

Corrigé de l'activité TD Drépanocytose (Moodle)

Q1. Que peut-on dire des gènes de la chaîne β de l'hémoglobine humaine et de celle du chimpanzé commun (*Pan Troglodyte*) ou du Bonobo (*Pan paniscus*)?

Les séquences des 2 singes ont 99,82% d'identité avec la séquence humaine.

Q2 Noter sur votre copie le nombre de nucléotides identiques entre les 2 séquences ainsi que le pourcentage d'identité.

Noter les 33 premières bases des deux séquences, identifier et localiser la mutation observée.

Sequence ID: Query_25471 Length: 541 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 541 [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
994 bits(538)	0.0	540/541(99%)	0/541(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACAGACACCATGGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGC	60		
Sbjct 1	ACAGACACCATGGGTGCACCTGACTCCTGTGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGC	60		

Q3. Les séquences d'ADN données sont entièrement transcrites dans les cellules. On travail uniquement sur les 33 nucléotides que vous avez notés. Déduire la séquence d'ARNm des 33 nucléotides de la séquence d'ADN non mutée de l'hémoglobine (le brin donné est le brin "non transcrit" ; la traduction débute toujours au niveau d'un codon ATG ou AUG sur l'ARNm). La noter sur votre copie puis en déduire et noter la séquence en acides aminés à l'aide du code génétique donné ci dessous (le code génétique est disponible ci-dessous en cliquant sur le bouton "code génétique").

Faire de même avec l'allèle muté et comparer les 2 séquences sur votre copie.

Allèle non muté ARNm : aca gac acc aug gug cac cug acu ccu gag gag
 Protéine : T D T M V H L T P E E

Allèle muté ARNm : aca gac acc aug gug cac cug acu ccu gug gag
 Protéine : T D T M V H L T P V E

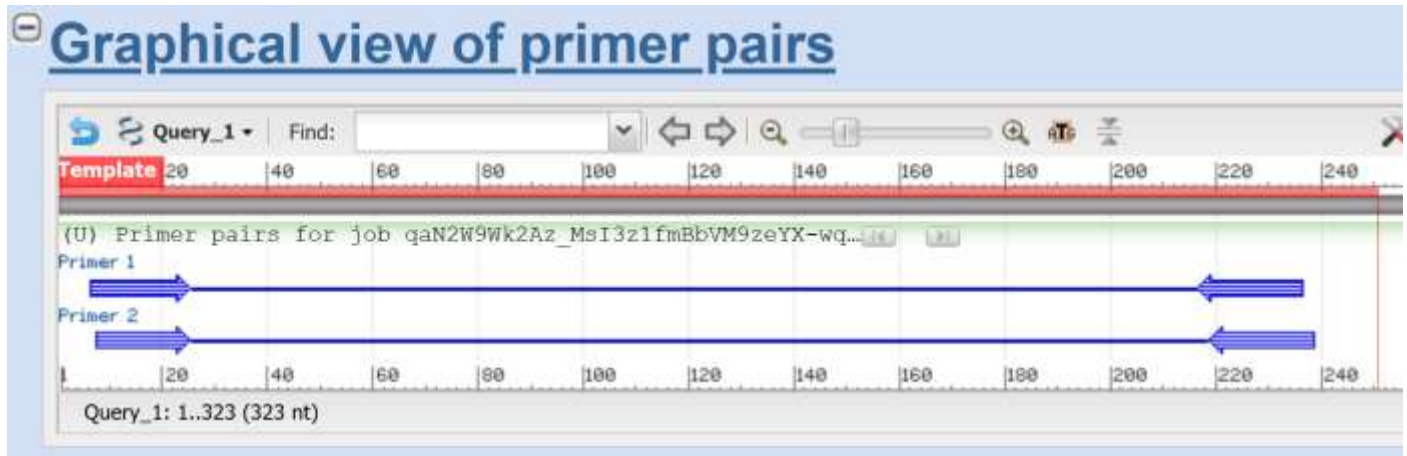
Q4. Vérifier les séquences polypeptidiques obtenues à la question précédente. Dire à quoi correspondent les 3 séquences protéiques données puis recommencer l'opération avec la séquence de l'allèle muté (acagacaccatggtgcacctgactcctgtggag).

Résultats obtenus

-5'3' Frame 1											
aca gac acc atg gtg cac ctg act cct gag gag	T	D	T	M	V	H	L	T	P	E	E
aca gac acc atg gtg cac ctg act cct gtg gag	T	D	T	M	V	H	L	T	P	V	E

Q5. Combien le logiciel propose t'il de paires d'amorces?

Le logiciel propose 2 paires d'amorces sensiblement identiques.



