

Tutorat n°1

Notions fondamentales en Biologie Moléculaire – Qu'est ce que l'ADN ?

L'utilisation des ADN polymérase thermostables issues d'organismes hyperthermophiles (*Archaea*) est aujourd'hui très répandue dans le monde de la biologie moléculaire. En effet, ces enzymes sont utilisées dans la technique dite de PCR (Polymerase Chain Reaction) pour amplifier *in vitro* de très grandes quantités d'un fragment ADN double brin (matrice) en nécessitant uniquement un couple d'amorces spécifiques, des nucléotides tri-phosphates (NTP = A,C,G,T), un tampon réactionnel et un appareillage spécifique appelé thermocycleur permettant de réaliser des cycles précis de température.

Pour ce premier tutorat, nous travaillerons sur la base de l'article de base ci-joint présentant la technique PCR et les ADN polymérase thermostables :

- **Saiki et al., 1988 Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491 (Document joint en PDF)**

Pour aller plus loin sur ce sujet, vous pourrez également consulter les articles suivants (en passant par PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)) qui est un moteur de recherche de publication :

- Lundberg et al., High fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *P. furiosus*. Gene, 108, 1-6.
- Cheng et al., 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. PNAS, 91, 5695-5699.
- Barnes, 1994. PCR amplification up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. PNAS, 91, 2216-2220.
- Moretti et al., 1998. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. Biotechniques, 25,716-722.

1/ Questions

1/ La figure 1 compare 2 stratégies d'amplification de l'ADN par la méthode de PCR. Présentez brièvement cette technique en rappelant les 3 étapes fondamentales de la réaction.

Quelles sont les différences entre les 2 enzymes utilisées (Klenow/Taq polymérase).

Les fragments d'ADN sont visualisés sur gel d'agarose (Figure 1A). Expliquez le principe de cette technique.

Comment la température influence-t-elle l'hybridation d'une amorce (oligonucléotide) sur l'ADN matrice ? En fonction de votre réponse commentez le résultat obtenu dans la figure 1A.

2/ La figure 1B représente le résultat d'une expérience de Southern Blot à l'aide d'un oligonucléotide amorce radiomarqué. Quel est le principe de cette technique. Quelles conclusions faites vous sur la base du résultat présenté.

3/ La figure 2 présente les facteurs influençant la spécificité de l'amplification avec une Taq polymérase. Quels sont les facteurs étudiés ? Quelles conclusions faites-vous ?

4/ La figure 4 compare la taille des fragments polymérisés en utilisant soit la Klenow soit la Taq polymérase. Que concluez-vous ?

5/ La figure 6 présente une expérience de séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger. Quel est le principe de cette technique (faire une figure) ? Que concluez-vous quand à la fidélité comparée de la Klenow et de la Taq Polymérase ?

2/ Projet industriel

Sur la base des outils et/ou techniques abordés dans ce tutorat, proposez une application à retombées industrielle et économique.