



PCR 101 : Amplification du Génome du phage lambda
Guide de l'élève

Cat# M6001TAE et M6002TAE

Version 081321-FR

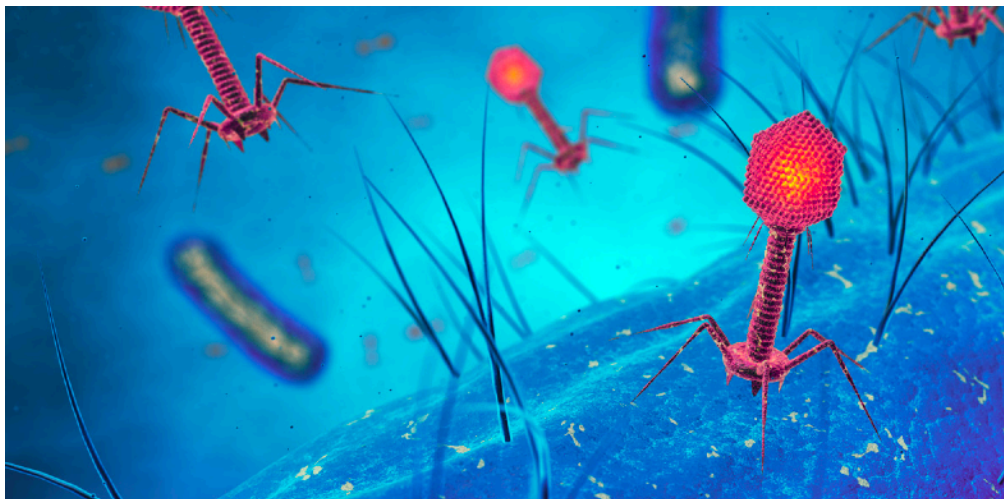


Table des matières

Sécurité au laboratoire	2
Discussion de groupe	3
Introduction à la PCR et au génome du phage lambda	4-8
Questions préalables	9-11
Protocole expérimental	12-13
Feuille de travail pour la collecte de données	14
Questions et analyses après le TP	15
Annexe A - Ressources recommandées	16
Annexe B - Glossaire PCR	17
Annexe C - Électrophorèse sur gel	18

Sécurité au laboratoire

1. Faites preuve de prudence lorsque vous chauffez ou faites fondre des réactifs.
2. Faites preuve de prudence lorsque vous travaillez avec des équipements électriques.
3. Les gants et les protections oculaires doivent être utilisés chaque fois que cela est nécessaire dans le cadre des bonnes pratiques de laboratoire.
4. Lavez-vous toujours soigneusement les mains après avoir manipulé du matériel biologique ou des réactifs.
5. Suivez toutes les précautions de sécurité décrites sur la fiche de données de sécurité des réactifs.
6. Les éléments du thermocycleur PCR, y compris la plaque PCR et le couvercle chauffé, peuvent être extrêmement chauds. Faites preuve de prudence lorsque vous ajoutez ou retirez des tubes de l'appareil.

Discussion de groupe

1. De nombreuses techniques de biologie moléculaire nécessitent de nombreuses copies d'une séquence d'ADN spécifique pour visualiser un résultat ou servir de réactif pour de futures expériences. Par exemple, pour voir une bande sur un gel, plus d'un milliard de morceaux d'ADN, tous de la même taille, doivent être présents ! Cependant, il arrive souvent que les échantillons avec lesquels les scientifiques commencent contiennent de l'ADN provenant de quelques cellules seulement. Avec votre groupe de laboratoire, proposez deux exemples de situations où les scientifiques devraient créer de nombreuses copies d'ADN à partir d'un petit nombre de copies de départ.

2. Avec votre groupe de laboratoire, faites un brainstorming sur la façon dont les scientifiques pourraient produire de nombreuses copies d'un morceau d'ADN souhaité :

3. Dans l'espace ci-dessous, esquissez un modèle/diagramme de la réplication de l'ADN à l'intérieur de la cellule pendant le cycle cellulaire. Indiquez comment les brins sont séparés, comment la réplication est initiée et les enzymes qui sont impliquées. Étiquetez tous les éléments de votre diagramme.

Introduction à la PCR et au génome du phage lambda

Ce TP vous fera découvrir l'un des concepts les plus puissants de la biologie moléculaire moderne, une révolution qui a transformé le diagnostic médical, la médecine légale, les sciences environnementales et d'autres disciplines des sciences de la vie au cours des 30 dernières années. En maîtrisant l'amplification en chaîne par polymérase (PCR), vous aurez les clés pour développer vos propres expériences de biologie moléculaire et le bagage nécessaire pour comprendre les nouvelles technologies de plus en plus complexes.

La technologie PCR répond à deux défis majeurs de la biologie moléculaire : comment amplifier l'ADN et comment cibler des séquences spécifiques pour l'amplification. Premièrement, l'ADN que les scientifiques veulent analyser est souvent prélevé en quantités extrêmement faibles (par exemple, une seule goutte de sang provenant d'une scène de crime). Pour disposer de quantités d'ADN utilisables, nous devons faire de nombreuses copies en utilisant l'ADN original comme modèle. Ensuite, parmi l'ensemble du génome, nous devons trouver uniquement la partie que nous voulons analyser, qu'il s'agisse d'un gène qui provoque une maladie ou d'une séquence qui peut aider à identifier une espèce. Ce n'est pas une mince affaire puisque le génome humain compte plus de 3 milliards de paires de bases (pb) et que nous nous intéressons souvent à des régions de moins de 300 pb.

