

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

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 $\Delta \Delta Ct$



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 $\Delta \Delta Ct$ 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 : 3 jours

LOCALITÉ : École de l'ADN, Nîmes

DATE : Du 4 au 6 Juin 2024

LOCALITÉ : VWR International, Rosny-sous-Bois

DATE : Du 24 au 26 Septembre 2024

COÛT : 2060 € NET - 6 stagiaires maximum

RÉFÉRENCE : BB030

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