

Nomenclature des enzymes de restriction

Les trois premières lettres de chacune d'entre elle concernent

- La première lettre du nom de genre, par exemple **E** (**E**scherichia).
- Les deux premières lettres du nom de l'espèce, par exemple **co** (**co**li).
- La quatrième concerne la souche bactérienne d'où est extraite l'enzyme en question.
- Le chiffre romain: indique l'ordre de la caractérisation de l'enzyme chez la même souche.

Exemple : HindIII signifie que c'est la troisième (**III**) Enzyme de restriction isolée et caractérisée de la souche bactérienne **H**aemophilus **in**fluenza **Rd**.

Tableau 1: Exemples des enzymes de restriction de type II.

Enzyme	Source Organism	Recognition Sequence
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG GGC/C
<i>MboI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	/GATC CTAG/
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	/GATC CTAG/
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AATC CTTAA/G
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	/CC(A or T)GG GG(T or A)CC/
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i> J62/pGL74	GAT/ATC CTA/TAG
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC CCTAG/G
<i>SauI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CC/TNAGG GGANT/CC
<i>BglI</i>	<i>Bacillus globigii</i>	GCCNNNN/NGGC CGGN/NNNNCCG
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG
<i>DraI</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	RG/GNCCY YCCNG/GR

N: n'importe quelle base R: n'importe quelle purine Y: n'importe quelle pyrimidine /: Position de coupure.

Série 1

Enzymes de restriction

Exercice 1

Soient les enzymes de restriction BamHI, Pst I, XhoI et MboI dont les sites reconnus sont :

BamHI : 5' G/GATCC 3' ; Pst I : 5' CTGCA/G 3' ; XhoI : 5' C/TCGAG 3' ; MboI : 5'/GATC3'.

Recopier la séquence de l'ADN et encadrer les sites de restriction en indiquant la position des coupures.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATCC3'

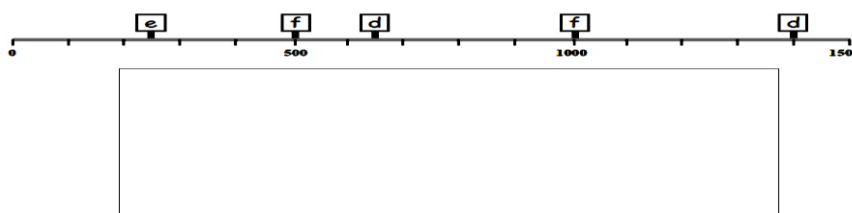
3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG5'

Seule MboI a une coupure franche. Les autres enzymes aboutissent à des bouts cohésifs

Exercice 2

Si nous travaillons avec un ADN linéaire tel que celui montré dans la figure ci-dessous, Quelle est la taille en paires de bases (pb) des fragments d'ADN obtenus en effectuant des digestions simples par les enzymes d, e et f et des doubles digestions avec diverses combinaisons entre eux?.

