

S6: biologie moléculaire

Chapitre 7: Partie Technique (1)

PCR

Polymerase chain reaction

Applications et optimisations

I- Principe de base de la technique PCR :

- PCR Classique
- PCR en temps réel

II- Problèmes pratiques – optimisation

III- Avantages et inconvénients (Contrôle des contaminations)

IV- RT-PCR (détection du Covid-19)

I- Principe de base de la technique PCR

Définition : Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne (1985 – Harry Mullis)

But : Amplifier un fragment d'ADN compris entre deux régions de séquence connue (forward-reverse).

Amplification exponentielle 2^n (n=nombre de cycles)
qq copies ADN \rightarrow qq μ g (milliards de copies)

Permet d'amplifier un simple segment d'ADN à partir d'un échantillon complexe et peu abondant (quelle que soit la taille)

I- Principe de base de la technique PCR



- Méthode enzymatique d'amplification sélective *in vitro* d'une séquence spécifique d'ADN

- Besoins

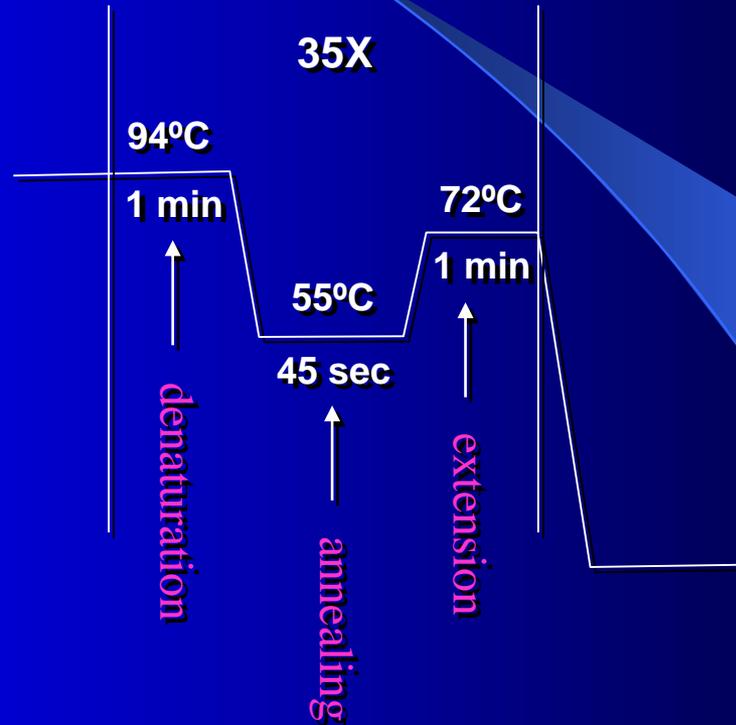
- * 2 oligonucléotides ou primers
- * Thermostable DNA polymerase →
- * dNTP's (dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
- * Template DNA ou AND matrice
- * Termocycleur avec trois étapes (températures)
- * VOLUME : ml au nl ????

Thermostable DNA polymerase – *Taq*DNA polymerase from *Thermus aquaticus* a thermophilic eubacterial microorganism (source d'eau chaude au Parc national Yellowstone)



I- Principe de base de la technique PCR

A simple thermocycling protocol



I- Principe de base de la technique PCR

PCR – avant les thermocyclers



**95° C
5 min**



**55° C
3 min**



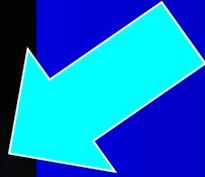
**72° C
5 min**



35 X ou plus

8h par PCR !

I- Principe de base de la technique PCR



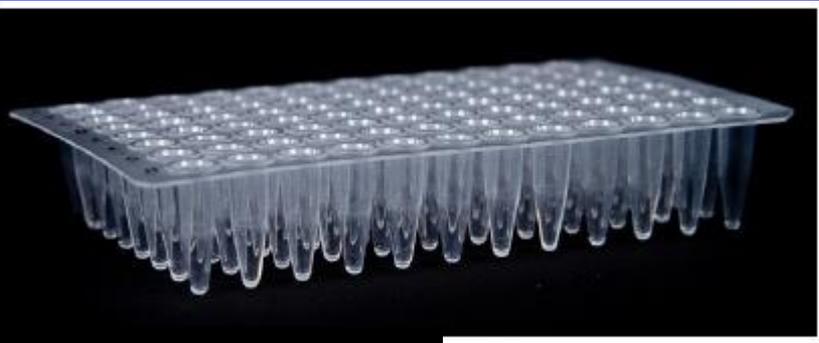
Thermocyclers



I- Principe de base de la technique PCR



**Tubes standards : ↑ volume, ↑ coût
évaporation + transfert de chaleur**



*** VOLUME: ml au nl ????**

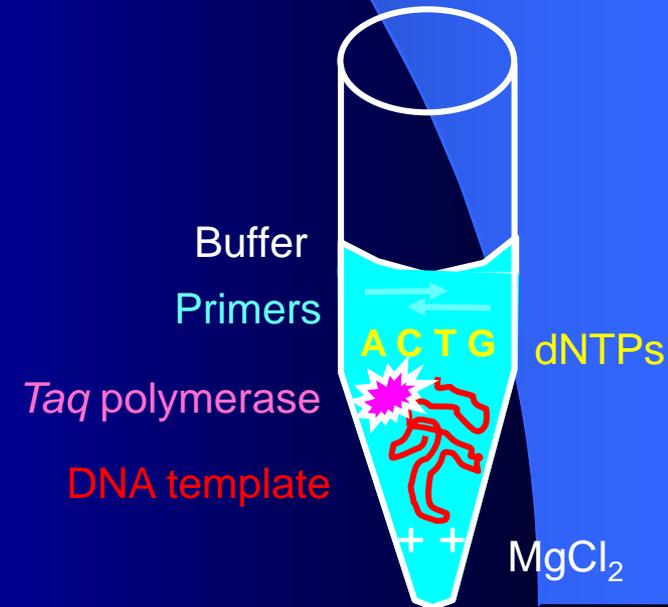


**Tubes PP ou PC : ↓ volume, ↓ coût
↓ évaporation + transfert de chaleur**

I- Principe de base de la technique PCR

PCR et réactifs

- Matrice DNA
- Oligonucleotide ou amorces ou primers
- dNTP's
- Thermostable DNA polymerase
- $MgCl_2$
- Tampon



I- Principe de base de la technique PCR

PCR et réactifs

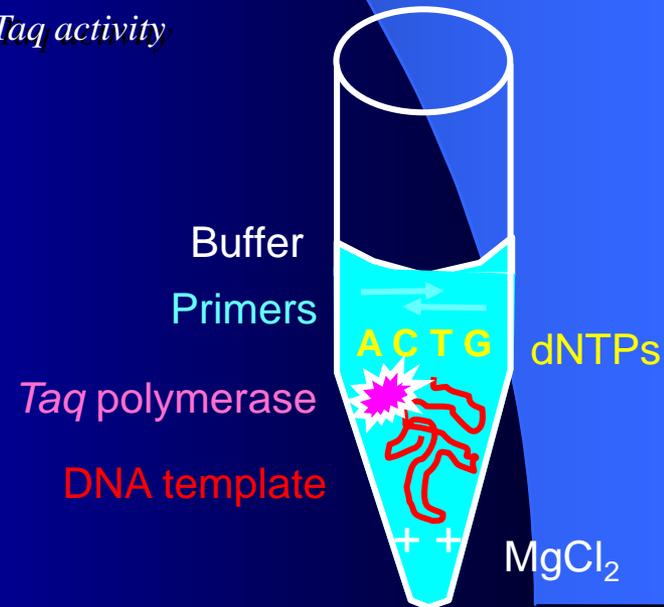
- **Matrice DNA (0.5 - 50 ng)**
< 0.1 ng plasmid DNA, 50 ng to 1 µg gDNA for single copy genes
- **Oligonucleotide ou amorces ou primers (0.1 – 2.0 µM)**
- **dNTP's (20 –250 µM)**
- **Thermostable DNA polymerase (0.5 – 2.5 U/réaction)**
- **MgCl₂ (1 – 5 mM)** *affects primer annealing and Taq activity*
- **Tampon (usually supplied as 10X)**

Working concentrations :

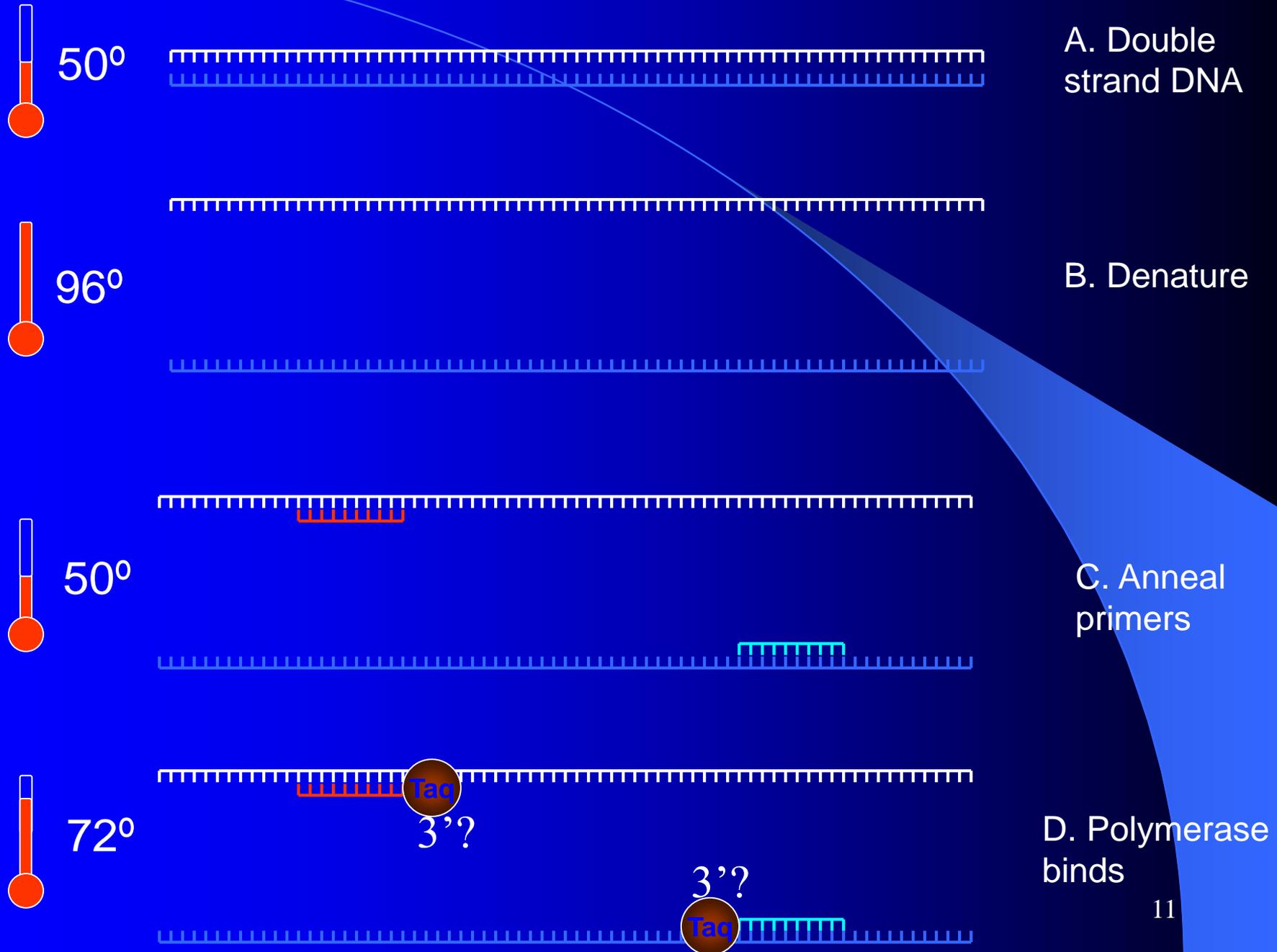
KCL (10 – 50 mM)

Tris-HCl (10 mM, pH 8.3)

