











BIOCHIMIE BIOLOGIE BIOTECHNOLOGIE

TSTL

AT Amplification de l'ADN de poissons et électrophorèse

Objectifs:

- Mettre en œuvre une technique de PCR
- Repérer les étapes d'un cycle de PCR
- Vérifier le résultat et la qualité de la PCR par électrophorèse
- Mettre en œuvre une technique d'électrophorèse

directement car il est en quantité beaucoup trop faible.

- Interpréter un électrophorégramme pour identifier le fragment d'intérêt

Au cours de l'AT2, un échantillon de tissu de chaque spécimen de poisson ou de raie à identifier a été prélevé sur les poissons fournis par l'Aquarium tropical. L'ADN génomique et mitochondrial de cet échantillon a ensuite été extrait grâce à un kit d'extraction puis purifié grâce à une colonne de chromatographie. L'ADN ainsi récupéré ne peut pas être analysé

Afin de pouvoir identifier l'espèce à laquelle appartient chaque spécimen, il faut augmenter la quantité d'ADN et pour cela une amplification (réplication) spécifique de la région d'ADN correspondant au gène marqueur de la cytochrome C oxydase I (COI) à partir de l'ADN purifié de chaque poisson ou raie. Une fois amplifiée, l'échantillon d'ADN pourra être envoyée au séquençage après que l'amplification du gène marqueur aura été confirmée par électrophorèse.

Le but de l'activité expérimentale est donc de :

- Réaliser une PCR pour amplifier la gène marqueur de la COI
- Valider la PCR réalisée en vérifiant la présence du gène de la COI en grand nombre de copies par électrophorèse en gel d'agarose.

Présentation de la PCR

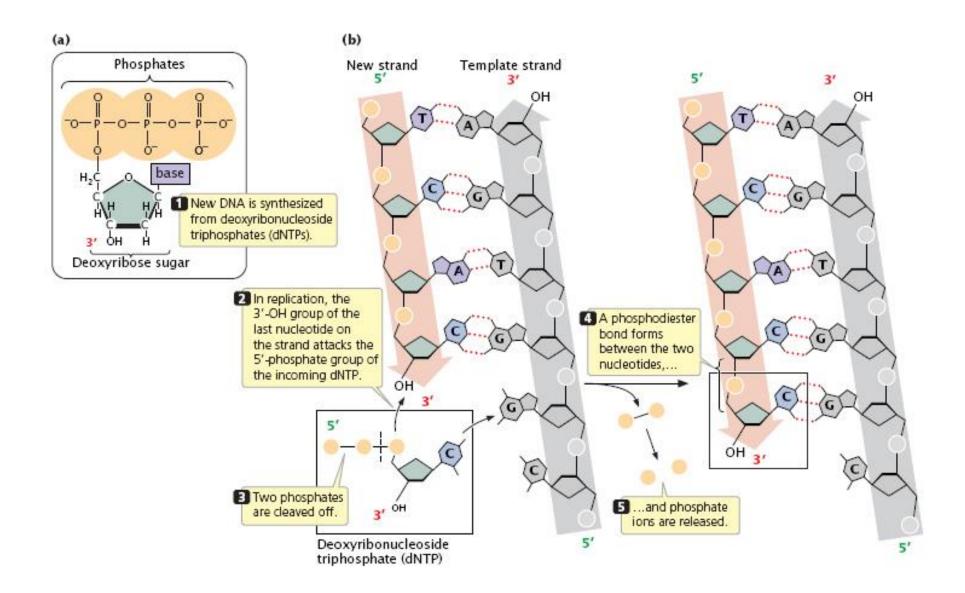
La PCR ou Polymerase Chain Reaction (= réaction en chaîne de la polymérase) est une technique qui a révolutionnée la biologie moléculaire. La première publication publique sur la PCR remonte à 1986 et a valu le prix Nobel de Chimie à son auteur <u>Kary Mullis</u> en 1993.

Objectif de la PCR : amplifier in vitro, de manière exponentielle (= en très grande quantité, jusque \times 10^6), un fragment d'ADN choisi, même si la quantité initiale est très faible (1 copie).

<u>Principe de la PCR</u>: basée sur la capacité de l'ADN polymérase à pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'un brin matrice, et ce uniquement à partir d'une amorce. La PCR utilise ces propriétés de l'ADN polymérase, de manière répétitive.

