

Amplification de l'ADN par réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

L'introduction de méthodes hors cellules pour la multiplication de fragments d'ADN d'origine définie (amplification de l'ADN) en 1985 a ouvert une nouvelle ère dans la génétique moléculaire (le principe de la PCR est contenu dans des publications antérieures). Cette technologie fondamentale s'est largement répandue avec le développement d'équipements automatisés utilisés dans la recherche fondamentale et appliquée.

Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR est une méthode cellulaire, rapide et sensible pour le clonage de fragments d'ADN. Une réaction standard et une grande variété de méthodes basées sur la PCR ont été développées pour tester les polymorphismes et les mutations. La PCR standard est une procédure in vitro d'amplification de séquences d'ADN cibles définies, même à partir de très petites quantités de matériel ou de matériel d'origine ancienne. L'amplification sélective nécessite certaines informations préalables sur les séquences d'ADN flanquant l'ADN cible. Sur la base de cette information, deux amorces oligonucléotidiques d'environ 15 à 25 paires de bases de longueur sont conçues. Les amorces sont complémentaires des séquences en dehors des extrémités 3' du site cible et se lient spécifiquement à celles-ci.

La PCR est une réaction en chaîne parce que les brins d'ADN nouvellement synthétisés agissent comme modèles pour la synthèse d'ADN supplémentaire pendant environ 25 à 35 cycles

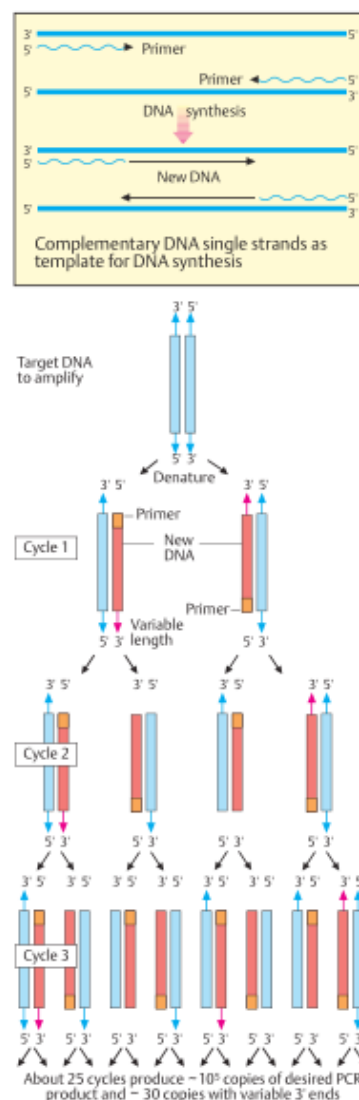
ultérieurs. Théoriquement, chaque cycle double la quantité d'ADN amplifié. A la fin, au moins 10^5 copies de la séquence cible spécifique sont présentes. Cela peut être visualisé comme une bande distincte d'une taille spécifique après électrophorèse sur gel. Chaque cycle, impliquant trois réactions précisément contrôlées dans le temps et contrôlées par la température dans les thermocycleurs automatisés, prend environ 1-5 min.

Les trois étapes de chaque cycle sont (1) dénaturation de l'ADN double brin, à environ 93-95 ° C pour l'ADN humain, (2) hybridation de l'amorce à environ 50-70 ° C en fonction de la température de fusion attendue de l'ADN duplex. et (3) la synthèse d'ADN en utilisant une ADN polymérase thermostable (à partir de micro-organismes vivant dans des sources chaudes, telles que *Thermophilus aquaticus*, Taq polymérase), typiquement à environ 70-75 ° C. A chaque cycle suivant, le modèle (représenté en bleu) et l'ADN nouvellement synthétisé au cours du cycle précédent (représenté en rouge) agissent comme modèles pour un autre cycle de synthèse. Le premier cycle conduit à l'ADN nouvellement synthétisé de longueurs variées (représenté par une flèche) aux extrémités 3 'car la synthèse est poursuivie au-delà des séquences cibles. La même chose se produit au cours des cycles ultérieurs, mais les brins variables sont rapidement surpassés en nombre par un nouvel ADN de longueur fixe aux deux extrémités, car la synthèse ne peut pas dépasser la terminaison de l'amorce à l'ADN matrice opposé.

amplification de l'ADNc et RT-PCR

Une séquence d'acides aminés partiellement connue d'un polypeptide peut être utilisée pour obtenir les informations de séquence requises pour la PCR. A partir de son ARNm, on peut dériver de l'ADNc et déterminer la séquence du sens et du brin antisens pour préparer des amorces oligonucléotidiques appropriées (1). Lorsque différents ARN sont disponibles en

petites quantités, des méthodes rapides basées sur la PCR sont utilisées pour amplifier l'ADNc provenant de différents exons d'un gène. L'ADNc est obtenu par transcriptase inverse à partir de l'ARNm, qui est ensuite éliminé par hydrolyse alcaline (2). Après avoir synthétisé un nouveau brin d'ADN complémentaire, l'ADN peut être amplifié par PCR (3). La PCR de transcriptase inverse (RT-PCR) peut être utilisée lorsque les séquences d'exons connues sont largement séparées dans un gène. Avec l'amplification rapide des extrémités de l'ADNc (RACE-PCR), le 5' et 3' les séquences d'extrémité peuvent être isolées à partir de l'ADNc.



Polymerase chain reaction (PCR)