S'arrêter et réfléchir

Comment trouver une région spécifique du génome parmi trois milliards de paires de bases ? Pour vous inspirer, regardez votre modèle de réplication de l'ADN.

L'histoire de la PCR

Comme pour de nombreuses idées en biotechnologie, la nature nous fournit la plupart des outils dont nous avons besoin. Chaque fois qu'une cellule se divise, elle fabrique deux répliques de son génome entier à l'aide d'enzymes spécialisées. Le phénomène d'appariement des bases complémentaires devrait vous donner une idée de la manière dont une région spécifique peut être ciblée. À la fin des années 1970, Frederick Sanger a développé une méthode de copie de l'ADN *in vitro* qui utilise de courts morceaux d'ADN appelés amorces pour initier la réplication par une ADN polymérase, similaire aux amorces d'ARN dans votre modèle de réplication cellulaire de l'ADN. Une amorce artificielle utilisée dans la méthode Sanger possède une séquence qui lui permet de se lier à un seul endroit de la séquence d'ADN cible.

S'arrêter et réfléchir

Pensez-vous qu'il soit possible pour une amorce de se lier à plus d'un endroit du génome ? Cela est-il plus probable pour les amorces longues ou pour les amorces courtes ?

En utilisant une seule amorce d'ADN, la méthode Sanger ne peut produire qu'une seule copie de la cible à la fois. En 1983, Kary Mullis a proposé une modification de cette méthode qui consiste à utiliser une deuxième amorce pour amorcer la réplication en utilisant la première copie

comme modèle. Rappelons que l'ADN a une structure antiparallèle où un brin va dans la direction opposée par rapport au second brin. Pour utiliser la première copie comme cible de réplication, la deuxième amorce que Mullis a ajoutée devait amorcer la réplication dans la direction opposée, c'est pourquoi une amorce est appelée amorce avant et l'autre amorce est appelée amorce arrière. Avec la séquence originale et sa copie servant de modèle, deux copies sont produites au lieu d'une. De plus, ces deux copies peuvent être utilisées comme modèles lors d'une deuxième série de copies, qui produit quatre copies. Après chaque tour, ou cycle, le nombre de copies a doublé.

Sur plusieurs cycles, des milliards de copies de la séquence d'ADN entre les deux amorces sont générées. Cette méthode est appelée réaction en chaîne de la polymérase (PCR) - polymérase en raison de l'enzyme qui est utilisée pour copier l'ADN et réaction en chaîne parce que les produits de la polymérase en raison de l'enzyme qui est utilisée pour copier l'ADN et réaction en chaîne parce que les produits d'un cycle servent de modèles pour le cycle de copie suivant. Cette technologie rapide et efficace pour générer des quantités utilisables d'ADN a valu à Mullis le prix Nobel de chimie. La première application de la PCR a été un test pour l'anémie falciforme.

S'arrêter et réfléchir

En partant d'un seul exemplaire, combien de copies sont produites après deux cycles de PCR ? Trois ? Indiquez le nombre de copies produites au cours des dix premiers cycles. Pouvez-vous penser à une fonction mathématique qui décrit l'augmentation du nombre de copies avec le nombre de cycles ? Pourquoi la PCR est-elle souvent appelée amplification de l'ADN ?

La PCR , comment ça marche ?

Au lieu d'essayer de recréer la machinerie biochimique complexe de la cellule dans un tube à essai, les scientifiques comptent sur la chaleur pour contrôler les différentes étapes de la réaction PCR. Pour que l'ADN puisse être copié, les bases nucléotidiques doivent être exposées, ce qui signifie que l'ADN double brin doit être séparé en brins simples. Rappelons que la chaleur appliquée à un glaçon affaiblit les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et provoque une transition de phase vers l'eau liquide. De même, la chaleur appliquée à l'ADN double brin affaiblit les liaisons hydrogène entre les bases, ce qui entraîne la séparation des brins en ADN simple brin. Comme pour la glace, on appelle parfois cela la fonte, mais on parle communément de dénaturation. Dans un cycle PCR, la **dénaturation** est effectuée à 90-98°C pendant 5-30 secondes. Cette température est juste en dessous du point d'ébullition de l'eau.

Une fois que l'ADN matrice a été séparé en brins individuels, la température est abaissée pour encourager les amorces à se lier à leurs séquences cibles. Tout comme dans l'analogie avec l'eau, une température plus basse favorise la formation de liaisons hydrogène entre les molécules, dans ce cas entre l'amorce et la matrice ADN. Cette étape, appelée **hybridation, se déroule** généralement entre 45 et 65 °C pendant 5 à 30 secondes. La température et la durée idéales de l'étape de recuit dépend des séquences des amorces utilisées. Elle doit être suffisamment faible pour que des liaisons hydrogène puissent se former entre l'amorce et la

séquence complémentaire spécifique, mais pas trop faible pour qu'une liaison non spécifique, ou aléatoire, entre l'amorce et la matrice se produise.

S'arrêter et réfléchir

Les amorces longues ou courtes devront-elles être soumises à une température de recuit plus basse pour se lier à leurs séquences complémentaires ?