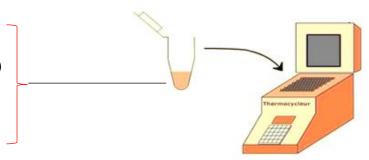
https://www.youtube.com/watch? v=iQsu3Kz9NYo

Rappels sur la réplication :

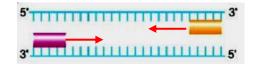


« Ingrédients » pour faire une PCR :

- Matrice ADN
- Amorces sens (F) et anti-sens(R)
- ADN polymérase
- dNTP
- Tampon



- **Une matrice**: ADN comportant le fragment à amplifier
- Un couple d'amorces spécifiques du fragment à amplifier : amorces sens et antisens (≈ 20 nucléotides)



- Une ADN polymérase thermostable (= résistant à des températures élevées): Taq polymérase isolée à partir de bactéries thermophiles: Thermus aquaticus
- Des dNTPs: desoxyribonucleotides triphosphate = A, T, C, G
- Tampon PCR : conditions de fonctionnement optimales pour la Taq Polymérase
 - → Maintien d'un pH optimal (8,5-9)
 - → Mg²⁺: cofacteur de l'enzyme Taq polymérase
 - → Mg²+ et cations monovalents (ex : K+) : neutralisation des charges négatives des groupements phosphates de l'ADN = stabilisation hybride ADN/ADN

<u>Point déterminant</u>: Les amorces permettent de cibler Le fragment à amplifier grâce au couple d'amorces spécifiques de la séquence en question.

Choix des amorces → déterminant pour l'amplification = se fait en fonction de la séquence des extrémités du fragment à amplifier

3 grandes étapes sont nécessaires pour avoir la réplication d'un ADN double brin.

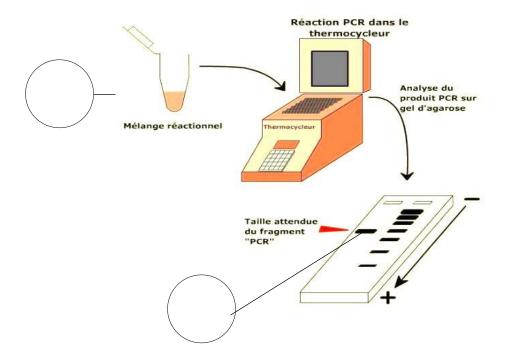
Ces 3 étapes sont réalisées à des températures différentes :

- 1. La première incubation se fait à température très élevée (de l'ordre de 95°C) et correspond à l'étape de <u>dénaturation</u> de l'ADN double brin en ADN simple brin → les deux brins séparés constituent les matrices qui vont servir de modèle pour que la polymérase synthétise les brins complémentaires.
- 2. La deuxième incubation se fait à une température (50-60°C) plus basse permettant aux amorces spécifiques de la séquence à amplifier de s'hybrider. C'est l'étape <u>d'hybridation</u> <u>des amorces</u>.
- 3. La troisième incubation se fait à une température intermédiaire entre les deux premières températures (72°C) correspondant à la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase. C'est l'étape d'élongation au cours de laquelle l'ADN polymérase

synthétise les brins complémentaires à partir des amorces en suivant la séquence des brins matrice.

Comment analyser les produits de PCR ?

- → L'amplicon (= produit d'amplification PCR) en très grande quantité peut être détecté par électrophorèse en gel d'agarose
- → Sa taille est vérifiée grâce à un marqueur de taille (MT) = étalon contenant des fragments d'ADN de taille connues.



Réflexion préliminaire

1. Polymerase Chain Reaction

- Q1. Indiquer le rôle de chaque réactif du mélange réactionnel de PCR donné dans la fiche technique 1.
- Q2. Justifier l'importance d'utiliser une ADN polymérase thermorésistante pour réaliser la PCR
- Q3. Indiquer le rôle des 3 étapes mentionnées dans le programme de température du thermocycleur données dans la fiche technique 1.
- Q4. D'après la fiche technique 1, donner la taille attendue pour le fragment amplifié.

→ Faire valider

Q5. A l'aide de la fiche technique 1, indiquer la composition et le rôle des témoins d'efficacité (=positif) et de spécificité (=négatif) à réaliser pour valider cette PCR.

2. Analyse des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose

Q6. Calculer la masse d'agarose à peser pour préparer 30 mL de gel à 1 % (m/v) d'agarose.

- Q7. En utilisant les fiches techniques 1 et 2 ainsi que le document 1, schématiser les résultats attendus sur le gel d'électrophorèse (indiquer le sens de migration ainsi que le marqueur de taille et les deux témoins de PCR).
- → Faire valider

Réalisation pratique

- **T1.** Réaliser l'amplification de la séquence *COI* par PCR à partir de l'ADN extrait lors de l'AT1 en suivant la fiche technique 1.
- **T2.** Calculer la température d'hybridation à utiliser lors de la PCR en analysant les informations données dans la fiche technique 1.
- T3. Remplir le tableau 'récapitulatif des amorces utilisées' de la FT1 et faire valider
- **T4.** Analyser les produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose selon la fiche technique 2.

Présentation et exploitation des résultats

- Q8. En utilisant le document 1, annoter la photo du gel obtenu concernant le marqueur de taille ainsi que les échantillons de PCR.
- → Faire valider
- Q9. Analyser les résultats de PCR sans oublier de reporter les annotations importantes sur la photo du gel.

CONCLUSION GENERALE

Q10. A l'aide du résultat obtenu lors de l'électrophorèse, conclure sur la qualité de l'extraction et/ou de la PCR.

