

DEVOIR A LA MAISON

BMGG (temps recommandé : 2H00)

Calculatrice non autorisée

Dictionnaire anglais/français autorisé.

Clonage et PCR

En 1983, Kary Mullis conçoit l'idée de la réaction d'amplification spécifique *in vitro* de l'ADN : la "Polymerase Chain Reaction" (PCR). L'ADN polymérase I d'*Escherichia coli*, utilisée à l'origine, était irréversiblement dénaturée à chaque cycle. En 1988, David Gelfand et ses collaborateurs isolèrent à partir de l'eubactérie thermophile *Thermus aquaticus* une enzyme qui devait devenir, sous le nom de Taq polymérase (EC 2.7.7.7), un outil majeur du génie génétique.

Depuis, cet outil ne cesse d'être amélioré. D'autres enzymes ont en effet été isolées à partir de bactéries thermophiles (eubactéries ou archaebactéries) et la connaissance de la séquence des gènes codant ces enzymes a permis de produire toute une panoplie d'enzymes recombinantes.

Différents protocoles sont actuellement proposés pour réaliser une "hot start" PCR ou "démarrage à chaud" de la PCR.

1. LE CLONAGE DIRECT DU GENE

La purification originelle de la Taq polymérase a nécessité de partir d'un grand volume de culture de *Thermus aquaticus* et a mis en jeu trois chromatographies successives sur colonne. Par la suite, le gène de la Taq polymérase a été cloné chez *E. coli* à partir d'une banque génomique de *Thermus aquaticus*, puis séquencé. Un clonage direct du gène est alors devenu possible, ce qui a permis de produire plus aisément l'enzyme, d'étudier sa relation structure-fonction et de l'améliorer.

1.1. Présenter, éventuellement à l'aide de schémas, les étapes de construction d'une banque d'ADN génomique et une méthode de criblage du gène de la Taq polymérase.

Le gène est amplifié spécifiquement à partir de l'ADN génomique de *Thermus aquaticus* puis inséré dans le site de clonage multiple (MCS) du plasmide pUC 18. La construction obtenue est utilisée, après ligature, pour transformer une souche hôte d'*E. coli*.

Le **document 1** présente :

- une brève présentation du principe du clonage
- les sites de restriction des enzymes utilisées
- une carte de restriction partielle du gène *Taq* avec les positions des amorces utilisées
- les séquences de ces amorces
- la carte du plasmide pUC 18.

1.2. Indiquer le rôle des séquences du plasmide pUC18 présentées sur la carte. (**Document 1**).

1.3. L'amplicon formé doit subir une double digestion par des enzymes de restriction. Préciser quelle double digestion doit être réalisée et expliquer pourquoi.

1.4. Comparer les sites de restriction de *Bam* H I et *Bgl* II. Justifier le choix des deux enzymes retenues pour ce clonage .

1.5. Montrer à l'aide d'un schéma que la stratégie utilisée conduit à une insertion orientée du gène *Taq* dans le vecteur pUC 18 et représenter la construction obtenue.

Le Document 2 reproduit les indications du vendeur de ces enzymes sur la composition des tampons de digestion fournis et les activités des enzymes dans ces tampons.

1.6. En déduire le tampon à utiliser lors de la double digestion de l'amplicon d'une part, et celui utilisé pour la digestion du vecteur d'autre part.

1.7. Donner le principe de la transformation d'*E. coli* par choc thermique en présence de chlorure de calcium CaCl_2 .

2. UNE Taq POLYMERASE RECOMBINANTE

Le **Document 3** présente un alignement informatique des séquences protéiques de la Taq polymérase (Taq) et de l'ADN polymérase 1 d'*E.coli* (pol), enzyme possédant les 3 domaines suivants :

Activité exonucléase 5'→3'	Activité exonucléase 3'→5'	Activité polymérase 5'→3'
Acides aminés 1 à 323	Acides aminés 324 à 517	Acides aminés 521 à 928

2.1. Citer le programme utilisé pour réaliser cet alignement.

2.2. Analyser les homologies de séquences résultant de cet alignement et conclure quant aux domaines susceptibles d'être présents dans la Taq polymérase.

