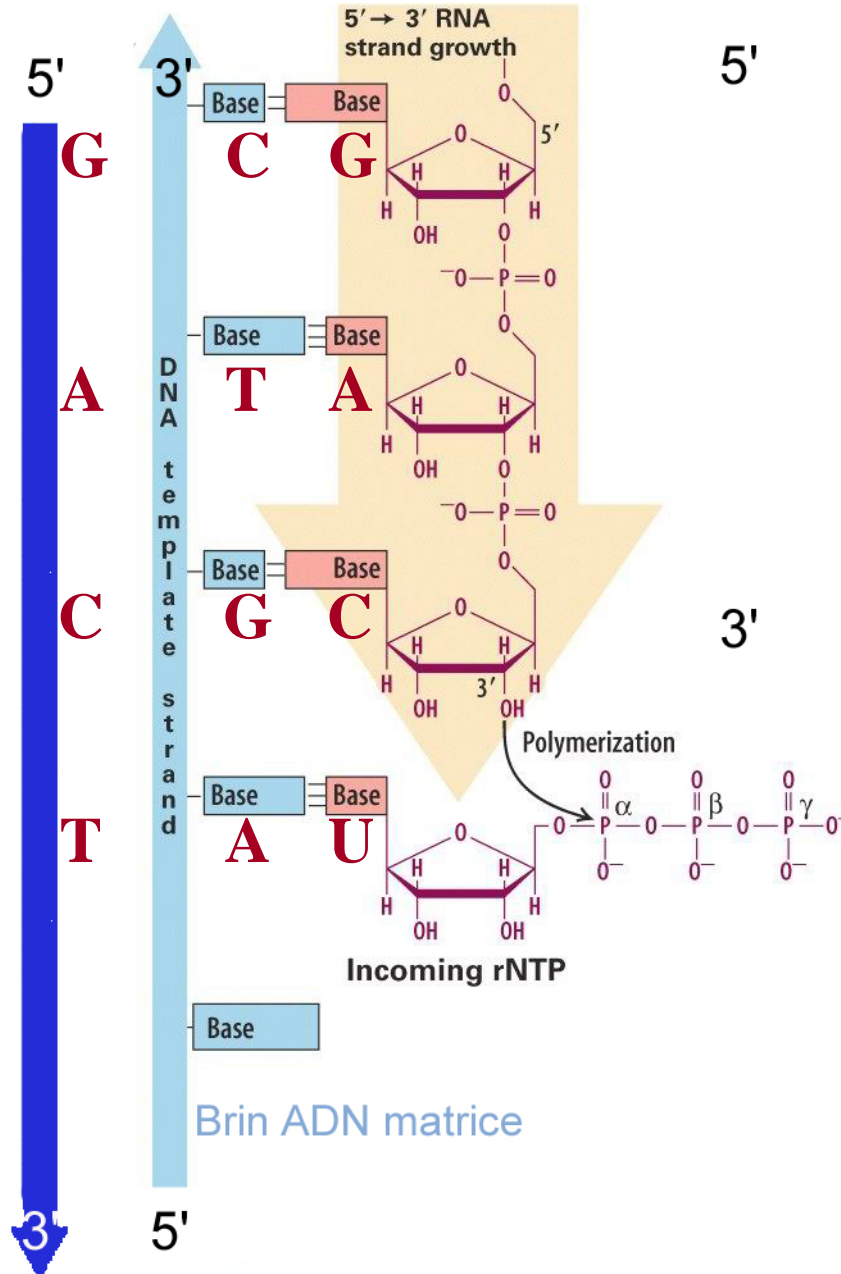
La mutation X est une **mutation ponctuelle** au sein de l'exon 2

La mutation Y correspond à une **insertion** avec décalage du cadre de lecture au sein de l'exon 2

