

Séance génome : Explication PCR et électrophorèse

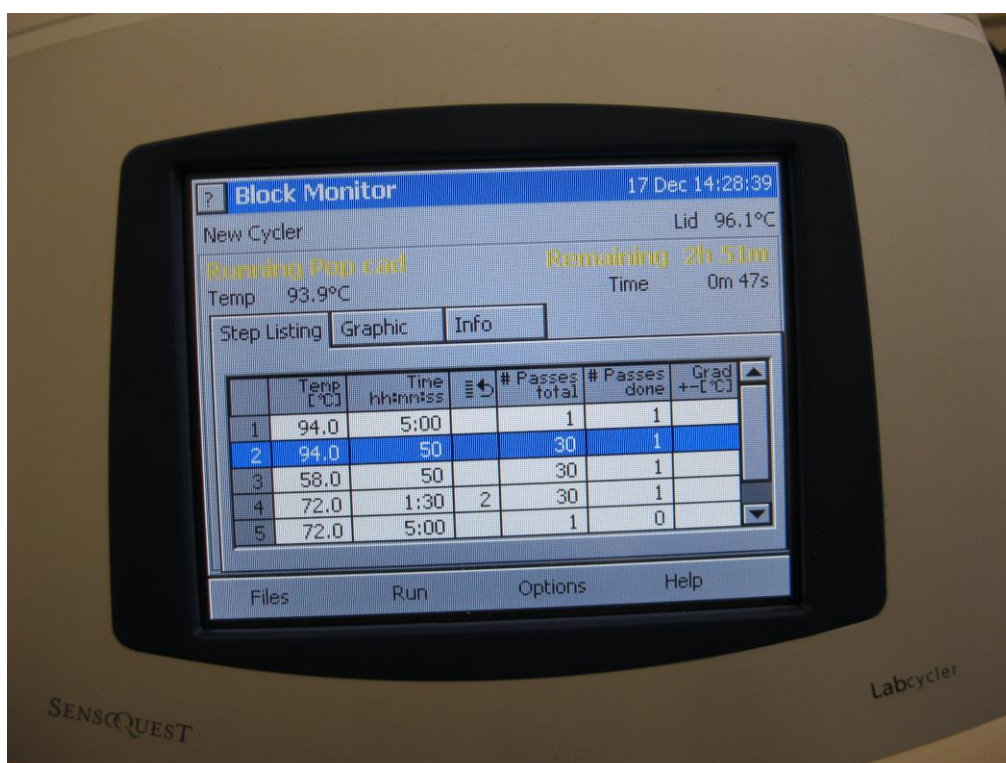
La PCR (Polymérase Chain Reaction) est une technique qui permet de démultiplier en de très nombreuses quantités une séquence de nucléotides parmi l'ensemble de la molécule d'ADN. Comment cela fonctionne-t-il et comment la réaliser ?

Protocole pour réaliser une PCR :