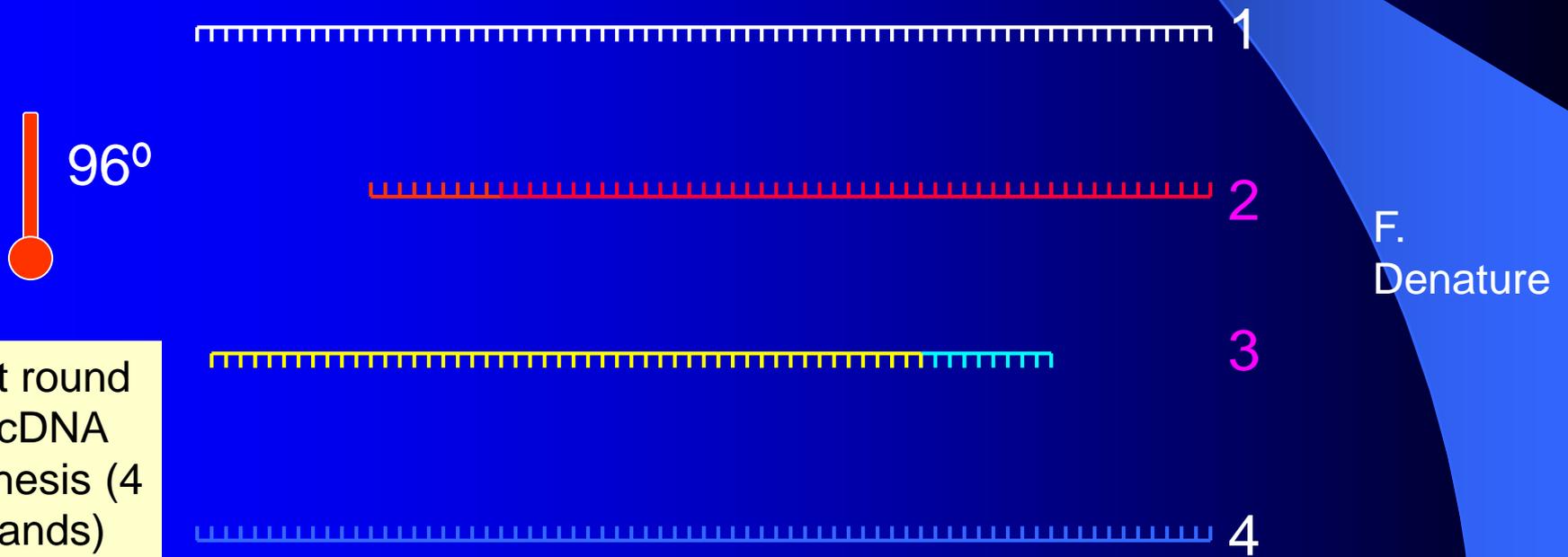
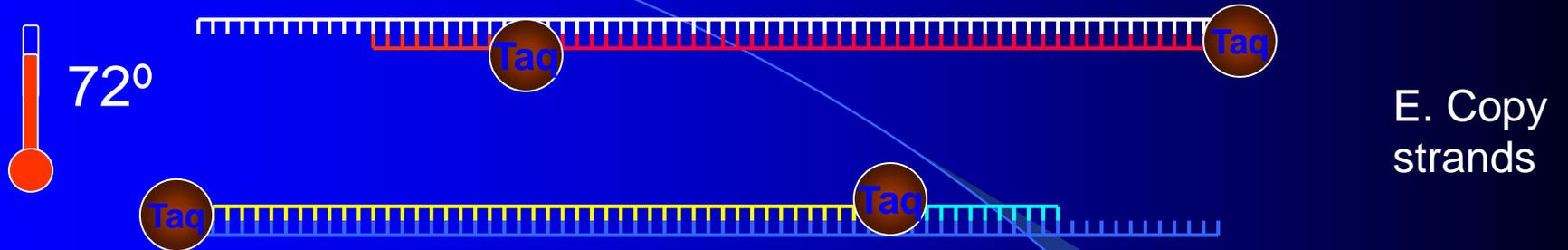
NaCl₂ (sometimes)



