

# Mallette « PCR »

## Thermocycleur BIOER

### Sommaire

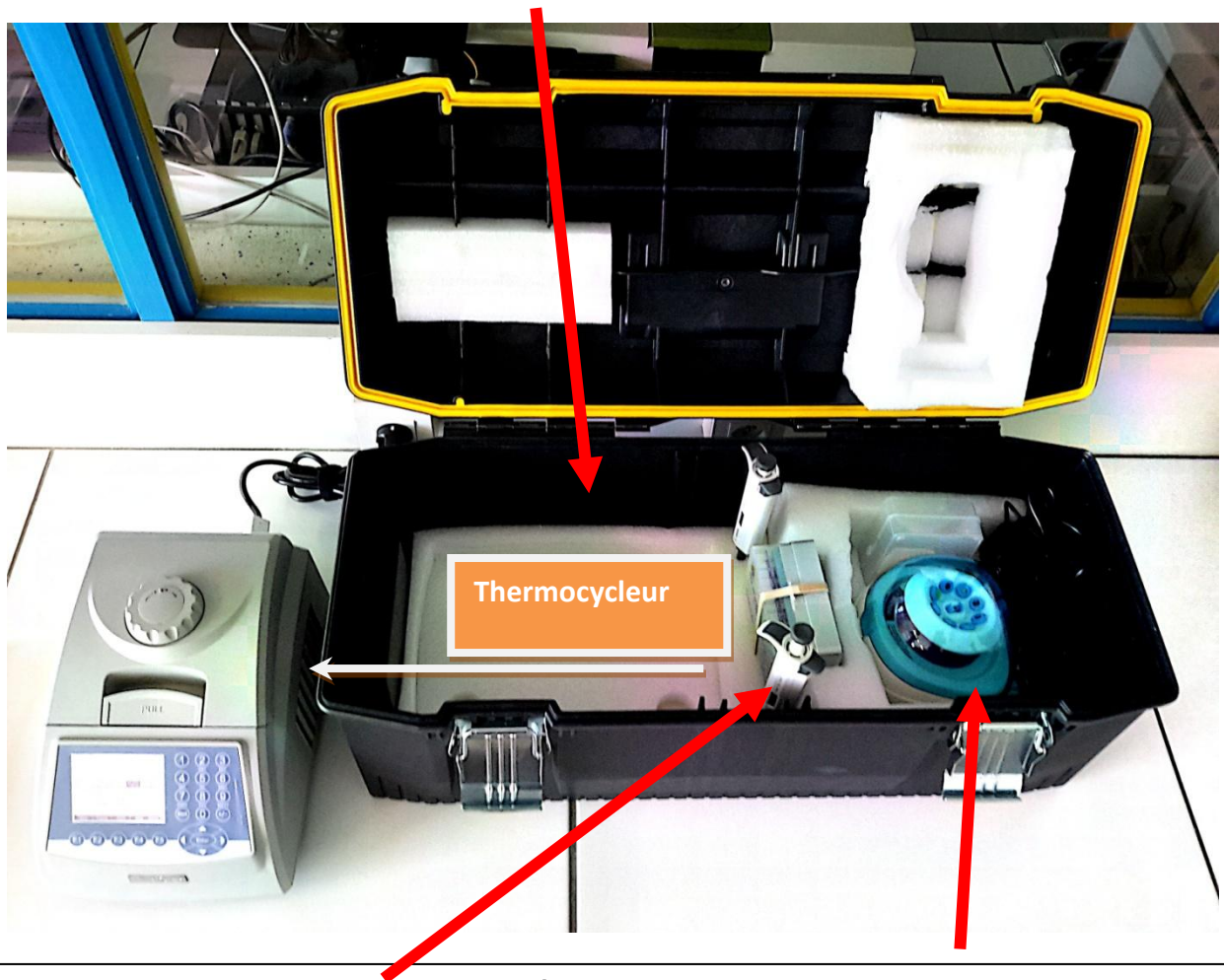
1	COMPOSITION DE LA MALETTE « PCR » .....	2
2	TECHNIQUE de PCR.....	2
2.1	Principe .....	2
2.2	Les outils de la réaction PCR .....	4
2.2.1	Les amorces .....	4
2.2.2	LES ENZYMES (ADN polymérases thermostables) .....	4
2.3	LES CYCLES D'AMPLIFICATION .....	5
2.3.1	LA DENATURATION DE L'ADN .....	5
2.3.2	L'HYBRIDATION DES AMORCES.....	5
3	CONSOMMABLES ET REACTIFS .....	6
3.1	Matériel « hors Malette » PCR.....	6
3.2	Matériel pour Electrophorèse.....	6
4	PARAMETRAGE du Thermocycleur BIOER .....	6
4.1	Lien « commercial » .....	6
	<a href="http://www.bioer.com.cn/en/html/productcenter/PCRTermalCycler/83.html#ad-image-0">http://www.bioer.com.cn/en/html/productcenter/PCRTermalCycler/83.html#ad-image-0</a>	
4.2	Lien tutoriel « papier ».....	6
	<a href="https://drive.google.com/file/d/0B1655j4BzP7-eHdHMmtaMjdkV1U/view?usp=sharing">https://drive.google.com/file/d/0B1655j4BzP7-eHdHMmtaMjdkV1U/view?usp=sharing</a>	
4.3	Lien tutoriel « Vidéo ».....	6
	<a href="https://www.youtube.com/watch?v=qnDlvkUuVCM">https://www.youtube.com/watch?v=qnDlvkUuVCM</a>	