3. PROCÉDÉ DE « HOT START »

3.1. Donner le principe et l'intérêt d'une « hot start » PCR.

L'effet inhibiteur de différents anticorps monoclonaux vis à vis de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* est testé selon 2 protocoles différents rapportés dans le **Document 4**.

3.2. Dans la perspective de l'utilisation d'un procédé "hot start" PCR, justifier les températures mises en jeu dans les protocoles 1 et 2.

Préciser ce qui est testé dans le protocole 1 et ce qui est vérifié dans le protocole 2.

3.3. Analyser les résultats obtenus lors de la mise en œuvre du protocole 1 et conclure. Donner un qualificatif pour les anticorps étudiés.

3.4. Déduire une conclusion des résultats du protocole 2.

3.5. Indiquer l'anticorps monoclonal à utiliser pour éviter la formation de produits non spécifiques au cours de la PCR. Justifier ce choix.

4. UTILISATION DE LA PCR

La PCR est utilisée pour le clonage de deux variants du gène PRNP codant la protéine PrPc du mouton, glycoprotéine, abondante à la surface des neurones qui serait à l'origine d'encéphalopathies spongiformes (maladie de Creutzfeld-Jakob, tremblante du mouton).

4.1. Rappeler les critères de choix des amorces.

Le **document n°5** présente la structure du gène PRNP du mouton. Seul l'exon n°2 code la protéine prion et son clonage a été décidé pour les deux variants du gène PRNP.

4.2. A l'aide du **document 6**, déterminer les séquences des deux amorces utilisables pour cette PCR et s'hybridant avec les régions soulignées. Justifier.

Elles sont nommées respectivement « amorce 161 » et « amorce 931 » selon leur site d'hybridation.

4.3. Calculer la T_m (°C) de chacune de ces deux amorces en utilisant la règle de Wallace :

$$T_m (\text{°C}) = (4 \text{ nombre de bases GC}) + (2 \text{ nombre de bases AT})$$

- Déterminer une valeur de température d'hybridation pour ce couple d'amorces.

4.4. Optimisation de la PCR

Cette PCR est réalisée avec différentes concentrations en magnésium. Les résultats sont présentés dans le **document n°7**.

4.4.1. Quelle est la composition du « témoin négatif » ? Quel est son rôle ?

4.4.2. Commenter les résultats des pistes 3 à 8.

4.4.3. Conclure quant aux conditions optimales en magnésium de cette PCR.

DOCUMENT 4

Protocole 1

L'ADN polymérase est incubée avec chaque anticorps 10 minutes à température ambiante. L'activité enzymatique est ensuite mesurée après incubation à 37°C pendant 240 minutes en présence d'ADN matrice et des quatre dNTPs. L'activité ADN polymérase est exprimée en % d'activité par rapport au contrôle sans anticorps.

Anticorps	Activité ADN polymérase % de contrôle A
Pas d'anticorps (contrôle A)	100 %
Pas d'anticorps. Pas d'enzyme (contrôle B)	0,3 %
Mab1	28 %
Mab2	87 %
Mab3	64,3 %
Mab4	1,4 %

Protocole 2

L'ADN polymérase est incubée avec chaque anticorps à température ambiante puis le mélange est chauffé à 85°C pendant 1 min avant d'être refroidi 5 minutes dans la glace. L'activité enzymatique est ensuite mesurée après incubation pendant 10 min à 75° C en présence d'ADN matrice et des quatre dNTPs.

L'activité ADN polymérase est exprimée en % d'activité par rapport au contrôle sans anticorps.

Anticorps	Activité : ADN polymérase % de contrôle A
Pas d'anticorps (contrôle A)	100 %
Pas d'anticorps. Pas d'enzyme (contrôle B)	0 %
Mab1	99,4 %
Mab2	104 %
Mab3	98,5 %
Mab4	101 %

DOCUMENT 1

Construction of the Expression Vector

Briefly, genomic DNA was isolated from *T. aquaticus* and used as a template to amplify the Taq DNA polymerase gene by Polymerase Chain Reaction (PCR). The Forward primer creates a unique *EcoR* I restriction cut site and the Reverse primer create a unique *Bgl* II restriction cut site.