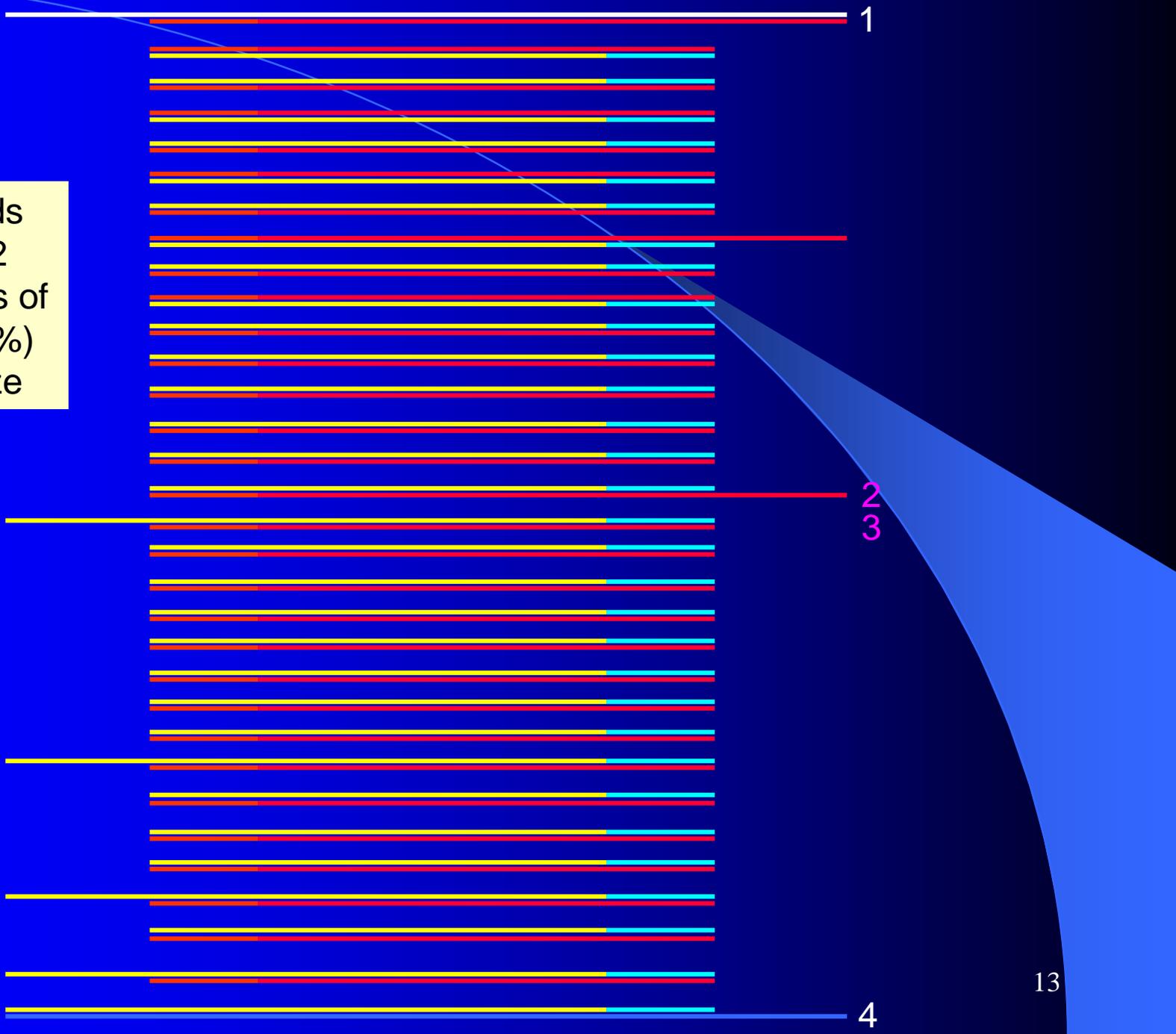
I- Principe de base de la technique PCR



I- Principe de base de la technique PCR



After 5 rounds
there are 32
double strands of
which 24 (75%)
are same size



13

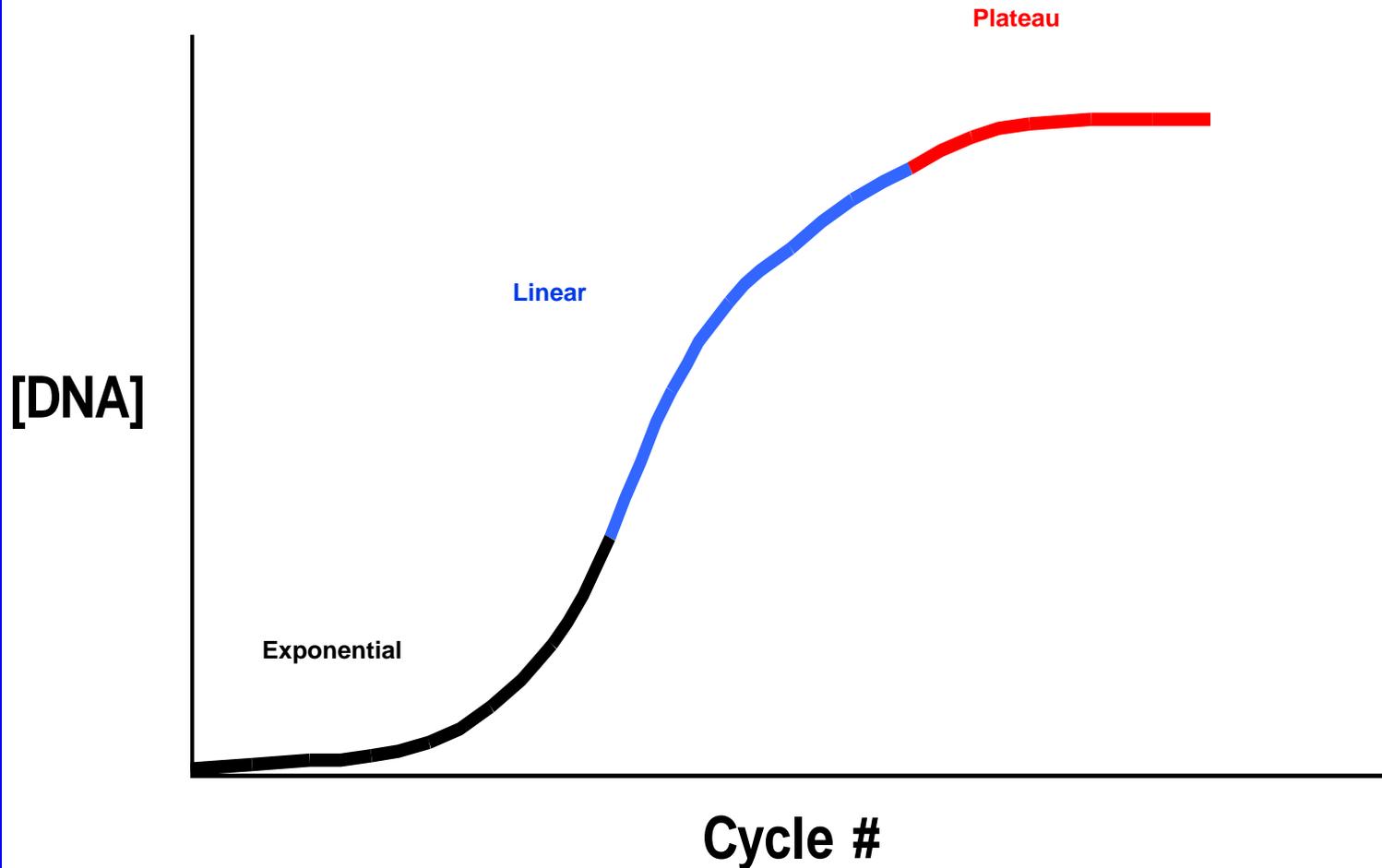
1

2
3

4

I- Principe de base de la technique PCR

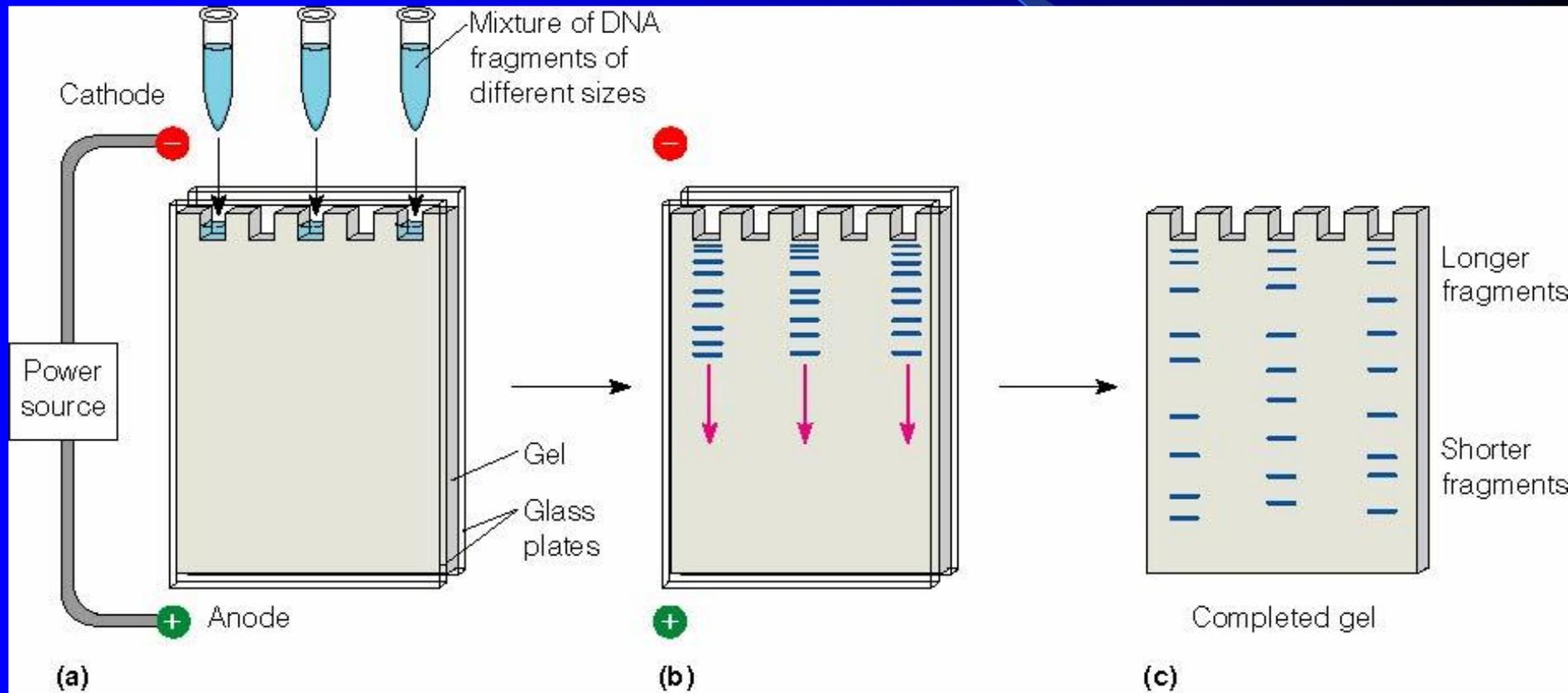
PCR phases in linear view



I- Principe de base de la technique PCR

PCR Classique

Analyze via electrophoresis



I- Principe de base de la technique PCR

PCR Classique

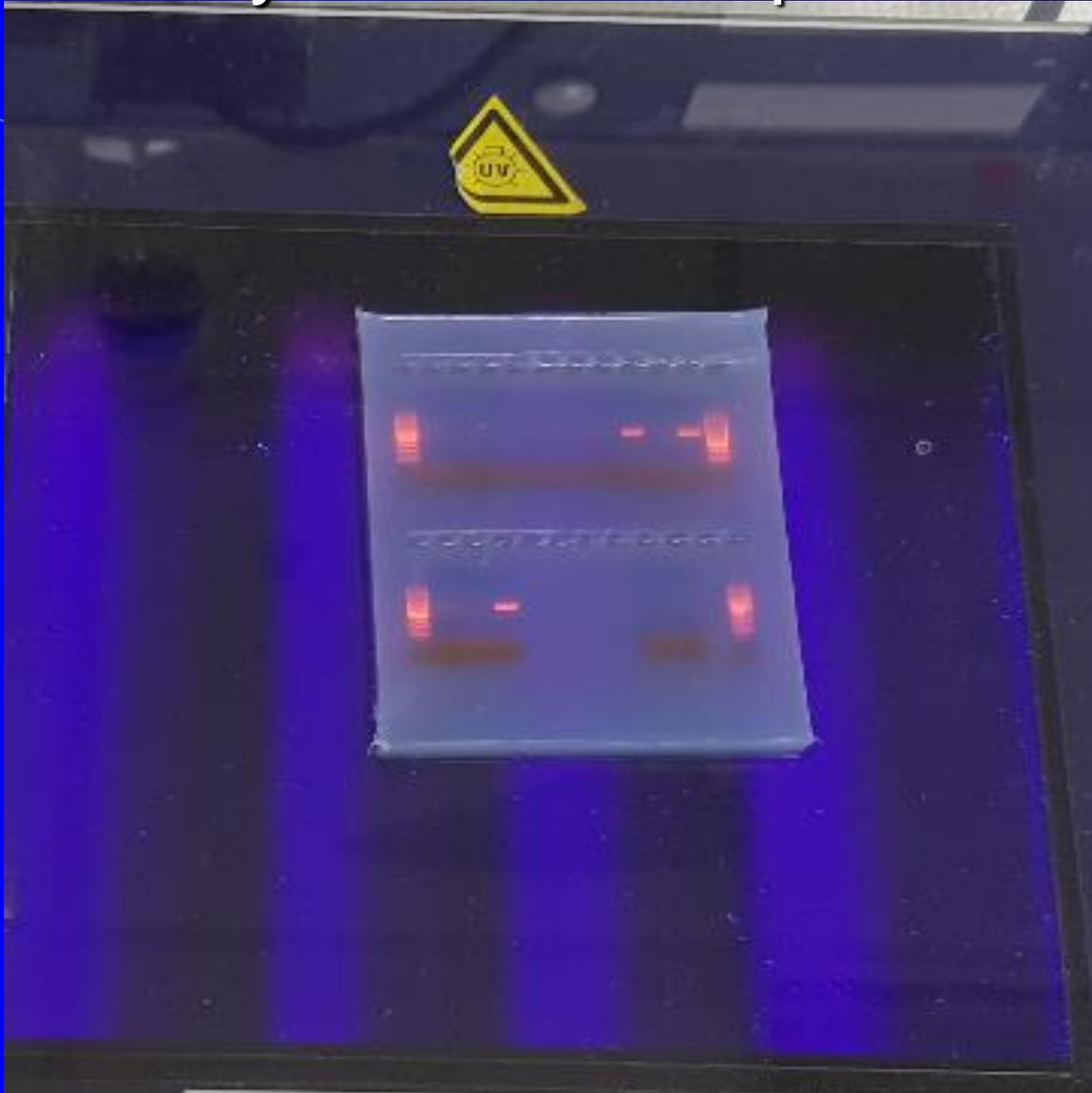
Analyze via electrophoresis



I- Principe de base de la technique PCR

PCR Classique

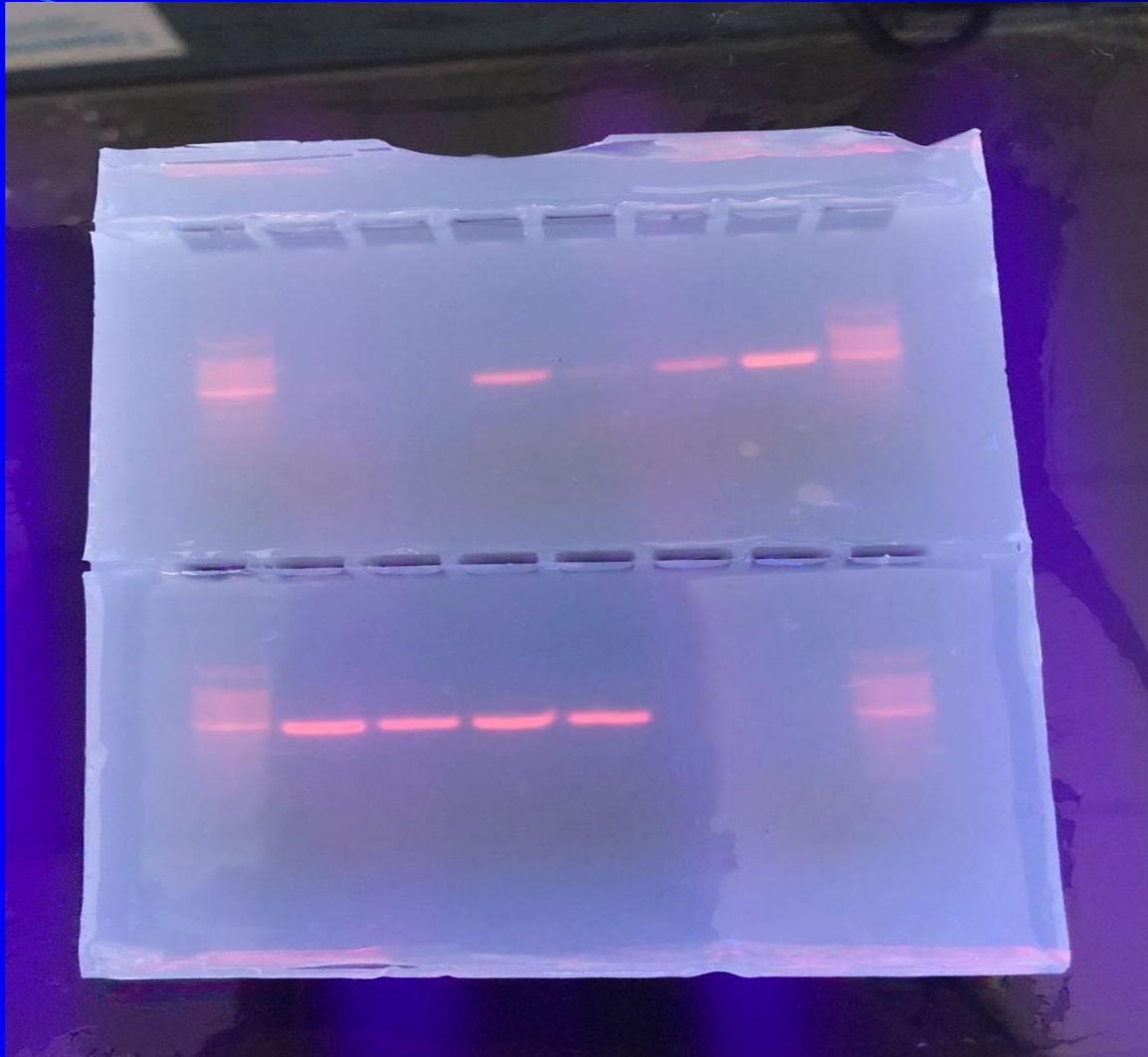
Analyze via electrophoresis



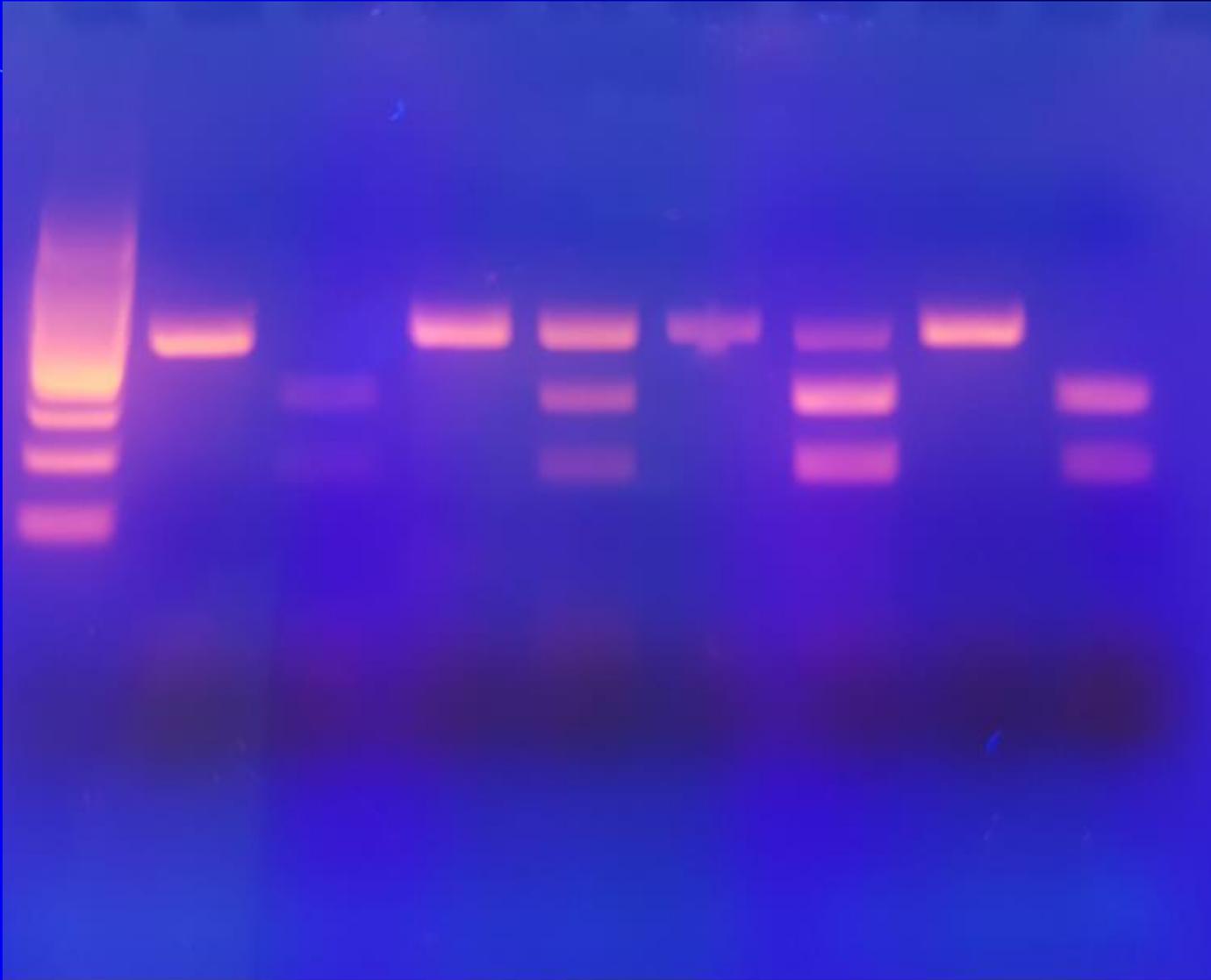
I- Principe de base de la technique PCR

PCR Classique

Analyse Post-PCR



I- Principe de base de la technique PCR
PCR Classique
Analyze via electrophoresis



