

Génétique

Kit PCR

Réf :117 235

Français – p 1

Version : 3201

***Kit PCR Détection bactériophage T4
(20 amplifications PCR)***

1. Amplification par PCR

1.1 Principe générale d'une réaction PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

L'ADN est synthétisé dans la nature grâce à un type d'enzyme appelé ADN polymérase. Pour fonctionner, cet enzyme a besoin d'une matrice d'ADN simple brin à répliquer, d'une amorce ADN complémentaire à l'ADN à répliquer et de désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). La découverte d'organismes thermophiles a permis de trouver des ADN polymérases ayant deux caractéristiques essentielles à savoir une température de fonctionnement élevée (typiquement vers 72°C) et surtout la capacité à ne pas être dénaturées définitivement par des températures supérieures à 90°C. Ces caractéristiques ont permis d'inventer la réaction PCR ou réaction de polymérisation en chaîne qui consiste à synthétiser *in vitro* de l'ADN de façon exponentielle.

La première étape de cette réaction (Figure 1) consiste en la dénaturation de l'ADN double brin qui sert de matrice. Pour ce faire, la solution d'ADN est chauffée à une température proche de l'ébullition ce qui permet de séparer les deux brins d'ADN par fusion thermique. La seconde étape consiste à appairer, de part et d'autre de la zone à amplifier, des amorces d'ADN simple brin synthétique. Cette opération est simplement réalisée en abaissant suffisamment la température pour que cet appariement puisse être stable. La troisième et dernière étape consiste à se placer à la température optimale pour la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase (typiquement 72°C) pendant le temps nécessaire pour que cette dernière ait le temps de synthétiser la longueur d'ADN souhaitée.