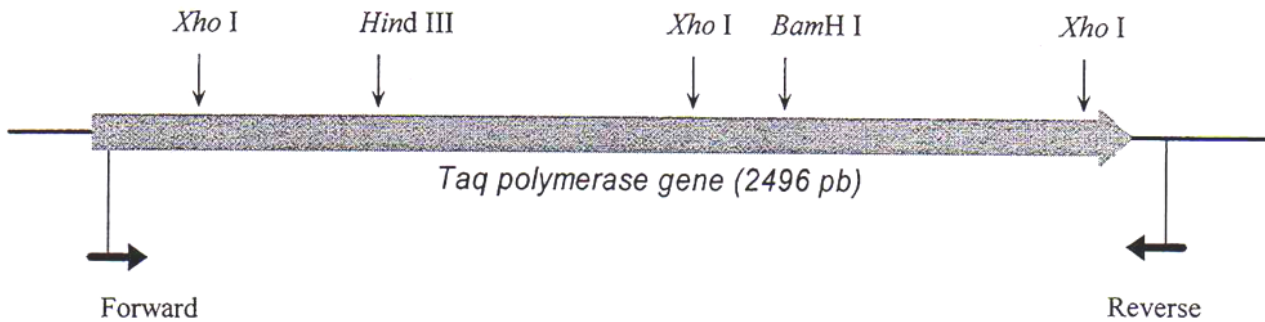
The resulting amplification product was digested with *EcoR* I and *Bgl* II and cloned into pUC18 digested with *EcoR* I and *Bam*H I.

This vector was designated pTAQ and transformed into *DH5 α E. coli* by Hanahan's method for bacterial transformation.

Sites de restriction des enzymes utilisées

<i>Bgl</i> II	A/GATCT
<i>EcoR</i> I	G/AATTC
<i>Bam</i>H I	G/GATCC

Carte de restriction partielle du gène Taq et positions des amorces utilisées

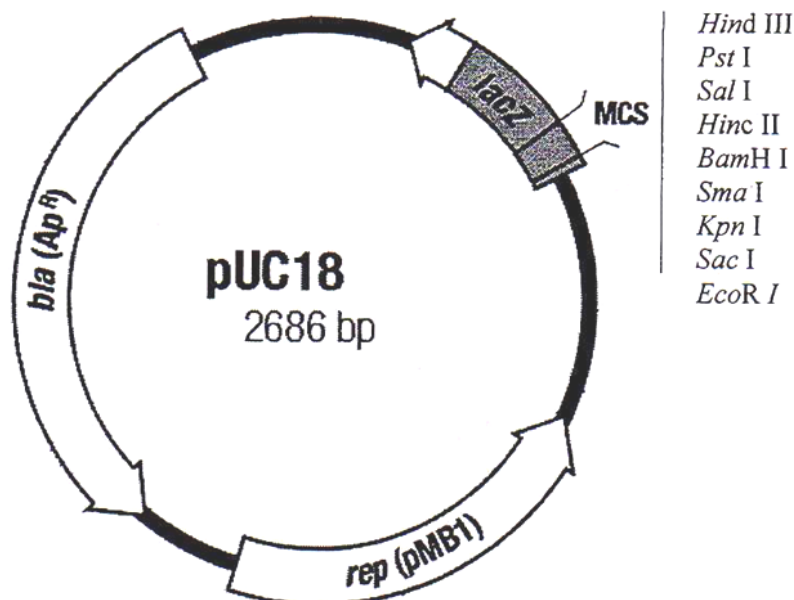


Séquences des amorces utilisées

Forward primer : 5'-CACGAATTCGGGGATGCTGCC-CCTCTTTGAGCCCAAG

Reverse terminal primer : 5'-GTGAGATCTATCACTCCTTGGCGGAGAGCCAGTC

Carte du plasmide pUC18



DOCUMENT 2

Buffer Compositions (1X):

Buffer 1 : 10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7.0 at 25°C).

Buffer 2 : 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT (pH 7.9 at 25°C).

Buffer 3 : 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT (pH 7.9 at 25°C).

