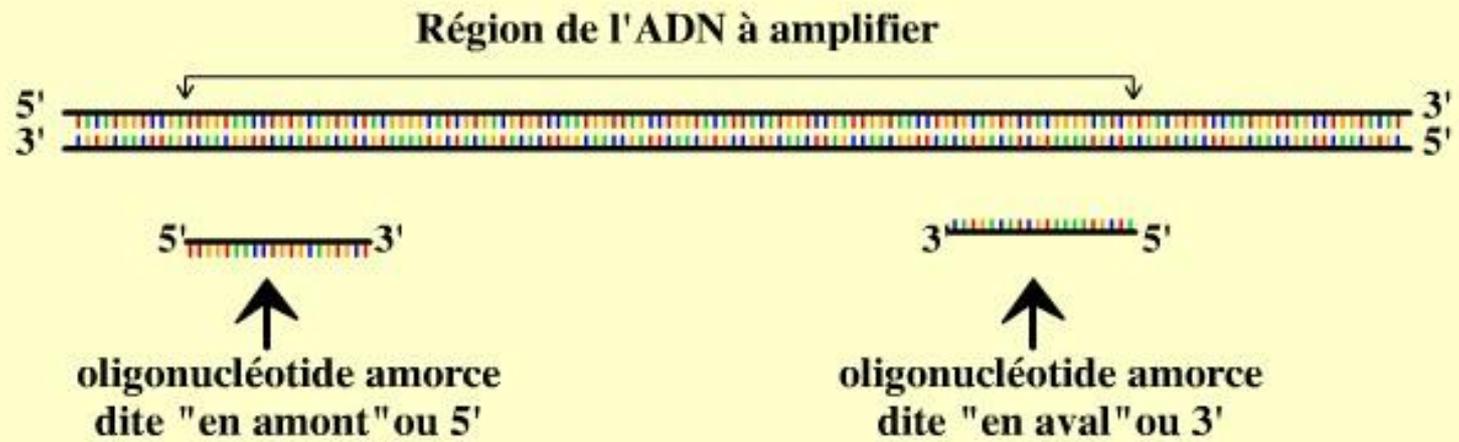


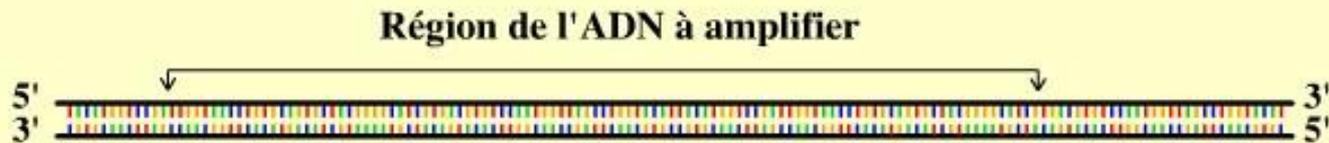
Activité n°2

*Amplification du gène d'intérêt FRI de *Populus nigra* par la PCR*

Principe de la PCR (capture d'images sur le site:
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/index.htm>)



La PCR (pour *Polymerase Chain Reaction*) permet d'obtenir un grand nombre de copies d'une région définie d'un ADN. C'est une réaction cyclique de polymérisation qui utilise un couple d'oligonucléotides amorces et une enzyme ADN polymérase thermostable.



Dans le mélange réactionnel en plus de l'ADN à "amplifier" (la matrice) il faut :

- un couple d'amorces oligonucléotidiques spécifique
- une ADN polymérase thermostable
- les quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP et dCTP)
- un tampon (TrisHCl, cations bivalents et monovalents).

Chaque cycle est une succession de 3 étapes :

- Une **dénaturation** en simple brin de l'ADN
- L'**hybridation** des oligonucléotides amorces
- La **polymérisation** des brins inverses complémentaires des brins matrices

Région de l'ADN à amplifier



La **dénaturation** de l'ADN est réalisée à une température, les liaisons hydrogène, qui maintiennent les deux brins ensemble, sont rompues. A la fin de cette étape, on obtient de l'ADN simple brin.



Les séquences des oligonucléotides amorces sont choisies pour former les limites de la séquence ADN qui doit être amplifiée. Chaque oligonucléotide fait de 15 à 25 nucléotides environ. Ces oligonucléotides doivent avoir des températures d'hybridation voisines.

La température d'hybridation, T_a , est inférieure de 5°C à la température de demi-dénaturation (T_m).