Figure 1

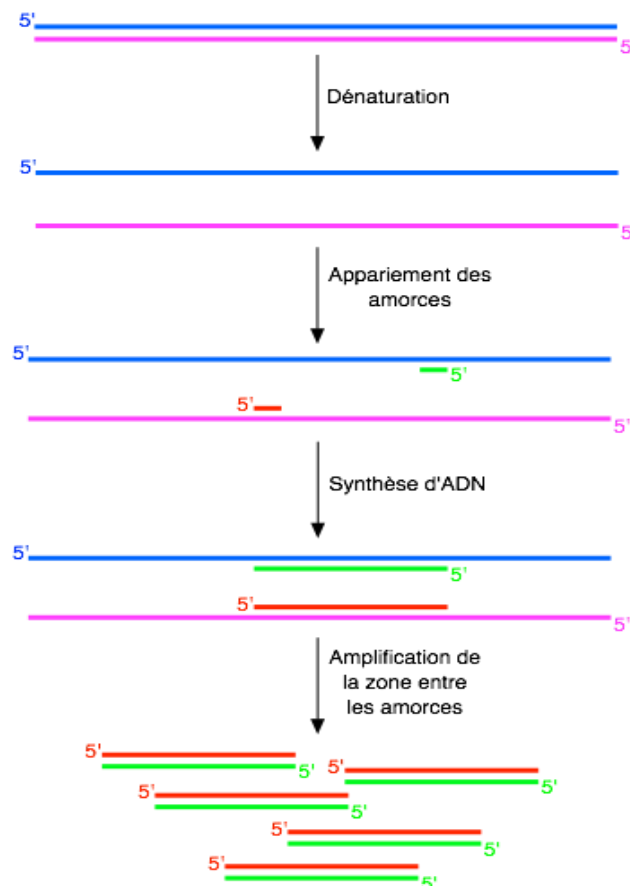
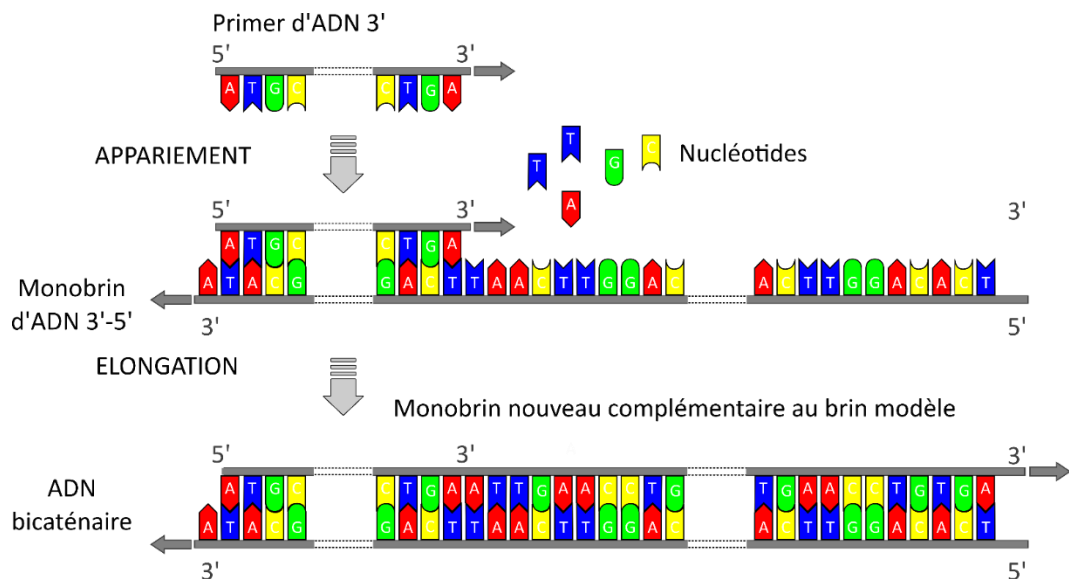
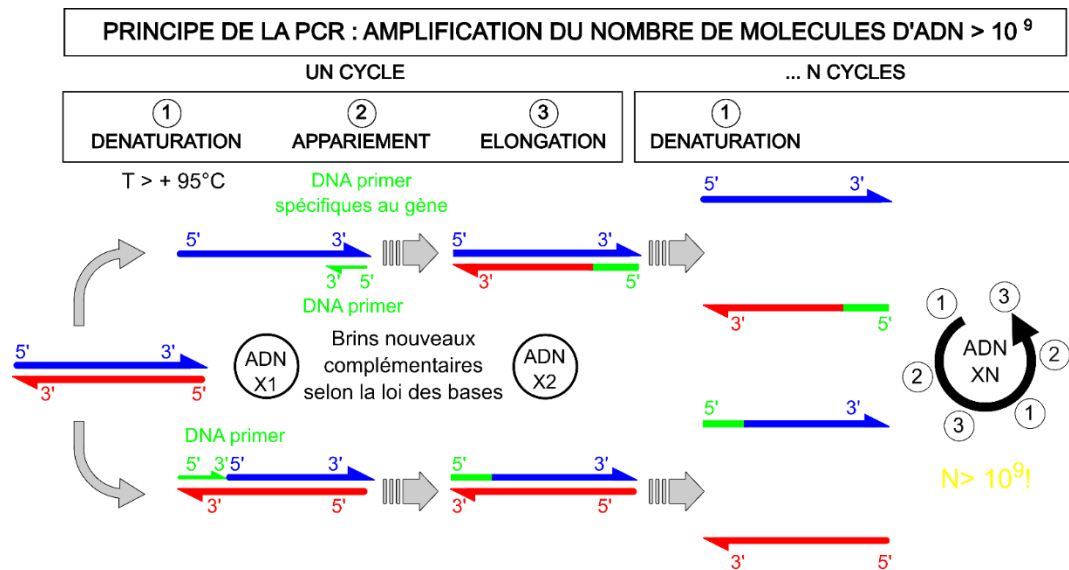


Figure 2

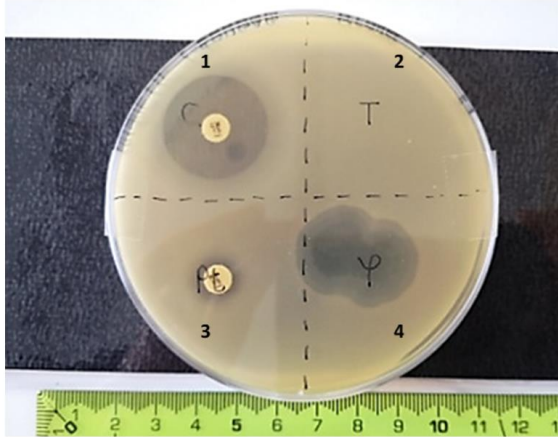


Primer = amorces

2. Les bactériophages

Les bactériophages sont des virus de bactéries et, avec les virus de plantes, ce sont les seuls virus que l'on peut **manipuler en classe en toute sécurité**.