Q6. La paire d'amorces retenue pour la suite est la paire n°1. Pour les 2 amorces de cette paire, noter La Tm, la longueur et le GC% sous une forme appropriée. Expliquer pourquoi l'amorce R a une Tm plus élevée que l'amorce F alors que son GC% est inférieur.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	ACCATGGTGCACCTGACTC	Plus	19	7	25	59.62	57.89
Reverse primer	AGGCCATCACTAAAGGCACC	Minus	20	236	217	60.03	55.00

L'amorce R a 1 nucléotide de plus que l'amorce F, ce qui compense le plus faible GC%.

Amorce F : 5' ACCATGGTGCACCTGACTC 3'

Amorce R : 5' AGGCCATCACTAAAGGCACC 3' qui donne en complémentaire dans le sens 3'→5' 3' GGTGCCCTTAGTGATGGCCT 5'

Q7. Recopier les 30 premiers nucléotides de la séquence. Souligner les nucléotides correspondant à l'amorce F et le lieu de la mutation (voir Q2.). Les amorces choisies permettent-elles d'amplifier la séquence contenant la mutation ?

allèle normal : ACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAG

amorce F : ACCATGGTGCACCTGACTC

allèle muté : ACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGIG

Oui, les amorces choisies, permettent bio d'amplifier la mutation

Compléments

Allèle normale : position des amorces en vert et violet (La séquence en vert est celle de l'amorce F. La séquence en violet est la séquence complémentaire de l'amorce R. LES 2 AMORCES NE S'HYBRIDENT JAMAIS SUR LE MÊME BRIN D'ADN)

ACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCTGGGCAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTGAGTCCTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGTCTGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCTGAGAATTCAGGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAA GAATCACCCACAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTT

Amplicon issu de l'allèle normal

ACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGG
CAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTG
AAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCT (230 nucléotides)

Amplicon issu de l'allèle muté

ACCATGGTGCACCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGG
CAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTG
AAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCT

Primer Map results

Results for linear 541 residue sequence "Untitled" starting "acagacacca"

```
>>>F>>> 7 to 25
1 acagacaccatggtgacacctgactcctgaggagaagtctgccgttactgccctgtggggcaaggtgaacgtggatgaagttggtggtgaggccctgggaggctg
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
1 tgtctgtggtaccacgtggactgaggactcctcttcagacgggcaatgacgggacacccogtccacttgacctaactcaaccaccactccgggaccogtccgac
106 ctggtggtctacccttggaccagaggttcccttgagtcctttggggatctgtccactctgatgctggttatgggcaaccctaaggtgaaggctcatggcaagaaa
106 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
106 gaccaccagatgggaacctgggtctccaaggaactcaggaacccctagacaggtgaggactacgacaataccogtgggattccactccagtagtaccgttcttt
<<<R<<< 217 to 236
211 gtgctcgggtgaccttagtgatggcctggctcacctggacaacctcaaggacacctttgccacactgagtgagctgcaactgtgacaagctgacgtggatcctgag
211 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310
211 cacgagccacggaaatcactaccggaccgagtggaacctggtggagttccogtggaaacgggtgtgactcactcagctgacactggttcgacgtgacacctaggactc
316 aacttcaggctcctgggcaacgtgctggtctgtgtgctggccatcactttggcaagaattcaccaccagtgacaggtgcctatcagaaagtgggtggctggt
316 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410
316 ttgaagtcaggaccogtggcagcagcagacacgaccgggtagtgaacacctttcttaagtggggtggtcactccgacggatagttcttaccaccggacca
421 gtggctaataccctggcccaagatcactaaagctcgcttcttctgctgccaattctattaaaggttcctttgttccctaagtcacaactactaaactggggga
421 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
421 caccgattacgggaccgggtgttcatagtgattcgagcgaagaacgacaggttaaagataattccaaggaaacaagggttcaggttgatgattgacccct
526 tattatgaagggcctt
526 530 540
526 ataatacttcccggaa
```

Primer:	Sequence:
F	5'-accatggtgcacctgactc-3'
R	5'-AGGCCATCACTAAAGGCACC-3'