	% activity in Buffer 1	% activity in Buffer 2	% activity in Buffer 3
<i>Bam</i> HI	75	100	50
<i>Bg</i> III	10	75	100
<i>Eco</i> RI	100	100	100

DOCUMENT 3

```

pol ----MVQIPQNPILILVDGSSYLRYAHFPPLTNSAGEPTGAMYGVNLMLRSLIMQYKPT
      *      ****      *      *      *      *      *      *      *
taq MAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFASLLKALKEDG-D      60

pol HAAVVFDAKGTFRDELFEHYKSHRPPMPDDLRAQIEPLHAMVKAMGLPLLAVSGVEADD
      *****      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq VVVVVFDAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLVRLVPGFEADD      120

pol VIGTLAREAEKAGRPVLISTGDKDMAQLVTPNITLINTMTNTILGPEEVNKGVPPELI
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq VLATLAKRAEKEGYEVRILTADRDLYQLLSERIAILHPEG-YLITPAWLYEKYGLRPEQW      180

pol IDFLALMGDSSDNIPGVPGVEKTAQALLQGLGLDTLYAEPEKIAGLSFRGAKTMAAKL
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq VDYRALAGDPSDNIPGVKGIGEKTAQRLIREWGSLENLFQHLDQVK-----PSLREKL      240

pol EQNKEVAYLSYQLATIKTDVELELTCEQLEVVQPAEELLGLFKKYEFKRWTADVEAGKW
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq QAGMEALALSRKLSQVHTDLPLEVDFG-RRRTPNLEGLRAFLELLEFGSLLHEFGLLEG300

pol LQAKGAKPAAKQETSVADEAPEVTATVISYDNYVTILDEETLKAWIAKLEKAPVFAFDT
      *      *      *
taq PKAAEEAPWPPPE-----      360

pol ETDSLDNISANLVGLSFAIEPGVAAYIPVAHDYLDAPDQISRERALELLKPLEDEKALK
      *      *      *      *      *      *
taq -----GAFLGFSFSRPEPMWAEALLALAGAWEG-----RLHRAQDPLRGLRDLKG      420

pol VGQNLKYDRGILANYGIELRGIAFDTMLESYILNSVAGRHDMSLAERWLKHKTIITFEEI
      *      *      *      *      *      *      *      *
taq VRGILAKDLAVLALREGLDLFPEDDPMMLLAYLLDPSN-----TTPEGV      480

pol AGKGNQLTFNQIALEEAGRYAEDADVTLQLHLKMWPDLQKHKGPLNVFENIEMPLVPV
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq ARRYGG-----EWTEAGERALLAERLFTLKERLKGEEERLLWLYEEVEKPLSRV      540

pol LSRIERNGVKIDPKVLHNSSEELTLRLAELEKKAHEIAGEEFNLSSTKQLQTLFQKQGI
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq LARMEATGVRLDVAYLQALSLEVEAEVRLQEEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLDFDELGL      600

pol KPLKKTG-GAPSTSEEVLEELALDYPLPKVILEYRGLAKLKSTYTDKLPMLINPKTRV
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq PAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVDRIQYRELTKLKNYIDPLPALVHPKTGRL      660

pol HTSYHQAVTATGRLSSTDPNLQNI PVRNEEGRRIRQAFIAPEDYVIVSADYSQIELRIMA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq HTRFNQTATATGRLSSTDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFVAEEGWLVVLDYSQIELRVLA      720

pol HLSRDKGLLTAFAEGKDIHRATAAEVFGPLLETVTSEQRRSAKAINFGLIYGMSAFGLAR
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq HLSGDENLIRVFQEGRDIHTQTASWMFGVSPGVDPMLMRAAKTINFGVLYGMSAHRLSG      780

pol QLNI PRKEAQKYMPLYFERYPGVLEYMERTRAQAKEQGYVETLDGRRLYLPDIKSSNGAR
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq ELSIPYEEAVAFIERYFQSYPKVRAWIEGTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVDPDLNARVKS      840

pol RAAAERAAINAPMQGTAADI IKRAMIAVDALQAEQPRVRMIMQVHDELVFEVHKDDVDA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
taq REAERMAFNMPVQGTAAADLMKLAMVRLFPRLQELG--ARMLLQVHDELVLEAPKDRAER      900

pol VAKQIHQLMENCTRLDVPLLVEVGSNGENWDQAH-
      *      *      *      *      *      *      *
taq VAALAKEVMGVPWLPQVPLEVEVGLGEDWLSAKE      934
    
```

