B2. La PCR

On veut comprendre le mécanisme de réplication semi-conservative de l'ADN à travers la réalisation d'une PCR (réaction en chaîne par polymérase ou *Polymerase Chain Reaction*).

Comment peut-on amplifier une quantité définie d'ADN ?

Pour répondre à la problématique, on vous demande : *d'**effectuer** le protocole de PCR et de **rendre** compte de vos résultats.*

Ressources complémentaires

Document 1. Principe de la PCR.

La **réaction en chaîne par polymérase** est utilisée pour obtenir une **quantité importante de copies d'un fragment d'ADN** défini, à partir d'une **quantité infime de celui-ci**. Elle consiste en une **réplication d'ADN** *in vitro*. Celle-ci est possible grâce à l'ajout :

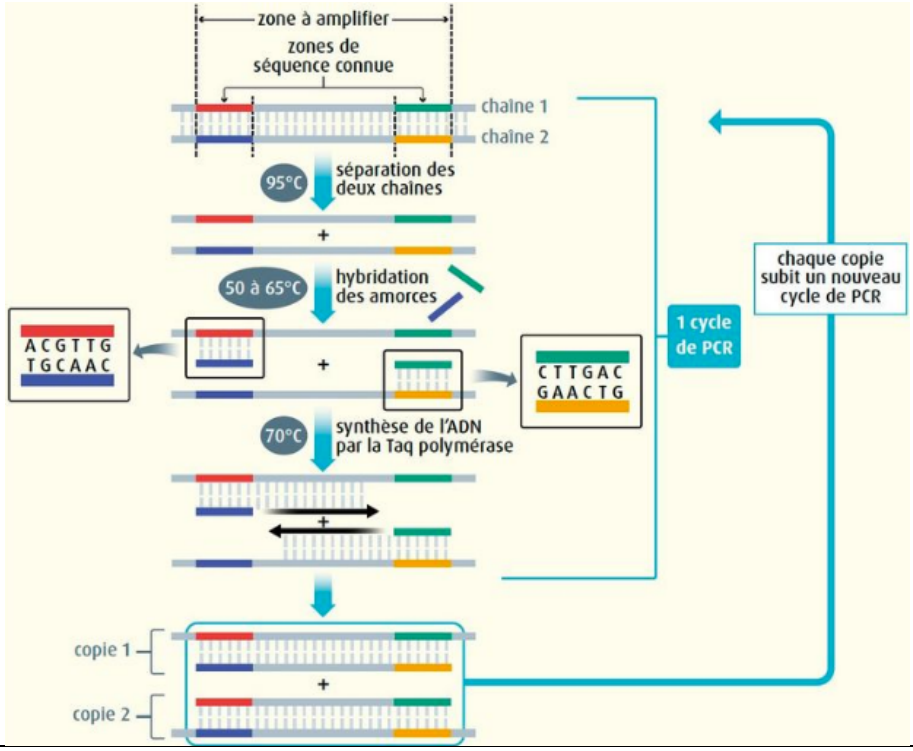
* d'une **enzyme de réplication**, l'ADN polymérase (appelée ici **Taq polymérase**) ;
* des **quatre nucléotides** nécessaires à la synthèse de l'ADN (NT à adénine, cytosine, guanine, thymine) ;
* d'**amorces de réplication** consistant en de courtes séquences d'ADN simple brin spécifiques de l'ADN d'intérêt.

Les amorces sont synthétisées artificiellement de façon à avoir une séquence strictement complémentaire aux extrémités de l'ADN d'intérêt (ce qui signifie que la séquence des extrémités de l'ADN à amplifier est connue). Elles bornent la séquence à amplifier et permettent l'activité de l'ADN polymérase.

