

## 10b : La PCR (locus PV92)

*Cette expérience a été mise en place afin de remplacer le protocole intitulé "PCR (locus D1S80)". L'amplification est en effet meilleure et les résultats plus simples à interpréter. Toutefois un nouveau protocole PCR a été développé, intitulé "PCR sensibilité au PTC", qui permet de faire le lien entre un génotype donné et le phénotype associé. L'expérience d'amplification par PCR du locus PV92 peut encore être empruntée sur demande.*

La technique de polymérisation en chaîne (en anglais « polymerase chain reaction ») ou PCR, permet d'amplifier des millions de fois un unique fragment d'ADN. Cette méthode est devenue un outil précieux non seulement pour la recherche en biologie moléculaire mais également pour le diagnostic médical, la détermination de microorganismes ou encore la criminologie. L'invention de la PCR revient à Kary Mullis dans les années 80. Il obtint pour cette découverte le Prix Nobel de Chimie en 1993. La découverte d'ADN polymérasés thermorésistants (la Taq polymérase par exemple) isolés de bactéries (*Thermus aquaticus*) vivant dans des sources d'eau chaude a facilité l'utilisation de la PCR et a permis son automatisation.

**Thèmes :** la PCR, la structure du génome humain, le génotypage, la criminologie, l'ADN, l'électrophorèse.

**La PCR :** Une réaction de PCR nécessite :

1. de l'ADN à amplifier (dénommé template)
2. des amorces (également appelés primers)
3. des desoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
4. une ADN polymérase thermorésistante (la Taq par exemple)
5. du magnésium (Mg<sup>++</sup>) indispensable au fonctionnement de l'ADN polymérase

Ces 5 ingrédients sont mélangés dans un tube à essai et soumis à différents cycles de températures.

1 cycle de PCR

1ère étape : **la dénaturation** (94°C).

L'ADN template est chauffé à 94°C. Les deux brins de l'ADN se séparent. On parle de dénaturation de l'ADN.

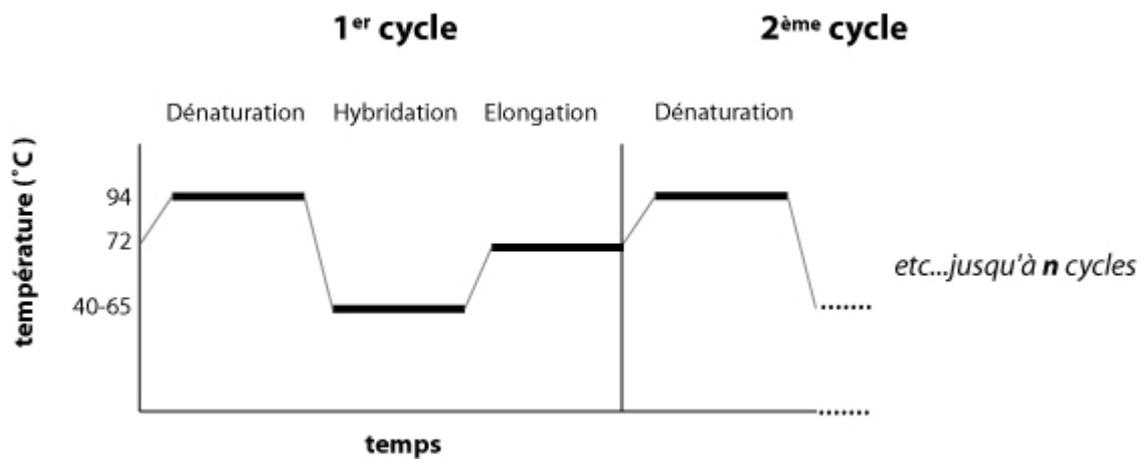
2ème étape : **l'hybridation** (40-65°C).

En descendant la température, les amorces s'apparient (s'hybrident) par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN.

3ème étape : **l'élongation** (72°C).

A cette température, la Taq synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la vitesse de polymérisation de l'enzyme (la Taq ajoute environ 1000 nucléotides par minute).

Ces trois étapes correspondent à 1 cycle de PCR, à la suite duquel on a doublé le nombre de fragment d'ADN cible initial. Environ une trentaine de cycle sont en principe effectués dans une expérience de PCR classique. Ainsi, après 30 cycles on aura amplifié 2<sup>n</sup> fois notre ADN cible.



