Préparation lire les p. 1 et 2 (apporter la blouse).

La PCR (Polymerase Chain Reaction) et l'électrophorèse

La réaction de polymérisation en chaîne est une technique d'amplification génétique in vitro qui a été conçue au début des années 80 par un chercheur américain, Kary Mullis (prix Nobel de Chimie 1990) travaillant pour une firme de biotechnologique Californienne.

Son principe est publié en 1985 dans "Science", cette technique a révolutionné les approches expérimentales en biologie moléculaire. Elle permet de dupliquer en grand nombre (x 10^9) une séquence d'ADN (amplicon) ou d'ARN, à partir d'une faible quantité (10^{-12} g) d'acide nucléique.

On peut l'utiliser en recherche fondamentale pour l'étude et l'analyse des génomes pour détecter la présence de virus, VIH ou SARS COV2, des traces d'OGM ou en criminalistique, test de paternité, douanier... en fait n'importe quel ADN.

La PCR est basée sur le mécanisme de réplication de l'ADN : l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, répliqué puis ré-enroulé, selon des cycles répétitifs comprenant les trois étapes suivantes :

• Dénaturation de l'ADN à haute température (entre 93 et 96°C), l'ADN bicaténaire est transformé en ADN monocaténaire.

• Hybridation à l'ADN cible de deux amorces (une pour chaque brin) comprenant de 20 à 25 nucléotides. Cette hybridation a lieu à une température comprise entre 55 et 65°C.

• Extension de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces spécifiques en utilisant une ADN polymérase (Taq polymérase). La température optimale de cette ADN polymérase est de 72°C.
Les premières ADN polymérases utilisées en PCR provenaient de la bactérie Thermus aquaticus (Taq polymérase) résistante à de hautes températures. De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes.

Vous allez devoir apprendre à utiliser :
- les micropipettes.
- la centrifugeuse.
- le thermocycleur MINIPCR (relié à l'ordinateur).
- la cuve à électrophorèse.
- manipulation avec blouse et lunettes

Matériel disponible.

Tube E : master mix, enzyme Taq = ADN polymérase + nucléotides
Tube PM : primer mix, amorces 1 et 2

Tube ADN : marqueurs de différences longueur

Tube T : ADN témoin sujet sain
Tube V : ADN de la victime (porteur du gène muté)
Tube A : prélèvement dans le véhicule du suspect A
Tube B : prélèvement dans le véhicule du suspect B

En TP

M. H tailleur de pierre à disparu de son chantier ou des traces de sang sont retrouvées. Les enquêteurs de la police supposent que le corps a été emporté.
Les 3 ouvriers de M. H sont suspectés, l'un se déplaçant à vélo, il est écarté des suspects.
Les véhicules des ouvriers A et B sont fouillés et la police scientifique y prélève des cheveux.

L'ADN de ces cheveux doit être analysé et comparé à l'ADN de M. H pour savoir si la victime a été transportée dans l'un des véhicules.

M. H est atteint d'une maladie génétique et porteur d'une mutation rare (1/4500 naissances). C'est une mutation du gène CFTR (pour cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), porté par le chromosome 7, dans le cas de M. H, il s'agit d'une délétion d'une partie de la séquence. La maladie est la Fibrose Kystique (ou mucovicidose) p. 316 à 321.

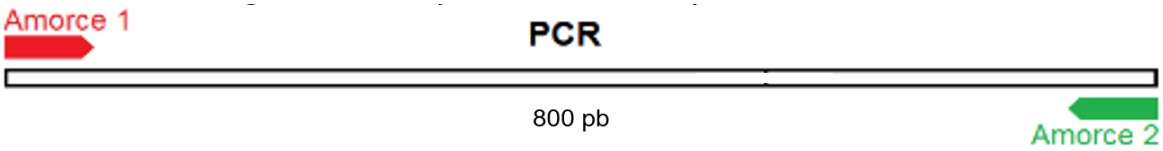
Réaliser l'étude pour savoir si l'un des véhicule a transporté M. H et orienter les enquêteurs.

Les étapes de la manipulation

Au laboratoire, on extrait l'ADN recueilli dans les véhicules, celui de M. H et d'un témoin (personne ne présentant pas cette mutation pour ce gène).
On prépare une séquence du gène CFTR de 800 nucléotides sur les 4443 du gène.