Tout comme dans votre modèle de répllication de l'ADN cellulaire, l'ADN polymérase utilisée dans la PCR se lie au complexe amorce-modèle et commence à ajouter des nucléotides (dNTP) à l'extrémité 3' de l'amorce. Cette étape, appelée **élongation**, donne lieu à une nouvelle copie attachée au modèle sous forme d'ADN double brin. La durée de l'étape d'extension dépend de la longueur du segment d'ADN qui est copié et peut aller de 5 secondes à 5 minutes.

À ce stade, vous avez peut-être remarqué un problème : l'ADN polymérase, sur laquelle repose tout le processus de PCR, est une enzyme protéique qui a besoin d'une structure tridimensionnelle très spécifique pour copier l'ADN. Avant d'arriver à l'étape d'extension, le mélange PCR, comprenant la polymérase, a déjà subi l'étape de dénaturation où la réaction a été chauffé presque à ébullition. Quiconque a cassé un œuf dans une poêle à frire sait ce qu'une chaleur intense fait aux protéines !

Dans les premiers temps de la PCR, une polymérase fraîche était ajoutée au tube de réaction à chaque cycle pour remplacer la polymérase qui avait été détruite par l'étape de dénaturation. Le fait de devoir ouvrir le tube et ajouter une nouvelle enzyme pendant 30 cycles était coûteux, inefficace et augmentait les risques de contamination de la réaction. L'innovation qui permettrait de lever ces obstacles est venue d'une source inhabituelle : le parc national de Yellowstone.

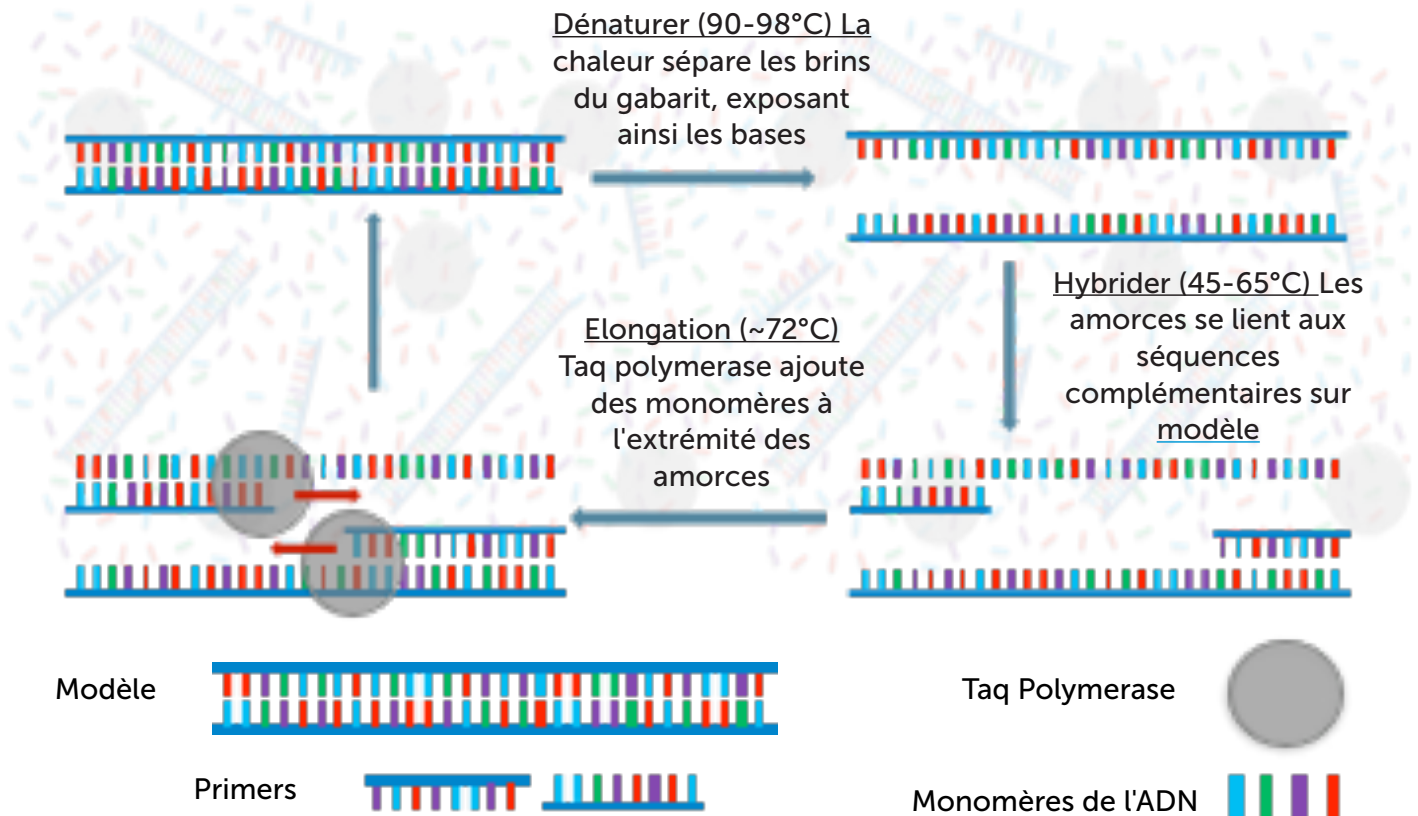
Dans les années 1970, des scientifiques avaient isolé une espèce de bactérie appelée **Thermus aquaticus** dans une source chaude de Yellowstone. **T. aquaticus** se développe à 75-80°C et peut survivre à des températures beaucoup plus élevées. Ses enzymes sont tout aussi tolérantes à la chaleur. *E. coli*, la source originale de la polymérase utilisée dans la PCR, se développe à 37,5°C, la même température que l'intestin des mammifères. Comme la biochimie de l'ADN est similaire dans l'arbre de vie, la polymérase de **T. aquaticus** (appelée Taq Polymerase) peut remplacer l'*E. coli* polymerase dans la PCR, avec la modification que l'étape d'extension est effectuée à 70-75°C.