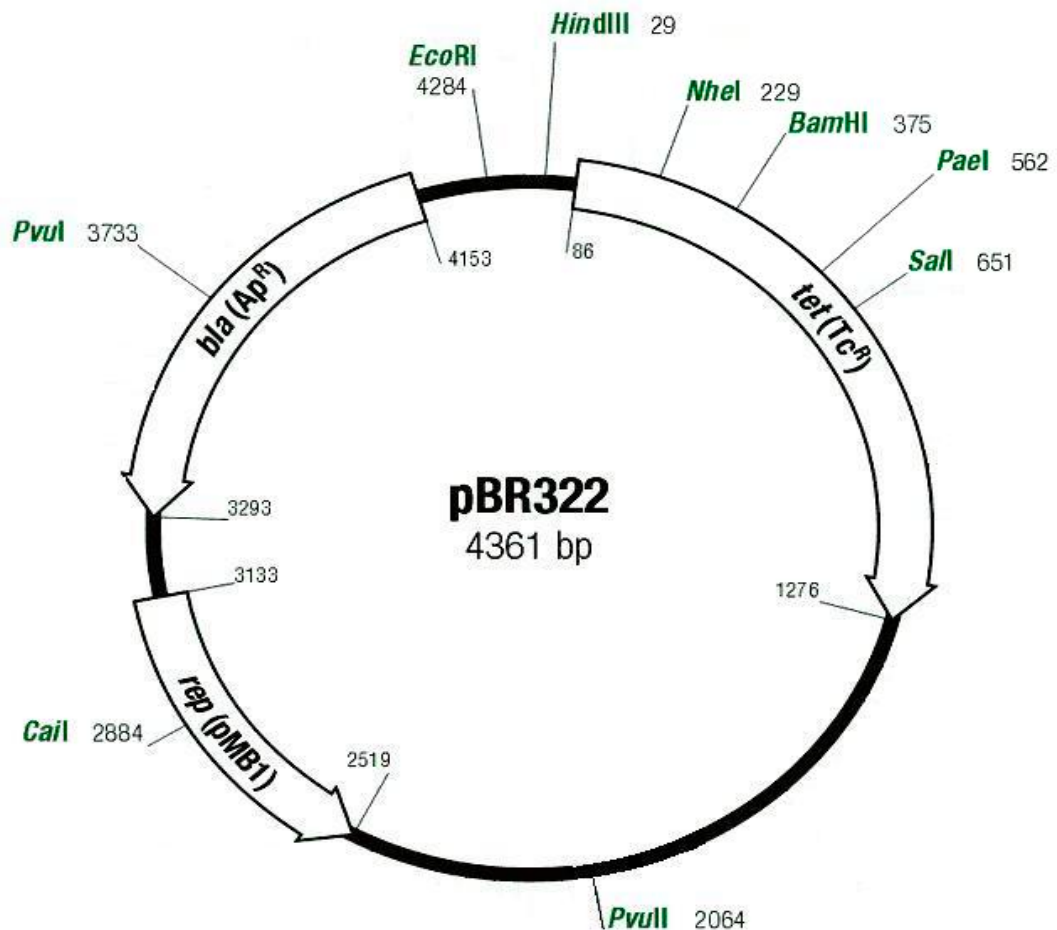
NB : Les chiffres correspondent au nombre de paires de bases d'ADN (taille totale est de 1500 pb).



Série 2
Clonage moléculaire

Exercice

Il arrive que le fragment inséré dans un vecteur soit notablement plus grand que le gène que l'on recherche. Dans ce cas, afin de limiter l'effort de séquençage, on reprend le fragment que l'on digère de diverses façons. Les sous fragments obtenus sont de nouveau inclus dans un vecteur. Parmi les plasmides recombinés on détermine ceux qui contiennent toujours le gène d'intérêt. On cherche alors quel est le plus petit fragment qui contient le gène pour ne séquencer que lui.



Carte simplifiée de pBR322.

1°) On a extrait et purifié un fragment de 15 kbp d'un vecteur λ contenant le gène A. Comment peut-on le fragmenter pour avoir des sous fragments plus petits mais dont certains contiennent encore le gène A entier ?

2°) Comment intégrer ces sous fragments dans pBR322, repérer les bactéries qui contiennent un plasmide recombiné et ressortir ce sous fragment ?

3°) Trois de ces sous fragments ont été retenus. On en a préparé 3 digestions différentes respectivement par ERI, ERII et ERIII, ainsi que des doubles digestions.

Quelle est la carte de restriction de s fragments A,B,C. Placez les uns par rapport aux autres.

Enzyme de restriction	site de coupure
EcoRI	G/AATTC
HindIII	A/AGCTT
BamHI	G/GATCC
Sall	G/TCGAC
DraI	TTT/AAA
HpaI	GTT/AAC
PvuI	CG/ATCG
NheI	G/CTAGC
PaeI	GCATG/C
Sau3A	/GATC
Tsp509I	/AATT
Sall	G/TCGAC

digestion par	Fragment A	Fragment B	Fragment C
ERI	3,2+0,4+0,3	2,6+2,2+0,3	2,6+1,8+1,7
ERII	1,8+1,1+1	3,3+1+0,8	3,3+1,7+0,8+0,3
ERI + ERII	1,4+1,1+0,7+0,4+0,3	1,9+1,4+0,8+0,7+0,3	1,9+1,4+1+0,8+0,7+0,3
ERIII	2,4+1,5	3+1,9+0,2	2,7+2,2+1,2
ERI + ERIII	2+1,2+0,4+0,3	2+1,6+1+0,3+0,2	1,7+1,6+1,2+1+0,6
ERII + ERIII	1,8+1+0,6+0,5	2,4+1+0,9+0,6+0,2	2,4+1,3+0,9+0,8+0,4+0,3