

Réalisation d'une PCR (ou APC) et analyses des fragments amplifiés PCR sur clones bactériens

Une banque de clones a été réalisée à partir d'ADNc dans le vecteur pGEM possédant les amorces universelles SP6 et T7.

Les inserts vont être amplifiés grâce à ces amorces universelles, leur taille déterminée et une hydrolyse par l'enzyme de restriction EcoR1 effectuée.

Une étude de deux paramètres de la réaction sera menée conjointement. Il s'agit de :

- la température d'hybridation des amorces,
- de la concentration en chlorure de magnésium.

1. Première séance : L'amplification de l'insert par PCR et analyse bio-informatique

Matériel et solutions

Tubes Eppendorf : 1,5 ml et 0,2 ml pour amplification.

Eau stérile qualité PCR

Couple d'amorces SP6 et T7

Taq polymérase 5U/ μ L

Tampon Taq 10x

MgCl₂ 25mM

dNTPs 5mM

Lyse bactérienne

Sur une culture de la nuit en milieu LB + ampicilline à 50 μ g/ml :

prélever 80 μ L

ajouter 20 μ L d'eau stérile

placer 8 min à 95°C (bain sec) puis 10 min à 4°C.

Amplification

	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité par tube
Lysat bactérien		2 μ L par tube	
Amorce T7	10pmol/ μ L	20pmol/tube	
Amorce SP6	10pmol/ μ L	20pmol/tube	
Tampon Taq	10X	1X	
dNTP	5mM	200 μ M	
MgCl ₂	25mM	1mM à 5mM par tube	
TAQpol.	2,5U/ μ L	1 U/tube	
Eau		Qsp 25 μ L	

Préparer un Mix pour 7 tubes contenant les amorces, le tampon, les dNTP et l'eau qsp 25 μ L.

Paramètres étudiés

- température d'hybridation des amorces : se référer aux propositions du thermocycleur.

Gradient de 45°C à 60°C

- concentration en chlorure de magnésium : 1 - 1,5 - 2 - 3,5 - 5 mM

Programme d'amplification

Dénaturation	10min – 94°C	1 cycle
Amplification	30sec - 95°C	
	30sec G < 45°C - 60°C >	30 cycles
	120sec – 72°C	
Terminaison	2min – 72°C	1 cycle

Conservation des échantillons

Les différents tubes microfuges sont congelés à -20°C jusqu'à la séance suivant.
Veiller à une parfaite identification des divers échantillons obtenus.

2. Deuxième séance : L'analyse des produits de PCR.

Matériel pour électrophorèse

Agarose
TBE 0,5x
Tampon de charge 10x
Marqueur de poids moléculaire
Enzyme EcoR1 et tampon adapté

Révélation

Révéler l'amplification par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% + BET.
Déposer 5µL de produit PCR pour chaque échantillon + 1µL de bleu de charge.
Prévoir le marqueur de taille.

Traitement des amplifiats

Précipitation à l'éthanol des amplifiats

- prélever 20µL du milieu d'amplification choisi en fonction des résultats de l'électrophorèse
- ajouter 1/10 du volume d'acétate de sodium 3M pH = 5
- 3 volumes d'éthanol absolu
- homogénéiser le mélange en renversant une dizaine de fois le tube
- centrifuger 20min à 10 000rpm
- éliminer le surnageant et sécher le culot 15min sous vide
- reprendre le culot par 10µL d'eau

Hydrolyse par enzyme de restriction

Dans un tube Eppendorf introduire :

- 10µL du mélange d'amplifiat purifié, ajouter:
- 2U d'enzyme de restriction EcoR1
- 2µL de tampon de digestion 10X
- eau qsp 20µL incubé 1 heure à 37°C.

Les digestions sont arrêtées par addition de 1/10 du volume de "bleu" 10X.

Electrophorèse

Révéler le résultat de l'hydrolyse sur gel d'agarose à 1% contenant du BET.

Déposer 10µL de produit de digestion pour chaque échantillon + 2µL de bleu de charge.
Migration 1H30 à 120 volts.

Photographie des résultats et analyses.

Analyse des produits de PCR

Conditions d'électrophorèse :

- Gel à 1% d'agarose + BET en tampon TBE
- Migration 75 min à 120 volts
- Marqueur Gène Ruler 1 kb DMA Ladder (Fermentas).

Conditions de PCR: Tm = 45,9°C

Puits 1: MgCl₂ 1mM ; puits 2: MgCl₂ 1,5mM ; puits 3: MgCl₂ 2mM ; puits 4: 3,5 mM MgCl₂ ; puits 5: MgCl₂ 5 mM ; puits M: Marqueur ; puits T: MgCl₂ 0 mM.

Compte rendu des deux séances sur la PCR

- Rappeler la composition des différents tubes réalisés lors de la préparation en binôme de la PCR et la température d'hybridation réalisée.
- A l'aide du marqueur moléculaire, déterminer la taille de l'insert amplifié. Prendre pour référence la bande du puits 4.
- Analyser l'effet de la concentration en MgCl₂ sur l'efficacité de la PCR. Commenter les résultats et justifier.