2.1 Historique



C'est en observant des « plages claires » au sein d'une culture de bactéries sur gélose en 1917 que le franco-canadien Félix D'Hérelle (figure 3) a formulé l'hypothèse d'une part que ces plages claires correspondaient à une lyse bactérienne et d'autre part que cette lyse pouvait être provoquée par un agent inconnu qu'il nomme "bactériophage", littéralement "le mangeur de bactéries". D'Hérelle isole en quelques mois des bactériophages actifs contre plusieurs espèces bactériennes. Dès 1918, il imagine un usage thérapeutique du bactériophage qu'il concrétise en 1919 par le traitement (avec succès) d'enfants victimes de dysenterie bacillaire hospitalisés à l'hôpital Necker de Paris. La phagothérapie est née.

Résultat de la culture d'*E. coli*

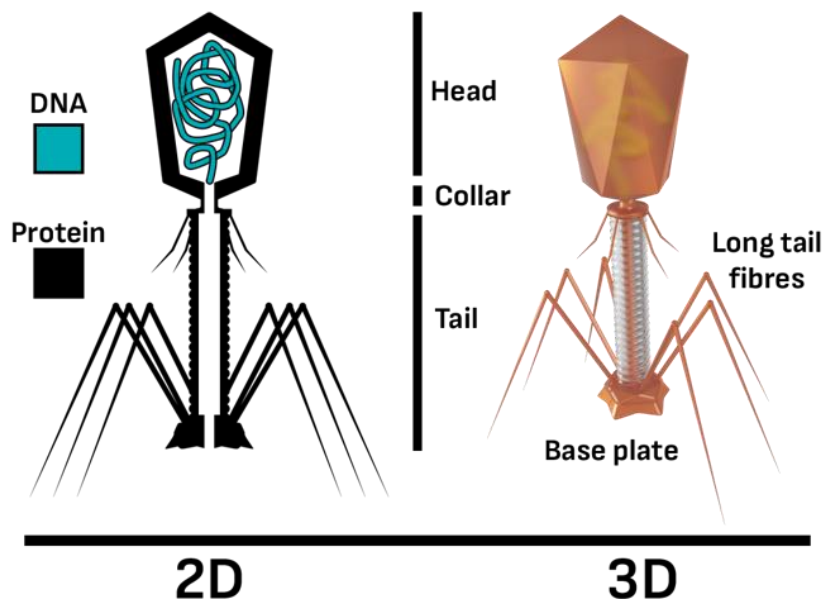
1 : disque de gentamicine, 2 : témoin sans dépôt, 3 : disque de pristnamycine, 4 : dépôt d'une goutte de bactériophages T4

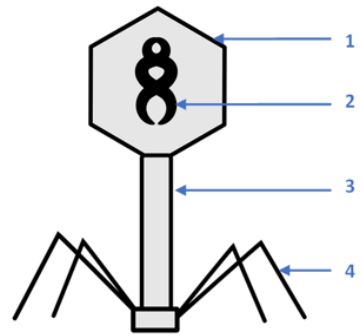
2.2 Structure d'un bactériophage

Les bactériophages sont des virus n'infectant que des bactéries. Leur taille est comprise entre 20 et 200 nm. Ils sont constitués d'une enveloppe protéique externe (la capside) protégeant le matériel génétique. Pour une majorité des bactériophages connus, ce matériel est une molécule d'ADN double-brin, mais il peut être aussi constitué d'ADN simple-brin, d'ARN simple-brin, ou d'ARN double-brin.

S'il existe différentes morphologies de bactériophages, la structure commune est la même. Elle comporte au minimum (figure 1) :

- le matériel génétique, en général contenu dans une capside,
- un dispositif d'arrimage à la bactérie cible,
- un dispositif d'injection du matériel génétique dans la bactérie.