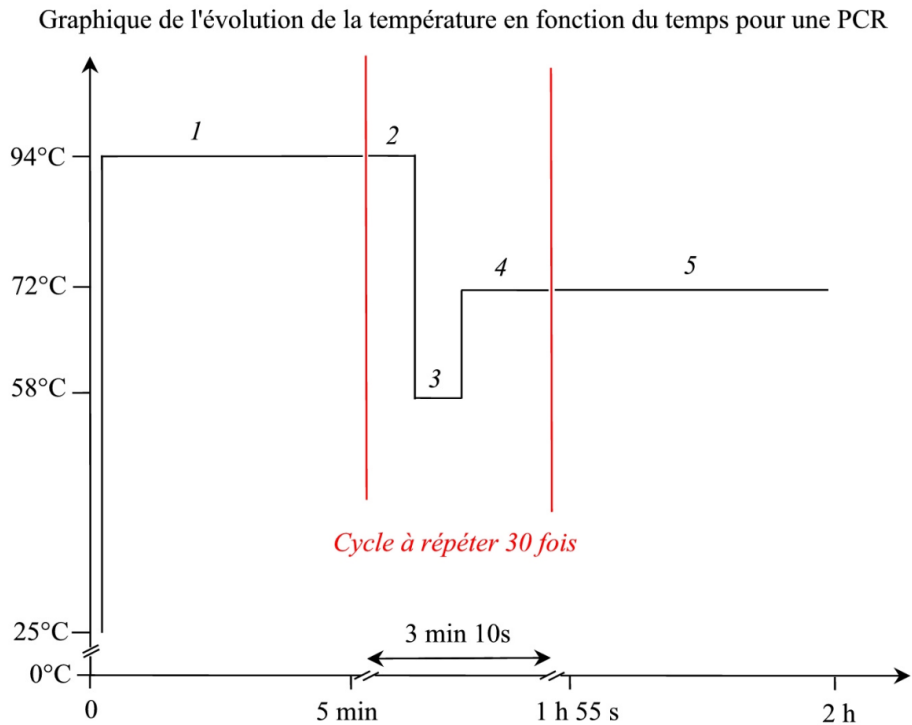
- Dans un tube PCR, introduire 0.5µl de l'amorce 1 ; 0.5 µl de l'amorce 2 ; 12 µl d'eau ppi ; 15 µl de GREEN TAq et, à la fin, 2 µl de solution d'ADN extrait précédemment.
- Agiter doucement pour ne pas abimer l'ADN.
- Déposer le tube dans son compartiment à l'intérieur du séquenceur.
- Programmer et lancer le séquenceur sur le programme « pop_CAD » de la manière suivante :

Étape	Nom de l'étape	Température	Temps	Nombre de cycles	
1	Dénaturation initiale	94°C	5 min	1	
Cycles					
2	Dénaturation	94°C	50 sec	30	
3	Hybridation	58°C	50 sec	30	
4	Elongation	72°C	1 min 30 sec	30	
Retour à l'étape 2 tant que les 30 cycles n'auront pas été effectués.					
5	Elongation finale	72°C	5 min	1	
6	Refroidissement	12°C	1 heure	1	Facultatif

Interface du séquenceur



Allure d'un cycle de PCR :



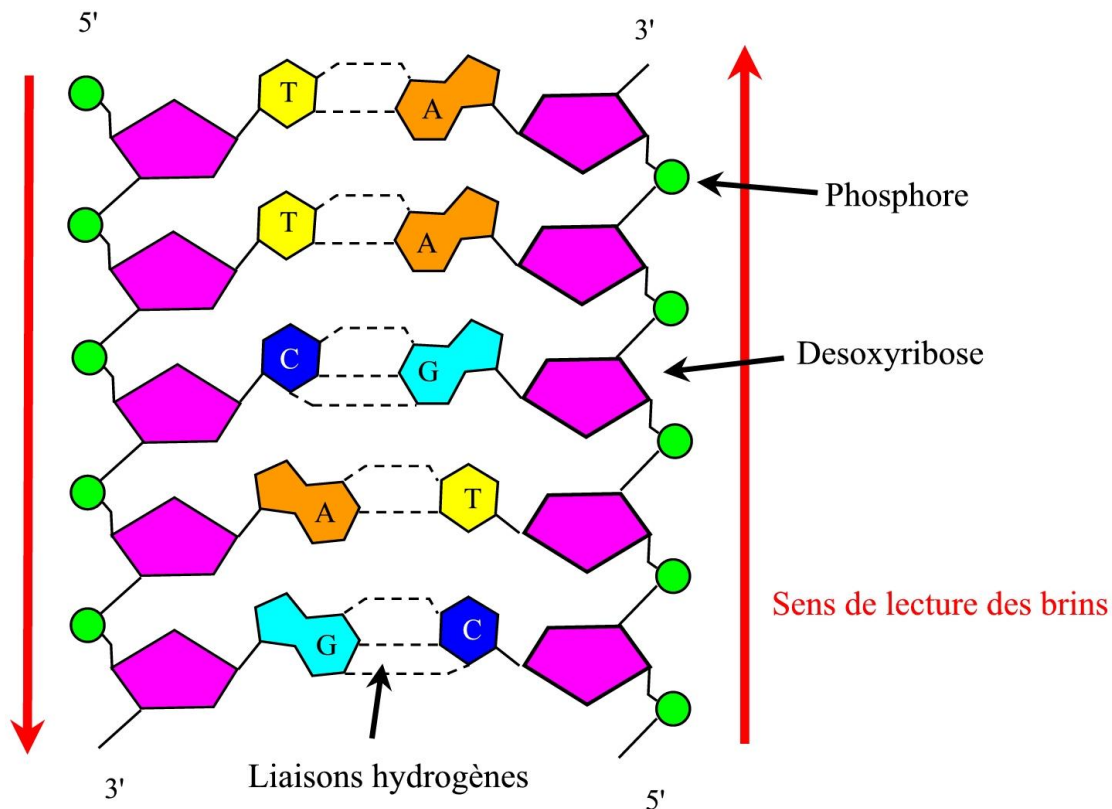
Explication des étapes :