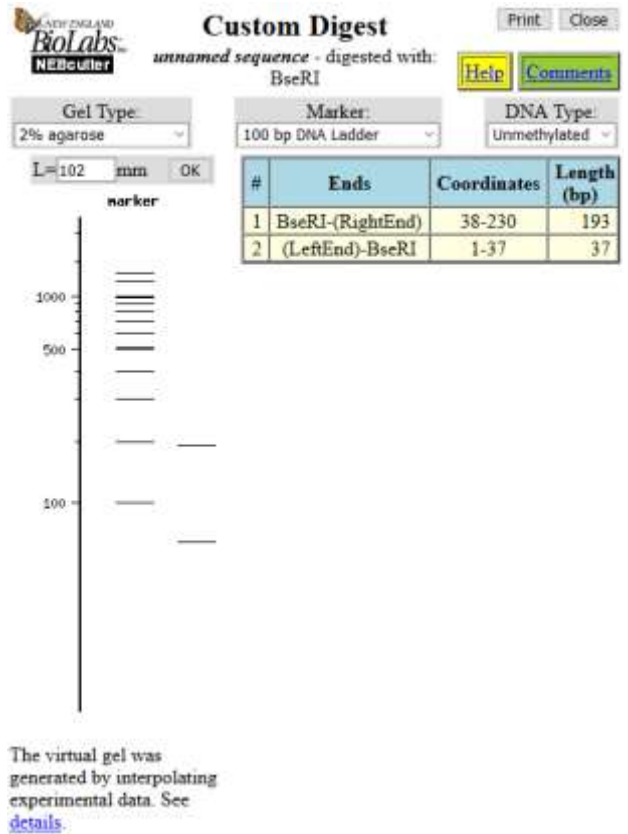
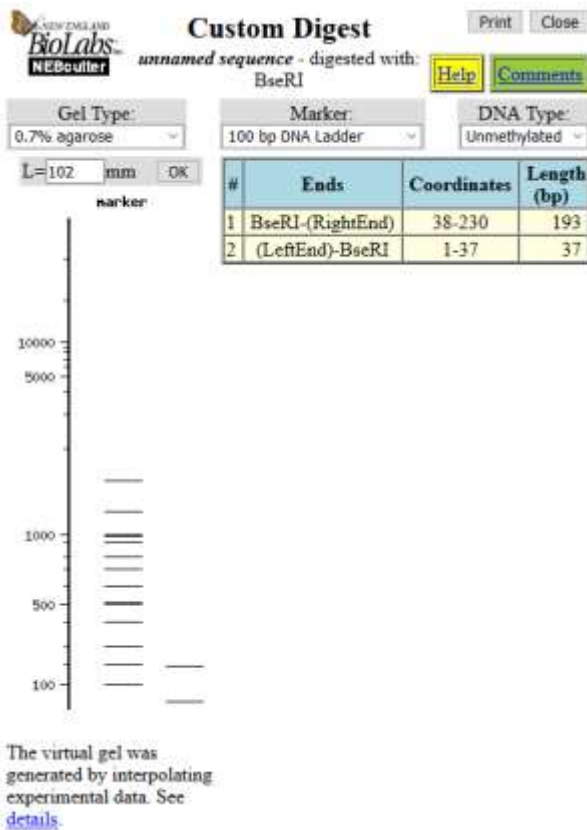
Q8. Trouver l'enzyme qui reconnaît le site de mutation, qui ne coupera que l'allèle non muté et coupe après le nucléotide n°30.

L'enzyme de restriction BseR1 reconnaît la séquence GAGGAG et coupe au nucléotide après 37 ce qui permet d'avoir un fragment de taille plus importante pour être vu sur gel d'agarose. Cette enzyme ne coupe qu'une fois ce qui permet d'obtenir 2 bandes sur électrophorèse.

Q9. Combien de fragments obtient-on après digestion ?

L'ADN est linéaire. On obtient donc 2 fragments avec un seul site de coupure.

Q10. Sur votre copie, représenter les gels obtenus pour des concentrations de 0,7 et 2% d'agarose. Nommer le gel le plus adapté à l'observation des fragments.



Q11. L'enzyme trouvée Q8 coupe t'elle l'amplicon issu de l'allèle muté ?
 Non car une base du site de restriction a été modifié

Q12. Combien de fragment(s) obtient-on si on réalise la digestion avec cette enzyme ?
 Pas de coupure donc il y a toujours un seul fragment après digestion (pas de coupure)

Q13. Rajouter la bande obtenue avec un amplicon intact sur les gels à 0,7 et 2%.
 Dessiner une bande entre la bande du marqueur 200 pb et la bande du dessus (30 pb)

Q14. Expliquer comment et pourquoi le fait de réaliser une PCR, une digestion enzymatique et un gel d'électrophorèse permet de dire si un ADN est porteur ou non de la mutation observée chez une personne souffrant de drépanocytose.

Lorsqu'on a extrait l'ADN d'un Patient, la PCR permet d'amplifier le fragment d'ADN contenant la mutation recherchée. Une digestion enzymatique réalisée sur l'amplicon permet de visualiser sur gel d'agarose 2 fragments d'ADN si l'ADN n'est pas porteur de la mutation et un seul fragment dans le cas contraire (allèle muté donc drépanocytose).

En réalité, comme chaque personne est porteur de 2 allèles pour ce gène, l'ADN d'un même individu peut contenir un allèle muté et un allèle non muté ce qui complique un peu l'exploitation des résultats.