1=capside, 2=matériel génétique,
3=dispositif d'injection du matériel
génétique, 4=dispositif d'arrimage

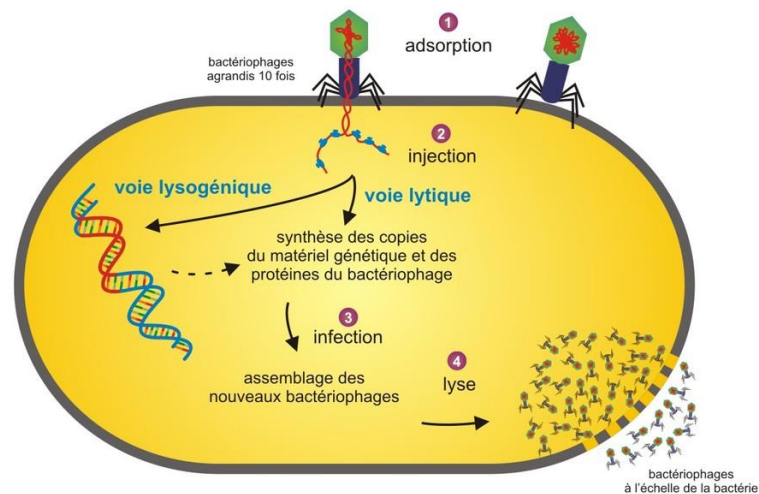
Figure 1 : Morphologies de bactériophages

Le cycle de reproduction des bactériophages

Selon leur cycle biologique, on distingue deux types de bactériophages : les virulents et les tempérés (figure 2).

Les bactériophages virulents détruisent la bactérie.

Les bactériophages tempérés sont dotés de la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien.



Source : Institut Pasteur, Laurent Debarbieux. <https://research.pasteur.fr/fr/team/group-laurent-debarbieux/>

Figure 2 : les cycles lytiques et lysogéniques

2.3 Objectif de l'expérience

Réaliser un test PCR sur virus.

Cette amplification par PCR va permettre de caractériser la présence du bactériophage T4 dans la suspension. Les produits de l'amplification sont révélés par électrophorèse d'ADN. Cette activité permet aux élèves de comprendre comment un « test-PCR » révèle la présence d'un virus spécifique. Elle est en lien direct avec le principe des tests réalisés afin d'identifier le SARS-COV-2 lors de la pandémie de COVID19.

L'objectif est donc ici d'utiliser des outils de biologie moléculaire pour rechercher « le principe actif » de cet effet bactéricide.

On peut introduire la séquence par une séance d'observation au microscope de la suspension. Celle-ci ne montre la présence d'aucun agent biologique visible. Cet agent est donc plus petit qu'une bactérie. La PCR révèle que des entités biologiques contenant de l'ADN sont présentes dans le liquide bactéricide. Il s'agit d'un virus : le bactériophage T4.

L'identification du bactériophage T4 va être réalisée par amplification par PCR du gène gp23. Ce gène code l'une des protéines majeures de la capsid. Cette protéine est spécifique du bactériophage T4 et la séquence du gène codant l'est également. La gp23 possède une séquence protéique de 551 acides aminés. Le gène gp23 a une séquence de 1556 pb, les amorces PCR ciblent une portion de ce gène, la séquence amplifiée est de 1077 pb.

Cette activité a été réalisée sous la supervision de
Pierre BRETON

Professeur et formateur en Sciences de la vie et de la Terre

Assisté du concours et de l'expertise scientifique de
Laurent DEARBIEUX,

Directeur de Recherche de l'unité « BACTÉRIOPHAGE, BACTÉRIE, HÔTE »,
Institut Pasteur de Paris






3. Mise en œuvre d'une amplification

3.1 Principe général de l'expérience

- 1 - Prélèvement d'un échantillon de la suspension à effet bactéricide
- 2 - Amplification par PCR
- 3 - L'électrophorèse permet de comparer avant et après l'amplification.

3.2 Le matériel pour 20 amplifications

Le contenu du kit :

- 1 Tubes d'amorces (tube à pastille bleue )
- 1 Tubes PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte )
- 1 Tube DNA release [bloqueur de réaction] (tube à pastille rouge )
- 1 Tube bactériophage T4 en solution, (tube à pastille blanche )
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ) pour l'électrophorèse
- 20 microtubes PCR 0,2 ml



Stockage : plusieurs mois à - 20°C (inf. à 1an pour un kit neuf)

Les réactifs entamés peuvent également être remis à - 20°C, cependant pour les tubes d'amorces (pastille bleue) et pour les tubes de mix PCR (pastille verte) le risque de contamination (par DNase) est très important, si ces tubes sont restés ouverts longtemps, et/ou ont subi plusieurs prélèvements par pipetage.