- Dénaturation de l'ADN : la dénaturation correspond à la séparation des 2 brins d'ADN ; les liaisons hydrogènes qui lient le brin 5' au brin 3' de la molécule d'ADN se rompent (= la molécule d'ADN s'ouvre en 2). La rupture des liaisons hydrogènes nécessite une quantité d'énergie considérable, d'où la température de 94°C
- Hybridation de l'ADN : l'hybridation consiste en la fixation des amorces sur la molécule d'ADN séparée. Pour cela, la température doit être plus basse de manière à permettre une quelconque fixation (si on ne diminuait pas la température, les amorces de pourraient pas se fixer).
- Elongation de l'ADN : Une fois que les amorces sont fixées, l'enzyme polymérase (GREEN TAq) va permettre la synthèse dans le sens 5' => 3' du brin complémentaire au brin d'ADN. Après l'élongation, 2 molécules d'ADN seront alors formées.

Explication de la fixation des amorces et de la synthèse du brin complémentaire et du fonctionnement de la PCR.

Tout d'abord, il faut savoir que la molécule d'ADN possède 2 brins, qui sont le complémentaire l'un pour l'autre selon la règle C=G ; A=T. Ces 2 brins possèdent également une autre distinction qui est leur sens de lecture. En effet, chaque brin d'ADN possède une extrémité 3' et une extrémité 5' qui sont inversées d'un brin à l'autre. Le sens de lecture d'un brin se fait toujours de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

Schéma d'une molécule d'ADN



Réalisation : Rémy DORNIER

Ce sens de lecture est dû à la molécule de désoxyribose, que possède la molécule d'ADN, qui peut exister sous plusieurs formes : la forme 5' et la forme 3'.

Maintenant que nous savons comment la molécule d'ADN se lit, nous allons pouvoir comprendre de quelle manière les amorces agissent sur la molécule. Prenons un exemple simple. **(ATTENTION : les amorces utilisées sont très simplistes ; les amorces réelles possédant entre 8 et 10 nucléotides. Les amorces ci-dessous permettent uniquement d'améliorer la compréhension)**

Amorce 1 : 3' TT 5'

Amorce 2 : 5' CG 3'

Séquence d'ADN : 5' ATATCCCGATGCAACT 3'
3' TATAGGGCTACGTTGA 5'

La séquence à amplifier, appelée amplicon, est en rouge dans les molécules d'ADN

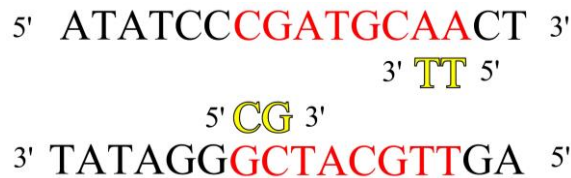
Commençons le premier cycle PCR :

- Etape 1 : Dénaturation : notre molécule d'ADN s'ouvre en 2

5' ATATCCCGATGCAACT 3'

3' TATAGGGCTACGTTGA 5'


