

PCR digitale: (dPCR)

OBJECTIFS

- Comprendre et appliquer les diverses méthodes et techniques de quantification des acides nucléiques ARN et ADN
- Acquérir les connaissances théoriques et pratiques de la dPCR
- Quantification absolue
- Avoir une vue d'ensemble des logiciels couramment utilisés pour l'analyse des résultats

PUBLIC CONCERNÉ

Tout public ayant des connaissances de bases en biologie moléculaire.

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

PROGRAMME

MATINS : COURS ET TRAVAUX DIRIGÉS

Rappel sur la technique de la qPCR

- Rappels sur les fondamentaux de la PCR quantitative, notion de C_q , 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

Présentation de la technique de la dPCR :

- Génération et partition en micro gouttelettes
- Préparation des échantillons
- Utilisation du système de fluidique
- Lecture par fluorescence
- Estimation de la quantification et concentration de la cible
- Correction de l'estimation avec la Loi Poisson et ses différents paramètres

Stratégies de la dPCR :

- Quantification absolue : détermination du nombre de copies d'un gène
- Variation du nombre de copies : CNV
- Détection d'un événement rare : mutation rare avec détermination de l'abondance d'une mutation dans un mélange de cellules normales
- Quantification de pathogènes : virus, bactéries, parasites
- Expression génique : intérêt pour visualiser de faibles variations d'expression

NORMES DIGITAL MIQE

Travaux dirigés :

- Design et conception des amorces, choix des amorces, résolution des problèmes de spécificité et de sensibilité
- Etude de cas et analyses de résultats à partir d'exemples



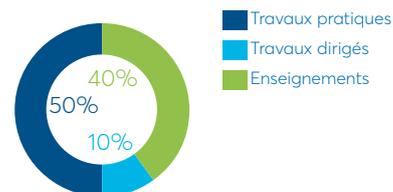
Après-midi : travaux pratiques

- Mise en place de la méthode de quantification absolue avec détermination du nombre de copies d'un gène et/ou quantification de pathogène : virus, bactéries, parasites ...
 - Extraction et purification d'ADN avec différentes méthodes
 - Contrôle du dosage et pureté
 - Préparation des échantillons
 - Plan de plaque
 - Lecture par fluorescence
 - Interprétation des résultats
- Mise en place de la méthode par expression génique avec pour intérêt la visualisation de faibles variations d'expression
 - Extraction et purification d'ARN
 - Contrôle du dosage et pureté
 - Reverse transcriptase
 - Préparation des échantillons
 - Plan de plaque
 - Lecture par fluorescence
 - Interprétation des résultats
- Optimisation de l'ensemble des contrôles et leurs intérêts (référence au Digital MIQE)

Equipement

- Principe de détection utilisées : EVA Green, sondes Taqman
- Travaux pratiques sur QX 200 et système NAICA

RÉPARTITION DE LA FORMATION



Evaluation des acquis : QCM, TD et TP.

DURÉE : 3 jours

LOCALITÉ : École de l'ADN, Nîmes

DATE : Du 18 au 20 Juin 2024

LOCALITÉ : VWR International, Rosny-sous-Bois

DATE : Du 19 au 21 Novembre 2024

COÛT : 2060 € NET - 6 stagiaires maximum

RÉFÉRENCE : BB037

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