Cette innovation a permis à la PCR de devenir l'outil omniprésent, peu coûteux et efficace qu'elle est aujourd'hui. Les réactions peuvent être mises en place une seule fois, scellées à l'intérieur d'un tube et placées dans un thermocycleur automatisé. Le thermocycleur (ou appareil PCR) est un instrument spécialisé qui modifie précisément et rapidement la température du tube entre la dénaturation, le recuit et l'extension. Après 20 à 40 cycles de ces trois températures, des billions de copies du produit d'ADN désiré peuvent être produites. L'ADN amplifié peut être analysé par électrophorèse sur gel à la fin de l'expérience, ou détecté au fur et à mesure de sa formation grâce à un équipement plus avancé.

S'arrêter et réfléchir

La PCR peut-elle utiliser les mêmes nucléotides que la cellule ?

Figure 1. Le mécanisme de la PCR



Résumé - Devenir un Pro de la PCR

La conception d'une réaction PCR efficace et spécifique est une compétence que les chercheurs développent avec l'expérience. Les températures et les durées de chaque étape du protocole PCR doivent également être choisies avec soin. Certaines sont standard pour toutes les réactions et d'autres doivent être optimisées pour chaque réaction.

Plusieurs facteurs contribuent à la réussite ou à l'échec d'une réaction PCR. Les amorces doivent être soigneusement conçues pour être spécifiques à la séquence cible. Si des séquences complémentaires aux amorces existent dans d'autres parties du génome, vous pouvez vous retrouver avec plusieurs produits, ou aucun produit. La température d'hybridation doit être soigneusement choisie pour favoriser la liaison spécifique de l'amorce à la cible. Le pH et la concentration de Mg^{2+} doivent être soigneusement contrôlés pour une activité maximale de l'ADN polymérase. Enfin, même de faibles concentrations de contaminants peuvent interférer avec la PCR, entraînant un échec complet de la réaction.

Dans ce TP, nous examinerons comment différentes amorces sont utilisées pour amplifier différents segments d'un même génome. Vous recevrez trois séries d'amorces différentes qui ciblent différentes séquences du génome du phage lambda. À partir des séquences d'amorces et de la séquence du génome du phage, vous pouvez prévoir la taille des segments qui seront amplifiés. Vous testerez votre prédiction en effectuant une PCR avec les différentes séries d'amorces et en analysant les résultats par électrophorèse sur gel d'agarose.

Prenez un moment pour revenir sur l'introduction et utilisez votre nouvelle compréhension du PCR pour compléter les détails manquants dans les deux tableaux récapitulatifs :

Tableau 1. Réactifs requis pour la PCR	
1	
2	
3	
4	
5	
6	Mg ²⁺ (nécessaire pour la fonction polymérase)
7	Tampon (pour maintenir un pH constant)

Tableau 2. Protocole de cyclage de la PCR - Valeurs typiques			
# cycles	Nom de l'étape	Température	Heure
	Dénaturation		
	Hybridation		
	Extension		

Le phage lambda

Le bactériophage lambda, ou **phage lambda**, est un virus qui infecte Escherichia coli (E. coli), une bactérie commune dans l'intestin des mammifères. Le phage se fixe à l'extérieur de la cellule bactérienne et injecte son génome dans le cytoplasme. Le phage peut alors entrer dans le cycle lytique ou lysogénique. Dans le cycle lytique, le génome est répliqué à l'intérieur de la cellule hôte et les gènes sont exprimés. Les produits des gènes s'assemblent alors en particules de phage qui sont libérées lors de la lyse de la cellule hôte. Dans le cycle lysogène, le génome du phage se recombine avec le génome de l'hôte en s'intégrant dans le chromosome bactérien. À ce stade, on appelle cela un **prophage** et il se réplique à chaque fois que le génome de l'hôte se réplique. Dans certaines conditions environnementales, le **prophage** est extrait du génome de l'hôte et peut entrer dans le cycle lytique.

Depuis sa découverte en 1950, le phage lambda a été intensivement étudié en tant que modèle pour la génétique moléculaire de base et pour ses applications en biotechnologie. Les expériences menées avec le phage ont conduit à des découvertes importantes dans des domaines tels que le repliement des protéines, la régulation génétique et la biochimie enzymatique. La capacité du phage à injecter son ADN dans les cellules bactériennes et à se recombinaison avec le génome de l'hôte en a fait un outil précieux pour l'édition des génomes des bactéries.

Le génome du phage lambda est constitué de 48 502 pb d'ADN double brin linéaire, codant pour plus d'un millier de protéines. La relative simplicité et l'accessibilité de ce génome en font un excellent outil pour l'exploration des techniques biochimiques de base, dont la PCR.

