qPCR (PCR quantitative) : de la théorie à la réalisation pratique

NOUVELLE FORMATION

OBJECTIFS

La formation est axée sur l'application de la technologie de la PCR en temps réel (Real-Time PCR), avec un accent particulier sur la pratique.

- Comprendre et appliquer les diverses techniques de quantification des acides nucléiques ARN et ADN
- Acquérir les connaissances théoriques et pratiques permettant de choisir la stratégie de PCR quantitative la mieux adaptée aux contraintes expérimentales
- Avoir une vue d'ensemble des logiciels couramment utilisés pour l'analyse des résultats

PUBLIC CONCERNÉ

Ingénieurs, techniciens.

Pré-requis : Maîtriser les techniques de base de la biologie moléculaire

PROGRAMME

LES MATINS : COURS ET TRAVAUX DIRIGÉS

Présentation des différents principes de la PCR quantitative

- Rappels sur les fondamentaux de la PCR quantitative, notion de Cq, formats de fluorescence, méthodes de calcul de l'efficacité
- Mise au point d'une PCR quantitative : optimisation, validation, plan d'expérience, stratégies de normalisation, dilutions etc.
- Calibration et droite d'étalonnage

Stratégies en PCR quantitative

- Méthode par quantification absolue (standard externe)
- Méthode par quantification relative avec et sans standard externe

Normes MIQE

TRAVAUX DIRIGÉS

- Design et conception des amorces, choix des amorces, résolution des problèmes de spécificité et de sensibilité
- Principes de la PCR relative, choix des gènes de normalisation avec différents logiciels, suivi de la normalisation par la méthode Δ Δ Ct

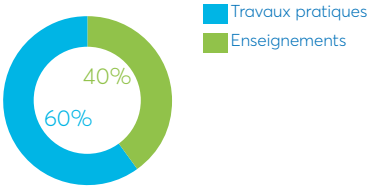
LES APRÈS-MIDI : LA PRATIQUE

- Mise en place de la méthode par quantification absolue avec sa gamme standard : extraction et purification d'ADN avec différentes méthodes, contrôle du dosage et pureté, plan de plaque, dilutions, établissement des standards, choix des fluorochromes, qPCR et interprétation des résultats
- Réalisation de courbe de fusion et leur interprétation
- Détermination de l'efficacité des amorces :
  - Méthode des dilutions en série et croisées,
  - Utilisation du principe de gradient de température sur des dilutions de standards
- Mise en place de la méthode par quantification relative avec utilisation du Δ Δ Ct avec et sans gamme standard :
  - Extraction et purification d'arn, contrôle du dosage et pureté, reverse transcriptase, plan de plaque, choix des fluorochromes, qpcr et interprétation des résultats
- Optimisation de l'ensemble des contrôles et surtout leur intérêt (référence au MIQE)
- Principe de détection utilisé : SYBR (EVA) Green, sondes à hydrolyse, Molecular Beacon

EQUIPEMENT

CFX96 (Bio Rad), Prime pro real time 48 (Techne).

RÉPARTITION DE LA FORMATION



Evaluation des acquis : QCM, TD et TP.

DURÉE : 4 JOURS

VWR INTERNATIONAL, FONTENAY-SOUS-BOIS
DU 15 AU 18 JUIN 2021

ÉCOLE DE L'ADN, NÎMES
DU 28 SEPTEMBRE AU 1 OCTOBRE 2021

2200 € NET - 8 STAGIAIRES MAXIMUM

RÉFÉRENCE : BB030

INTERVENANT : Stéphane THEULIER,
Université de Nîmes - Ecole de l'ADN de Nîmes