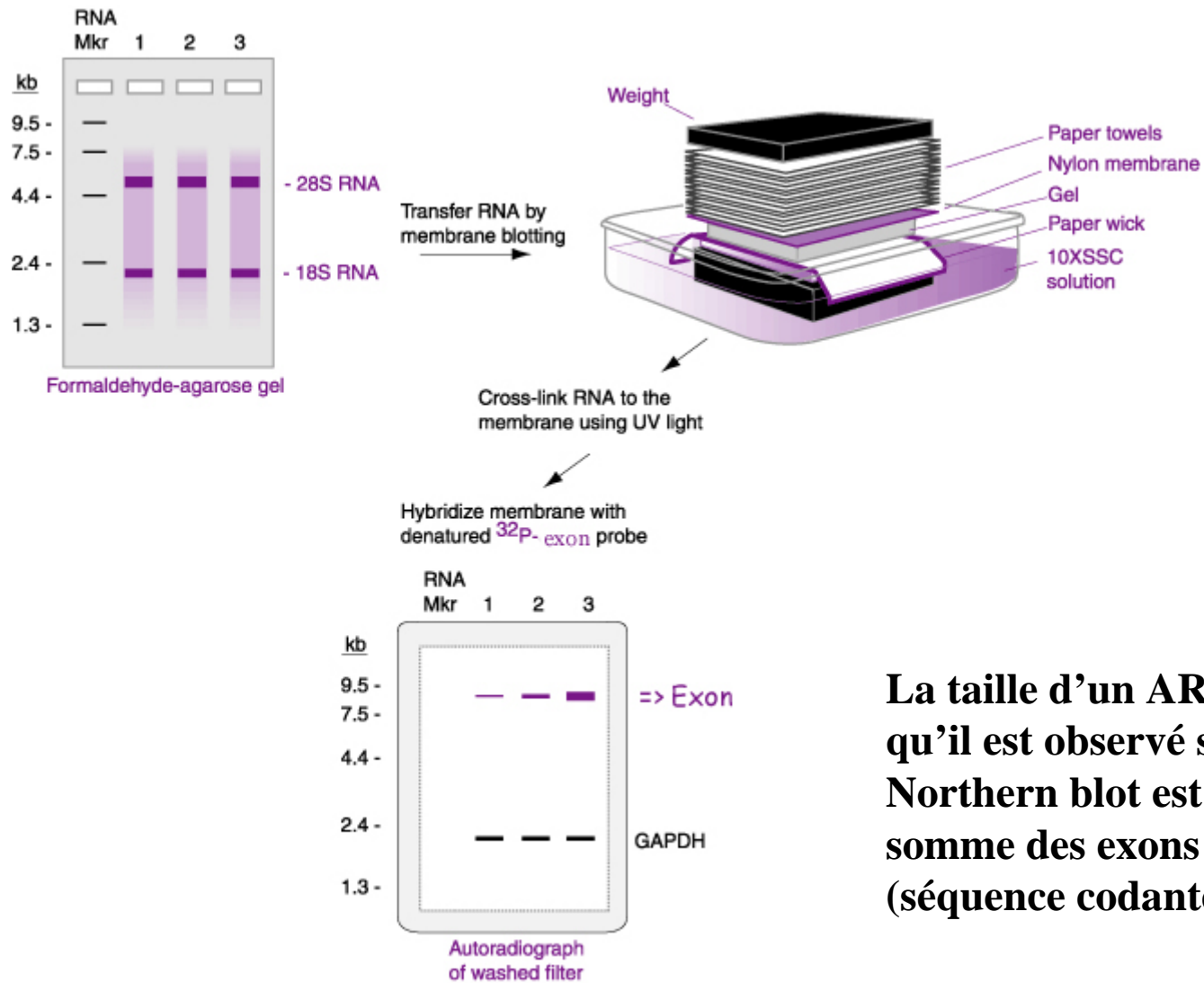
La mutation Z est une **mutation ponctuelle**

Séquence donnée :
Brin ADN 5'→3'

Brin ADN non
transcrit

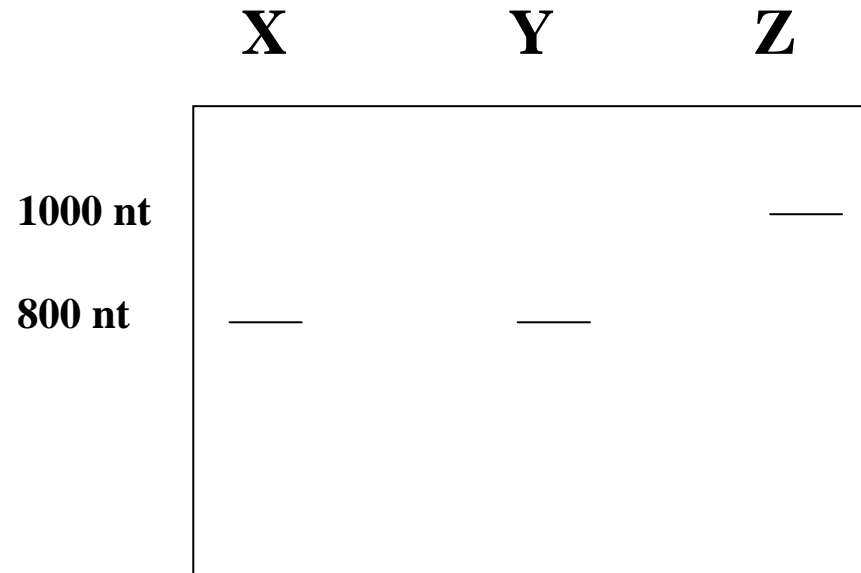


Hybridation de type Northern : transfert d'ARN



La taille d'un ARNm tel qu'il est observé sur le Northern blot est égale à la somme des exons + UTR (séquence codante + UTR)