Le processus de PCR fonctionne selon **quatre étapes** :

- Le mélange est d'abord chauffé à une température proche de 100°C afin de **dénaturer** (= séparer) les brins d'ADN. En effet, les molécules d'ADN d'intérêt sont formées de **deux brins qui doivent être séparés** préalablement à la réplication. De plus, la dénaturation assure aussi que l'ADN d'intérêt et les amorces soient dans une configuration linéaire pour faciliter l'étape d'hybridation qui suit.
- Le mélange est ensuite refroidi vers une température de 45 à 60 °C pour permettre **l'appariement des amorces avec l'ADN d'intérêt** : c'est l'**hybridation**.
- L'ADN polymérase va alors ajouter les nucléotides à l'extrémité de chaque amorce en utilisant le brin d'ADN d'intérêt comme matrice de réplication : c'est l'**élongation**. Cette étape s'effectue à 72 °C (température optimum de fonctionnement de l'enzyme Taq polymerase). De cette manière, un nouveau brin complémentaire est formé et on obtient ainsi **deux molécules d'ADN double brin identique à l'ADN d'intérêt**.
- Le cycle formé par ces 3 premières étapes est **répété plusieurs fois**. A chaque cycle, **le nombre de molécules d'ADN est doublé**.
- La dernière étape consiste en la **terminaison des molécules d'ADN** nouvellement synthétisées. Cette étape s'effectue aussi à 72 °C et assure que les molécules d'ADN nouvellement synthétisées soient entières et correspondent strictement à la molécule d'ADN d'intérêt.

Principe de la PCR.



Manipulation proposée :

Etapes principales de la manipulation.

- Préparation des microtubes ;
- Réglage des paramètres du thermocycleur et réalisation de la PCR ;
- Mise en place puis réalisation de l'électrophorèse ;
- Observation et analyse des résultats (dont photo ou schéma).

Précautions de sécurité :

- ne pas inhaler ni ingérer les produits.
- éviter les projections dans les yeux. En cas de projection dans les yeux, rincer à grande eau.
- manipuler les colorants avec des gants.

Matériel :

- centrifugeuse, thermocycleur, cuve à électrophorèse d'ADN ;
- Gants, micropipettes et cônes à usage unique, microtubes ;
- MIX (bouchon bleu) : contient le tampon de la réaction, les amorces et les nucléotides ;
- Taq polymérase (bouchon vert) ;
- ADN génomique de phage lambda (bouchon incolore) : c'est la séquence d'ADN à amplifier ;
- SAFEGREEN (bouchon marron).

Protocole :

1) Préparation des tubes :

- Chaque groupe prépare 1 µtube suivant les consignes données dans le tableau.
    - 2 ou 3 groupes feront le tube A
    - 2 groupes feront le tube B
    - 2 groupes feront le tube C

Préparation des tubes.

Nom des tubes à préparer et volume à prévoir		**Tube A**	**Tube B** (tube sans ADN)	**Tube C** (tube sans Taq)
MIX (bouchon bleu)	19 µl	x	x	x
Taq polymérase (bouchon vert)	3 µl	x	x	
ADN génomique de phage lambda (bouchon incolore)	4 µl	x		x
Volume total		26 µl	22 µl	23 µl

Attention : à l'échelle de la classe, un tube témoin négatif comprenant tous les réactifs (= A) sera réservé sans être mis dans le thermocycleur.

- **Homogénéiser** le contenu des tubes en aspirant et refoulant très délicatement à l'aide d'une micropipette.
- Bien **fermer** les tubes.
- **Donner** un rapide tour de centrifugeuse pour faire retomber tout le liquide au fond du tube et éliminer les éventuelles bulles.

2) Paramétrage du thermocycleur et réalisation de la PCR.

- **Ouvrir** l'application miniPCR sur un ordinateur et **rester** dans l'onglet « Bibliothèque ».
- **Cliquer** sur le bouton « + » à droite.
- **Sélectionner** le protocole PCR dans le menu déroulant situé en haut du volet de droite.
- **Entrer** un nom de protocole : par exemple « PCR RAPIDE ».
- **Définir** les paramètres du protocole tels qu'indiqués dans le tableau ci-dessous :

Etape	Température (°C)	Durée (s)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	60	1
Dénaturation	95	15	10 (ou plus)
Hybridation	55	15	
Elongation	72	30	
Terminaison	72	60	1

- **Cliquer** sur « Enregistrer » pour stocker le nouveau protocole. Votre protocole est maintenant prêt à être utilisé et disponible dans la bibliothèque de protocoles.
- **Mettre** les tubes dans le thermocycleur et **lancer** le programme.