Questions préalables

1. En utilisant ce que vous venez d'apprendre sur la PCR, modifiez votre diagramme de réplication de l'ADN dans la cellule pour montrer le mécanisme de réplication de l'ADN pendant une réaction PCR.
2. La PCR cible une région spécifique du génome pour la copie. Quel réactif de la réaction PCR rend spécifique une région plutôt qu'une autre ? Comment cette spécificité est-elle obtenue ?
3. Une fois les cycles PCR terminés, vous ferez migrer les produits sur un gel afin de déterminer la taille du fragment que vous avez copié. À part la bande correspondant à ce fragment, quelles autres bandes pourriez-vous voir sur le gel ?
4. Parfois, après avoir effectué une réaction PCR, on ne voit pas de bandes sur le gel. Citez trois raisons pour lesquelles cela peut se produire.
5. Que se passerait-il si les amorces étaient exclues de votre réaction PCR ?

6. Pourquoi des organismes simples comme le phage lambda et son hôte sont-ils utiles en biologie moléculaire ?

7. Sur la page suivante, vous trouverez une séquence d'ADN correspondant à une région du génome du phage lambda ainsi que les séquences des trois paires d'amorces que nous utiliserons. En utilisant ces informations et vos connaissances en matière de PCR, notez la taille des fragments qui seront amplifiés avec chaque paire d'amorces dans le tableau 3.

8. Le taux de copie de la polymérase FastTaq que vous utiliserez dans ce laboratoire est de 100 bp/sec. En utilisant les longueurs de fragments que vous avez déterminées à la question 7, calculez le temps d'extension minimum requis pour chaque cycle. (Indice : effectuez ce calcul pour le fragment le plus long que vous avez trouvé à la question 7).

Génome du phage lambda - partiel (535 pb)

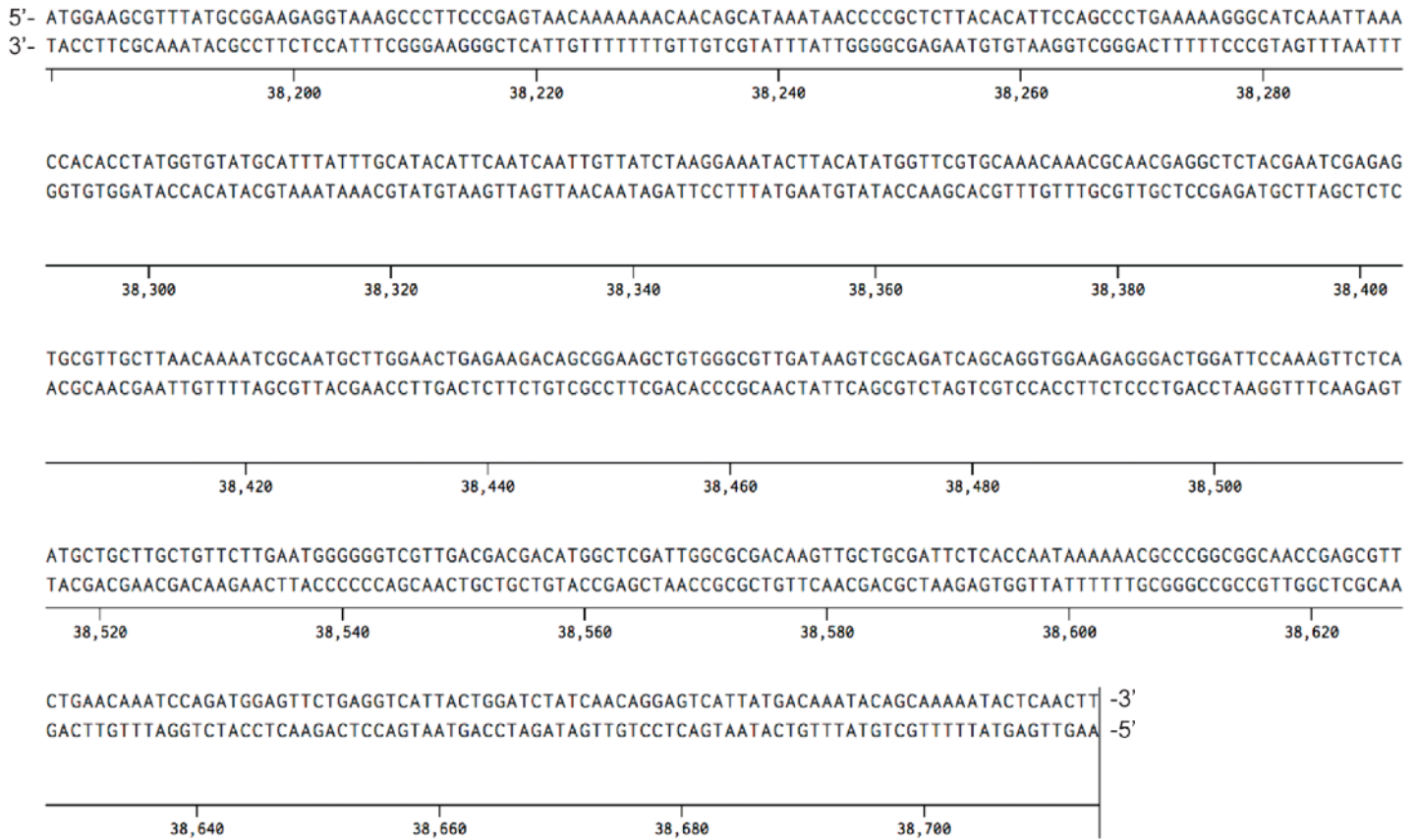


Tableau 3. Amorces avant et Amorces inverses

	Amorces avant	Amorces inverses	Longueur du fragment (pb)
Série d'amorces 1	5'-GAAGCGTTTATGCGGAAGAG-3'	5'-CGTTGCGTTTGTTCGAC-3'	
Série d'amorces 2	5'-GAAGCGTTTATGCGGAAGAG-3'	5'-ACCTGCTGATCTGCGACTTA-3'	
Série d'amorces 3	5'-GAAGCGTTTATGCGGAAGAG-3'	5'-TGA CTCCTGTTGATAGATCCAGT-3'	