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Nous rappelons que le T_m dépend de la composition en considérée, selon la formule suivante :

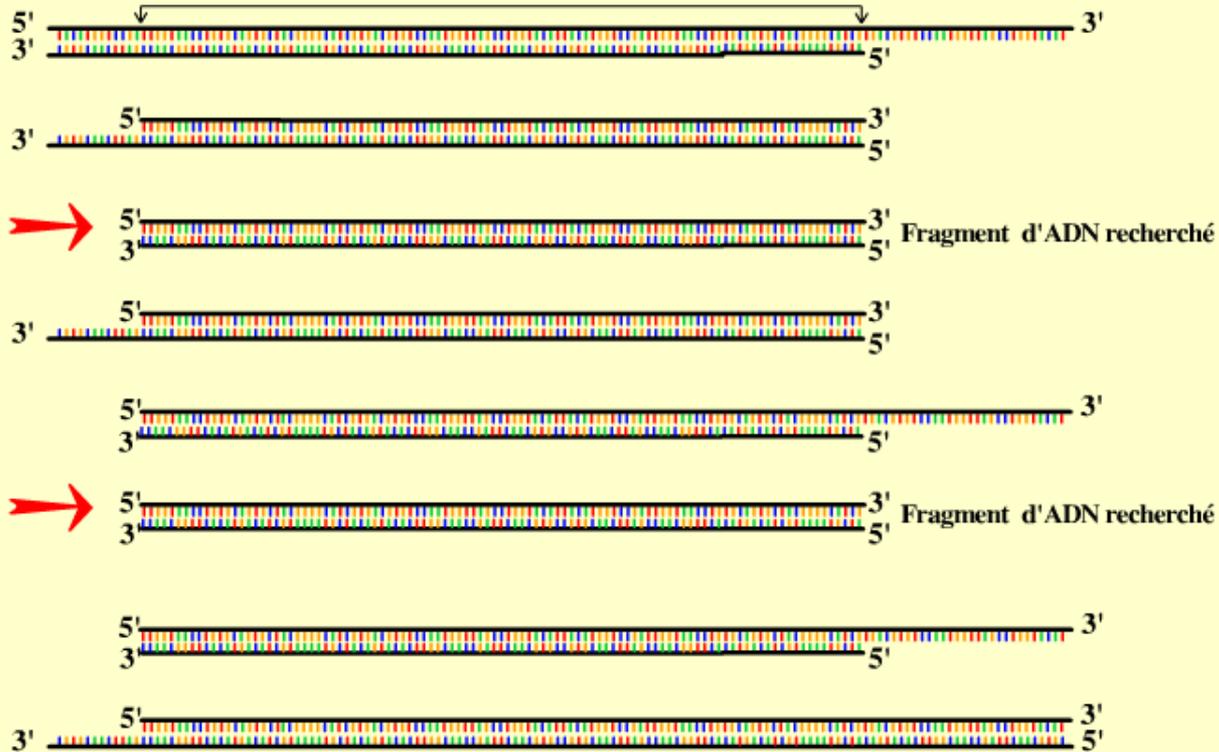
$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)$$

Région de l'ADN à amplifier

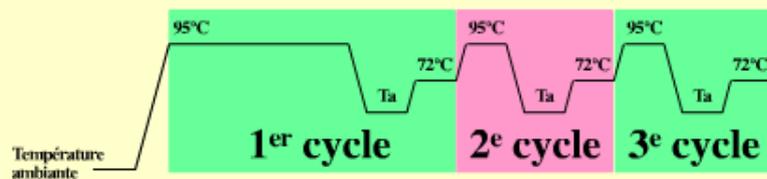


Pour réaliser une réaction de polymérisation en chaîne, l'ADN polymérase utilisée doit pouvoir résister aux passages répétés à haute température. La Taq polymérase issue d'un organisme thermophile est particulièrement indiquée pour les réactions PCR.

La température de polymérisation de cette Taq polymérase est de 72°C . Comme toutes les ADN polymérase, elle effectue la polymérisation à partir de l'extrémité 3' OH libre d'une amorce dans le sens de synthèse, 5' vers 3'.



A la fin du 3^e cycle de PCR nous avons 2 molécules du fragment d'ADN double brin de la bonne taille (pour une molécule d'ADN de départ).
 Au cours des cycles suivants il va s'ensuivre une multiplication de ces molécules d'ADN qui suit une loi de croissance exponentielle.



Exemple de l'amplification d'une portion du gène Fri...

Extraction d'échantillons français SEINE (ASE) ou CORSE (ULI). 10 extractions en tout.

Le gène amplifié est FRIGIDA , gène de la vernalisation. Amorces PnFRI_01f et PnFRI_01r



Echantillon 2µL étiqueter comme indiqué	Gène amplifié	Mix avec amorces à ajouter 15 µL
ULI ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ULI ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ULI ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ULI ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ULI ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ASE	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ASE ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ASE ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ASE ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r
ASE ?	FRI	PnFRI_01f et PnFRI_01r

Header	Steps	Info	Advanced
Temp [°C]	Time hh:mm:ss	# Passes	Grad +/- [°C]
3	55.0	20	35
4	72.0	45	2
5	72.0	5:00	1
6	12.0	15:00:00	1
7			

