
L3-Biologie Biochimie Terre et Environnement

UE BM0501 Examen Ecrit Terminal Sujet de M. F. DELACOUX

Vous effectuez un stage dans un laboratoire de recherche. Vous êtes chargés (ées) de mener à bien les expériences de mutagenèse dirigée. Le gène IAP (annexe 1) est étudié depuis longtemps dans l'équipe que vous intégrez, il est donc déjà cloné dans le plasmide pEYFP-C1 (annexe 4).

I/ Acides aminés à muter

Vous devez muter l'acide aminé en position 32 de la protéine recombinante (partie correspondant à la partie codante du gène IAP) en acide aspartique.

Vous décidez de muter le gène par la technique de la « méga-amorce »

Question 1 : Que peut apporter la mutation en acide aspartique au niveau de la compréhension du rôle de l'acide aminé sauvage ? (2 points)

II/ Amorces PCR et PCR

Le clonage avait été réalisé afin que la construction n'apporte au niveau de la protéine recombinante que trois acides aminés, sans compter le tag provenant du plasmide.

Question 2 : Dessinez les amorces de mutagenèse et de clonage dont vous avez besoin pour faire la 1^{ère} étape de la mutation par PCR. Expliquez vos raisonnements concernant les deux amorces (4 points)

Question 3 : Quelle est la taille du fragment PCR obtenue à l'aide de ces deux amorces (2 points)

Question 4 : Dessinez l'amorce de clonage dont vous avez besoin pour faire la 2^{ème} PCR en utilisant le fragment amplifié par la PCR précédente. Expliquez votre raisonnement concernant la conception de cette amorce (3 points)

Question 5 : Quelle est la taille du fragment de cette 2^{ème} PCR (2 points)

III/ Résultats de la mutagenèse dirigée

Question 6 : Quelles sont les limites, les défauts et les avantages de la technique de la « méga-amorce » par rapport à d'autres techniques de mutagenèse dirigée (3 points)

Question 7 : Que pouvez-vous proposer comme manipulation simple pour répondre à la limite majeure de cette technique (2 points)

Question 8 : Que décidez-vous de vérifier avant l'expression de la protéine mutée ? Pourquoi ? (1 point)

IV/ Séquences de la protéine recombinante

Question 9 : Quelles sont les séquences en acides nucléiques et en acides aminés situées aux jonctions plasmide/insert. Soyez explicite quant à l'origine de ces séquences (plasmide, enzyme de restriction ou gène) (3 points)

Question 10 : Quelle est la taille de la protéine recombinante, détaillez votre calcul ? (3 points)

Annexe 1 : IAP ou CD47 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

```

gene      1..2047
          /gene="CD47"
CDS       148..1119
          /gene="CD47"
          /note="isoform 1 precursor is encoded by transcript"
          /codon_start=1
          /product="CD47 antigen isoform 1 precursor"
          /protein_id="NP_001768.1"
          /translation="MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTV
          NMEAQNTITEVYVKWKFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
          SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIE LKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQF
          GIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTG
          ILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLS
          IALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGM MNDE"
sig_peptide 148..201
          /gene="CD47"
misc_feature 166..1047
          /gene="CD47"
          /note="Region: CD47 integrin associated protein"
          /db_xref="CDD:15846"
mat_peptide 202..1116

```

/gene="CD47"
/product="CD47 antigen isoform 1"

ORIGIN

```

1 gggagcgcgc gtgcgcgcgg ccgtgcagcc tgggcagtgg gtcctgcctg tgacgcgcgg
61 cggcgctcga gcctgcctgt aacggcggcg gcggctgctg ctccagacac ctgcggcggc
121 ggcggcgacc atggggcggg cgcggagatg tggcccctgg tagcggcgct gttgctgggc
181 tcggcgtgct gcggatcagc tcagctacta tttataaaaa caaaatctgt agaactcagc
241 ttttgtaatg aactgtcgt cattccatgc tttgttacta atatggaggc aaaaaacact
301 actgaagtat acgtaaagtg gaaattttaa ggaagagata tttacacctt tgatggagct
361 ctaaacaagt ccactgtccc cactgacttt agtagtgcaa aaattgaagt ctcaacaata
421 ctaaaaggag atgcctcttt gaagatggat ccgagtgatg ctgtctcaca cacaggaaac
481 tacacttggtg aagtaacaga attaaccaga gaaggtgaaa cgatcatcga gctaaaatat
541 cgtgttggtt catggttttc tccaaatgaa aatattctta ttggtatttt cccaattttt
601 gctatactcc tgttctgggg acagtttggt attaaaacac ttaaataatag atccgggtgg
661 atggatgaga aaacaattgc tttacttggt gctggactag tgatcactgt cattgtcatt
721 gttggagcca ttctttctgt cccaggtgaa tattcattaa agaatgctac tggccttggt
781 ttaattgtga cttctacagg gatattaata ttacttcaact actatgtggt tagtacagcg
841 attggattaa cctcctctgt cattgccata ttggttattc aggtgatagc ctatacctc
901 gctgtgggtt gactgagtct ctgtattgcg gcgtgtatac caatgcatgg ccctcttctg
961 atttcagggt tgagtatctt agctctagca caattacttg gactagttta tatgaaattt
1021 gtggcttcca atcagaagac tatacaacct cctaggaaag ctgtagagga acccctaat
1081 gcattcaaag aatcaaaagg aatgatgaat gatgaataac tgaagtgaac tccaggactc
1141 cgatttgagg agtagtaaga cgtgaaagga attcacttgt gtttaagcac ctaggccttg
1201 atgattcact gttggggaga agaaacaaga aaagtaactg gttgtcacct atgagaccct
1261 tacgtgattg ttagttaagt ttttattcaa agcagctgta atttagttaa taaaataatt
1321 atgatctatg ttgtttgccc actcagatcag cagttttttg ttgttatttt taatcaatta
1381 gggcaatag tagaatggac aatttccaag cttgatgcct ttcaggctct aggcctctg
1441 gcctctaggt aaccagttta aattggttca gggtgataac tacttagcac tggcctgggtg
1501 attaccaga gatattctatg aaaacctagg gcttccatca aacctttgcc aactcagggt
1561 cacagcagct ttgggcagtt atggcagtat ggcattagct gagagggtgc tggcacttct
1621 gggtaaatg aataataaat taagtacagg caggaatttg gttgggagca tctgtatga
1681 tctccgatg atgtgatatt gatggagata gtggtoctca ttcttggggg ttgccattcc
1741 cacattcccc ctcaacaaa cagtgtaca ggtccttccc agatttaggg tacttttatt
1801 gatggatag ttttcttagg attcacataa ccccttgaaa ccctgtcttg tctcctggt
1861 acttgcttct gctgtacaag atgtagcacc ttttctctctc tttgaacatg gtctagtgc
1921 acggtagcac cagttgcagg aaggagccag acttgttctc agagcactgt gttcacactt
1981 ttcagcaaaa atagctatgg ttgtaacata tgtattccct tcctctgatt tgaaggcaaa
2041 aatctac