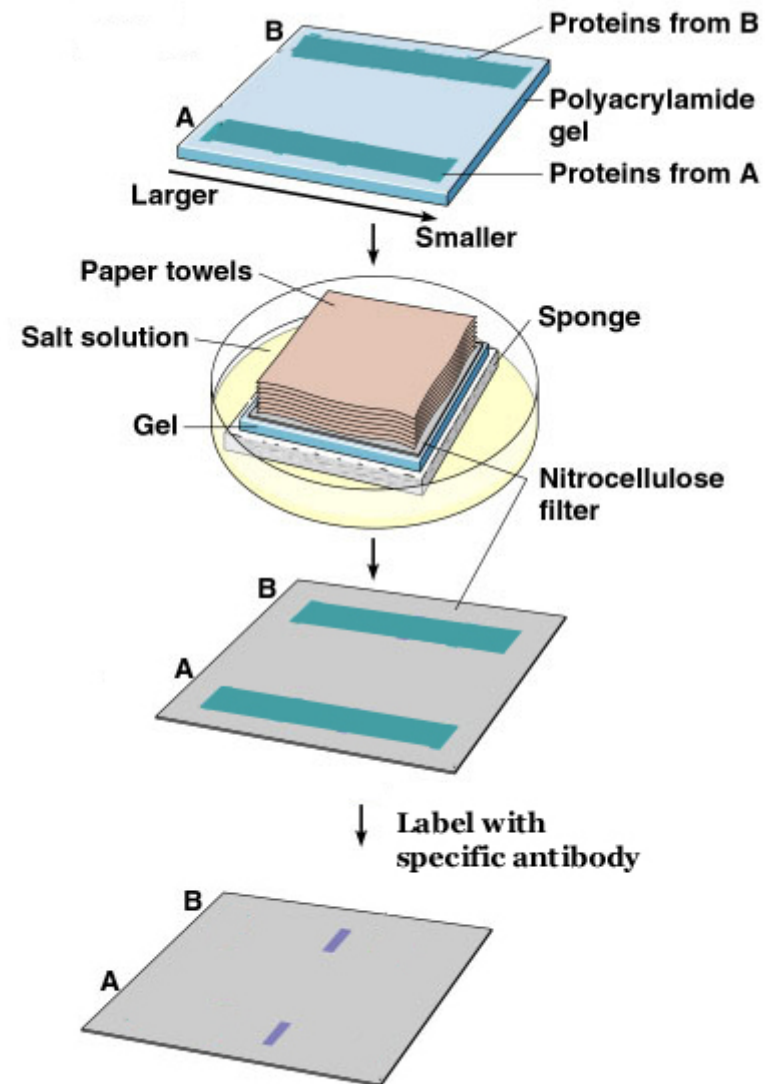
Northern blot : autoradiogramme attendu



Les mutations ponctuelles et celle correspondant à l'insertion/délétion de pb n'affecteront pas l'ARNm **sauf si ces mutations touchent les signaux d'épissage (cas Z).**

Hybridation de type Western : transfert de protéine

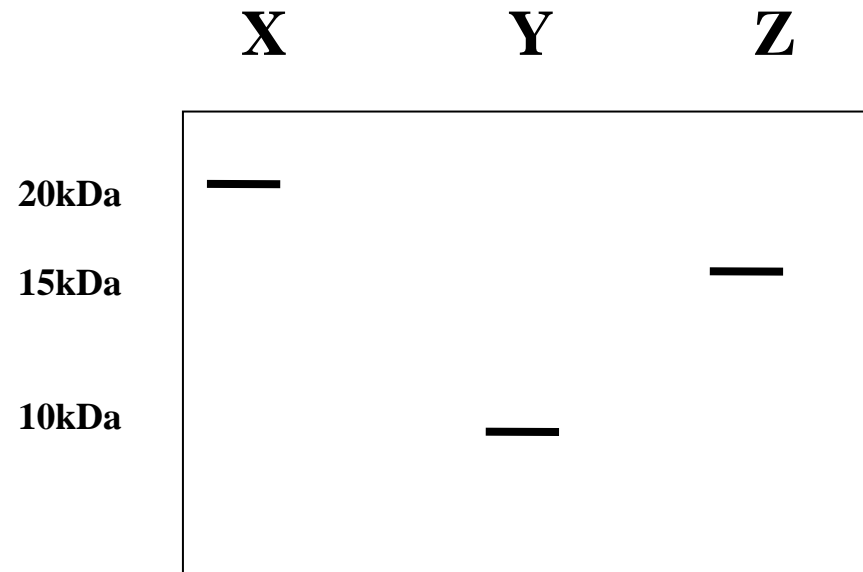
La taille d'une protéine
telle qu'elle est observée
sur le Western blot est
égale à la somme des exons
sans les UTR.



Western blot

La région codante débute au codon d'initiation, et finit à un codon STOP

La région codante sauvage comprend **600 pb** ce qui correspond à un polypeptide de environ **200 acides aminés** soit approximativement **20 kDa**.



La **mutation X** est qualifiée de **silencieuse** : le produit protéique formé n'est pas affecté

La **mutation Y** crée un codon **STOP** => protéine raccourcie de 100 AA (soit 10 kDa)

La **mutation Y**, qui **affecte le site donneur d'épissage**, crée plus loin un **codon STOP (UAA) en PHASE** dans l'intron 2 => protéine de + petite taille que la protéine sauvage.