

I. But

Ce TP a pour but d'analyser par PCR le résultat d'un clonage bidirectionnel du gène de la GFP en phase dans le vecteur PSK digéré par BamH I. Puis, analyse de la PCR avec électrophorèse sur gel d'agarose. La construction plasmidique correspond au phénotype observé.

II. Principe

La PCR est une technique qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue à partir d'une faible quantité d'acide nucléique. Elle permet de produire de multiples copies d'une séquence d'ADN cible. Le génotype est l'ensemble des gènes d'un organisme, et le phénotype est l'ensemble des caractéristiques d'un organisme résultant de l'expression de ces gènes. Dans cette étude, il est possible de former trois types de plasmide : un plasmide sens, un plasmide anti-sens et un plasmide vide ; obtenue suite à un clonage bidirectionnel de la GFP en phase dans le vecteur PSK digéré par BamH I.

Nous devons commencer par déterminer le nombre de types de plasmides que nous donne ce clonage. Pour cela, on commence par déterminer les combinaisons d'oligomères envisageables grâce à la séquence du fragment de 731 paires de bases de la GFP, des séquences des oligomères G2, G3, T3 et T7 et de la carte physique des vecteurs pBluescript II/SK (+/-). On sait que les oligomères G2 et G3 amplifient la phase codante de la GFP, l'un est dans le sens direct où l'extrémité 5' est placée au 99^{ème} nucléotide, tandis que l'autre est dans le sens inverse (sens inverse) et son extrémité 3' est placée au 636^{ème} nucléotide. De plus, les oligomères T3 et T7 se fixent sur le plasmide PSK.

A partir des constructions plasmidiques, on peut déterminer le nombre de paires de bases. Ces valeurs théoriques pourront être comparées aux valeurs expérimentales obtenues grâce à l'électrophorèse sur gel d'agarose et révélées par fluorescence aux UV.

Toutes ces informations nous permettent de placer les oligomères G2, G3 et T3, T2 par rapport à chaque plasmide, mais également de prévoir les observations auxquelles on s'attend lors de l'électrophorèse des acides nucléiques. De plus, on sait que si les amorces sont orientées dans le même sens, elles se lieront au même brin d'ADN, et la réaction PCR ne pourra pas se produire car il n'y aura pas de brin opposé pour amorcer la synthèse. L'utilisation du poids moléculaire, exprimé en Dalton, nous permettra de comparer les valeurs de nucléotides théoriques avec celles obtenues expérimentalement. L'électrophorèse sur gel d'agarose quant-à-elle une bonne technique pour séparer les biomolécules chargées tel que l'ADN dans notre cas. Celui-ci est chargé négativement, la migration se fait donc vers la charge positive de l'appareil au niveau de l'anode.

Voici les représentations des plasmides de façon schématique et les combinaisons possibles :



08/11/2023

Génotype	Plasmide sens	Plasmide anti-sens	Plasmide vide
Phénotype	AMP^R Colonie jaune fluo	AMP^R Colonie blanche	AMP^R Colonie bleu
G2+G3	538 pb	538 pb	0 pb
T3+T7	902 pb	902 pb	171 pb
T3+G2	0 pb	702 pb	0 pb
T3+G3	705 pb	0 pb	0 pb
T7+G2	729 pb	0 pb	0 pb
T7+G3	0 pb	732 pb	0 pb

Nous avons choisi d'étudier les couples d'oligomères : T3+T7 et T3+G2. En effet, les combinaisons sont possibles pour les trois plasmides pour le couple T3+T7, de plus, on retrouve le même nombre de paires de bases pour le plasmide anti-sens et sens. Ce couple nous permettra donc d'identifier les colonies bleues. Pour le couple T3+G2, nous avons une seule combinaison possible qui est celle avec le plasmide anti-sens et donc avec des colonies blanches qui sont attendues.

Nous pourrions donc analyser la PCR pour les différents plasmides.

III. Matériels et méthodes :

Liste du matériel :

- Tube Eppendorf 1 mL
- Microtubes Eppendorf
- Pipette Eppendorf (micropipette)
- Cure-dent
- Éprouvette graduée de 100 mL et 1 L
- Becher
- Erlenmeyer
- Bloc chauffant : VWR Digital Heatblock
- PCR réalisée sur l'appareil Bio-Rad T100 Thermocycler
- Pour les tubes, on utilise l'appareil Mini-Star pour centrifuger
- Micro-onde Whirlpool MT-232
- Appareil à électrophorèse BIO-RAD (support horizontal + peigne
- U.V : BIO-RAD
- Barette PCR

l'on souhaite préparer plus de réactifs au niveau du master mix, d'où le facteur 5. On obtient donc les volumes suivant :