```

Annexe 2 : enzymes de restriction absentes de la séquence d'IAP de 1 à 2047

AatII	AccIII	Acc16I	Acc65I	AccB1I	AccBSI
AclI	AcvI	AcyI	AdeI	AfeI	AflII
AflIII	AgeI	AhdI	AjuI	AleI	AlfI
AloI	AloI	Alw44I	AlwFI	AlwNI	Aor13HI
Aor51HI	ApaI	ApaLI	AscI	AsiGI	AsiSI
Asp718I	AspCNI	AspEI	AssI	AsuII	AsuC2I
AsuNHI	AviII	AxyI	BaeI	BaeI	BalI
BanI	BanIII	BauI	BbeI	BbrPI	BbuI
BbvCI	Bce83I	BcgI	BcgI	BciVI	BcnI
BfiI	BfrI	BfuI	BglI	BglII	BlfI
Bme1580I	BmgI	BmgBI	BmrI	BmtI	BoxI
BplI	Bpu10I	Bpu14I	BpuEI	Bsa29I	BsaBI
BsaHI	BsbI	BscGI	Bse8I	Bse21I	Bse118I
BseAI	BseCI	BseJI	BseSI	BshNI	BshTI
BsiI	BsiWI	BsmBI	Bsp13I	Bsp24I	Bsp24I
Bsp68I	Bsp106I	Bsp119I	Bsp120I	BspCI	BspDI
BspEI	BspHI	BspLU11I	BspMII	BspMAI	BspTI
BspT104I	BspT107I	BspXI	BsrBI	BsrFI	BssAI
BssSI	Bst98I	BstACI	BstBI	Bst2BI	BstENI

BstNSI	BstPAI	BstXI	Bsu15I	Bsu36I	BsuTUI
BtgZI	BtrI	CaiI	CauII	CciNI	Cfr9I
Cfr10I	Cfr42I	Clal	CpoI	CspI	Csp45I
CspAI	CspCI	CspCI	DraIII	DrdII	DriI
Eam1105I	EciI	EclHKI	Eco47III	Eco72I	Eco81I
EcoHI	EcoRI	EgeI	EheI	Esp3I	FdxI
FseI	FspI	FspAI	FunI	HgiCI	Hin1I
HincII	HindII	HpaI	Hpy99I	Hsp92I	KasI
KpnI	Kpn2I	KspI	KspAI	MabI	MamI
MbiI	MlsI	MluI	MluNI	Mly113I	MroI
MroNI	MscI	Msp20I	MspCI	MssI	MstI
MvrI	NaeI	NarI	NciI	NgoMIV	NheI
NotI	NruI	NsbI	NspI	NspV	OliI
PacI	PaeI	PagI	PalAI	PasI	PciI
PdiI	Pfl123II	Pfl1108I	PfoI	PinAI	Ple19I
PmaCI	PmeI	PmlI	PpiI	PpiI	PscI
PshAI	PsiI	Psp1406I	PspAI	PspCI	PspLI
PspOMI	PsrI	PsrI	PstI	PvuI	RcaI
RgaI	RsrII	Rsr2I	SacII	SalI	SanDI
SapI	SmaI	SbfI	ScaI	SdaI	SexAI
SfiI	SfoI	Sfr303I	SfuI	SgfI	SgrAI
SgrBI	SgrDI	SgsI	SmaII	SmiI	SpaHI
SphI	SplI	SrfI	Sse232I	Sse8387I	SsmI
SunI	SwaI	TaqII	TaqII	TssI	UbaF9I
UbaPI	UthSI	Vha464I	VneI	XagI	XbaI
XceI	XhoI	XmaI	XmaCI	ZhoI	ZraI
ZrmI					

Annexe 3 : Sites de coupure et tampons de digestion de quelques enzymes de restriction

Nom	Sites de coupure	Tampon de digestion
Apal	GGGCC/C	A, E
BamHI	G/GATCC	C, D
Clal	AT/CGAT	B
EcoRI	G/AATTC	A, F
FdxI	CCATG/G	B, F
HindIII	A/AGCTT	C
HpaI	C/CGG	A, B, C
NotI	GC/GGCCGC	E, H
PstI	CTGCA/G	G, H
Sall	G/TCGAC	A, B
SmaI	CCC/GGG	C
XbaI	T/CTAGA	B, H
XhoI	C/TCGAG	B