- Etape 2 : Hybridation : les amorces 1 et 2 vont venir se fixer chacune sur leur brin d'ADN respectif (amorce 1 en 3'/5' va se fixer sur le brin en 5'/3' et l'amorce 2 en 5'/3' va venir se fixer sur le brin en 3'/5'. De cette façon, la complémentarité de la molécule d'ADN est respectée)
(ATTENTION : une amorce en 3'/5' ne pourra jamais se fixer sur un brin d'ADN en 3'/5' et inversement)



- Etape 3 : Elongation : les bases azotées vont venir compléter, dans le sens 5' => 3', le brin complémentaire.



Séquence utilisée pour le cycle suivant

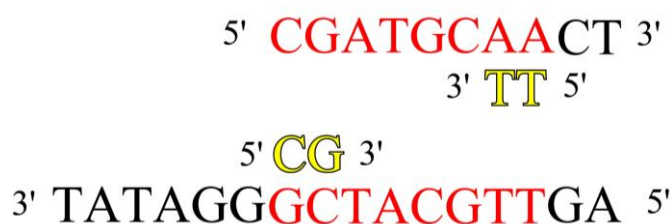


Maintenant que le 1^{er} cycle est terminé, entamons le 2^{ème} cycle. De manière à ce que l'explication soit plus compréhensible, à la fin de chaque cycle, nous ne prendrons qu'une des 2 molécules d'ADN formées, qui sera signalée par un rectangle violet.

- Etape 1 : Dénaturation

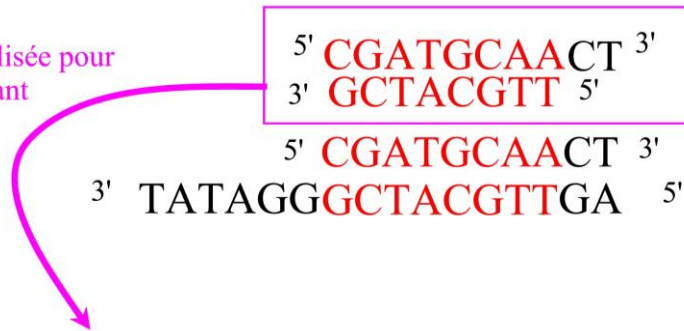


- Etape 2 : Hybridation



- Etape 3 : Elongation

Séquence utilisée pour
le cycle suivant



Le deuxième cycle est terminé, passons au troisième cycle.