I- Principe de base de la technique PCR

PCR Classique

Analyze via electrophoresis



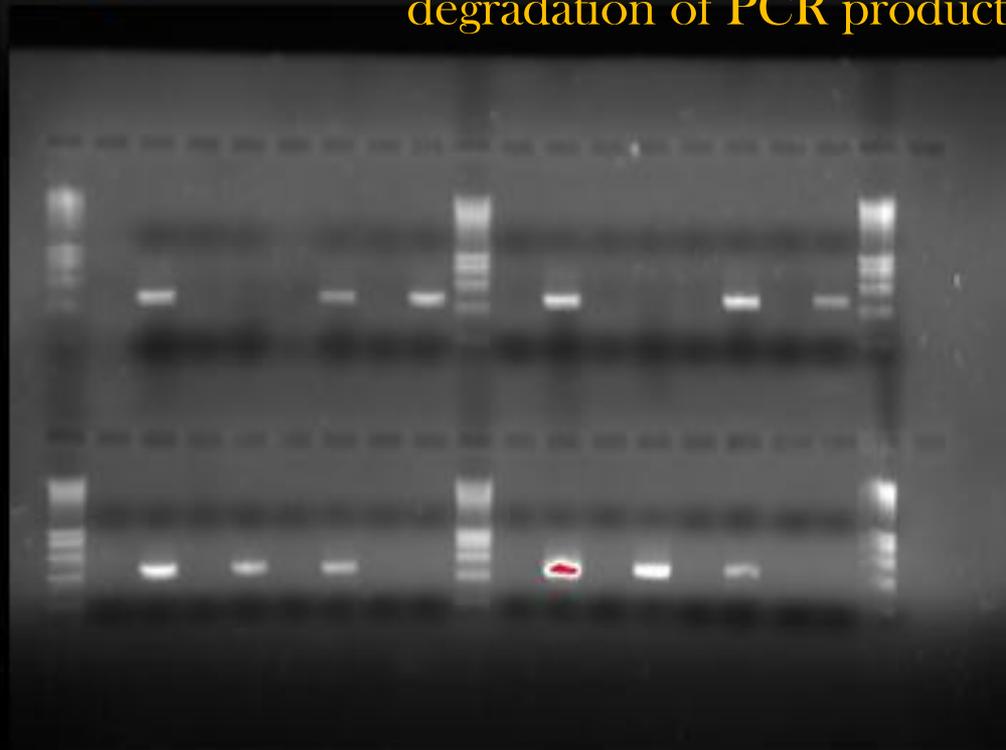
I- Principe de base de la technique PCR

PCR Classique

Analyze via electrophoresis

- Plateau
 - End-point analysis. The reaction has stopped and if left for long - degradation of PCR products.

RESULTS



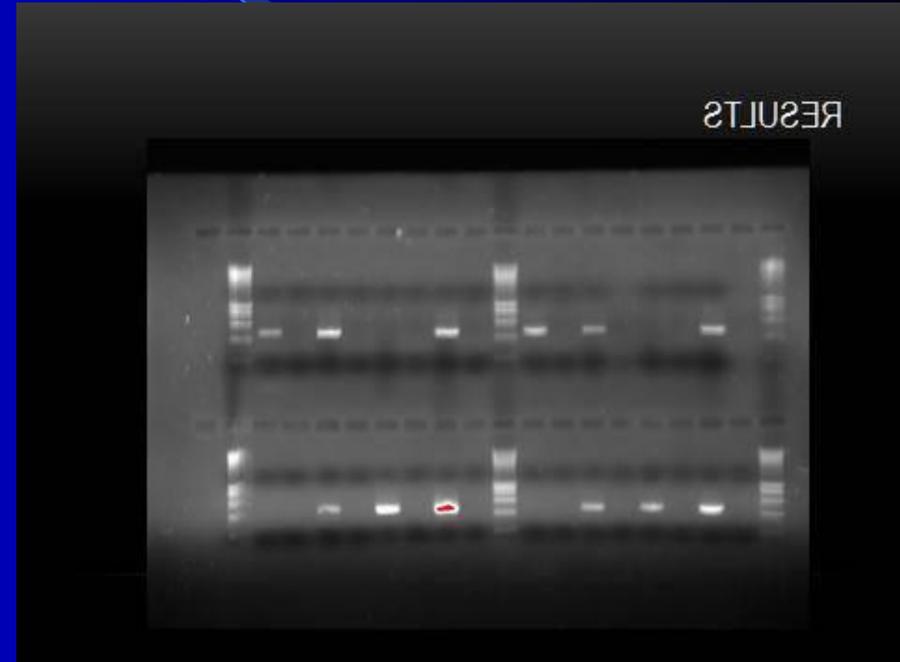
I- Principe de base de la technique PCR

PCR Classique

Analyse via electrophoresis

Phase plateau :

- Accumulation des produits PCR
- ...



L'efficacité de la PCR varie de PCR à PCR, de lots de tube, enzymes...

LA PCR CLASSIQUE

PAS QUANTITATIVE

II - Problèmes pratiques - optimisation

Les facteurs influençant la réussite de la PCR:

- Quantité et qualité de l'ADN
- Taille du fragment à amplifier
- Spécificité des amorces

II - Problèmes pratiques - optimisation

Paramètres critiques

1 - Choix des amorces

2 - La température d'hybridation des amorces +
La concentration en $MgCl_2$

3 - La nature de la polymérase

4- les différents temps du cycle PCR

1 - Choix des amorces

Deux **oligonucléotides synthétiques** simple brin correspondant à des séquences situées de part et d'autre du segment d'ADN cible à amplifier et sur des brins opposés.

- **Amorce sens/forward** = portion de séquence simple brin 5' → 3' (brin sens ou brin +)
- **Amorce antisens/reverse** = portion de séquence du simple brin inverse/complémentaire 3' → 5' (brin antisens ou brin -).

II - Problèmes pratiques - optimisation

1 - Choix des amorces

Taille des amorces : = ou > 18 nucléotides ;

Composition en nucléotides : > 50% en bases (G + C) ;

Température annealing : proche ou semblable pour les 2 amorces

= ou < de quelques degrés à la température de fusion de l'oligonucléotide :

Formule de Wallace:

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

II - Problèmes pratiques - optimisation

Primer Dimers

1 - Choix des amorces

- Pair of Primers

5'-ACGGATACGTTACGCTGAT-3'

5'-TCCAGATGTACCTTATCAG-3'

- Complementarity of primer 3' ends

5'-ACGGATACGTTACGCTGAT-3'

3'-GACTATTTCCATGTAGACCT-5'

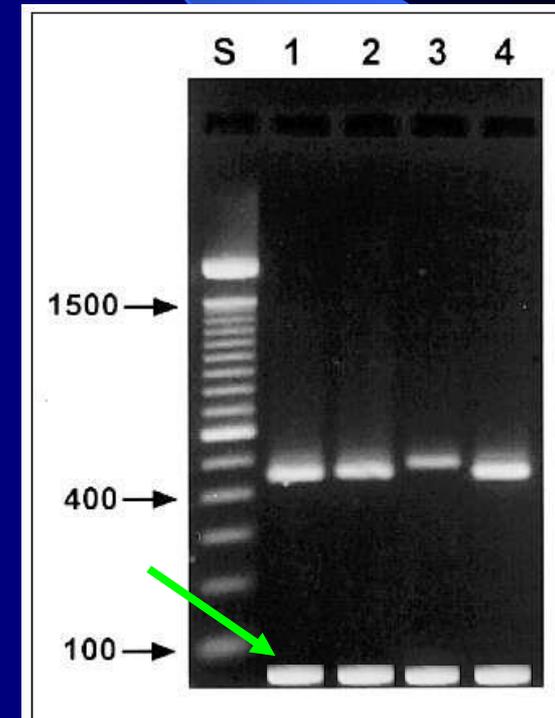
- Results in PCR product

Primer 1

5'-ACGGATACGTTACGCTGATAAGGTACATCTGGA-3'

3'-TGCCTATGCAATGCGACTATTCCATGTAGACCT-5'

Primer 2



II - Problèmes pratiques - optimisation

Primer Design (voir Bioinformatique)

1 - Choix des amorces

1. Typically **20 to 30 max (rare???)** bases in length
2. Annealing temperature dependent upon primer sequence (~ 50% GC content)
3. Avoid secondary structure, particularly 3'
4. Avoid primer complementarity (primer dimer)
5. The last 3 nucleotides at the 3' end is the substrate for DNA polymerase - G or C
6. Many good freeware programs available

II - Problèmes pratiques - optimisation

1 - Choix des amorces

Primer Design Software: bioinformatics

Many free programs available online

OLIGO, primer express

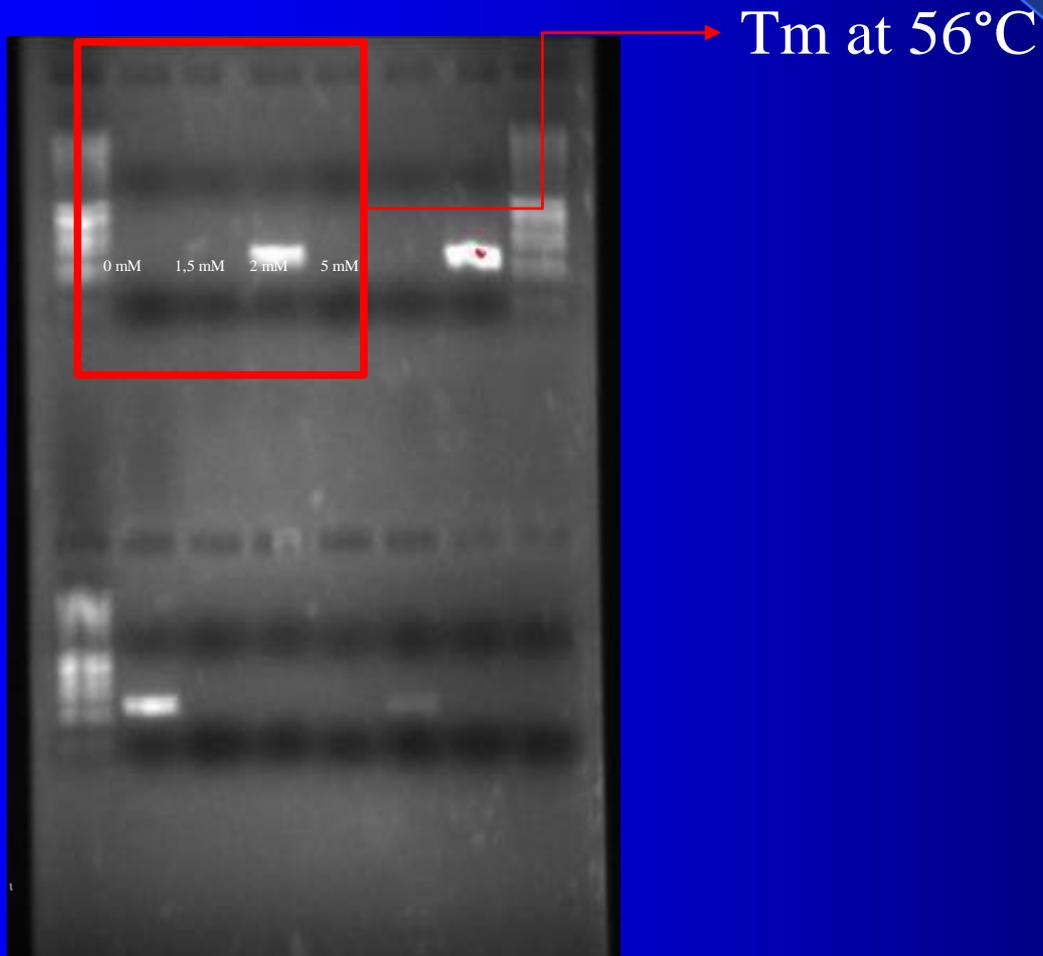
PRIMER 3

PrimerQuest... **BIOINFORMATIQUE**

II - Problèmes pratiques - optimisation

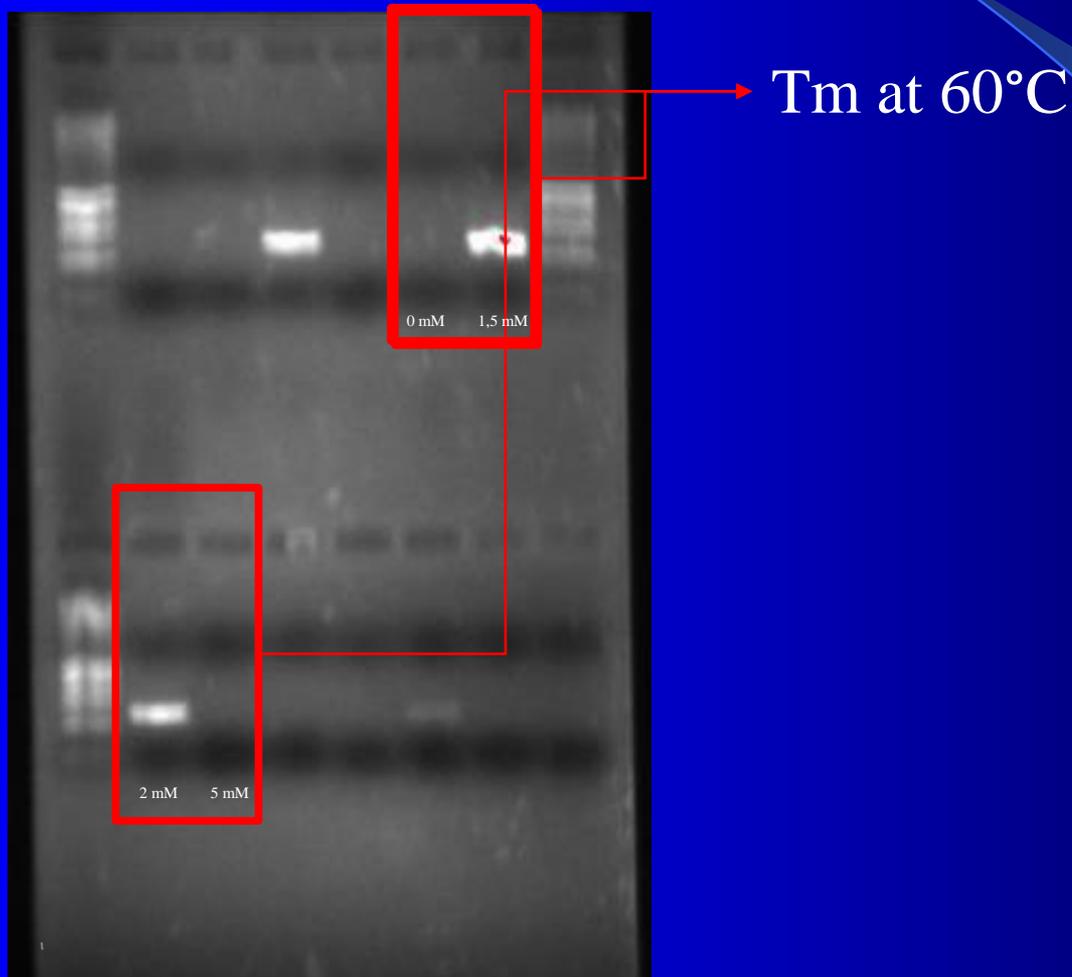
2 - La température d'hybridation des amorces