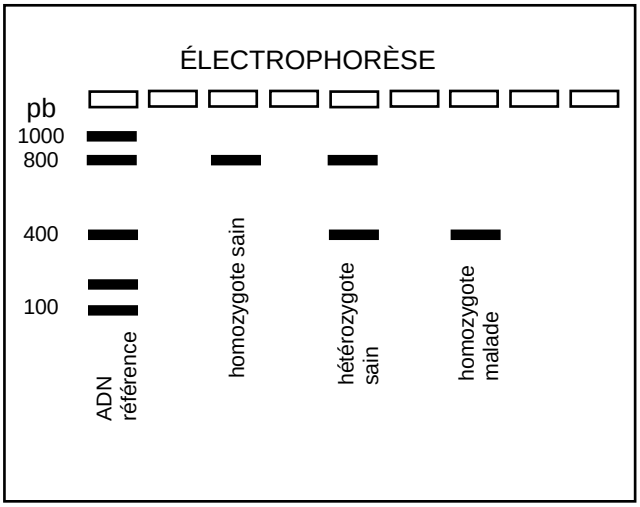
1ère étape : Amplification de l'ADN par PCR

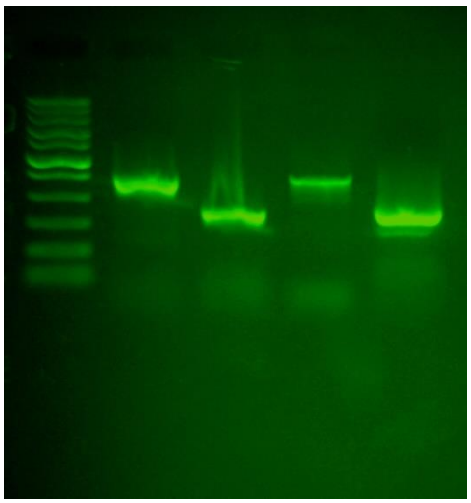
La PCR permet augmenter la quantité d'ADN. On réalise une réplication en chaîne de l'ADN à partir d'amorces se fixant au début du gène et de la Taq, les fragments obtenus sont des amplicons.



2ème étape : Séparation des fragments par électrophorèse

Les amplicons sont déposés dans les puits et vont migrer dans le gel dans un courant électrique.
Il y a séparation des fragments en fonction de leur charge et de leur taille.
Les allèles étant différents, la comparaison doit permettre de connaître les caractéristiques des individus.





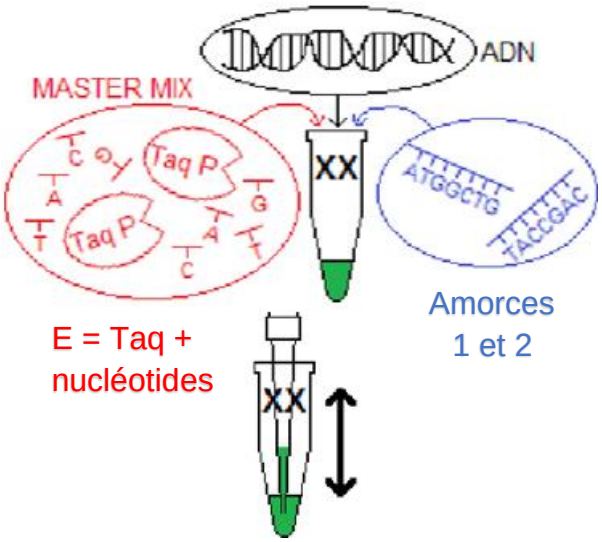
1ère étape : Amplification de l'ADN par PCR

Noter vos initiales sur le côté du microtube PCR.

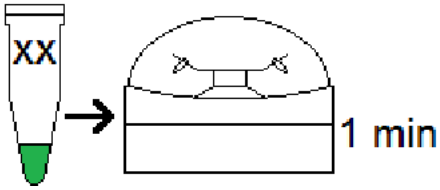
Préparation d'un échantillon (T ou V ou A ou B)

Ajouter dans le microtube **la Taq** (E) 15 µL en le déposant sur le côté.
Changer le cône de la micropipette.
Tourner légèrement le microtube sur son support.
Ajouter dans le microtube les amorces (PM) 10 µL réaliser le dépôt à un endroit différent du E.

! Aspirer et refouler plusieurs fois avec la micropipette pour bien mélanger les réactifs de PCR !



Boucher soigneusement le microtube et le **centrifuger** pendant 1 min.
! Veiller à bien équilibrer la centrifugeuse (2 microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !

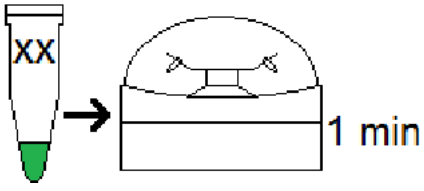


Placer les microtubes dans le thermocycleur.
! Repérer bien l'endroit où vous avez placé votre tube, vérifier le marquage !
Fermer soigneusement le couvercle du thermocycleur quand tous les tubes sont en place mettre sur "ON".
Relier par câble USB et ouvrir le programme.
Programmer le thermocycleur :
1. Lancer l'application MiniPCR
2. Cliquer sur « + ».
3. Choisir « PCR ».
4. Entrer un nom pour le protocole, par exemple « amplification PTC ».
5. Entrer les paramètres du protocole PCR.
6. Cliquer sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole.
7. Cliquer sur "Démarrer" pour lancer la PCR.