# Mallette « PCR »

## Thermocycleur BIOER

### 1 COMPOSITION DE LA MALETTE « PCR »

- Un thermocycleur de la marque BIOER



Mais aussi : deux pipettes « PCR », une boîte de cônes, une micro-centrifugeuse pour microtubes

*Vue de la mallette « PCR »*

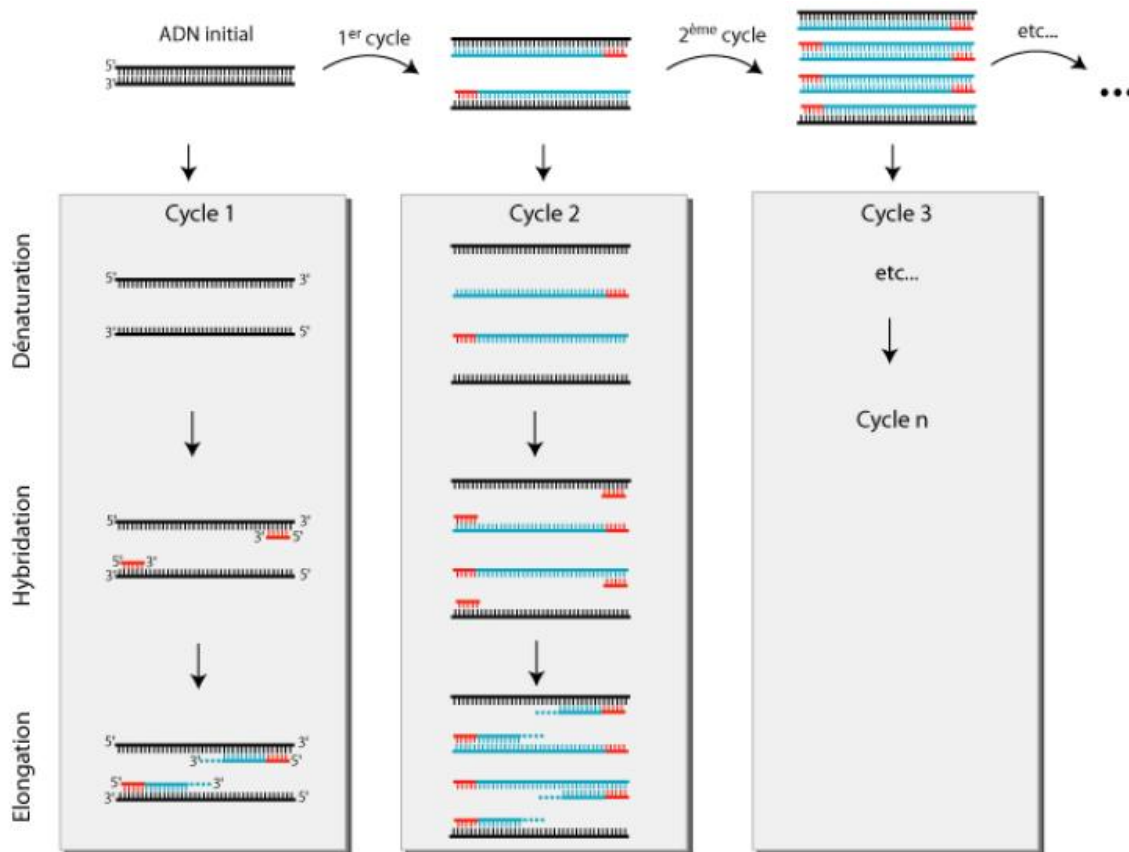
## 2 TECHNIQUE de PCR

### 2.1 Principe

La Réaction de Polymérisation en Chaînes est une technique d'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorces. Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier.