Ingrédients	Volume 1 réaction (µL)	Volume 5 réaction (µL)
Tp PCR ×10	2	10
dNTP 25 mM	0,2	1
Oligo 1,10 µM	0,6	3
Oligo 2,10 µM	0,6	3
ADN bactérien	2	2
ADNpolymérase thermostable	0,1	0,5
H ₂ O	14,5	72,5

- Mode opératoire :

Dans un tube Eppendorf, on introduit les composés suivant dans cet ordre à l'aide d'une micropipette :

- 1- 72,5 µl d'eau
- 2- 10 µl de Tp PCR
- 3- 3 µL de l'oligo 1 (T3)
- 4- 3 µL de l'oligo 2 (T7 ou G2)
- 5- 1 µL de dNTP
- 6- 0,5 µL d'ADN polymérase thermostable

On homogénéise notre tube au vortex.

c. Préparation des micro-tubes pour la réaction de PCR :

Pour les masters mix préparés, 4 PCR comprenant une PCR témoin sont prévues soit 8 PCR au total. Dans les 4 premiers tubes, on introduit 18 µL du master mix des oligomères T3 et T7. On y rajoute 2 µL d'ADN bactérien dans les trois premiers tubes selon l'ordre suivant : blanc, bleu et fluo. Le 4^{ème} tube, soit le tube témoin, est complété avec 2 µL d'eau distillée. On reproduit le même protocole pour les 4 autres tubes avec l'autre solution de master mix pour les oligomères T3 et G2.

Les microtubes de 200 µL sont introduits dans un thermocycleur et subissent différents paliers et cycles de températures : 1×94°C 5', 35×94°C 20'', 53°C 30'', 72°C 30''. Le premier cycle de température correspond à la dénaturation, c'est-à-dire l'obtention de deux brins simples à partir d'un double brin. Le deuxième cycle correspond à l'hybridation des amorces à leur séquence complémentaire, cette température a été déterminée par rapport à celle de la fusion des oligonucléotides. Le dernier cycle correspond à la synthèse des brins complémentaires par polymérase.

d. Préparation du gel d'agarose à 1.5 % :

- 1) Préparation du tampon T.A. Ex1

La solution mère de Tris base 40M, acétique 50 mM, EDTA 2 mM à PH 8,3 est utilisée pour former le tampon ; elle est concentrée, il faut donc la diluer 50 fois. Pour cela, 20 mL de cette solution mère est placés dans une éprouvette graduée de 1000 mL, puis on complète à l'eau distillée.

2) Dissolution de l'agarose

1,8 g d'agarose euromedex sont pesés dans un erlenmeyer, auquel on rajoute 120 mL de la solution tampon T.A.E $\times 1$. L'erlenmeyer est placé dans un four à micro-ondes. Il faut vérifier que notre agarose se dissout correctement, pour cela on agite délicatement. Au début, l'aspect est hétérogène avec des particules blanches. Il faut donc chauffer la solution plusieurs fois jusqu'à une légère ébullition et que la solution devienne translucide et sans particule incolore ainsi notre agarose sera dissoute.

Précaution opératoire : Le BET est un produit toxique et mutagène. Il est impératif de porter des gants, des lunettes et de travailler avec précaution lors de son utilisation. De plus, les gants doivent être jetés après manipulation. Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques et permet, après électrophorèse, leur détection par fluorescences aux UV.

3) Solidification du gel

Une fois l'agarose dissoute, on dépose notre gel sur un support. On ajoute 15 μL de BET (bromure d'éthidium), en s'assurant que le cône de la pipette plonge dans la solution pour garantir le dépôt complet du BET. Ce colorant permet de détecter l'ADN après électrophorèse par fluorescence aux UV.

Pour homogénéiser la solution, on mélange et on élimine les bulles à l'aide du cône de la micropipette. Un peigne est placé au fond du support afin de permettre la formation des puits après polymérisation. Une fois le gel solidifié, on place le support dans un appareil à électrophorèse. Par la suite, on enlève le peigne délicatement afin d'éviter de casser les puits. Enfin, on immerge le support avec la solution tampon d'électrophorèse T.A.E $\times 1$ préparé préalablement. On attend que notre gel polymérise.

e. L'électrophorèse :

Elle permet de définir la taille des fragments d'acides nucléiques en les séparant en fonction de leur mobilité électrophorétique dans un gel.

Une fois la PCR effectuée, on ajoute 4 μL de la solution de dépôt, composée de bleu de bromophénol à 0,025% (deux marqueurs de migration), ainsi que de glycérol à 60%, aux 10 μL d'échantillon dans chaque tube. Cette solution permet de faire glisser la solution et de visualiser la migration : front de migration = bleu de bromophénol et demi-migration = xylène cyanol. De plus, le glycérol permet d'augmenter la densité du milieu réactionnel et facilite le dépôt.