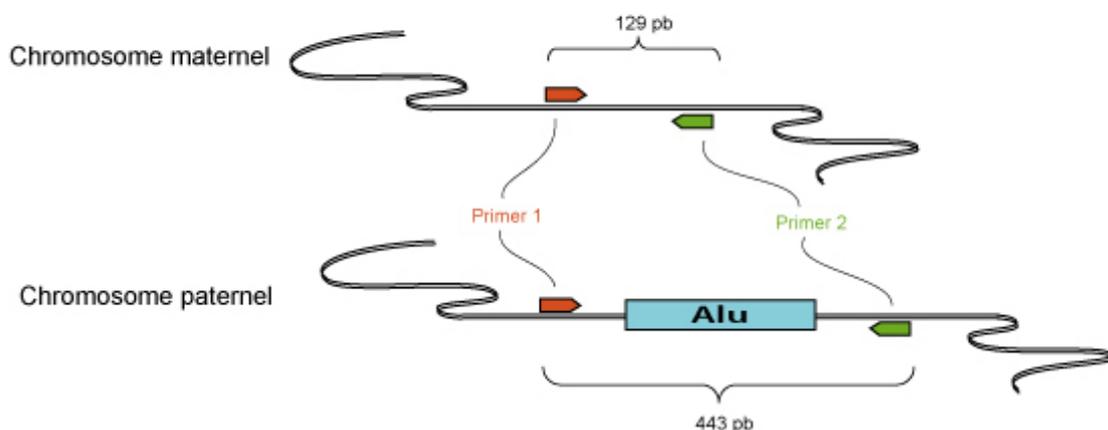
### Les séquences alu :

L'ADN humain est constitué de nombreuses séquences répétées représentant plus de 50% du génome. Les séquences **Alu** font partie des éléments répétés les plus abondants. Il s'agit de courtes séquences d'environ 300 pb qui ont été mobilisées chez les primates il y a environ 65 millions d'années. Le nom de ces séquences vient du fait qu'elles possèdent un site de restriction pour l'enzyme *AluI*. La dispersion des séquences Alu dans le génome s'effectue en utilisant un intermédiaire ARN par un processus dénommé rétroposition. Ces éléments Alu contribuent à l'évolution du génome, à son architecture mais peuvent également être la cause de certaines maladies génétiques. Les séquences Alu continuent de se disperser à raison d'une insertion toute les 200 naissances.

Certaines séquences Alu se sont insérées récemment (il y a environ 1 million d'année) et ne se retrouvent pas chez tous les individus. Ce polymorphisme peut être utilisé pour l'étude des populations. Par exemple, le locus PV92 situé sur le chromosome 16 peut, suivant les personnes, contenir ou non une séquence Alu.

Certains individus possèdent ainsi un élément Alu sur leurs 2 chromosomes 16 (+/+), ou sur l'un des 2 (+/-), ou pas d'insertion à ce locus (-/-).

Locus PV92 (sur le chromosome 16)



## L'EXPERIENCE:

Cette expérience peut être envisagée sous la forme d'une enquête policière : *Un individu est venu dans le laboratoire de biologie saboter des expériences. Lors de ses méfaits il a laissé un indice : de la salive, ou un cheveu. Toute la classe est considérée comme « suspect potentiel » et le but de l'expérience sera de mettre la main sur le coupable.* Le profil (génotype) de chaque élève pour ce locus sera observé sur gel d'agarose et comparé au profil du suspect. Le nombre de répétitions de chaque élève pourra également être déterminé.

## PROTOCOLE :

La quantité d'ADN peut être critique pour obtenir des bons résultats. Bien qu'il soit possible d'effectuer cette expérience à partir d'un bulbe de cheveux **il est préférable d'utiliser des cellules de la bouche**, plus nombreuses, et obtenues facilement à partir de l'intérieur des joues.

### 1) Extraction d'ADN

#### A partir de cellules épithéliales de la bouche:

- Mettre 500 µl d'H<sub>2</sub>O dans un tube Eppendorf
- Frotter abondamment l'intérieur des joues avec un écouvillon (coton tige) stérile afin d'obtenir un maximum de cellules épithéliales
- Tremper l'écouvillon dans le tube contenant les 500 µl d'H<sub>2</sub>O. Tourner l'écouvillon et le frotter contre les parois du tube
- Bien essorer l'écouvillon en le sortant du tube
- Centrifuger le tube 2 minutes à la vitesse maximum afin de faire tomber les cellules épithéliales.
- A l'aide de la P1000 enlever le surnageant en prenant soin de laisser le culot de cellules au fond du tube. Attention à ne pas aspirer le culot de cellules. Le cas échéant centrifuger à nouveau la salive.
- Ajouter 0.1 ml de solution de NaOH 200 mM sur le culot et le resuspendre en vortexant ou en pipetant à l'aide de la P1000
- Fermer le tube et incubé à 95 °C pendant 10 minutes dans le bloc chauffant
- Vortexer brièvement
- Ajouter 0.1 ml de HCl 200 mM dans votre tube.
- Ajouter 0.1 ml Tris-HCl (pH 8.5) 200 mM dans votre tube.
- Votre préparation d'ADN est prête et peut être stockée au congélateur ou utilisée directement pour la suite de l'expérience