Le cycle de PCR dure 20 à 30 min (suivant le nombre de cycles). Il est possible en parallèle d'afficher les graphiques représentant schématiquement le nombre de copies d'ADN, ainsi que les étapes de la PCR en animation.

3. Préparation de l'électrophorèse, mise en place des produits, puis migration.

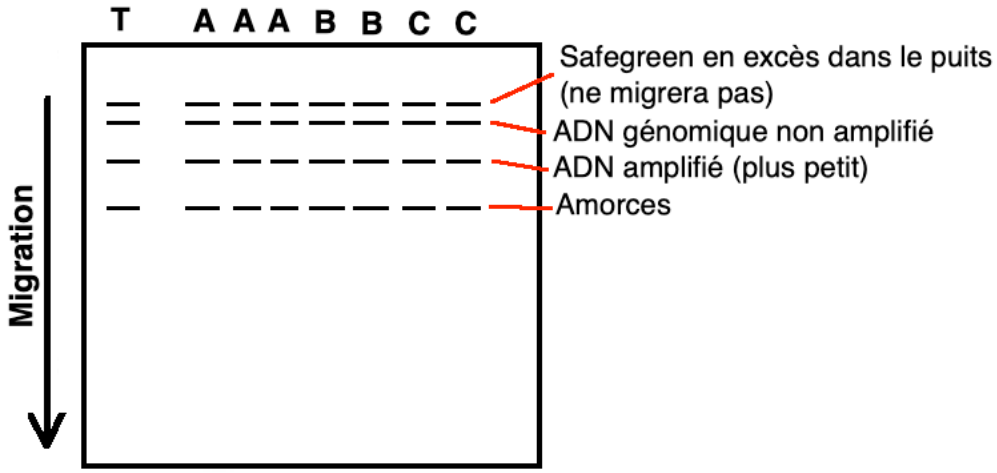
Afin d'observer les résultats de PCR, on effectue ensuite une électrophorèse du contenu des tubes. Le colorant SAFEGREEN permet de visualiser l'ADN (ADN génomique non amplifié, ADN amplifié (plus petit) et amorces).

Au préalable, un gel de gélose a été coulé au laboratoire, puis 9 puits ont été creusés dans la gélose : ce sont les puits de dépôt des produits.

- **Verser** le tampon TBE sur le gel pour remplir les puits, puis de part et d'autre du gel jusqu'à l'affleurement (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- **Pulvériser** une dose de produit anti-condensation dans le couvercle orange de la cuve, puis l'**essuyer** avec le petit chiffon bleu prévu. La pulvérisation est à refaire entre chaque migration.

- Dans chaque tube de réaction de PCR et dans le témoin négatif, **ajouter** 2 µl de SAFEGREEN (bouchon marron) et **homogénéiser** à l'aide de la micropipette.
- **Déposer** 15 µl (pour le peigne à 9 dents) de chaque échantillon à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. **Faire** doucement et **éviter** les bulles (attention à bien noter l'ordre des dépôts comme dans le schéma du bas de la page).
- A l'échelle de la classe, sur un gel, il faut **déposer** en plus le témoin négatif (= celui qui n'est pas passé dans le thermocycleur).
- **Fermer** la cuve à électrophorèse et la **brancher** sur l'alimentation.
- **Mettre** en marche la cuve en appuyant sur le bouton.
- **Mettre** la lumière. En quelques minutes, vous voyez déjà l'ADN qui fluoresce en vert (attention le safegreen seul fluoresce aussi, mais reste dans le puits s'il n'est pas fixé à l'ADN).
- Pour augmenter le contraste, filmer ou prendre des photos de la migration en temps réel, placer la chambre noire délicatement sur la cuve.

Aide à l'interprétation : localisation possible des différents échantillons après migration.



T = témoin négatif. C'est le tube A avec tous les réactifs (ADN génomique et amorces), mais pas de cycle dans le thermocycleur.
A. C'est le tube A avec tous les réactifs (ADN génomique et amorces) passé dans le thermocycleur
B. C'est le tube sans l'ADN génomique
C. C'est le tube sans Taq.