T_m théorique de 60°C



II - Problèmes pratiques - optimisation

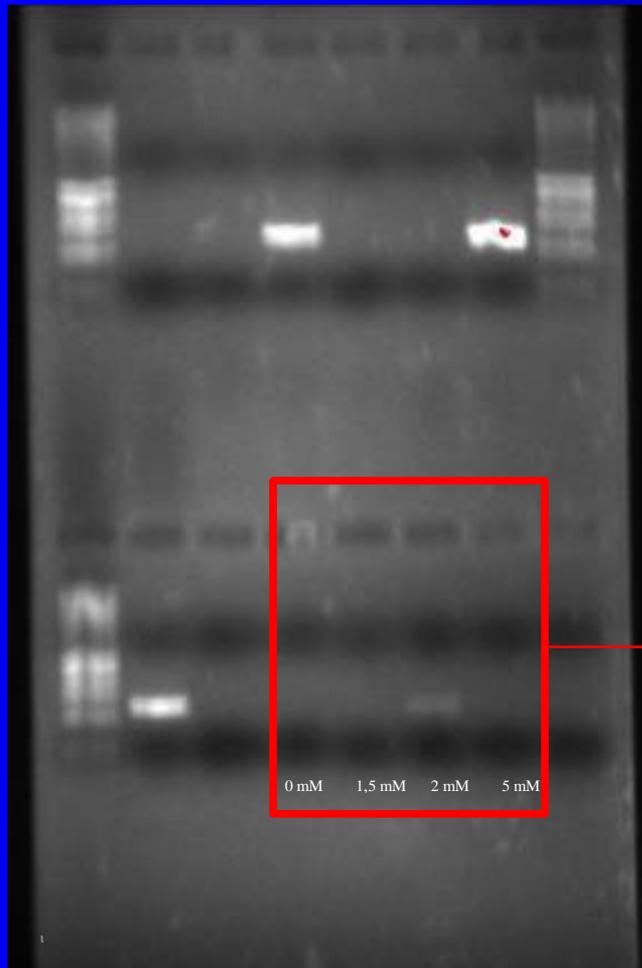
2 - La température d'hybridation des amorces T_m théorique de 60°C



II - Problèmes pratiques - optimisation

2 - La température d'hybridation des amorces

T_m théorique de 60°C



T_m at 64°C

II - Problèmes pratiques - optimisation

3 - La nature de la polymérase

- Robuste,
- Fidèle,
- Réplicative et donc processive,
- Rapide, **FAST -Hot start POL**
- Pas chère,
- Double activité (distributive donc réparation),
- ...

I- Principe de base de la technique PCR

3 - La nature de la polymérase

Taq est active à basse température

A basse température, amorçage est probable

Temp

Taux d'Extension

55° C

24 nt/sec

37° C

1.5 nt/sec

22° C

0.25 nt/sec

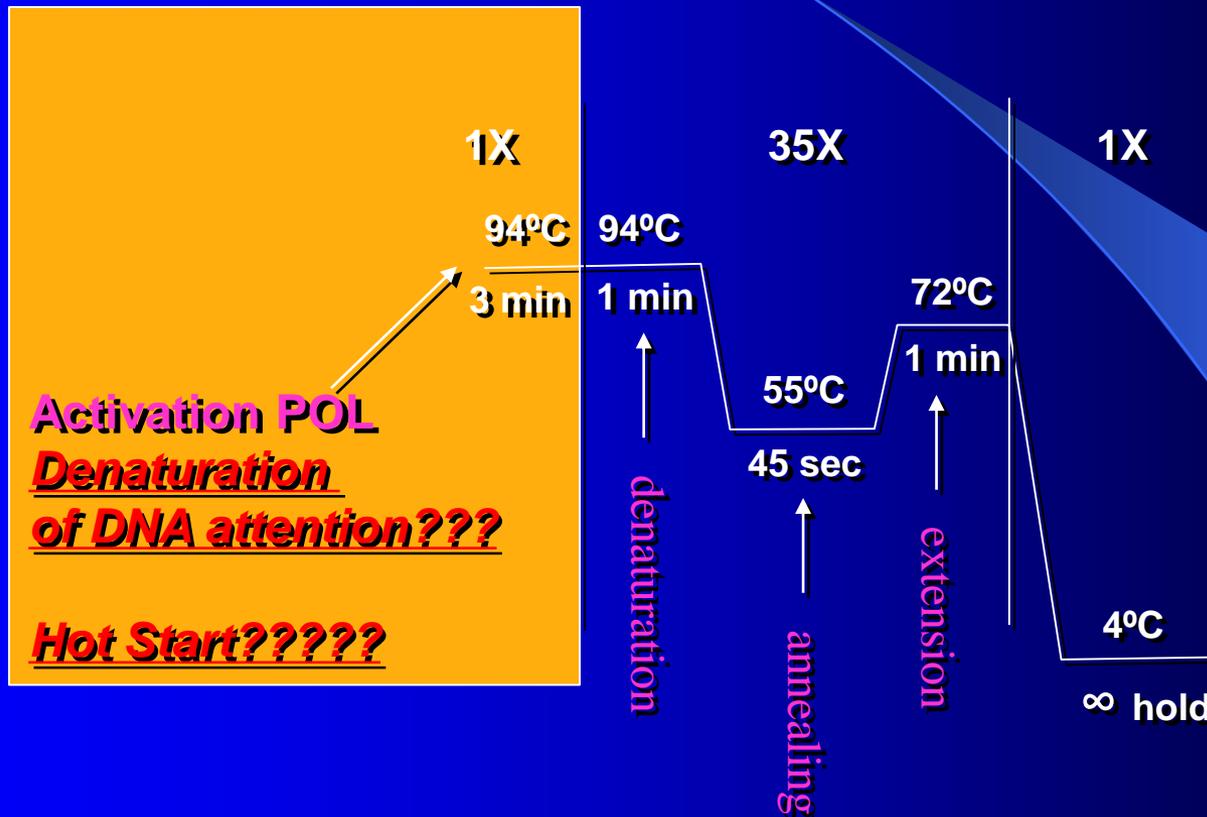


150 nucleotides /10 min

I- Principe de base de la technique PCR

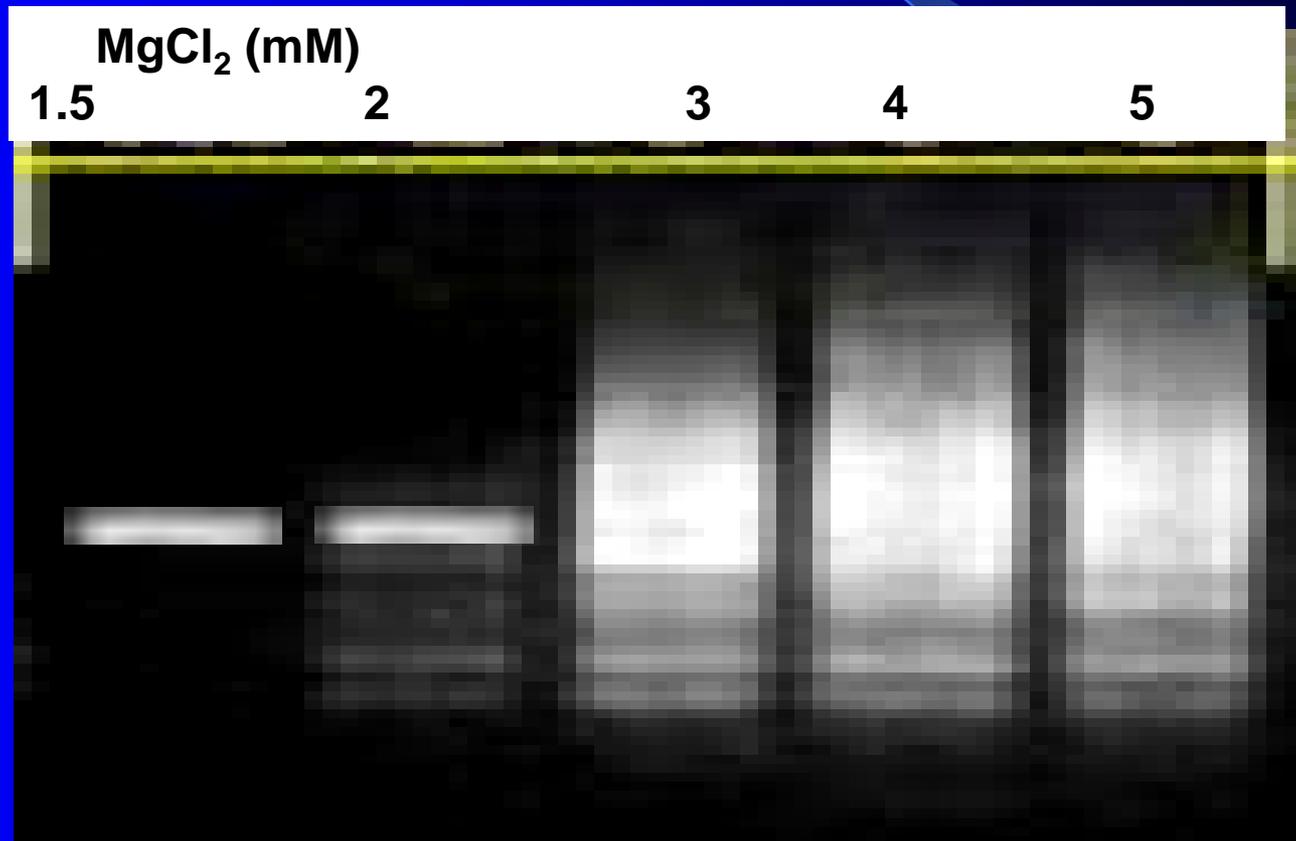
3 - La nature de la polymérase

A simple thermocycling protocol



II - Problèmes pratiques - optimisation

4 - La concentration en $MgCl_2$



II - Problèmes pratiques - optimisation

5- les différents temps du cycle PCR

Typical PCR Temperatures/Times

Initial denaturation???? Activation POL	90° – 95° C	1 – 3 min Option
Denature	90° – 95° C	0.5 – 1 min
Primer annealing	45° – 65° C	0.5 – 1 min
Primer extension	70° – 75° C	0.5 – 2 min



25 – 40 cycles

PCR: polymerase chain reaction- making many copies of cDNA

- View animation of PCR:
- best:
- <http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/shockwave/pcranwhole.html>
- OK:
- <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrani.html>
- <http://www.people.virginia.edu/%7erjh9u/pcranim.html>
- <http://www.abpschools.org.uk/resources/poster-series/pcr/pcranim.asp>
- PCR animation links
- http://www.dna.utah.edu/PCR_Animation_Links.htm