Matériel complémentaire nécessaire :

Thermocycleur

Micropipette 2 – 20µl + cônes stériles

Gants

Feutre à pointe fine

Blouse

Centrifugeuse de paillasse, peut être utile pour la récupération des petits volumes au fond des tubes.



Conseils de manipulation

Il est généralement recommandé de placer les tubes sur la glace pendant les manipulations. Toutefois, ceci n'est pas absolument indispensable, surtout si les consommables sont utilisés dans leur intégralité et les réactions préparées dans un temps raisonnablement court.

Les produits obtenus par PCR (ADN) sont sans danger et s'éliminent avec les déchets normaux.



Quelques règles de bases pour éviter les contaminations des tubes :

- La paillasse est propre et dégagée.
- L'utilisation de gants est préconisée mais n'est pas obligatoire. Toutefois, on veillera à bien se laver les mains au savon avant les manipulations des différents composants du kit.
- Être vigilant lors de la manipulation des tubes de réactifs et du tube PCR, limiter le temps d'ouverture, éviter les mouvements brusques et les brassages d'air au-dessus des tubes ouverts.

3.3 Mode opératoire

3.3.1 Paramétrage du thermocycleur

Allumer et programmer le thermocycleur

Principe : une amplification de 30 cycles.

(Choisir modèle 3 du thermocycleur Jeulin et modifier le nombre de cycles)

Etape	Action	Température	Temps
Initiation	Dénaturation	98°C	5 minutes
Cycle de base x 30	Dénaturation	98°C	5 secondes
	Hybridation	64°C	20 secondes
	Polymérisation	72°C	20 secondes
Terminaison		72°C	1 minute
Attente (1)		<8°C	

(1) Non nécessaire si l'analyse sur gel est menée immédiatement

3.3.2 Préparation des tubes réactionnels

La manipulation est très simple, elle nécessite uniquement l'utilisation de micropipette et de cônes stériles.

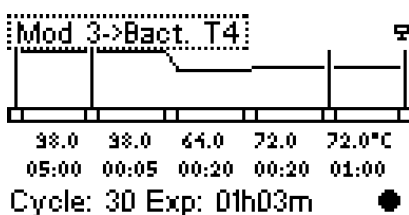
Dans un microtube PCR 0.2mL, on prépare :

10µl de PCR mix + 10µl d'amorces + 1 µL Bactériophage T4

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier l'expérimentateur.
2. Prélever 10 µL du "PCR Master Mix" (vert) et les placer dans le microtube PCR.
3. Changer de pointe de micropipette.
4. Prélever 10 µL du "Primer Mix" (bleu) et les placer dans le microtube PCR.
Mélanger par pipetage doux.
5. Changer de pointe de micropipette
6. Prélever 1 µl d'échantillon de solution de T4 à amplifier tube (blanc)
7. Refermer rapidement et déposer le tube dans le thermocycleur

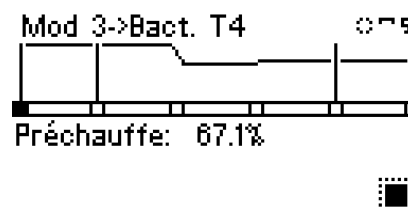
- **Important** : bien identifier chaque microtube à l'aide d'une inscription au feutre fin sur la languette du bouchon ou sur la charnière.
- Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme

Thermocycleur didactique **Jeulin**,



Sélectionner le programme Modèle 3

Placer le curseur sur



puis appuyer OK

=cycle en cours (1h environ)

En fin de cycle, les échantillons peuvent être maintenus plusieurs heures à une température de conservation < 8°C.

Les microtubes 18 °C, ils se peuvent être entreposés directement au congélateur - conserveront alors plusieurs semaines.

4. Préparation du gel d'électrophorèse

4.1 Préparation des solutions

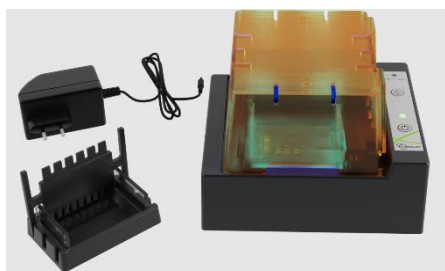
❖ Préparation du tampon TAE 1X :

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL tampon migration).
- Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger.

