
L3-Biologie Biochimie Terre et Environnement

UE BM0501 Examen Ecrit Terminal Sujet de M. F. DELACOUX Répondez sur une copie distincte

Vous effectuez un stage dans un laboratoire de recherche, vous êtes chargés (ées) de mener à bien des expériences qui ont attrait à la 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 : Pourquoi privilégiez-vous cette technique ? (3 points)

Question 2 : 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 a 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 3 : 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 4 : Quelle est la taille du fragment PCR obtenue à l'aide de ces deux amorces (1 point)

Question 5 : 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 (2 points)

Question 6 : Quelle est la taille du fragment de cette 2^{ème} PCR (1 point)

III/ Résultats de la mutagenèse dirigée

Question 7 : 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 8 : Que pouvez-vous proposer comme manipulation simple pour répondre à la limite majeure de cette technique (2 points)

Question 9 : Que décidez-vous de vérifier avant l'expression de la protéine mutée ?, Pourquoi ? (1 point)

IV/ Séquences de la protéine recombinante

Question 10 : 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 11 : Quelle est la taille de la protéine recombinante ? (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 I precursor is encoded by transcript"
          /codon_start=1
          /product="CD47 antigen isoform I precursor"
          /protein_id="NP_001768.1"
          /translation="MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTV
NMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQF"
```

GIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTG
ILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLS
ILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE"

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 tgggcagtggt gtccctgctg tgacgcgcgg
61 cggcgctcga gcctgcctgt aacggcggcg gcggtctctg ctccagacac ctgcgggcggc
121 ggcggcgacc atggggcggg cgcggagatg tggcccctgg tagcggcgct gttgctgggc
181 tcggcgtgct gcggatcagc tcagctacta ttttaataaaa caaaatctgt agaactcacg
241 ttttgtaatg aactgtcgt cattccatgc tttgttacta atatggaggc acaaaacact
301 actgaagtat acgtaaagtg gaaatttaaa ggaagagata ttacacctt tgatggagct
361 ctaaacaagt ccactgtccc cactgacttt agtagtgcaa aaattgaagt ctcaacaatta
421 ctaaaaggag atgcctcttt gaagatggat ccgagtgatg ctgtctcaca cacaggaaac
481 tacacttggt aagtaacaga attaacccaga gaaggtgaaa cgatcatcga gctaaaatat
541 cgtggtggtt catggttttc tccaaatgaa aatattctta ttgttatttt cccaattttt
601 gctatactcc tgttctgggg acagtttggg attaaaacac ttaaatatag atccggtggt
661 atggatgaga aaacaattgc tttacttggg gctggactag tgatcactgt cattgtcatt
721 gttggagcca ttcttttctg cccaggtgaa tattcattaa agaatgctac tggccttggg
781 ttaattgtga ctctacaggg gatattaata ttacttcact actatgtgtt tagtacagcg
841 attggattaa cctccttctg cattgccata ttggttatto aggtgatagc ctatatcctc
901 gctgtggttg gactgagtct ctgtattgcg gcgtgtatac caatgcatgg cctcctctg
961 atttcaggtt tgagtatctt agctctagca caattacttg gactagttaa tatgaaattt
1021 gtggcttcca atcagaagac tatacaacct cctaggaaag ctgtagagga acccottaat
1081 gcattcaaag aatcaaaagg aatgatgaat gatgaataac tgaagtgaac tcgaggactc
1141 cgatttgagg agtagtaaga cgtgaaagga attcacttgt gtttaagcac ctaggccttg
1201 atgattcact gttggggaga agaacaaga aaagtaactg gttgtcacct atgagaccct
1261 tacgtgattg ttagttaagt ttttattcaa agcagctgta atttagttaa taaaataatt
1321 atgatctatg ttgtttgcc actcgagatc cagttttttg ttgttatttt taatcaatta
1381 ggggcaatag tagaatggac aatttccaag cttgatgoot ttcaggctct agggcctctg
1441 gcctctaggt aaccagttta aattggttca ggggtgatac tacttagcac tgccctgggtg
1501 attaccaga gatatctatg aaaacctagg gcttccatca aacctttgcc aactcaggtt
1561 cacagcagct ttgggcagtt atggcagtat ggcattagct gagagggtgc tgcacttct
1621 gggtaaatgg aataataaat taagtacagg caggaatttg gttggggagca tctgtatga
1681 tctccgatg atgtgatatt gatggagata gttgctcctca ttcttggggg ttgccattcc
1741 cacattcccc cttcaacaaa cagtgaaca gttccttccc agatttaggg tacttttatt
1801 gatggatag ttttctaggg attcacataa ccccttgaaa cctgtcttg tctcctggt
1861 acttgcttct gctgtacaag atgtagcacc ttttctctc tttgaaatg gtctagtgc
1921 acggtagcac cagttgcagg aaggagccag acttgttctc agagcactgt gttcacactt
1981 ttcagcaaaa atagctatgg ttgtaacata tgtattcctt tctctgatt tgaaggcaaa
2041 aatctac