DOCUMENT 5

Principales caractéristiques du gène PRNP du mouton (*ovis aries*)

gene ID : 493887
taille ADN : # 20 kpb taille du transcrit : 4178 bases 3 exons,
mais seul l'exon 2 (nucléotides 161 - 931 soit 771 pb) code pour la protéine PRION de 256 aa
(ID P23907)

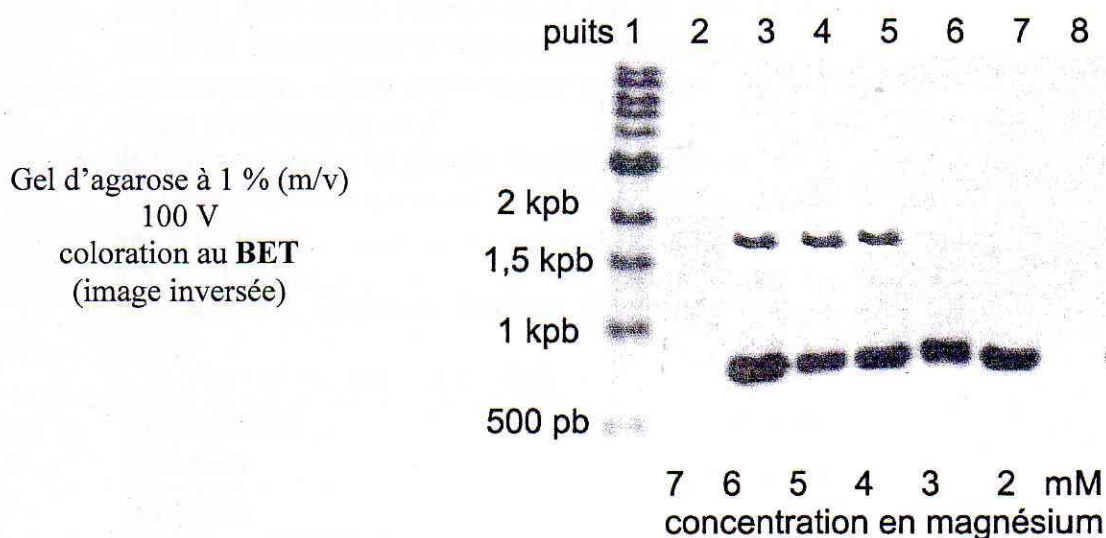
DOCUMENT 6

Séquence de l'exon n° 2 du gène PRNP du mouton

161 atggtgaaaa gccacatagg
181 cagttggatc ctggttctct ttgtggccat gtggagtgac gtgggcctct gcaagaagcg
241 accaaaaacct ggcggaggat ggaacactgg ggggagccga taccgggac agggcagtc
301 tggaggcaac cgetatecac etcagggagg ggggtgctgg ggtcagcccc atggaggtgg
361 ctggggccaa cctcatggag gtggetgggg tcagcccat ggtggtggct ggggacagcc
421 acatggtggt ggaggetggg gtcaaggtgg tagccacagt cagtggaaca agcccagtaa
481 gccaaaaacc aacatgaage atgtggcagg agctgtgca gctggagcag tggtaggggg
541 ccttggtggc tacatgctgg gaagtgccat gacaggect ctatacatt ttggcaatga
601 ctatgaggac cgttactate gtgaaaacat gtaccgttac cccaaccaag tgtactacag
661 accagtggat cagtatagta accagaacaa ctttgtgcat gactgtgtea acatcacagt
721 caagcaacac acagtcacca ccaccaccaa gggggagaac tteaccgaaa ctgacatcaa
781 gataatggag cgagtgggtg agcaaatgtg caccaccag taccagagag aatcccagge
841 ttattaccaa aggggggcaa gtgtgatect cttttctec cctctgtga tctctctcat
901 ctcttctc attttctca tagtaggata g

DOCUMENT 7

Electrophorégramme Optimisation de la concentration en magnésium



puits 1 : marqueur : 1 kpb ladder (biolabs)
puits 8 : témoin négatif