** En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TAE 1 X à préparer doit être adapté.*

❖ Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1% (exemple pour une système compact minigel) :

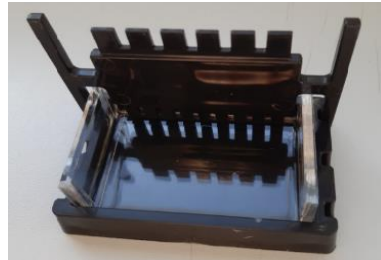
Dispositif électrophorèse
Tout-en-un



phor**Easy**

Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.

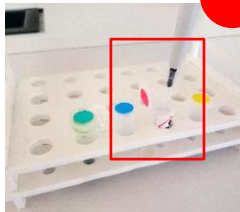
- Peser 0,15 g d'agarose dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète).
- S'assurer que la solution est parfaitement translucide
- Ajouter 1,5µl (2 µl maximum) de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erlenmeyer
- Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.



Astuce, utiliser le Colorant Gelgreen jusqu'au dernier μg : des dépôts solides dans le bouchon, indiquent un début de déshydratation du colorant. Ceux-ci peuvent être repris facilement dans quelques microlitres d'eau distillée puis intégrés de suite dans le gel.

5. Electrophorèse des fragments ADN amplifiés

5.1 Préparation de l'ADN amplifié



À faire pour chaque microtube :

- Ouvrir délicatement le microtube et y ajouter 2 μL de la solution "DNA-Release" (tube à pastille **rouge**).
- Mélanger par pipetage doux.

Le mélange réactionnel est prêt à déposer, le tampon de charge et les témoins de migration sont déjà présents dans le mix PCR.

5.2 Principe de l'électrophorèse

Les échantillons d'ADN sont soumis à un champ électrique et migrent dans **un gel d'agarose à 1%**.

L'ADN est chargé négativement par les groupements phosphates. Dans une cuve à électrophorèse, on place un gel d'agarose, les solutions d'ADN amplifié sont déposées du côté de la cathode (pôle négatif -).

L'ADN migre en fonction de son poids moléculaire : plus le fragment d'ADN est long plus il va migrer lentement vers l'anode (pôle positif +), à l'inverse un fragment plus court se déplacera plus rapidement.

5.3 Préparation du dispositif pour électrophorèse

- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale.
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative).
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres.

Quel volume d'ADN amplifié déposer dans les puits à l'aide de la micropipette ?

Révélation utilisant un colorant fluorescence Gelgreen : déposer 8 μL de solution amplifiée d'ADN par puits

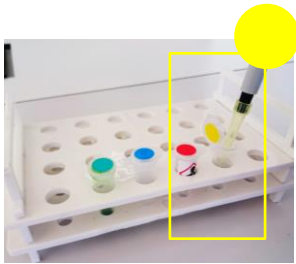
Révélation par coloration Azure A ou autre colorant : 10 à 12 μL de solution amplifiée d'ADN par puits



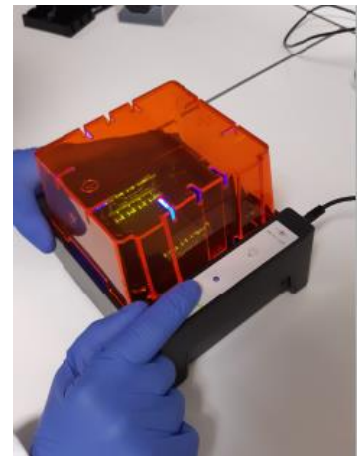
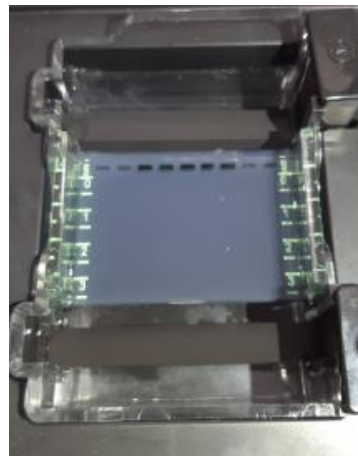
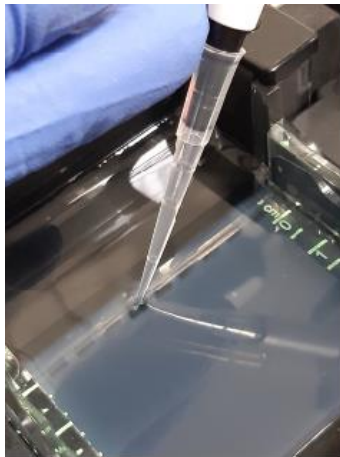
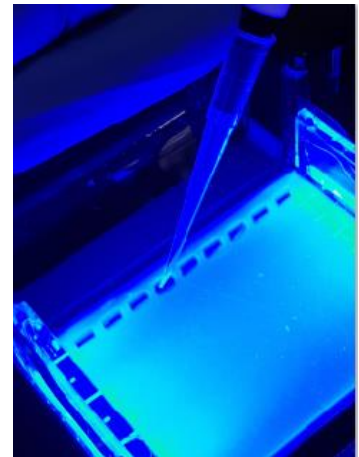
5.4 Dépôts et migration