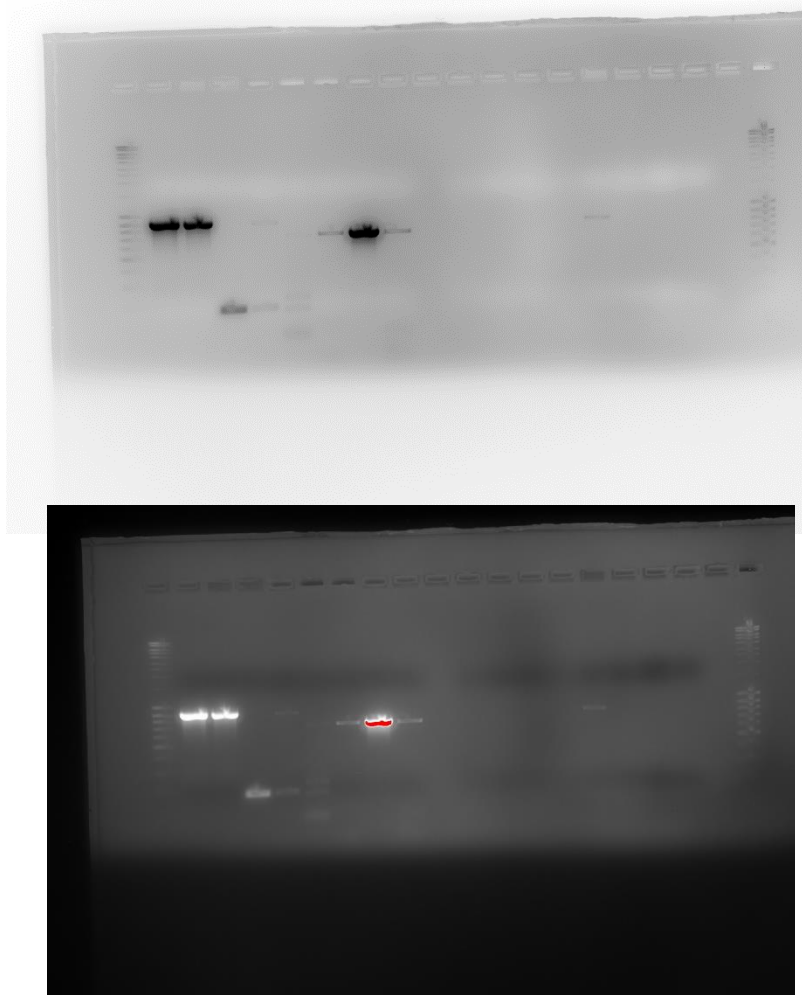
Les échantillons centrifugés sont introduits dans les puits formés lors de la polymérisation du gel. Un marqueur de poids moléculaire est ajouté en début et à la fin du gel afin de permettre le traitement des résultats.

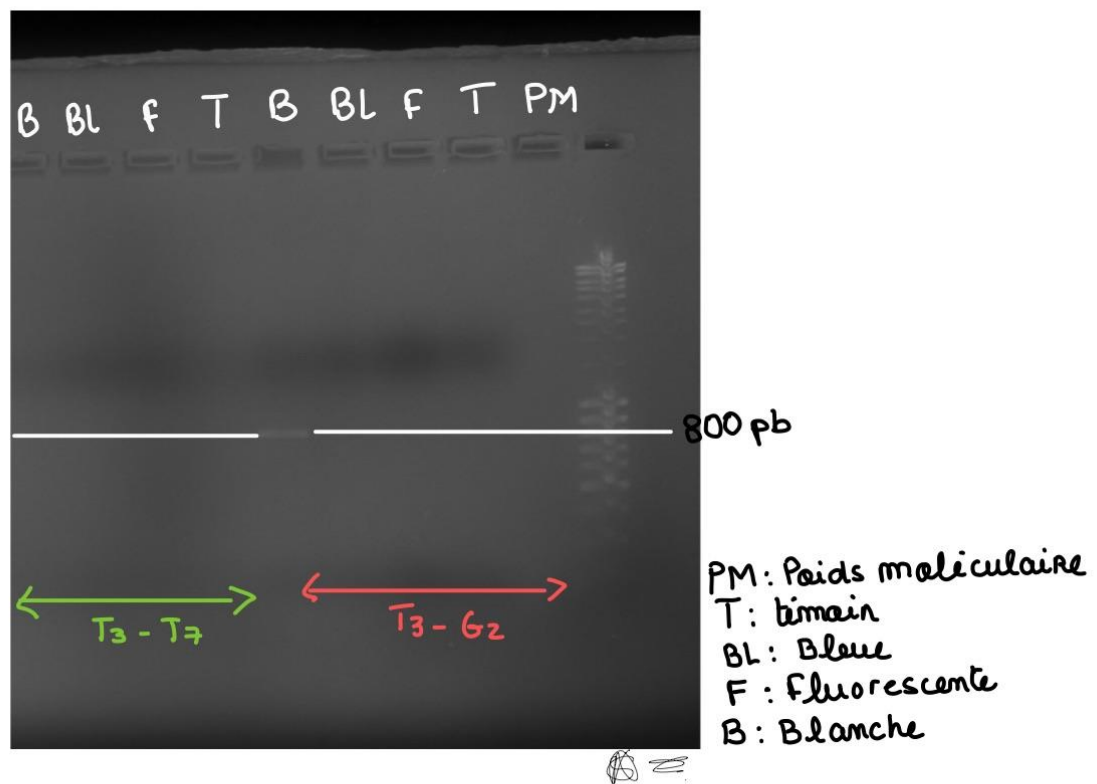
Les dépôts ont été effectués dans les puits comme ceci :