! Risque de brûlure !
Une fois la PCR terminée, **ouvrir** le couvercle et **retirer** les microtubes.

CYCLE	T (°C)	Temps (s)
Dénaturation initiale	94°C	30 s
Dénaturation	94°C	5 s
Hybridation	57°C	5 s
Elongation	72°C	8 s
Élongation finale	72°C	30 s
Nombre de cycles 30 Soit 40 à 45 minutes		

Boucher soigneusement le microtube et le **centrifuger** pendant 1 min.
! Veiller à bien équilibrer la centrifugeuse (2 microtubes face à face) avant de démarrer la centrifugation !



2ème étape : Séparation des fragments par électrophorèse

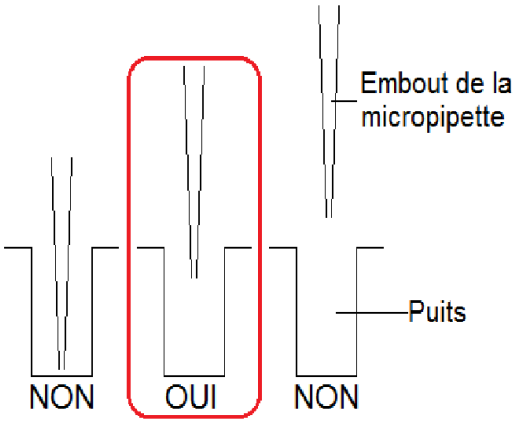
La cuve à électrophorèse contient un gel d'agarose avec 9 puits immergés dans 25 mL de tampon TBE. Les molécules sont déposées dans les puits et migrent en fonction de leur charge et de leur masse.
Le gel contient un révélateur de l'ADN, le Gel GREEN qui permet de voir l'ADN en le rendant fluorescent sous une lampe U.V.

Sans déplacer la cuve à électrophorèse !

Réaliser les dépôts de manière soignée, **avec un cône propre pour chaque dépôt.**

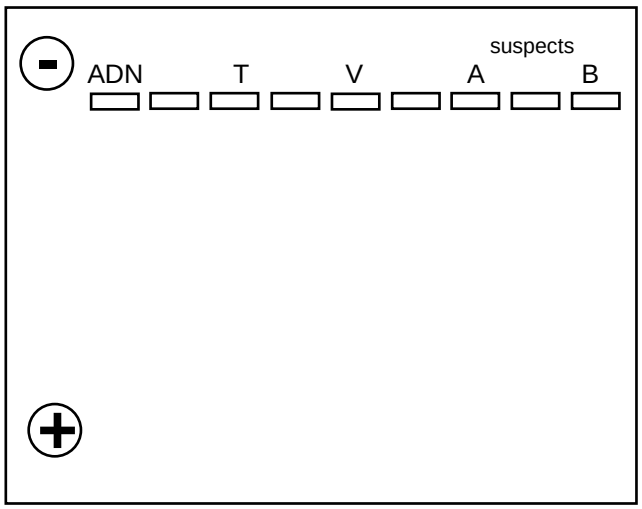
Le dépôt des échantillons se fait à la micropipette. La manière d'effectuer ces dépôts conditionne la réussite de la manipulation !

Si on effectue le dépôt au fond du puits, il y a un risque de percer le fond du puits !
Si on effectue le dépôt trop au-dessus du puits, le dépôt se fera hors du puits !



Vous avez 5 dépôts à faire.
- Pour connaître la taille des fragments d'ADN (tube ADN paillasse prof), ce **microtube contient des marqueurs de taille moléculaire de l'ADN** (mélange de différents fragments d'ADN de taille connue), faire un dépôt de 10 µL.

- Réaliser un dépôt de 15 µL de chacun des tubes dans l'ordre suivant : T puis V puis A puis B.



Une vidéo de la technique : https://urlz.fr/gJvv

Placer le couvercle sur la cuve d'électrophorèse quand tous les dépôts sont réalisés.
Mettre en marche la cuve d'électrophorèse.
Mettre le cache sur la cuve et contrôler régulièrement l'avancée de l'électrophorèse.
Durée 15 à 20 minutes.

Une fois l'électrophorèse terminée, activer la lampe U.V. qui permet de mettre en évidence la fluorescence de l'ADN, **prendre une photo du gel.**
Comparer et conclure.
Éteindre et débrancher la cuve.

Questions d'étude à effectuer pendant le TP

Quel est le rôle des amorces ?

Quel est le rôle de la Taq ?

Quel est le rôle physiologique de la protéine CFTR ?

Comparer les séquences du gène d'un individu sain et de M. H avec Geniegen2.

Afficher la protéine CFTR avec Rastop.

L'une des deux voitures a-t-elle transporté M. H ?

La preuve est-elle incriminante (permet-elle de dire que, A ou B sont coupables) ?