- Déposer 8 μ l du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel - **jaune**)
- ADN amplifié : Déposer 8 μ l d'ADN amplifié par PCR (1 puits par tube)

Astuce : pour éviter les fuites de produits hors des puits et les bulles d'air lors des dépôts, déposer très lentement à mi-hauteur dans les puits et arrêter avant que le cône ne soit entièrement vide (ne pas dépasser la 1ère butée du piston de la micropipette).

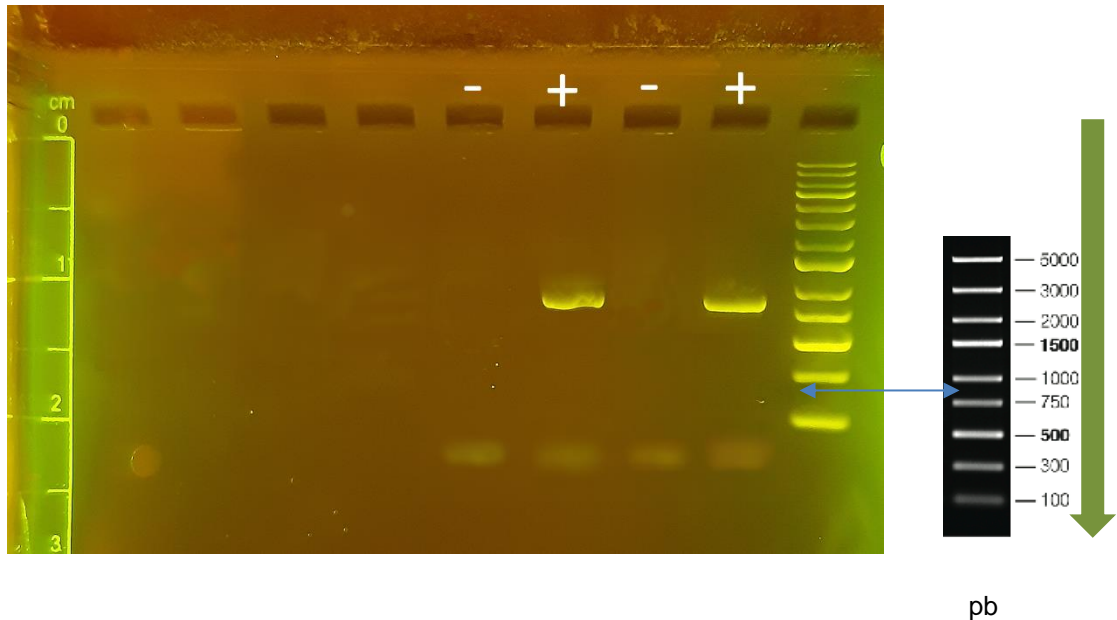


L'éclairage LED permet de mieux visualiser les puits



6. Résultats

Nous utilisons un colorant, qui, en présence d'acide nucléique (ADN) et sous l'excitation du lumière bleue (470nm) réémet une lumière jaune/verte (525 nm). Toutes les bandes fluorescentes correspondent à des fragments d'ADN de même taille, comme nous le montre le marqueur de poids moléculaires (PM).



Puits 1 et 3 (-) = 8 µl témoin négatif (eau distillée)
Puits 2 et 4 (+) = 8 µl Tube PCR après amplification
Puits 5 échelle de poids moléculaire

L'électrophorèse permet d'identifier un fragment d'ADN amplifié d'environ 1000 pb.

Ce fragment amplifié l'a été grâce aux amorces spécifiques du gène gp23 du bactériophage T4.