Protocole expérimental

Aujourd'hui, vous allez mettre en place des réactions PCR avec trois séries d'amorces ciblant trois régions du génome du phage lambda ainsi qu'une réaction de contrôle. En plus des jeux d'amorces et de l'ADN du phage lambda, vous recevrez un MasterMix FastTaq, qui contient une Taq ADN polymérase spéciale à copie rapide, le tampon PCR, les ions Mg²⁺ et les dNTP (monomères de l'ADN). Suivez le protocole ci-dessous pour préparer vos échantillons et installer l'appareil de PCR.

1. Marquez le dessus et les côtés de quatre tubes PCR à paroi mince avec vos initiales et P1, P2, P3 et -C, pour les trois jeux d'amorces et un contrôle négatif (pas d'amorces). Ces jeux d'amorces sont les mêmes que ceux que vous avez utilisés pour vos calculs dans la question 7 du prétraitement.
2. Ajouter les réactifs à chacun des tubes selon le tableau 4. Pipeter les réactifs directement dans le fond des tubes PCR et essayer d'éviter de créer des bulles.

Tableau 4. Configuration de la PCR	TUBE			
	P1	P2	P3	-C
FastTaq 2x MasterMix (µL)	10	10	10	10
ADN Lambda (µL)	5	5	5	5
Amorces (µL)	5 (PS1)	5 (PS2)	5 (PS3)	5 (H2O)
Volume total (µL)	20	20	20	20

3. S'il y a des réactifs collés sur les parois des tubes, faites tourner brièvement une centrifugeuse pour recueillir tout le liquide au fond du tube. Si une centrifugeuse n'est pas disponible, taper le fond du tube sur la paillasse. Tapotez doucement le tube avec votre doigt pour vous assurer que les réactifs sont bien mélangés et qu'aucune bulle n'est coincée au fond du tube.
4. Allumez votre thermocycleur PCR MiniOne® et placez vos tubes dans les puits sur la plaque d'aluminium. Suivez les instructions de votre guide de démarrage pour programmer les paramètres de cycle (tableau 5) sur l'application mobile PCR de la MiniOne® et lancez le protocole PCR.

Tableau 5. Mode opératoire pour la PCR du génome du lambda			
# cycles	Nom de l'étape	Température	Heure
20	Dénaturation	94°C	5 secondes
	Hybridation	54°C	5 secondes
	Extension	72°C	5 secondes

- Suivez l'évolution du protocole PCR grâce au graphique en temps réel de l'application mobile PCR MiniOne®
- Lorsque le protocole PCR est terminé, retirez vos tubes du thermocycleur. Les échantillons peuvent être utilisés immédiatement pour l'électrophorèse sur gel ou être conservés au réfrigérateur pendant la nuit.
- Préparez vos échantillons pour l'électrophorèse sur gel en ajoutant 5 µl de colorant de chargement 5x à chaque échantillon (tableau 6). Mélangez avec votre doigt. Si nécessaire, centrifuger ou tapoter sur la paillasse pour amener tout le liquide au fond du tube.

Tableau 6. Préparation des échantillons pour l'analyse des gels		
Exemple	Ajouter 5x le colorant de chargement	Charge sur le gel
Marqueur de taille	-----	10 µL
Tube P1	5 µL	10 µL
Tube P2	5 µL	10 µL
Tube P3	5 µL	10 µL
Tube -C	5 µL	10 µL

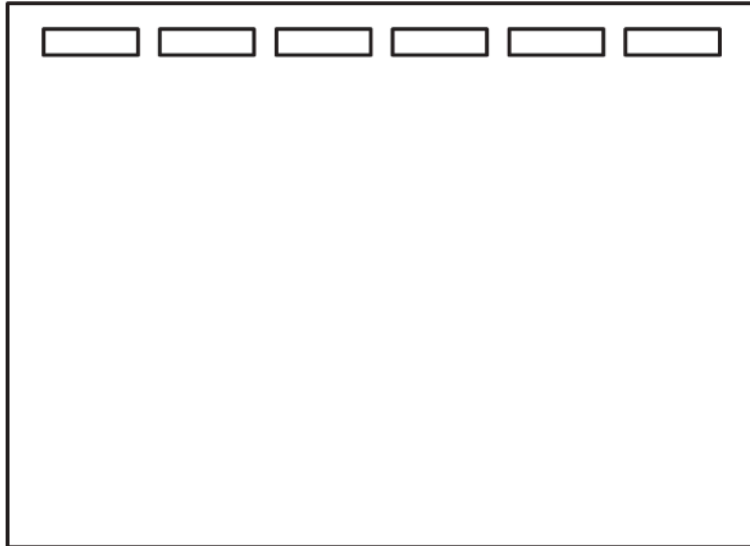
- Coulez le GreenGel™ à 2% d'agarose à l'aide du support de coulage MiniOne®. Utilisez le côté à 6 puits du peigne.
- Après que le gel se soit solidifié (~10 minutes), retirez soigneusement le peigne et suivez les instructions pour installer la chambre d'électrophorèse du MiniOne®.
- Versez du tampon dans un côté du réservoir pour pousser l'air hors du plateau de gel, créant ainsi un beau fond uniforme, sans bulle d'air emprisonnée, pour une image claire des résultats.
- Chargez 10 µl de chaque échantillon et le marqueur de taille MiniOne® dans les puits, en gardant une trace de l'emplacement à l'aide du tableau 7.