```

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

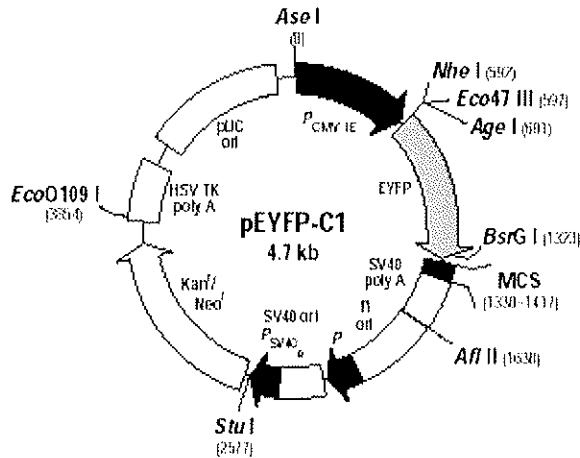
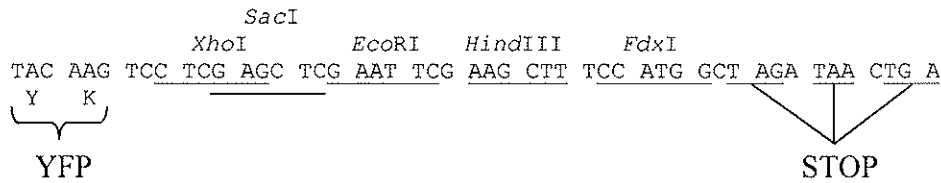
AatII	AccIII	Acc16I	Acc65I	AccB1I	AccBSI
AclI	AcvI	AcyI	AdeI	AfeI	AflII
AflIII	AgeI	AhdI	AjuI	AleI	AlfI
AloI	AloI	Alw44I	AlwFI	AlwNI	Aor13HI
Aor51HI	ApaI	ApaLI	AscI	AsiGI	AsiSI
Asp718I	AspCNI	AspEI	AssI	AsuII	AsuC2I
AsuNHI	AviII	AxyI	BaeI	BaeI	BalI
BanI	BanIII	BauI	BbeI	BbrPI	BbuI
BbvCI	Bce83I	BcgI	BcgI	BciVI	BcnI

BfiI	BfrI	BfuI	BglI	BglII	BlfI
BmeI580I	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	ClaI	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	Pfl11108I	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
ClaI	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
SalI	G/TCGAC	A, B
SmaI	CCC/GGG	C
XbaI	T/CTAGA	B, H
XhoI	C/TCGAG	B

Annexe 4: plasmide d'expression eucaryote pEYFP-C1 (détail du MCS, tag YPF de 365 acides aminés)



Annexe 5 : le code génétique

1 ^{ère} position (5')	2 ^{ème} position			3 ^{ème} position (3')	
	U	C	A	G	
U	UUU Phe/F	UCU Ser/S	UAU Tyr/Y	UGU Cys/C	U
	UUC Phe/F	UCC Ser/S	UAC Tyr/Y	UGC Cys/C	C
	UUA Leu/L	UCA Ser/S	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu/L	UCG Ser/S	UAG Stop	UGG Trp/W	G
C	CUU Leu/L	CCU Pro/P	CAU His/H	CGU Arg/R	U
	CUC Leu/L	CCC Pro/P	CAC His/H	CGC Arg/R	C
	CUA Leu/L	CCA Pro/P	CAA Gln/Q	CGA Arg/R	A
	CUG Leu/L	CCG Pro/P	CAG Gln/Q	CGG Arg/R	G
A	AUU Ile/I	ACU Thr/T	AAU Asn/N	AGU Ser/S	U
	AUC Ile/I	ACC Thr/T	AAC Asn/N	AGC Ser/S	C
	AUA Ile/I	ACA Thr/T	AAA Lys/K	AGA Arg/R	A
	AUG Met/M	ACG Thr/T	AAG Lys/K	AGG Arg/R	G
G	GUU Val/V	GCU Ala/A	GAU Asp/D	GGU Gly/G	U
	GUC Val/V	GCC Ala/A	GAC Asp/D	GGC Gly/G	C
	GUA Val/V	GCA Ala/A	GAA Glu/E	GGA Gly/G	A
	GUG Val/V	GCG Ala/A	GAG Glu/E	GGG Gly/G	G