- Etape 1 : Dénaturation



- Etape 2 : Hybridation



- Etape 3 : Elongation



Séquence recherchée

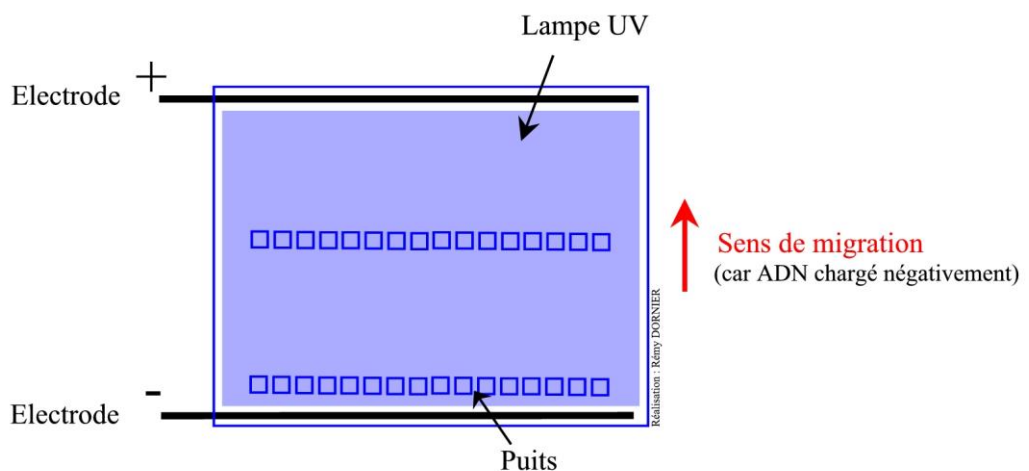
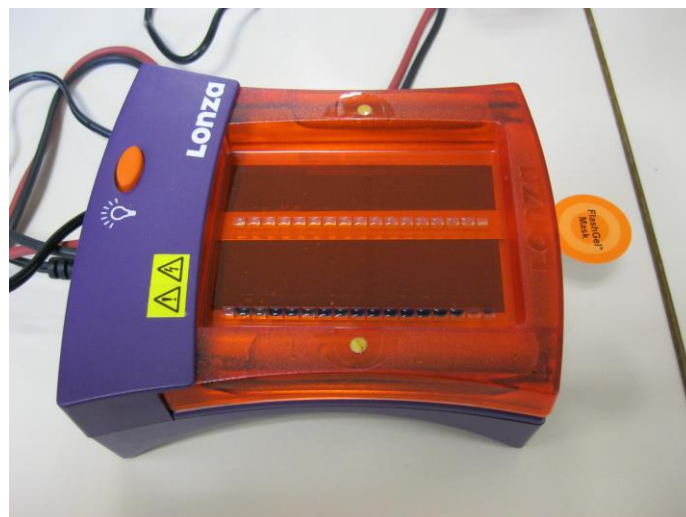
Ce n'est qu'au bout du troisième cycle que la séquence d'ADN recherchée apparaît. Les cycles suivants vont alors permettre de démultiplier cette séquence. Le nombre de 30 cycles est un nombre suffisant pour que cette séquence soit majoritaire dans le tube PCR et pour que les chances de prélèvements de cette même séquence soient proches de 90 %.

Voilà donc élucidé le principe de la PCR.

Lorsque les 30 cycles sont effectués, il reste ensuite à vérifier que la séquence d'ADN voulue ait bien été multipliée si ADN il y avait dans le tube. Pour cela, nous allons réaliser une électrophorèse.

L'électrophorèse consiste en la migration de la séquence d'ADN sur un gel d'agarose entre 2 électrodes en fonction de sa masse molaire molécule. Cette technique permet de savoir si, après une PCR, la séquence d'ADN multipliée correspond bien à celle recherchée. La tâche laissée par le front de progression sera alors comparée aux tâches témoins de différentes séquences d'ADN sous une lampe UV (seul moyen de pouvoir observer le résultat).

Photo et schéma d'une cassette à électrophorèse (2 plateaux)