Blanc (T3+T7)	Bleu (T3+T7)	Fluo (T3+T7)	Temoin	Blanc (T3+G2)	Bleu (T3+G2)	Fluo (T3+G2)	Temoin	PM
-------------------	-----------------	-----------------	--------	------------------	-----------------	-----------------	--------	----

On lance notre électrophorèse, la migration a lieu à température ambiante et à une tension de 120 V. Après l'électrophorèse, le gel est exposé aux UV afin de permettre la visualisation des bandes d'ADN sous forme d'une photographie.

IV. Résultats et interprétations





La photographie suivante est obtenue. A gauche, il s'agit des résultats de l'autre binôme de la paillasse (Noé et Pierre) qui ont étudiés les couples T3 et T7, et T3 et G3. Et à droite, voici nos résultats obtenus.

Voici les tableaux récapitulatifs de nos résultats :

	T3+T7 (colonie bleu)	T3+T7 (colonie blanche)	T3+T7 (colonie fluo)	T3+G2 (colonie bleu)	T3+G2 (colonie blanche)	T3+G2 (colonie fluo)
Nos résultats	-	-	-	-	800 pb	-
Résultats théoriques	171 pb	902 pb	902 pb	0 pb	702 pb	0 pb

08/11/2023

	T3+T7 (colonie bleu)	T3+T7 (colonie blanche)	T3+T7 (colonie fluo)
Résultats autre binôme	300 pb	900 pb	900 pb
Résultats théoriques	171 pb	902 pb	902 pb

V. Discussion

- Amorce T3 et T7

À la suite de l'analyse sur électrophorèse, on constate que la réaction PCR pour le couple d'amorce T3+T7 n'a pas fonctionné. Il est crucial d'analyser les éventuelles causes d'échec de la réaction PCR pour le couple d'amorces T3+T7. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à un ce non fonctionnement.

Manipulation et préparation d'échantillon : Les erreurs lors de la manipulation des échantillons, y compris les erreurs dans la préparation des échantillons ou des oligomères dans l'ajout de réactifs au master mix peuvent effectivement conduire à des résultats non concluants.

Problèmes d'oligomères : Les amorces sont des éléments clés de la PCR notamment pour l'amplification spécifique de la région d'intérêt, et si elles ne sont pas correctement conçues, cela peut entraîner l'échec de la réaction.

Problèmes d'amorces : L'amorce T7 n'a pas été fonctionnelle. Cela est déterminé par le fait qu'on retrouve bien un résultat en ayant utilisé le couple T3+G2, ce qui signifie que l'amorce T3 est bien fonctionnelle. Cependant, nous ne pouvons pas remettre en cause le programme de la PCR avec notamment la température ou encore avec l'élongation du nombre de paire de base, étant donnée, que notre binôme a quant à lui bien retrouver les résultats attendus.

En théorie, on aurait dû obtenir des bandes spécifiques pour chaque type de plasmide dans les puits correspondant. Nous aurions dû obtenir des colonies fluorescente (plasmide sens) et blanche (plasmide anti-sens) au niveau du marquage du poids moléculaire de 900 pb. Pour les puits de la colonie bleue, on aurait dû obtenir une bande entre 150 et 200 pb.

Il peut être utile de revoir la conception des amorces, de vérifier les conditions de la PCR, et éventuellement de reprendre la réaction avec des ajustements si nécessaire. Il faudrait répéter l'expérience pour confirmer les résultats et identifier la source potentielle du problème.

- Amorce T3 et G2

Pour le couple d'amorce T3+G2, on souhaite amplifier le gène de la GFP, qui donne un caractère blanc aux bactéries. À la suite de l'observation UV du gel, on retrouve une bande UV au niveau

