

PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel permet de mesurer :

- la quantité de transcription d'un gène par l'ARN.
- mesurer la quantité d'ADN présent au départ.

Elle permet de suivre en temps réel la production d'ADN. La quantité d'ADN présent a chaque cycle.

Premier cycle la fluorescence oscille.

Le principe est de suivre la quantité de produits grâce au niveau de fluorescence.

The parameter CT (threshold cycle) is defined as the fractional cycle number at which the fluorescence passes the fixed threshold.

Deux approches pour quantifier l'ADN sont possible :

- Relative connaître la quantité par rapport à un autre échantillon. Connaître le niveau d'expression d'un gène par exemple, d'un malade et d'un patient sain.
- Absolu connaître la quantité de façon absolue. Par exemple pour quantifié des protéines virales.

Comme pour une PCR classique,

Les paramètres qui agissent sur la température de fusion :

Paramètre	Agit sur	Si le paramètre augmente
le coeff de Chargaff %GC	le nombre de liaisons hydrogène	Stabilise

le pH qui ionise les phosphates	la force de répulsion électrostatique (dénaturant)	Dénature
la concentration en cation, force ionique	neutralise les charges	Stabilise
L'urée, formamide	compétiteur des liaisons hydrogène entre bases	Dénature
la concentration en ADN, Activité de l'eau	affecte la constante diélectrique	Stabilise
la longueur de la molécule d'ADN	le nombre de zones riches en GC	Stabilise

Révéler les fragments d'ADN présent

Révéler les fragments présent :

Indirecte seul Directe

Non spécifique consiste à utiliser des agents intercalants. tout est quantifié

Spécifique un séquence spécifique est quantifié

Les types de sondes

Sondes spécifiques

- Taqman La fluorescence inhibé par sa liaison avec la sonde. Lorsque la sonde est appareillée. La polymérase dégrade l'extrémité 5 '-3' et libère le fluorochrome qui devient actif.
- FRET Deux sondes qui lorsqu'elles sont adjacentes. Elles deviennent fluorescentes. Il y a deux fluorochromes. Le premier émet un photon capté par le seconde. Les spectre d'absorption et d'émission doivent se recouper.
- Balise moléculaire. Fluorophore inhibé et lié à l'ADN.

Avantages et inconvénients de chaque méthodes :

Méthode de quantification

$$N = N_0 \times 2^c$$

Valeur seuil de fluorescence correspond

$$E + 1$$

Avec E l'efficacité.

Rmq : L'efficacité de 100 correspond à le coefficient est de 2.

En passant par log, on démontre que :

$$C_t = \frac{-1}{\log(E + 1)} \times \log(N_0) + \frac{\log(N_{seuil})}{\log(E)}$$

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{pente}} - 1}$$

Relative ratio entre plusieurs gènes calibres.

Absence de variation de l'expression des gènes calibres

Si l'efficacité du gène calibre est différente de celle du gènes d'intérêt.

Comme l'efficacité réactionnelle change en fonction des gènes étudiés. Il faut réaliser une gamme de gènes (au moins 3). Il permettront de modéliser en fonction de l'efficacité.

Il faut au moins 2 gènes calibres. Ces gènes doivent avoir le même ratio pour chaque échantillon.

Gène calibre :

Pseudogène gène inactif.

J'ai l'impression que l'on suit deux gènes. (échantillon différents).

Triplica pour 1 calibre, 1 gène de

Il existe des catégories Les gènes domestiques ont été catégorisé en niveau d'expression.

Pas de variation d'expression en fonction des conditions expérimentales

2 approches pour calculer les paramètres :

- Standard curve method
- Comparative CT method

Standard curve method

Trois échantillons pour chaque

-

Critical Guidelines

Contrôle endogène gène de contrôle qui n'a pas de différence d'expression entre les différents échantillons. Concrètement, on choisit généralement un gene qui s'exprime de façon identique dans chaque cellule comme ceux qui codent pour l'actine,... (ce type de gène est appelé housekeeping).

Calibre est l'échantillon qui est comparé et sert de référence aux autres échantillons. Sa valeur 1

Le gene de reference doit avoir un Cp similaire pour chaque échantillon.(expression constante).

Rmq : un Ct grand indique que le gène est faiblement exprimé.

$$\Delta C_t =$$

The guidelines below are critical for proper use of the standard curve method for absolute quantitation:

It is important that the DNA or RNA be a single, pure species. For example, plasmid DNA prepared from E. coli often is contaminated with RNA, which increases the A260 measurement and inflates the copy number determined for the plasmid.

Accurate pipetting is required because the standards must be diluted over several orders of magnitude. Plasmid DNA or in vitro transcribed RNA must be concentrated in order to measure an accurate A260 value. This concentrated DNA or RNA must then be diluted 10⁶–10¹² -fold to be at a concentration similar to the target in biological samples.

The stability of the diluted standards must be considered, especially for RNA. Divide diluted standards into small aliquots, store at –80 °C, and thaw only once before use.

It is generally not possible to use DNA as a standard for absolute quantitation of RNA because there is no control for the efficiency of the reverse transcription step.

ddPCR

gouttelette de 1 nL sur la loi de Poisson.

$$T = \frac{-D \times 1000}{V_d} \ln \left(1 - \frac{P}{R}\right)$$

Avec :

- *T* concentration absolue copies par nL.
- *D* facteur de dilution.
- *V_d* volume moyen des gouttelettes
- *P* nombre de gouttelettes positives.
- *R* nombre de gouttelettes total.

Répartition des fragments suit la loi de poisson.