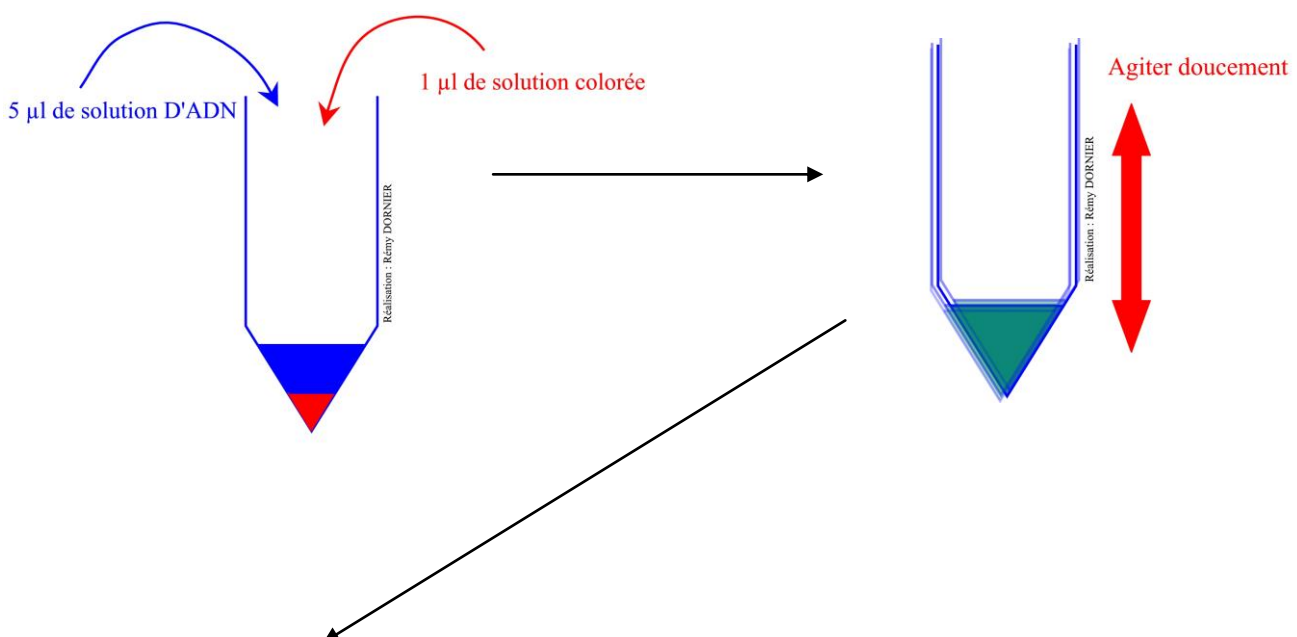


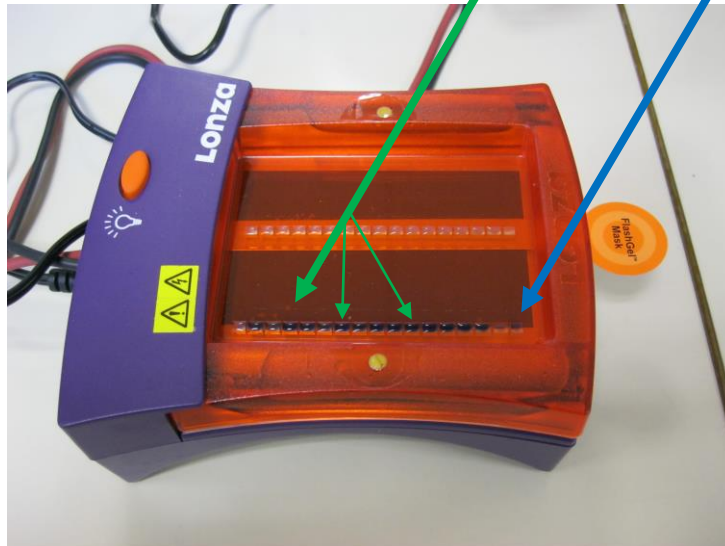
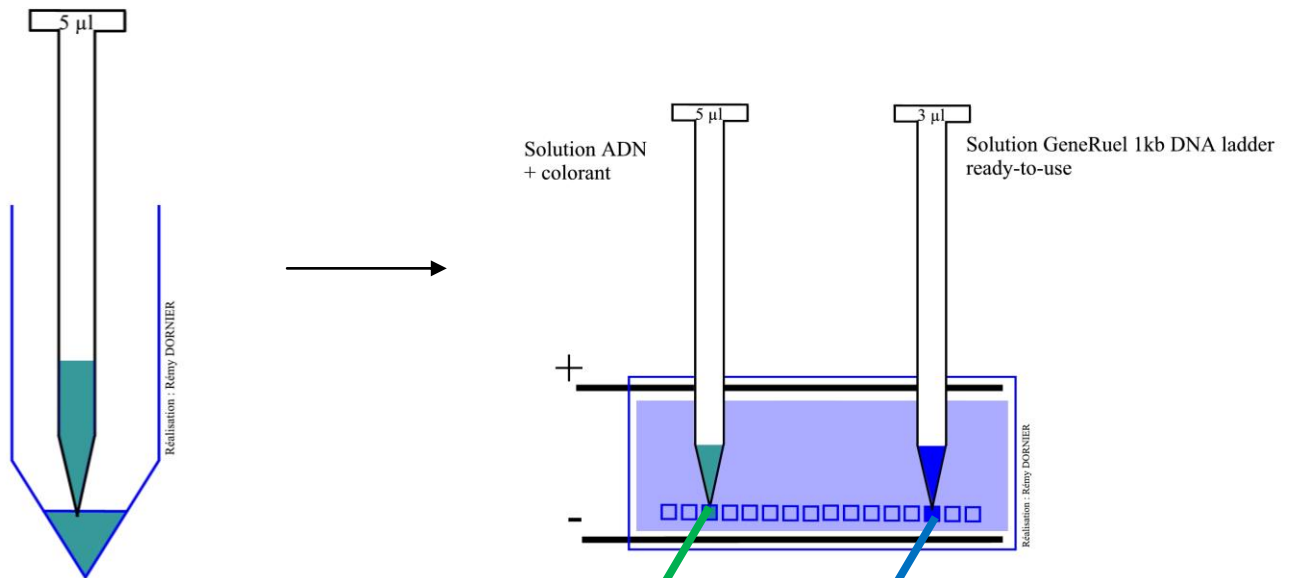
Il se peut qu'aucune tâche ne soit observée lors de l'électrophorèse. Dans ce cas, cela veut pouvoir dire 2 choses : soit l'extraction de l'ADN a été déficiente et aucune molécule d'ADN ne se trouvait dans le tube PCR. Soit la PCR n'a pas fonctionné et/ou a amplifié un autre gène.