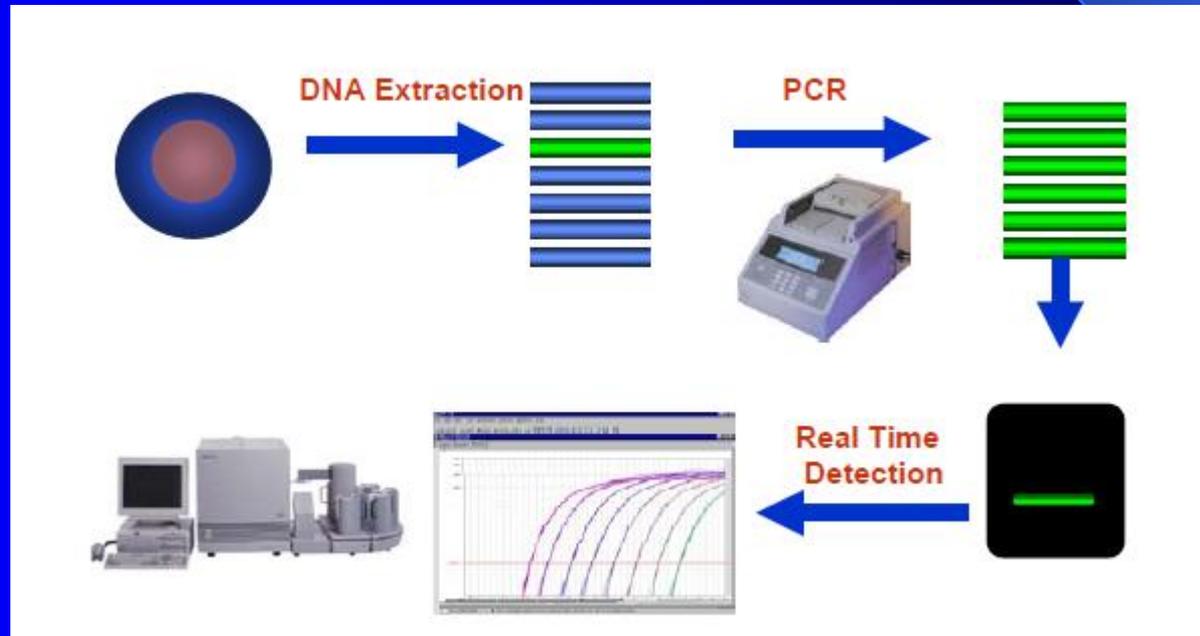
IV - Les évolutions de la PCR

- PCR quantitative

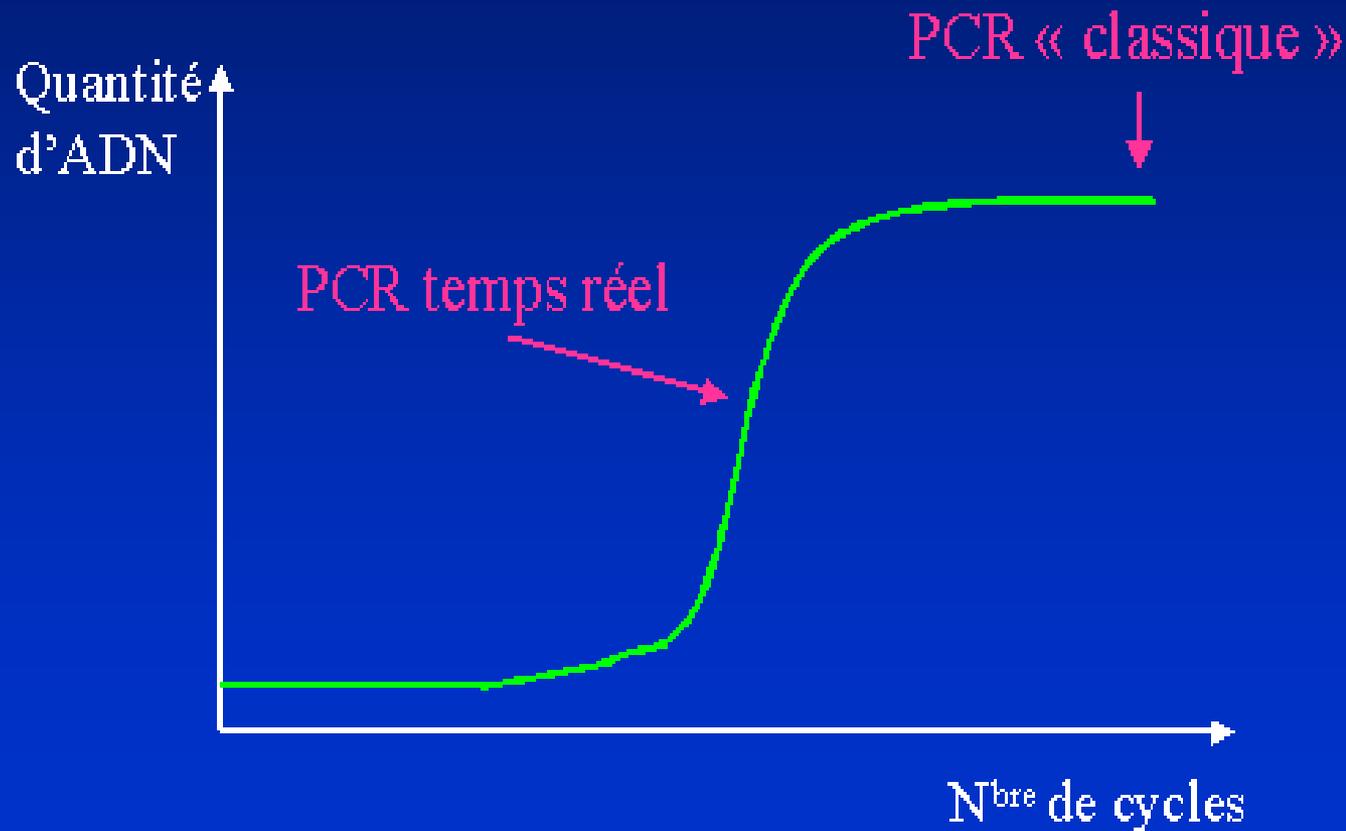
I- Principe de base de la technique PCR:

PCR en temps réel

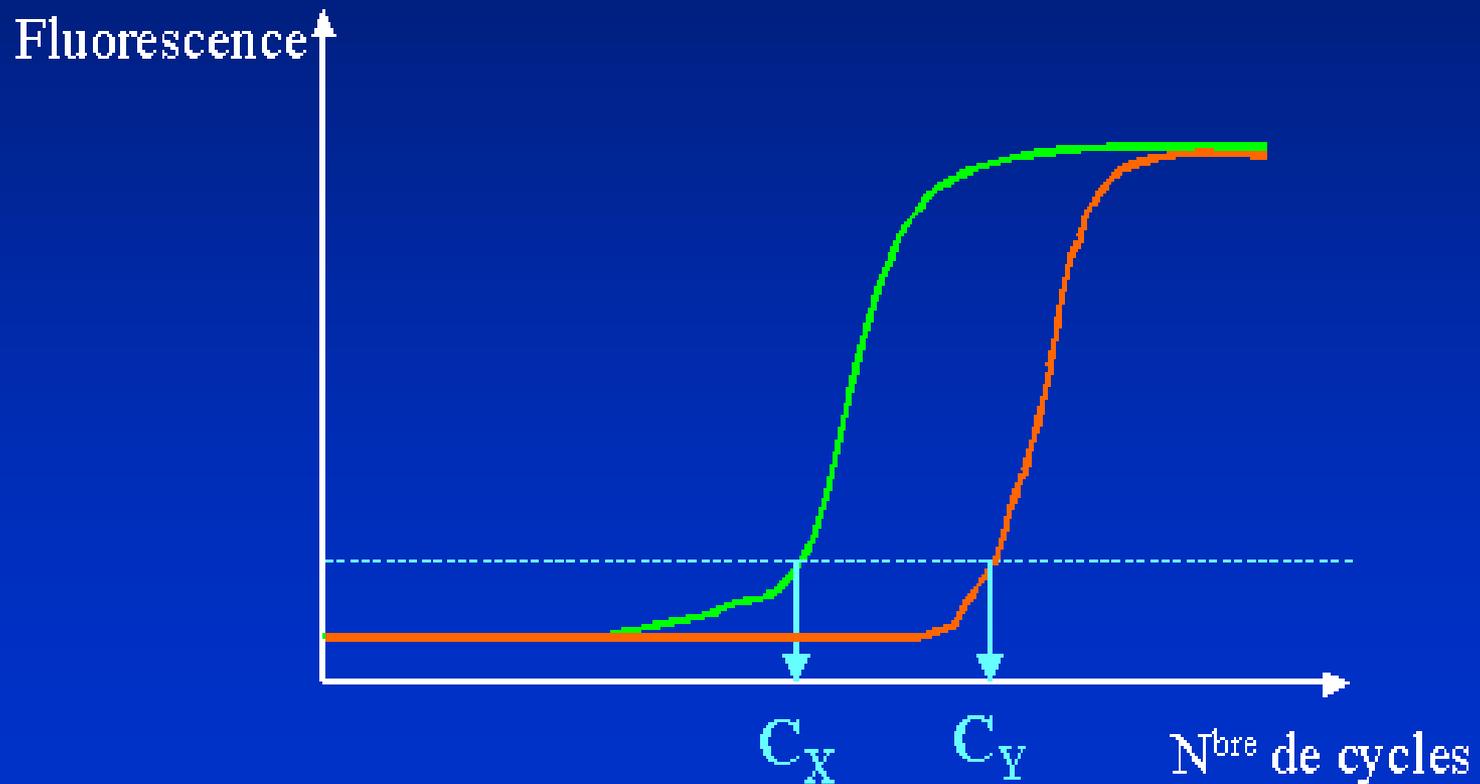
PCR quantitative ou PCR en temps réel



PCR « classique » versus PCR en temps réel



Monitoring de l'amplification



Detection vs real time PCR

Uses fluorescence as a reporter by Three general methods:

1. DNA-binding agents

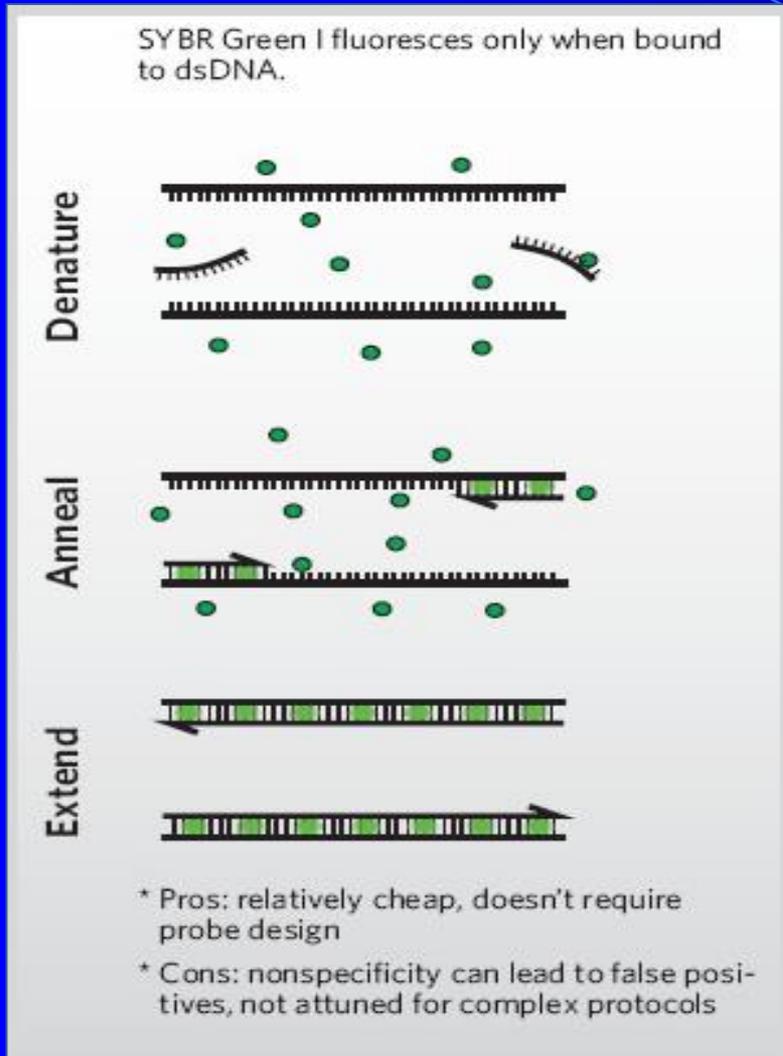
(SYBR Green) less accurate

2. Hydrolysis probes

(TaqMan... Voir Master)

SYBR[®] green

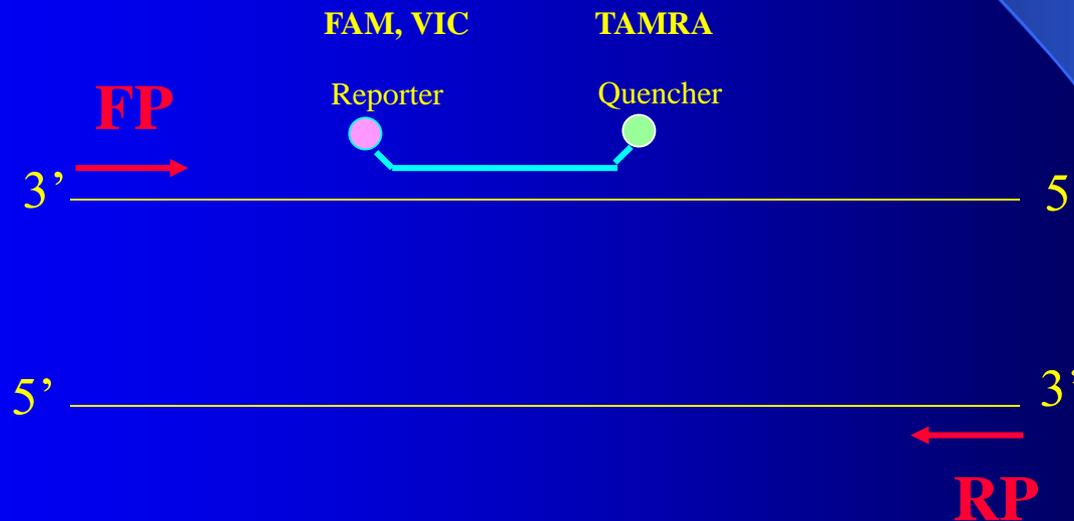
Le SybrGreen est un agent intercalant fluorescent en présence d'ADN double brin.



