

## 3.2. De quelques copies à des centaines de milliers

Bienvenue à un nouvel épisode de ce sujet passionnant. N'oubliez pas que nous avons vu dans la dernière vidéo comment faire pour extraire l'ADN des cellules. Une des applications plus courantes de l'ADN est dans le diagnostic, en utilisant une technique appelée, Réaction en chaîne par polymérase Polymerase Chain Reaction ou PCR.

Il s'agit d'une technique très sensible. Avec lui, nous serions en mesure de détecter la proverbiale «une aiguille dans une botte de foin», et, pour paraphraser certains scientifiques «faire une botte de foin avec une aiguille». C'est parce que quelques molécules d'ADN, comme vous allez le voir, sera multipliée des millions de fois.

C'est une technique polyvalente, qui a nombreuses applications; et rapide, des résultats en quelques heures. Avantages ne sont pas tous. Le principal inconvénient est sans doute la possibilité de contamination avec les autres ADN, donner des résultats faussement positifs.

Nous allons faire une PCR dans notre laboratoire virtuel pour amplifier notre ADN. Tout d'abord, nous préparerons des réactifs. Nous allons voir ce qu'il faut.

Ah, oui, nous avons besoin de certaines séquences 18-25 nucléotides de long appelés des amorces, ou oligonucléotides. Ces séquences sont spécifiques pour l'ADN que nous voulons amplifier. Nous avons besoin de deux: un seul sens et un autre antisens, et chaque hybride avec un des brins de l'ADN cible recuit dans les régions séparent entre 200 et 1500 nucléotides.

Quoi d'autre avons-nous besoin? Ah, nous avons besoin des dNTPs, c'est-à-dire les désoxyribonucléotides ATP, CTP, GTP et le TTP, qui composent le cADN.

En outre, ah, oui, nous avons besoin d'une enzyme, l'ADN polymérase, qui s'appelle Taq, provenant d'une bactérie très résistante à la chaleur appelé *Thermus aquaticus*. Taq synthétise un brin complémentaire de l'ADN.

Enfin, il faut un tampon avec la concentration appropriée de magnésium; et n'oubliez pas de nous inclure des contrôles positifs et négatifs.

Nous combinons les montants précis dans des tubes Eppendorf de petit format ou en plaques multipuits, selon le nombre d'échantillons. Nous allons utiliser un appareil appelé thermocycleur, qu'on peut programmer pour changer après la série de trois phases, les températures qui sont répétées environ 25 - 30 fois ou cycles.

La première phase est appelée dénaturation. Il consiste à soumettre l'échantillon d'ADN à 94° et 95°C pour séparer les deux brins de l'ADN. Une fois qu'ils sont séparés elle progresse vers l'étape suivante, appelé l'hybridation, il se produit à une température entre 50 et 65°C, selon la séquence des amorces. Dans cette phase les amorces reconnaîtront à la séquence d'ADN spécifique, si c'est qu'il n'y a, et ils seront hybrident avec eux. N'oubliez pas qu'il y en a un pour le brin positif et l'autre, l'antisens, pour la négative.

Dans la dernière phase d'extension à 72°C, La Taq polymérase va ajouter les dNTPs suivant où les amorces ont recuit, le brin d'ADN qui s'étend jusqu'à la fin. Ainsi, il retourne à être un ADN bicaténaire. Après cela, il recommencera à 94 ou 95°C pendant dénaturation du produit amplifié, que, comme vous l'avez remarqué, il a doublé.

La majorité des enzymes inactiver à cette température, mais comme le Taq provient des bactéries résistantes à la chaleur, n'est pas endommagé avec température et il n'a pas besoin d'être ajoutés à chaque cycle.

Le nombre de molécules d'ADN est dupliqué dans chaque cycle, donc en théorie, plus d'un million de copies du fragment original sont obtenues après 20 cycles, délimité par les amorces.

Vous comprenez maintenant pourquoi les scientifiques disent une botte de foin peut être obtenue par une aiguille?

Impressionnante. Maintenant, nous avons seulement besoin de visualiser l'amplification, généralement séparant le résultat par électrophorèse sur gel d'agarose, ou par d'autres techniques.

Dans la vidéo suivante, nous allons voir des versions différentes de la PCR et la façon de quantifier la quantité d'acide nucléique présent.

Je vous remercie beaucoup pour votre attention.