Protocole d'une électrophorèse sur système Flash Gel de Lonza.

- Préparer la cassette d'électrophorèse composée de 17 + 17 puits, répartis en 2 lignes
- Inonder les puits de la première ligne (si utilisation d'une seule des 2) avec de l'eau bi-distillée.
- Faire évacuer l'eau en penchant la cassette
- Eponger les dernières gouttes avec du papier absorbant SANS toucher les puits.
- Si utilisation d'une seule des 2 lignes, placer le masque FlashGel sous le plateau central des puits d'échantillon.
- Dans un tube PCR, prélever 5 µl de la solution d'ADN amplifiée (celle qui sort du séquenceur) et 1 µl de solution colorée « 6X DNA loading dye » (le rapport entre la quantité d'ADN et la solution colorante doit toujours être de 5).
- Mélanger gentiment la préparation pour ne pas casser l'ADN
- Prélever 5 µl de la solution préparée et la déposer dans l'un des puits de la cassette à électrophorèse (chaque puits ayant une capacité maximale de 5 µl)
- Prélever 3 µl de la solution de « GeneRuler 1kb DNA ladder ready-to-use » et la déposer dans un autre puits de la cassette à l'électrophorèse.
- Connecter les électrodes sur leur support
- Brancher l'appareil
- Le régler sur 150 V
- Au bout de 10 minutes, observer le résultat à l'aide de la lampe UV incrustée dans l'appareil.

Schémas des prélèvements à réalisés lors d'une électrophorèse





Concernant le *populus nigra*, 5 gènes vont être intéressants dans notre étude dont un particulier : le gène CAD. Après électrophorèse, la présence de ce gène pourra être vérifiée par une tâche aux alentours de 923 pb (paires de base). Voici le résultat de 14 électrophorèses du même gène démultiplié (le gène CAD) :

Borne -
 ↓
Sens de migration
 ↓
 Borne +



Sur cette électrophorèse, nous remarquons, à chaque extrémité, la dépose d'un marqueur de taille, qui correspond à la solution « GeneRule 1 kb DNA ladder ready-to-use ». Ces marqueurs nous permettent de visualiser les différentes hauteurs des tâches correspondant aux différents gènes. Ici, nous remarquons que 10 solutions d'ADN de populus nigra possèdent bien le gène CAD à 923 pb. 2 témoins sont négatifs (problèmes éventuels lors de l'extraction) et 3 sont très peu intenses.

Ces 10 échantillons d'ADN positifs seront envoyés, en quantité égale à 25 µl, au génoscope, qui va valider ou non l'électrophorèse avant d'envoyer les échantillons à Paris, où ils seront décodés pour pouvoir être exploitables.