Dossier technique

Fiches techniques:

- Fiche technique 1 : Amplification du marqueur COI par PCR
- Fiche Technique 2 : Analyse des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose

Documents:

- Document 1 : Marqueur de taille Lambda EcoRI/HindIII

Fiche technique 1

Amplification du marqueur COI par PCR

Matériel

- 1 tube à PCR
- Micropipettes P10, P20, P200 + Cônes
- Portoir de microtubes
- Portoir de microtubes PCR
- Poubelle pour solides
- Bac de glace
- Thermocycleur

Réactifs/milieux/matériel biologique

- Solution d'ADN extrait lors de l'AT2
- Amorces sens F et anti-sens R spécifiques de la séquence d'ADN de la COI
- Tampon de PCR 10X
- Désoxyribonucléotides libres dNTP (dATP+ dCTP+ dGTP+ dTTP)
- Taq polymérase (green Taq)
- Eau Ultrapure

Mode opératoire

Toutes les étapes doivent être effectuées sur glace et avec des gants.

1. Dans un tube PCR, ajouter les réactifs suivants :

Réactifs	Microtube PCR
Mix de PCR 2X (en μL)	20
Amorce sens (µL)	1
Amorce anti-sens (µL)	1
Eau ultra pure qsp 40 μL (μL)	
ADN de poisson	1

- 2. Homogénéiser par aspiration-refoulement
- **3.** Déposer les tubes dans le thermocycleur. Le thermocycleur est réglé¹ pour suivre le programme de températures suivant :

Activation	94°C / 1 min	
Cycle X 50	Etape 1	94°C / 30 sec
	Etape 2	/ 30 sec
	Etape 3	72°C / 1 min
Extension finale		72°C / 3 min

Détermination de la température d'hybridation

L'étape critique est celle de l'hybridation car si elle se fait mal, la PCR sera ratée. La température d'hybridation optimale de chaque couple d'amorce doit donc être déterminée avant toute PCR. Pour cela, il faut d'abord obtenir la température de fusion ou T_m, (*melting temperature*)

¹ Pour des raisons expérimentale, le programme machine est standardisé pour ce projet : aller sur l'appareil => Barcod 19 (avec 50 cycle et Ta= 50°C)= paramètre mis au point par le chercheur de l'aquarium

TSTL BIOTECHNOLOGIE

GENETIQUE

qui est la température théorique pour laquelle la moitié des molécules d'amorce sont hybridées sur le brin d'ADN complémentaire. Elle peut être calculée avec différentes équations telle que :

$$T_m = 4 x (G + C) + 2 (A + T)$$

Avec C, G, A et T : le nombre de cytosines, guanines, Adénines, Thymines dans l'amorce. Le couple d'amorces utilisées pour amplifier la séquence de COI est indiqué dans l'extrait de publication donné ci-dessous (A. Dettai et collaborateurs, 2012) :

	Gene	Description (Source: HGNC Symbol)	Location of the amplified fragment in the gene*	Gene location: Group (position)*	Frag. Size	Primer name	Primers
Mitoc.	COI	Cytochrome oxidase 1	3' end (Folmer region)	Mitochondrial genome	≈650 bp	TelF1 TelR1	5'- TCGACTAATCAYAAAGAYATYGGCAC-3' 5'- ACTTCTGGGTGNCCAAARAATCARAA- 3'

La Température d'hybridation ou T_a (annealing temperature) est calculée d'après la température de fusion : $T_a = T_m - 5$ °C

Cela permet de maximiser l'hybridation tout en évitant l'hybridation non spécifique de l'amorce à d'autres endroits du génome qui se produit avec une température trop basse.

Tableau récapitulatif pour les amorces utilisées :

Nom du gène	Nom complet	des	Séquence des amorces (forward et reverse)	Température de fusion (T _m) (°C)	Température d'hybridation (T _a) (°C)
			TCGACTAATCAYAAAGAYATYGGCAC		
			ACTTCTGGGTGNCCAAARAATCARAA		

Fiche technique 2

Analyse des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose

Matériel

- · Générateur de courant
- Cuve de migration
- Gants

Réactifs/milieux

- Produits de PCR obtenus
- Gel d'agarose 1 %
- Tampon TAE 1X
- Tampon de charge TpC

Mode opératoire

- Transférer 15 µL de produits de PCR dans un microtube propre
- Ajouter dans chaque microtube PCR 3 µL de tampon de charge TpC
- Déposer 18 μL de chaque échantillon sur gel
- Réaliser la migration à 150 V pendant 1h en suivant la migration des marqueurs de front.
- Arrêter la migration guand les marqueurs de front de migration sont à 1 cm du bord du gel.
- Débrancher le générateur. Ouvrir la cuve

Seront également déposés sur le gel par le professeur :

Le marqueur de taille (MT)

- Un témoin négatif de la PCR

Document 1

Marqueur de taille Lambda EcoRI/HindIII

