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 osciille.

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 connaitre la quantité par rapport à un autre échantillon. Connaitre le niveau d’expression dun gène par exemple, d’un malade et d’un patient sain.
* Absolu connaitre 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 quantitfié

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

Valeur seuil de fluorescence correspond

Avec l’efficacité.

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

En passant par log, on démontre que :

Relative ratio entre plusieurs gènes calibreurs.

Absence de variation de l’expression des gènes calibreurs

Si l’efficacité du gène calibreur 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 calibreurs. Ces gènes doivent avoir le même ratio pour chaque échantillon.

Géne calibreur :

Pseudogène géne inactif.

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

Triplica pour 1 calibreur, 1 gène de

Il existe des catégoriesLes 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. Concrétement, 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).

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

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

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

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

goutelette de 1nL sur la loi de Poisson.

Avec :

* concentration absolue copies par nL.
* facteur de dilution.
* volume moyen des gouttelettes
* P nombre de gouttelettes positives.
* P nombre de gouttelettes total.

Répartition des fragments suit la loi de poisson.