### 2) Amplification par PCR

- Préparer le mélange de réactif pour la PCR **juste avant l'emploi**. Ce mélange contient le **2 x Taq mix** (taq polymérase, dNTPs, tampon de polymérisation et tampon de charge rouge), les primers et de l'H<sub>2</sub>O.
- Pour une classe de 16 élèves par exemple, on compte 16 réactions plus un contrôle négatif ainsi qu'un contrôle positif soit un total de 18 réactions. Afin de faciliter le pipetage et pour avoir assez de matériel en cas d'erreurs nous prévoyons un mélange pour 22 réactions.

	<b>1 x</b>	<b>22 x</b>
<b>2x Taq ready Mix</b>	12.5µl	275µl
<b>Primers mix PV92</b>	5 µl	110 µl
<b>DMSO</b>	1.25 µl	30 µl
<b>H2O</b>	1.25 µl	30 µl

- Ce mélange est préparé dans un tube Eppendorf 1.5 ml juste avant l'emploi. Mélanger en pipetant en haut et en bas délicatement.
- Distribuer ensuite les 20 µl du mélange dans les petits tubes de PCR préalablement marqué **sur le côté** par les initiales des personnes à tester.
- Dans votre petit tube ajouter 5 µl de votre solution d'ADN. Fermer le tube.
- Dans le petit tube PCR destiné au contrôle négatif, ajouter 5 µl d'H<sub>2</sub>O à la place de l'ADN. Fermer le tube.
- Dans le petit tube PCR destiné au contrôle positif, ajouter 5 µl d'ADN B2B. Fermer le tube.
- En suivant les instructions du mode d'emploi de la machine PCR, mettre les tubes dans la machine et lancer le programme PV92.
- Le programme dure environ 1h15. Il comporte les cycles suivants:

94°C, 5 minutes

- |                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| 94°C, 30 secondes | } | 40 cycles |
| 54°C, 30 secondes |   |           |
| 72°C, 30 secondes |   |           |

72°C, 5 minutes

- A la fin de la réaction de PCR les tubes peuvent être gardés au congélateur
- Arrêter la machine PCR en suivant les indications du mode d'emploi

### 3) Préparation du gel d'agarose

Le gel d'agarose est une matrice pour séparer les molécules d'ADN selon leur taille dans un champ électrique. Les petits fragments migrent plus vite que les grands, la concentration d'agarose est choisie en fonction de la taille des fragments à séparer. Ici nous allons utiliser un gel à 1.5% d'agarose.

- Peser 1.05 g d'agarose et mettez-le dans un Erlenmeyer de 250ml.
- Ajouter 70 ml de tampon d'électrophorèse (TBE 1x).
- Faire bouillir (four à micro-ondes, plaque chauffante ou bec bunsen).
- Laisser refroidir le liquide (à environ 60°C).
- Ajouter 7 µl de SYBR-safe (intercalant qui permettra de visualiser l'ADN) et mélanger en agitant l'Erlenmeyer.
- Verser l'agarose dans la cuve préparée avec un peigne pour former les puits (attention si l'agarose est trop chaud la cuve d'électrophorèse se déforme !)

Les cuves d'électrophorèse possèdent des petits blocs en plexi pour protéger les électrodes. Souvent les cuves sont déformées et les blocs ne rentrent plus. Il suffit donc de couper, après solidification du gel, une petite lamelle d'agarose en haut et en bas du gel pour libérer les électrodes.