Détection du bactériophage T4 par PCR



Le matériel :

- 1 Tube d'amorces (tube à pastille bleue ■■■)
- 1 Tube PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte ■■■)
- 1 Tube DNA release [bloqueur de réaction] (tube à pastille rouge ■■■)
- 1 Tube bactériophage T4, (tube à pastille blanche ■■■)
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ■■■) pour l'électrophorèse
- 1 microtubes PCR 0,2 mL
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse



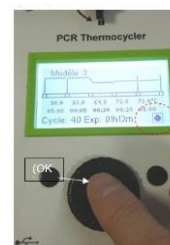
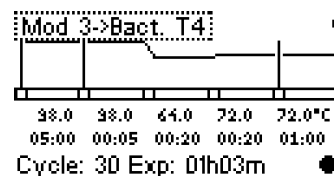
PHASE 1 : L'AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

- Allumer et programmer le thermocycleur
- Principe : une amplification de 30 cycles

Correspond au modèle 3 **modifié** du thermocycleur Jeulin



Préparation des tubes réactionnels

Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier l'expérimentateur

1. Prélever 10 μ L du "PCR Master Mix" (■■■) et les placer dans le microtube PCR
2. Changer de pointe de micropipette
3. Prélever 10 μ L du "Primer Mix" (■■■) et les placer dans le microtube PCR
Mélanger par pipetage doux
4. Changer de pointe de micropipette
5. Prélever 1 μ L d'ADN à amplifier tube (blanc)
6. Refermer rapidement



Fermer le microtube PCR. **Le repérer** à l'aide d'une marque.

Placer les tubes dans le thermocycleur, **fermer** le couvercle et **lancer** le programme

Sélectionner le programme. **Placer** le curseur sur ■■■ puis **appuyer** OK

→ ■■■ = cycle en cours (1h environ)



Préparation de l'ADN amplifié

- Ouvrir délicatement le microtube et y ajouter 2 μ L de la solution "DNA-Release" (tube à pastille ■■■)
Mélanger par pipetage doux





Electrophorèse


PHASE 2 : REVELATION

Préparation du dispositif pour électrophorèse

- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres

Dépôts et migration

Les puits sont situés du côté du pôle négatif de la cuve à électrophorèse

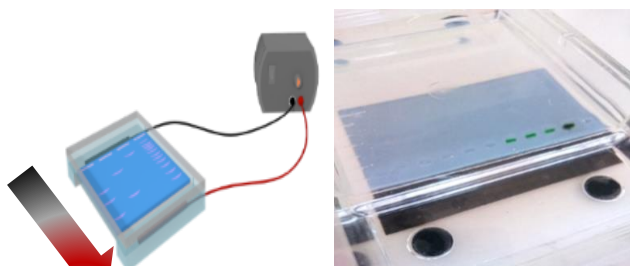
- Déposer 8 μ l du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel – )
- ADN amplifié : Déposer 8 μ l d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)
- Poser le couvercle sur la cuve



Matériel électrophorèse standard (grand gel)

- Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité.
- Allumer et attendre la migration **pendant 30 min** en 140 V

é



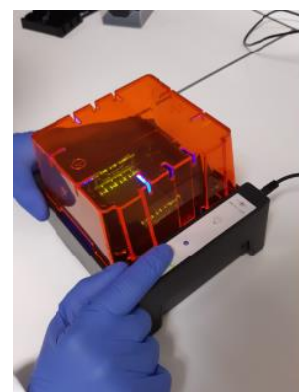
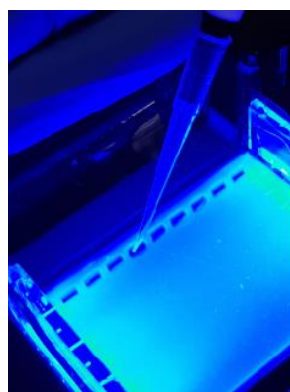
Dépôt ADN
Un revêtement noir glissé sous la cuve, permet de mieux voir la position des puits

Lecture

- Utiliser le transilluminateur pour révéler les bandes d'ADN

Matériel électrophorèse compact (minigel)

- Allumer et attendre la migration pendant 20 min
- On peut observer en temps réel le bon déroulement de la migration à l'aide du transilluminateur intégré



Lecture

- Allumer la lumière bleue
(Pour l'analyse prendre une photo à l'aide un smartphone, en déposant l'appareil directement sur le couvercle orange)