PCR quantitative avec une sonde TaqMan®

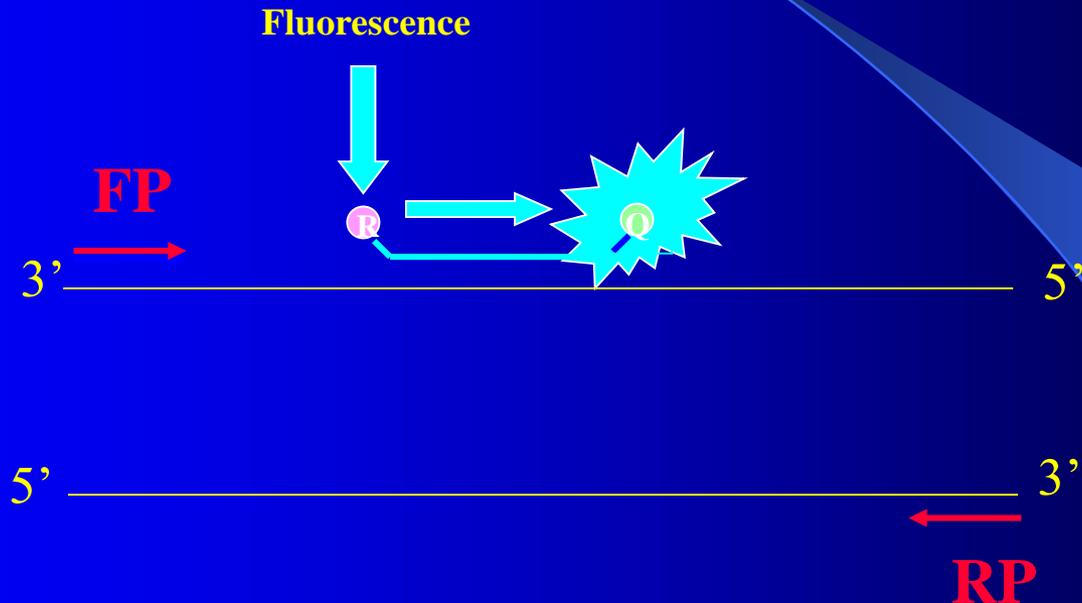
Cette méthode repose sur deux principes :

- la technologie FRET (fluorescence resonance energy transfer)
- l'activité 5'-exonucléase de la Taq Pol



- Spécificité l'amorce pour la PCR
- Spécificité de l'hybridation de la sonde TaqMan

Essais 5' nucléase avec la sonde TaqMan®



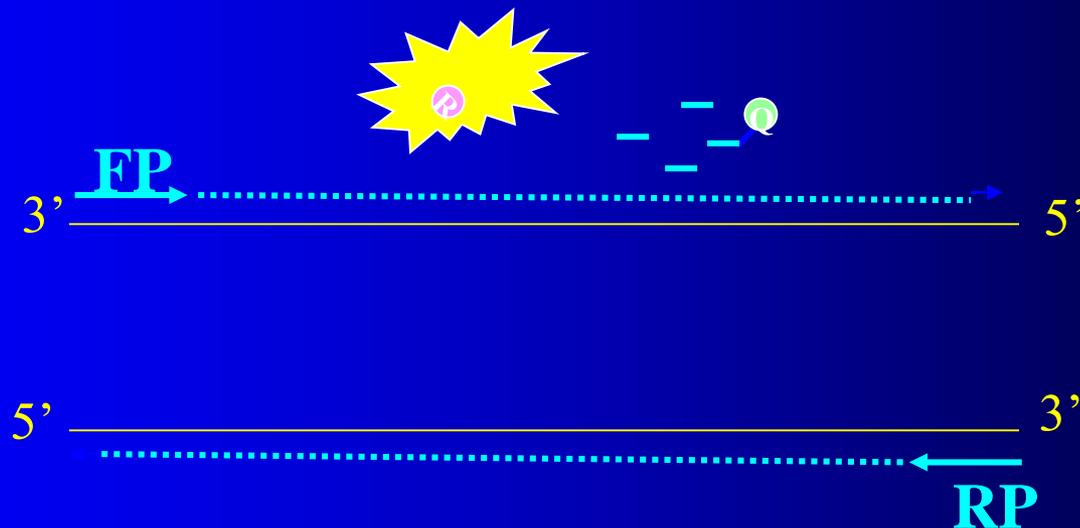
-FRET (fluorescence resonance energy transfer) depuis le reporteur (haute énergie) vers le quencher (faible énergie),

→ pas de signal fluorescent émis par le reporteur quand la sonde est intacte

Essais 5' nucléase avec la sonde TaqMan®



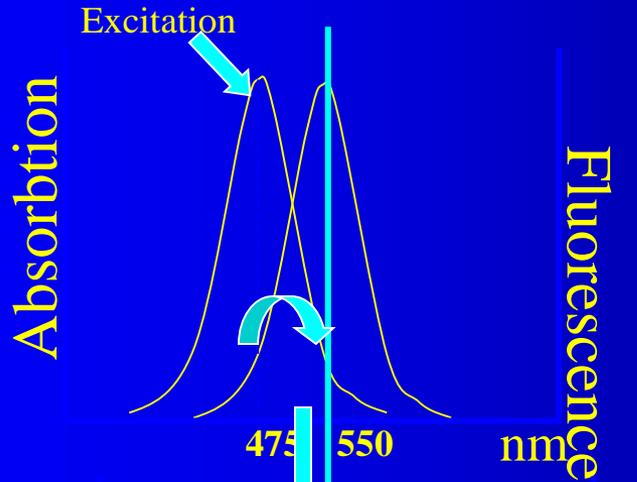
-au cours de l'élongation catalysée par la Taq Pol l'activité 5' nucléase déplace la sonde



-lorsque la polymérisation est complétée, pour chaque molécule d'ADN synthétisée un reporteur émet de la fluorescence.

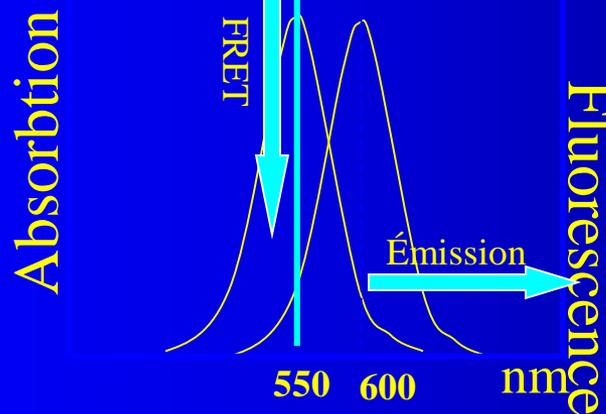
Mécanisme de quenching

FAM



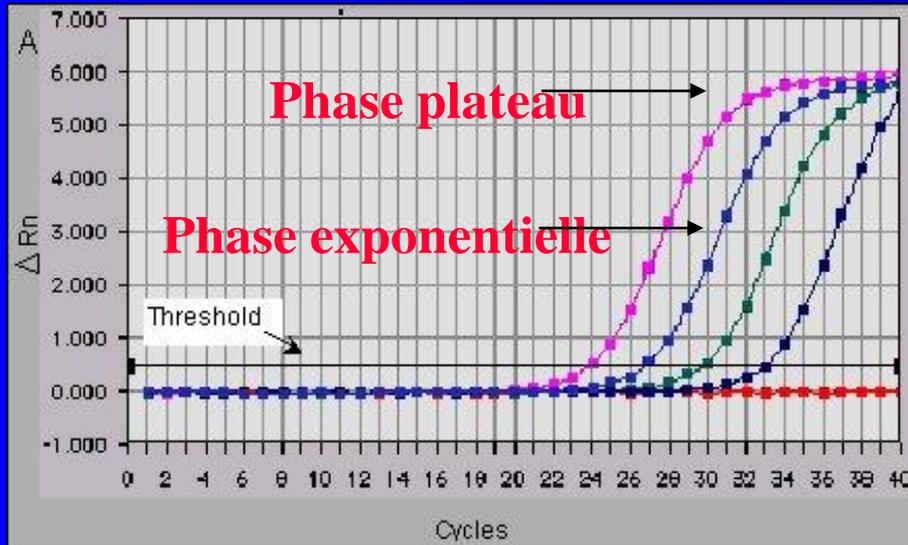
-Le spectre d'émission du Reporteur recouvre le spectre d'absorption du Quencher

TAMRA



-FRET

PCR conventionnelle *versus* PCR quantitative



PCR conventionnelle

- Analyse en point final sur gel d'agarose
- Analyse du produit final

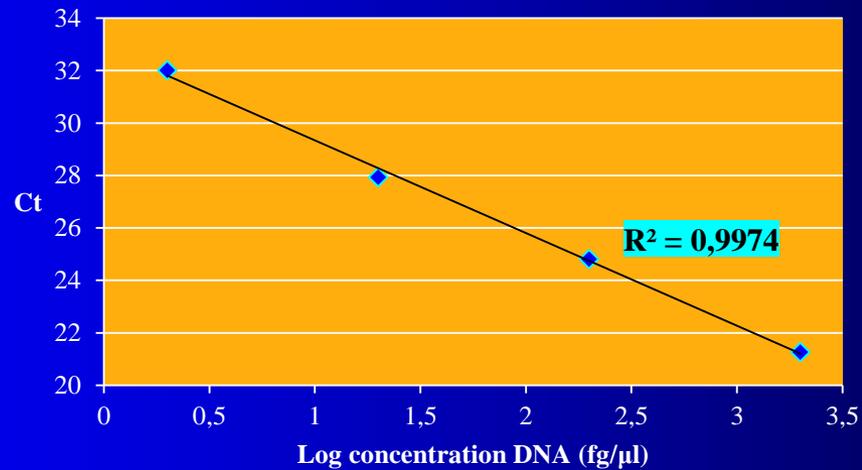
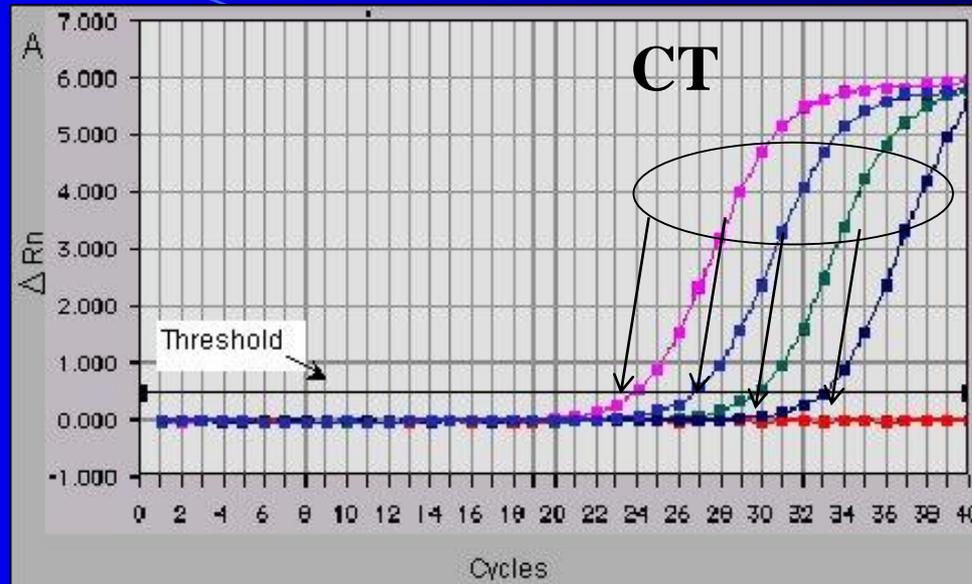
Analyse dynamique de la PCR quantitative

- haute précision pendant la phase exponentielle
- variabilité importante à la phase plateau

PCR taqman/PCR syber green:
MULTIPLEXE.....