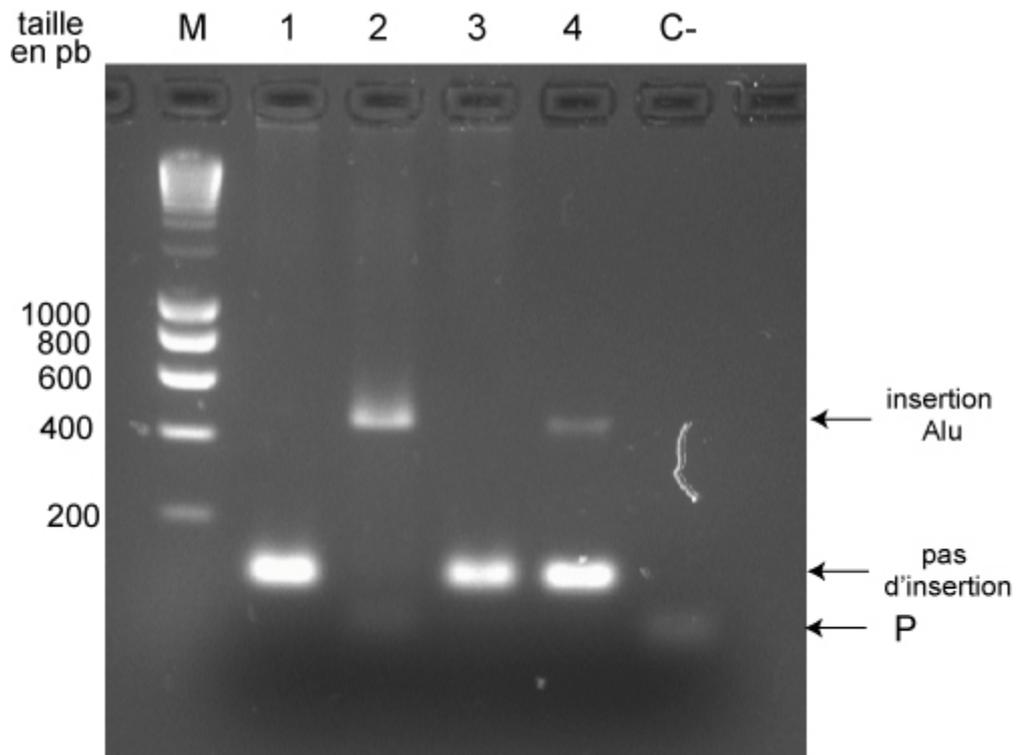
- Lorsque le gel est refroidi et solidifié ajouter du tampon d'électrophorèse (TBE 1x) et enlever le peigne.

### 4) Analyse des génotypes sur gel

- Récupérer vos tubes. Ils contiennent déjà le tampon de charge (rouge) et sont donc prêt à être mis sur gel.
- Charger le gel:
  - 1er puits: 5 µl de marqueur
  - 2ème puits et suivants: 20 µl de vos échantillons
  - Avant dernier puits: le contrôle négatif

- Dernier puits: le contrôle positif

- Allumer le transformateur et faire migrer à 100V (ampérage maximum).
- Quand le colorant rouge de migration arrive en bas du gel, arrêter le transformateur.
- Prendre le gel et visualiser les bandes sous la lampe bleue.
- Prendre une photo.



## 5) Résultats et discussions

- Observez votre génotype et ceux des autres personnes.
- Calculez la **fréquence des génotypes** de la classe.
- Calculez la **fréquence des allèles** de la classe.
- Calculez la **valeur de Hardy-Weinberg** pour la classe.

## Matériel:

- Pipettes P20 et embouts stériles
- Pipettes P200 et embouts stériles
- Pipettes P1000 et embouts stériles
- Ecouvillons stériles
- Gants
- Microcentrifugeuse
- Bloc chauffant 95°C
- Tubes à réaction (Eppendorf 1.5ml)
- Tubes PCR (0.2 ml)
- Portoirs pour tubes PCR
- Portoirs pour tubes Eppendorf
- Machine PCR
- H<sub>2</sub>O stérile
- NaOH (200 mM)
- HCl (200 mM)
- Tris-HCl pH 8.5 (200 mM)
- 2x mix PCR (comprenant la Taq DNA polymérase, les dNTPS et le tampon)
- Primers
- Agarose
- Cuve d'électrophorèse
- Tampon de migration TBE 1x
- SYBR-Safe
- Lampe de détection d'ADN (lumière bleue)
- Marqueur de poids moléculaire
- ADN B2B (C+)

## Stockage du matériel:

- Le 2x Taq mix est stocké au congélateur (-20°C), dégelé sur glace (ou brièvement à température ambiante), gardé dans la boîte réfrigérante pendant la manipulation et remis à -20°C après usage.
- Le SYBR-Safe est stocké au frigo (4°C). Il faut le sortir environ 30 minutes avant de l'utiliser pour que la solution soit bien soluble.
- Le marqueur d'ADN, l'ADN B2B (contrôle positif), les primers sont stockés au congélateur (-20°C), dégelé à température ambiante et remis à -20°C après usage.
- Le reste du matériel peut être gardé à température ambiante.