Tableau 7. Enregistrement de l'échantillon chargé dans chaque voie						
Puit	1	2	3	4	5	6
Echantillon						

- Faites migrer votre gel pendant 20 minutes ou jusqu'à ce que les bandes se soient clairement séparées. Documentez vos résultats avec votre téléphone portable ou votre appareil photo et collez une image de votre gel dans votre carnet de laboratoire.

Feuille de travail pour la collecte de données

Après avoir terminé l'analyse par électrophorèse sur gel de vos produits PCR, esquissez vos résultats finaux sur le schéma ci-dessous, ou collez une image de votre gel :



Questions et analyses

1. Les tailles des bandes du MiniOne® Marker sont : 100, 300, 500, 1000, 2000 pb. Estimez la taille des bandes de vos pistes PCR en les comparant à celles du Marqueur de taille MiniOne. Vos estimations sont-elles cohérentes avec les tailles que vous avez prédites lors de l'exercice de pré-labo ? Si ce n'est pas le cas, comment expliquez-vous la différence ?
2. Avez-vous observé d'autres bandes sur le gel en plus des produits PCR attendus ?
3. Le tube C était un contrôle négatif - nous avons délibérément omis les amorces pour démontrer l'une des exigences d'une réaction PCR réussie. Un autre contrôle négatif courant dans les réactions PCR est un "contrôle sans matrice" dans lequel de l'eau est ajoutée à la place de la matrice ADN. Quel est l'objectif d'un contrôle négatif "sans matrice" ?
4. Quelles différences attendez-vous à voir dans votre gel si vous avez programmé 30 cycles au lieu de 20 ?
5. Ce protocole utilise une polymérase à grande vitesse qui peut copier l'ADN à 100 bp/sec. Qu'est-ce que vous vous attendriez à voir sur votre gel si vous programmiez un temps de prolongation de 2 secondes au lieu de 5 secondes ?
6. Bonus : une réaction multiplex se produit lorsque plusieurs paires d'amorces sont combinées dans le même tube pour amplifier plusieurs régions génomiques à la fois. Pensez-vous que les paires d'amorces utilisées dans ce laboratoire pourraient être utilisées pour amplifier les trois fragments dans le même tube ? Pourquoi ou pourquoi pas ?

Annexe A - Ressources recommandées

Le DNA Learning Center du Cold Spring Harbor Laboratory dispose d'un certain nombre d'excellentes ressources sur l'ADN et les biotechnologies qui permettent de comprendre le contexte de ce laboratoire :

- Animation de la méthode Sanger de copie de l'ADN : <https://www.dnalc.org/view/15479-Sanger-method-of-DNA-sequencing-3D-animation-with-narration.html>
- Animation interactive et graphique de l'amplification exponentielle de l'ADN par PCR : <https://www.dnalc.org/view/15924-Making-many-copies-of-DNA.html>
- Une vidéo illustrant le mécanisme de la PCR à l'aide de modèles moléculaires 3D : <https://www.dnalc.org/view/15475-The-cycles-of-the-polymerase-chain-reaction-PCR-3D-animation.html>

Scitable by Nature Education est également une ressource utile pour une variété de sujets en biologie moléculaire :

- Introduction à la réplication de l'ADN cellulaire : <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cells-can-replicate-their-dna-precisely-6524830>
- Une explication plus détaillée du mécanisme moléculaire : <https://www.nature.com/scitable/topicpage/major-molecular-events-of-dna-replication-413>

Vous pouvez en apprendre davantage sur le phage lambda et son histoire en biologie moléculaire ici :

- Murray, N. E., Gann, A. (2007) What has phage lambda ever done for us ? Current Biology, 17 (9), R305-R312.