Une de ces amorces est une copie du brin codant et l'autre, une copie du brin non codant. Sous l'action d'une enzyme (ADN polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'-3' d'une séquence exactement complémentaire du brin hybridé.

La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée (voir figure<sup>1</sup> ci-dessous).



- La PCR (*polymerase chain reaction*) permet d'amplifier spécifiquement une région de DNA double brin de quelques centaines de paires de bases. Ce DNA doit d'abord être séparé en simples brins (dénaturation à 95°C).
- On ajoute au DNA de départ une large quantité d'amorces (oligonucléotides synthétiques complémentaires des deux extrémités de la région à amplifier) qui vont s'hybrider à 50-60°C environ avec la séquence complémentaire sur chacun des brins de DNA, et les quatre dNTP qui serviront de substrats.
- On soumet le tout à l'activité d'une DNA polymérase (*Taq polymerase*) qui synthétise à 72°C un brin complémentaire à partir du 3'OH de l'amorce hybridée. On obtient quatre brins de DNA.
- On recommence à dénaturer ces 4 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 8 brins de DNA.
- On recommence à dénaturer ces 8 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 16 brins de DNA.
- Et ainsi de suite 35 fois, ce qui aboutit à 34359738368 brins de DNA (34 milliards), ce qui représente une quantité suffisante pour étudier le fragment de DNA amplifié.

<sup>1</sup> UPMC -Biologie Moléculaire - Prs C. Housset et A. Raisonier

## 2.2 Les outils de la réaction PCR

### 2.2.1 Les amorces

Le choix d'amorces efficaces et spécifiques doit respecter plusieurs règles :

- *La longueur* : le nombre statistique minimum de nucléotides composant une amorce doit être égal à 17. En pratique, le nombre de nucléotides se situe entre 20 et 30 bases.
- *La séquence* : les séquences des deux amorces du même couple doivent présenter le maximum de divergences et plus particulièrement à l'extrémité 3', afin d'éviter leur cohybridation. La teneur en G+C doit être d'environ 50 %. La richesse en GC améliore la stabilité du duplex amorce-matrice.
- *La concentration* : les concentrations optimales pour 30 à 40 cycles varient entre 10 et 50 pmoles de chaque amorce.
- *Le nombre de cycles* : pour obtenir un signal détectable sur gel, il faut une amplification de  $2^n$  molécules dans les conditions optimales en n cycles. Il faut noter qu'un nombre de cycles trop élevé provoque l'accumulation de produits non spécifiques.
- *La température* : la température d'hybridation  $T_h$  est spécifique d'une amorce. Elle se calcule à partir du  $T_m$  des amorces.

On se place en général à  **$T_h = T_m - 5^\circ\text{C}$**  (voir 2.3.2)

L'estimation du  $T_m$  peut être réalisée à partir de la composition de l'oligonucléotide.

Si celui-ci a une **longueur égale ou inférieure à 20 nt**, on compte  $2^\circ\text{C}$  par couple A-T et  $4^\circ\text{C}$  par couple G-C.

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

A partir de  **$N > 20$** , on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au-delà de ce chiffre :  $1 + [(N-20)/20]$ .

$$T_m = [4x(G+C) + 2 (A+T)] \times [1 + (N-20)/20]$$

### 2.2.2 LES ENZYMES (ADN polymérase thermostables)

L'amplification d'une séquence nucléotidique par la technique de la PCR utilise la réaction catalysée par les ADN polymérase en présence obligatoirement des éléments suivants : ADN (matrice), magnésium, dNTP, couple d'amorces.

La **Taq polymérase** présente une activité maximale entre 70 et 75 °C.

## 2.3 LES CYCLES D'AMPLIFICATION

### 2.3.1 LA DENATURATION DE L'ADN

La première dénaturation de l'ADN matrice est importante. Il faut toutefois noter que les temps de dénaturation très longs réduisent l'activité enzymatique (la demi-vie de l'enzyme est supérieure à 2h à +95°C).