Détermination du Ct (cycle seuil)

PCR Taqman
COVID 19



La valeur de Ct est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence

III - Avantages et inconvénients

- 1 Sensibilité
 - Faible quantité de matériel initial
 - Gain de temps / sérologie
- 2 Rapidité
 - Gain de temps / culture
- 3 Spécificité
 - Discrimination ++

! Contaminations

IV - Les évolutions de la PCR

1 - RT-PCR

2 - PCR quantitative

IV- RT- PCR : Reverse Transcriptase PCR

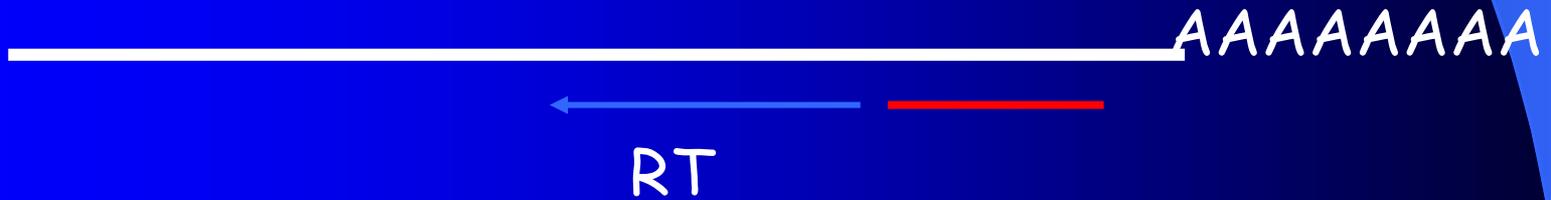
ARN : matrice d'amplification

- transformation d'ARNm en cDNA sous l'action d'une transcriptase reverse
- amplification du cDNA par PCR.

Différents types d'amorces :

- oligo dT qui s'hybrident sur la queue poly A des ARNm
Attention : seul les Eucaryotes.
- amorce spécifique de l'ARNm à étudier
Eucaryotes et procaryotes;

IV- RT- PCR : Reverse Transcriptase PCR



Summary of RT PCR

- RT-PCR animation
- http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/RTPCR/RT_PCR.html



جامعة مولاي إسماعيل
UNIVERSITÉ MOULAY ISMAÏL



كلية العلوم والتقنيات
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

S6: biologie moléculaire

Chapitre 8: Partie technique (2)

Génie génétique I: Nomenclatures et définitions

Manipulation des fragments d'ADN

1- Isolement de fragments d'ADN

- Cisaillement mécanique: cette technique réalise des coupures au hasard

Sonication: ce sont des ultra-sons qui cassent l'ADN

Warring blendor: un mixer donne des fragments de plus en plus courts en fonction de la longueur du traitement

Vortex: ce sont les vibrations qui agissent pour briser l'ADN

- Les enzymes de Restriction: ce sont de puissants outils utilisés en génie génétique. Elles reconnaissent toutes des séquences d'ADN bien particulières qu'elles clivent. **Souvent la séquence reconnue par l'enzyme est palindromique c'est-à-dire symétrique.**

Palindrôme

Digestion par une enzyme de restriction

1. Reconnaissance d'une séquence spécifique (palindrome – enzyme = homodimère)
2. Coupure bicaténaire



Site de restriction de l'enzyme *Eco* RI

Définitions

Le génie génétique:

Il s'agit de l'ensemble des outils et des techniques de biologie Moléculaire permettant, de manière contrôlée:

- l'étude des modifications du génome
- leur isolement
- leur clonage
- leur séquençage
- leur découpage

Dans un but de recherche *fondamentale ou appliquée.*

Manipulation des fragments d'ADN

Les enzymes de Restriction: Applications

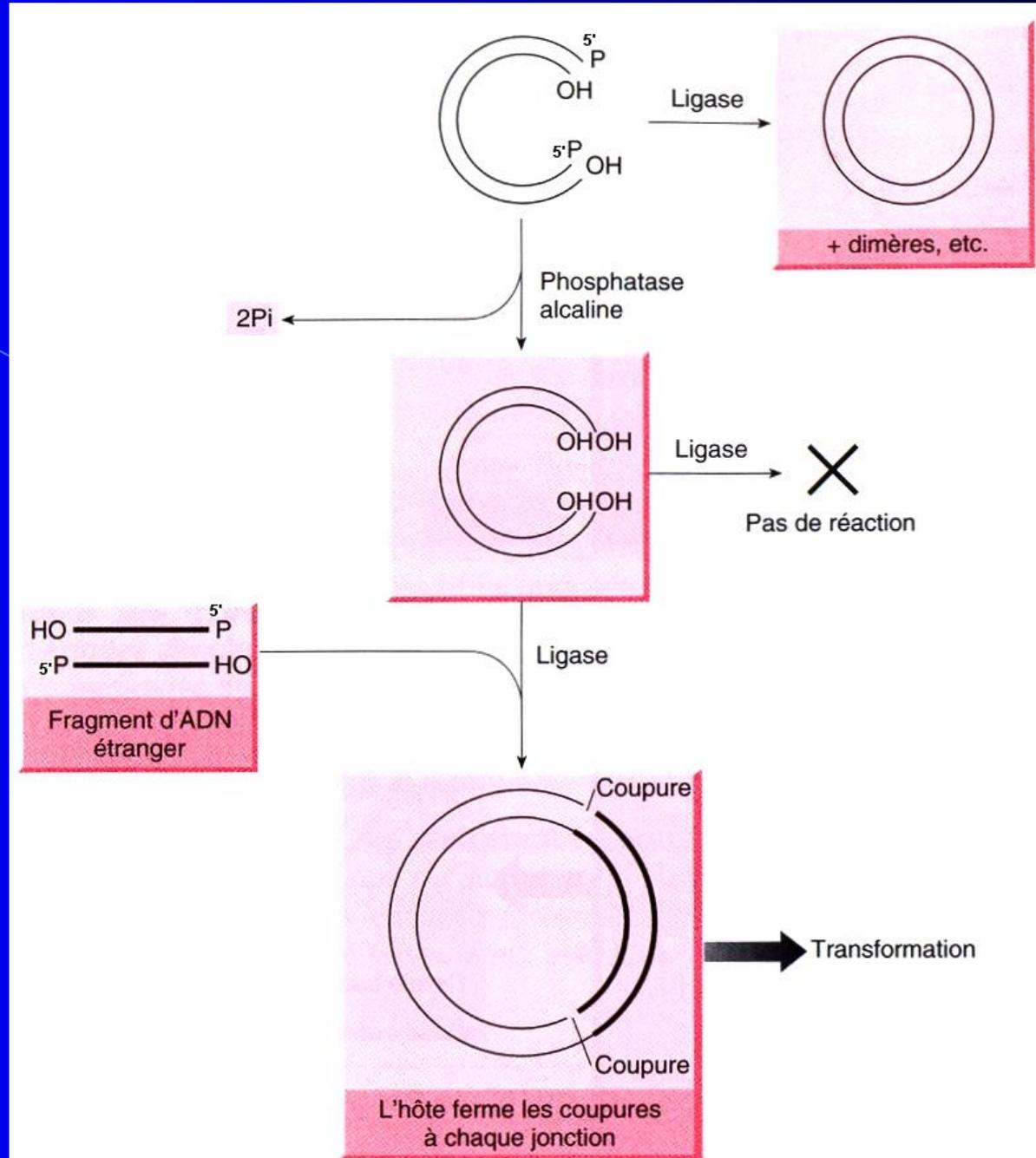
- **Cartes de restriction**: c'est une succession linéaire de sites sur l'ADN, clivées par différentes enzymes de restriction.
- **RFLP**: Se sont des variations dans les cartes de restriction résultant de mutations qui altèrent les sites de restriction.
- **Analyse de la méthylation de l'ADN eucaryote ou parocaryote**: l'ADN est naturellement méthylé au niveau A (pro) et c (Eu), par ex:
 - Hpa II coupe seulement si son site CCGG n'est pas méthylé au niveau du 2^{ème} C
 - Hpa I coupe le même site à condition que le 2^{ème} C soit méthylé. Cette enzyme est donc utilisée pour identifier les sites de MET d'ADN.

Manipulation des fragments d'ADN

2- Modification de fragments d'ADN

- Modifications enzymatiques: les enzymes qui modifient l'ADN sont:
 - ADN pol d'E. Coli: polymérase $5' \longrightarrow 3'$
Exonucléase $3' \longrightarrow 5'$ et Exonucléase $5' \longrightarrow 3'$
 - Reverse transcriptase: polymérase qui peut copier les ARN
 - Poly-A polymérase: ajoute des queues polyA à l'extrémité $3'$
 - Phosphatase alcaline: enlève des phosphates en $5'$ et permet d'éviter la recircularisation d'un vecteur de clonage linéarisé par une enzyme de restriction.
 - ADN ligase: répare les coupures simples brins en formant une liaison phosphodiester entre $5'P$ et $3OH$.

Ligation de l'ADN hétérologue et du plasmide



Manipulation des fragments d'ADN

3- Vecteurs pour le clonage dans E. coli

- Vecteurs primaires:

- **Les plasmides:** il s'agit d'un ADN circulaire double brin indépendant du génome. Il code souvent pour une fonction qui apporte un plus à la bactérie (résistance aux antibiotiques).

- **La conjugaison:** ce phénomène désigne le transfert biologique du DNA d'une cellule à une autre. On peut diviser les plasmides en deux groupes

Plasmides conjuguants (Plasmide F ou épisome):

Plasmides non conjuguants: **En biosécurité**, on préfère travailler avec ces plasmides.

Manipulation des fragments d'ADN

3- Vecteurs pour le clonage dans E. coli

- Vecteurs primaires:

-Les plasmides possèdent deux moyens de contrôle du nombre de copies:

Le contrôle *stringent*: la réplication du plasmide est liée à la réplication du génome, UN PLASMIDE PAR CELLULE

Le contrôle *relaxe*: la réplication du plasmide est indépendante de celle du génome, ces plasmides sont souvent de petite taille, PLUSIEURS PLASMIDES PAR CELLULE

Manipulation des fragments d'ADN

3- Vecteurs pour le clonage dans E. coli

- Vecteurs primaires:

-Caractéristiques des plasmides utilisés en génie génétique:

1- origine pour les bactéries

2- un ou plusieurs marqueurs de sélection

3- le plus possible de sites de restriction uniques dans les marqueurs

4- Biosafe

5- PM aussi grand possible que possible

6- contrôle relaxe

Manipulation des fragments d'ADN

3- Vecteurs pour le clonage dans *E. coli*

- Vecteurs primaires:

Exemples de vecteurs de clonage:

1- PBR322 (4363, Tet) dérive de trois plasmides naturels:

- Plasmide R1: résistance à l'ampicilline
- Plasmide pMB1: Origine de réplication
- Plasmide pSC101: résistance à la tétracycline

Il y'a 15 copies par cellule.

2- Dérivés de pBR322:

- pBR 327= pBR 322 mais avec un fragment de 1000 pb en moins

3- pBR329= pBR322 avec en plus le gène de résistance au chloramphenicol

Manipulation des fragments d'ADN

3- Vecteurs pour le clonage dans *E. coli*

- Vecteurs primaires:

Exemples de vecteurs de clonage:

4- les PUC: ils conservent le gène *amp^R* permettant une sélection par colorimétrie utilisant le gène *lacZ* (B-galactosidase). L'insertion d'un ADN étranger dans ce gène empêche la synthèse de l'enzyme.

Stabilité des plasmides:

- Pression de sélection par un antibiotique
- Taille 0,1 à 10 kb

Manipulation des fragments d'ADN

3- Vecteurs pour le clonage dans E. coli

- Les bactériophages:

Les phages : M13 et ses dérivés:

Le génome est simple brin avec une taille de 6400 nucléotides (c'est petit)

Il se cultive uniquement sur des souches E. coli F+ car le pili sert de récepteur pour les virus. Les bactéries infectées par le M13 résistent à l'infection.

La bactérie produit plusieurs milliers de phages par heure (1000 phages par cellule).

Taille: 9 à 20kb

Manipulation des fragments d'ADN

3- Vecteurs pour le clonage dans E. coli

-Les vecteurs Hybrides:

Ces vecteurs sont synthétisés aux laboratoire dans le cadre du génie génétique.

-Les cosmides:

Le cosmide est un hybride entre un plasmide et un phage. Il possède:

- 1- Un ou plusieurs gènes de Res à un antibiotique
- 2- Une origine de réplication de plasmide
- 3- Un ou plusieurs sites de restriction
- 4- Taille environ 35-50 kb.

Manipulation des fragments d'ADN

3- Vecteurs pour le clonage dans *E. coli*

-Les vecteurs Hybrides:

Ces vecteurs sont synthétisés aux laboratoires dans le cadre du génie génétique.

-Les phagemides:

Le phagémide est un hybride entre un plasmide et un phage filamentueux M13. Il possède:
Taille environ 35-50 kb.

Gene Cloning and Vectors

Taille du gène à insérer est dépendante du vecteur

Types of Cloning Vectors:

- **Plasmid** - an extrachromosomal circular DNA molecule that autonomously replicates inside the bacterial cell; cloning limit: 100 to 10,000 base pairs or 0.1-1 kilobases (kb)
- **Phage** - derivatives of bacteriophage lambda; linear DNA molecules, whose region can be replaced with foreign DNA without disrupting its life cycle; cloning limit: 8-20 kb
- **Cosmids** - an extrachromosomal circular DNA molecule that combines features of plasmids and phage; cloning limit - 35-50 kb
- **Bacterial Artificial Chromosomes (BAC)** - based on bacterial mini-F plasmids. cloning limit: 75-300 kb
- **Yeast Artificial Chromosomes (YAC)** - an artificial chromosome that contains telomeres, origin of replication, a yeast centromere, and a selectable marker for identification in yeast cells; cloning limit: 100-1000 kb