Annexe B - Glossaire PCR

Term	Définition
Amorces	De courts morceaux d'ADN avec des séquences complémentaires aux séquences flanquant la région à copier. Les amorces sont conçues spécifiquement pour chaque réaction PCR en tenant compte de nombreuses variables, notamment la longueur, la teneur en nucléotides et les caractéristiques structurales. De nombreux outils informatiques sont disponibles pour aider à la conception des amorces.
Cycle	Un cycle se réfère à une série d'étapes de dénaturation, de recuit et d'extension de la réaction PCR. Le nombre de cycles nécessaires pour une réaction particulière dépend de la quantité d'ADN avec laquelle vous commencez et de la quantité d'ADN que vous essayez de produire. Avec une concentration de départ élevée, 20 à 25 cycles suffisent pour produire suffisamment d'ADN à visualiser sur un gel. Lorsque la concentration de départ est faible ou que de grandes quantités de produit sont nécessaires, 35 à 40 cycles peuvent être utilisés.
Denaturation	La dénaturation utilise une température élevée pour rompre les liens entre les bases sur les brins opposés. L'ADN double brin est divisé en ADN simple brin, exposant les bases afin qu'elles puissent être copiées. Les paramètres typiques sont de 90-98°C pendant 5-30 secondes par cycle. Denaturation
Dénaturation initiale	Lors de la copie d'un morceau d'ADN génomique, une étape initiale de dénaturation est souvent utilisée pour s'assurer que les longs brins d'ADN sont entièrement séparés et libérés des protéines liées avant le début du cycle thermique. Les réglages typiques sont de 90-96°C pendant 30 secondes à 10 minutes.
dNTPs	Les nucléotides, les éléments moléculaires de l'ADN.
Enzyme	Une enzyme est un catalyseur biologique qui accélère une réaction chimique sans changer les produits ou être consommé par la réaction. La plupart des enzymes sont des protéines et elles contrôlent un large éventail de réactions dans les cellules, de la copie de l'ADN à l'extraction de l'énergie des aliments.
Elongation	À environ 70 °C, la polymérase se met au travail et commence à ajouter des nucléotides (dNTP) à l'extrémité 3' des amorces recuites, copiant le brin complémentaire. Les réglages typiques sont de 72°C pendant 5 secondes - 5 minutes par cycle.
Elongation finale	Dans certains protocoles, une étape d'extension supplémentaire est utilisée. Celle-ci permet à la polymérase d'ajouter les paires de bases finales à l'extrémité des brins, ce qui est nécessaire dans certaines applications. La durée typique est de 2 à 10 minutes.
Hybridation	Lorsque la température d'une réaction PCR est abaissée, de courts morceaux d'ADN, appelés amorces, se lient à des séquences spécifiques du génome ciblant cette région à copier. La température d'hybridation est spécifique aux amorces utilisées dans votre réaction - la température typique est de 45 à 65°C pendant 5 à 30 secondes par cycle.
Monomère	Une molécule qui peut être liée à d'autres molécules similaires pour former un polymère.
Polymère	Molécule constituée de nombreuses unités similaires liées entre elles.
Matrice	ADN contenant la séquence qui sera copiée dans une réaction PCR. Il peut s'agir d'un court fragment ou d'un génome entier.
tampon	Un sel ajouté à une solution aqueuse qui aide à maintenir un pH constant. Les tampons sont essentiels dans la PCR car la fonction de l'Buffer
Thermocycleur	Également appelé appareil PCR, un thermocycleur est un instrument qui modifie automatiquement la température de la réaction PCR selon un programme défini par l'utilisateur. Il chauffe et refroidit la réaction entre les températures de dénaturation, de recuit et d'extension sur un nombre de cycles déterminé.

Annexe C - Électrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel est une technique utilisée dans de nombreux domaines scientifiques pour analyser les composants de mélanges chimiques complexes. Les mélanges d'ADN, d'ARN, de protéines ou de colorants peuvent être séparés en leurs composants individuels sur la base de la taille moléculaire et de la charge électrique en utilisant une matrice de séparation dans un champ électrique.

Le gel utilisé dans l'électrophorèse sur gel est un enchevêtrement de polymères formant une matrice tridimensionnelle avec des pores remplis d'eau à travers lesquels les molécules migrent. Une densité plus élevée de polymères crée des pores plus petits. Comme les trous d'un tamis ou d'une passoire, la taille des pores doit être adaptée à la taille des molécules à séparer. Les gels peuvent être fabriqués à partir de différentes substances selon l'application. L'un des matériaux les plus couramment utilisés et les plus efficaces est l'agarose, un polymère extrait d'algues marines. Les gels d'agarose sont formés (ou coulés) en versant de l'agarose fondu dans un plateau où il se solidifie en refroidissant pour prendre la forme souhaitée. Un peigne est placé pendant que l'agarose est fondu, puis retiré après sa solidification pour créer des puits où les échantillons sont chargés.

Après solidification du gel, celui-ci est placé dans un tampon électriquement conducteur entre des électrodes parallèles positives ((+) anode) et négatives ((-) cathode) Une tension est appliquée entre les électrodes, ce qui crée un champ électrique uniforme dans le gel. Les molécules dans les puits commencent à se déplacer sous l'influence du champ électrique : les molécules chargées positivement migrent vers la cathode (-) et les molécules chargées négativement migrent vers l'anode (+).

La vitesse de déplacement d'une molécule dans un champ électrique est déterminée par la force de sa charge électrique par rapport à son poids moléculaire. Cette force est quantifiée comme le rapport entre la charge et la masse. La vitesse de mouvement à l'intérieur d'un gel est également influencée par la taille de la molécule par rapport aux pores du gel. Les polymères dans le gel sont comme une course d'obstacles : les petites molécules se déplacent facilement à travers les pores, voyageant plus vite et plus loin que les grosses molécules volumineuses. Cependant, une grosse molécule peut se déplacer plus rapidement dans un gel qu'une petite molécule lorsque la force de sa charge par rapport à sa masse est nettement plus élevée. La forme peut également affecter la façon dont une molécule se déplace à travers le gel. Les longues molécules de type spaghetti se déplacent plus lentement que les molécules compactes, qui se glissent facilement à travers les pores. Les molécules de même taille, de même forme et de même charge se déplacent ensemble et forment une bande distincte. Si plusieurs types ou tailles de molécules sont présents dans l'échantillon, ils se sépareront les uns des autres et chacun d'eux formera une bande distincte.



 theminione.eu

 +32 475 36 68 34

 info@theminione.eu

FastTaq, GreenGel et PrepOne sont des marques commerciales d'Embi Tec. GelGreen est une marque de commerce de Biotium. MiniOne est une marque déposée de C.C. IMEX.
Brevets en instance.