**Université Mohamed Khider -Biskra-**

**Faculté des Sciences Exactes et des SNV. Département des SNV**

**TD n˚5 - PCR**

**Exercice 1 :**

Un biologiste souhaite amplifier un fragment d’ADN à l’aide de la PCR. Il utilise deux amorces ayant les séquences suivantes :

- Amorce 1 (sens) : 5'-ATGCGTAGCTGATC-3'

- Amorce 2 (antisens): 5'-GCTTACGGTACGTA-3'

Les conditions de la PCR sont les suivantes :

- Température de dénaturation : 95°C

- Température de polymérisation : 72°C

- Concentration en MgCl : 2 mM

1. Calculez la température de melting ( Tm ) des deux

2. Proposez une température d’hybridation optimale (T\_a ) pour cette réaction.

3. Que se passerait-il si la température d’hybridation choisie était trop basse (ex. 40°C) ? Et si elle était trop élevée (ex. 70°C) ?

4. Quelle amorce sera la moins stable si la concentration en sels est diminuée ? Justifiez votre réponse.

**Exercice 2 :**

5’-GAGGCGCGGTCCGCACTGCGCAGGCGTAGAGCTCTGCGCTGAGTTGTAGTTAGCGCCTTCTC-3’

3’-CTCCGCGCCAGGCGTGACGCGTCCGCATCTCGAGACGCGACTCAACATCAATCGCGGAAGAG-5’

On souhaite amplifier par PCR le fragment d’ADN ci-dessus de la base n°5 à la base n°62.

1. Dessiner et orienter l’amorce de 20 nucléotides qui va reconnaître le brin supérieur ?
2. Dessiner et orienter l’amorce de 20 nucléotides qui va reconnaître le brin inférieur ?
3. Schématiser le premier cycle de PCR ?
4. Schématiser le devenir de ces produits lors du second cycle.

**Exercice 3 :**

Les douaniers d’un port Français ont reçu pour consigne d’écarter tout produit transgénique. Ils interceptent une cargaison de produits frais (tomates, pamplemousses, maïs et soja) en provenance des Etats-Unis. Ces produits sont susceptibles de provenir de plants génétiquement modifiés contenant un gène de résistance à un herbicide. Les douaniers souhaitent donc vérifier si les produits de cette cargaison contiennent ou non ce gène. Pour cela, l’ADN d’un échantillon de chacun de ces produits est extrait afin d’être analysé par PCR.

1. Parmi les 4 oligonucléotides ci-dessous, lesquels vous parait-il judicieux d’utiliser pour amplifier par

PCR la région du gène indiquée sur la figure 1 ?

* 1. 5’ GGAAATCTGTGGGCATTGTG 3’
  2. 5’ ATGCATAACATCAGGGACATT 3’
  3. 5’ AATGTCCCTGATGTTATGCAT 3’
  4. 5’ CACAATGCCCACAGATTTCC 3’

Après amplification, les produits de PCR sont déposés sur un gel d’électrophorèse puis visualisés. Les résultats sont donnés dans la figure 2.

1. Quelle est la taille attendue du produit de PCR chez un organisme porteur du gène de résistance à

l’herbicide ?

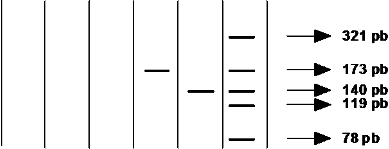
1. Décrivez et interprétez chaque résultat
2. Quelle(s) hypothèse(s) pourriez-vous formuler pour expliquer les résultats obtenus chez le maïs ?
3. Comment vérifier expérimentalement ces hypothèses ?

# Figure 1 : Séquence d’une partie du gène de résistance à l’herbicide recherché

5’ - - - - GG AAA TCT GTG GGC ATT GTG ACC ACC ACG AGA GTG AAC CAT GCC ACC CCC AGC GCC GCC TAC GCC CAC TCG GCT GAC CGG GAC TGG TAC TCA GAC AAC GAG ATG CCC CCT GAG GCC TTG AGC CAG GGC TGT AAG GAC ATC GCC TAC CAG CTC ATG CAT AAC ATC AGG GAC ATT 3’

# Figure 2 : Représentation du gel d’électrophorèse après migration.

1- Contrôle négatif (organisme sans gène

1 2 3 4 5 6

de résistance) 2- Tomate

1. Pamplemousse
2. Soja
3. Maïs
4. Marqueur de masse moléculaire