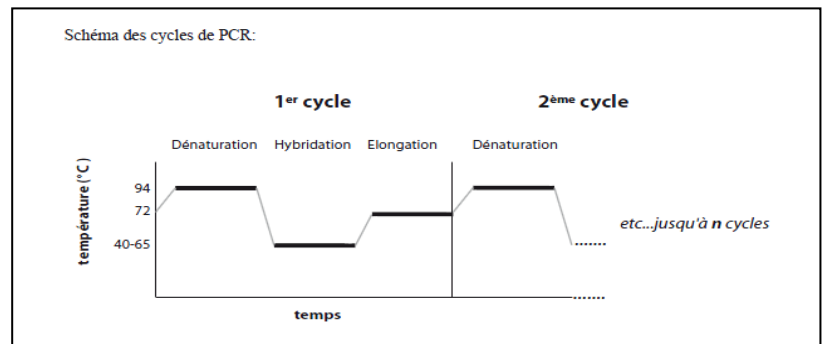
### 2.3.2 L'HYBRIDATION DES AMORCES

La température et la durée de l'hybridation sont fonction de la composition, de la longueur et de la concentration des amorces. On considère comme valable une température inférieure de 5°C au plus à la  $T_m$  la plus basse calculée pour chacune des deux amorces.

### 2.3.3 L'AMPLIFICATION

**Un échantillon de PCR standard comporte:**

- 1ng - 1µg d'ADN à amplifier
- 10 à 50 pmoles de chaque amorce
- 20 µM de chaque dNTP
- 10 µl de tampon 10X
- 2,5 U d'ADN polymérase



Le volume est complété par exemple à 100 µL par de l'eau ultrapure

Les échantillons sont déposés dans l'**appareil (thermocycleur)**, où ils subissent une dénaturation de x minutes avant de commencer le programme de **30 à 40 cycles standard** comportant chacun :

**\* une étape de dénaturation:**

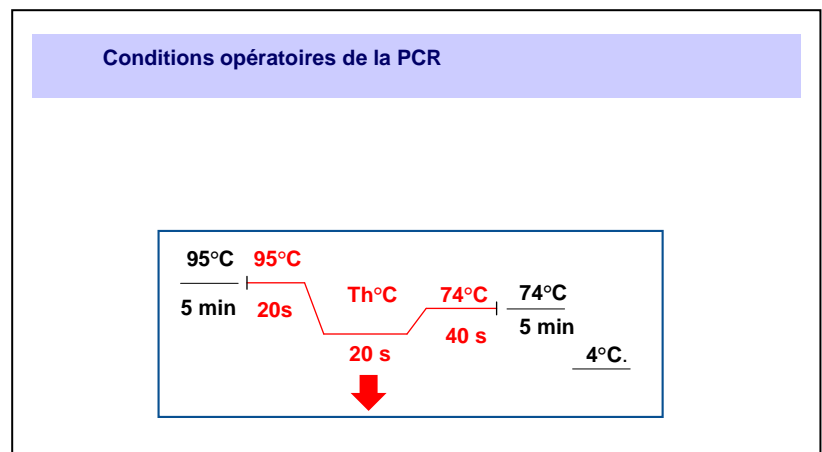
x min ou s, à + 95°C

**\* une étape d'hybridation:**

y min ou s, à ( $T_h = T_m - 5^\circ$ ) C

**\* une étape d'élongation:**

z min ou s, à + 74°C



## 2.4 CONTROLE DE L'AMPLIFICATION

On réalise une électrophorèse en gel d'agarose des amplifiats PCR, en comparaison avec des marqueurs de taille (pb)

## 3 CONSOMMABLES ET REACTIFS

### 3.1 Matériel « hors Malette » PCR

- Microtubes PCR et tubes Eppendorf (préparation Mix)
- Pipettes automatiques classiques + cônes adaptés (tips cotonnés si possibles) + gants jetables + container pour déchets biologiques
- GreenTaq ou ensemble des réactifs du MIX
- Amorces spécifiques et extraits d'ADN à amplifier

### 3.2 Matériel pour Electrophorèse

- Equipement propre au lycée
- Sinon, obligation de réserver la Malette « Electrophorèse horizontale » ;

Liens académiques :

<http://ww2.ac-poitiers.fr/biochimie/spip.php?article159>

[http://ww2.ac-poitiers.fr/biochimie/IMG/pdf/doc\\_mallette\\_electrophorese.pdf](http://ww2.ac-poitiers.fr/biochimie/IMG/pdf/doc_mallette_electrophorese.pdf)

## 4 PARAMETRAGE du Thermocycleur BIOER

### 4.1 Lien « commercial »

<http://www.bioer.com.cn/en/html/productcenter/PCRTermalCycler/83.html#ad-image-0>

### 4.2 Lien tutoriel « papier »

<https://drive.google.com/file/d/0B1655j4BzP7-eHdHMmtaMjdkV1U/view?usp=sharing>

### 4.3 Lien tutoriel « Vidéo »

<https://www.youtube.com/watch?v=qnDlvkUuVCM>



## Description du Thermocycleur BIOER



*Principe de fonctionnement et photo du thermocycleur BIOER*