

## PCR en temps réel/quantitative.

### 1-Introduction:

Basée sur les mêmes méthodes que la PCR classique, la PCR en temps réel (=quantitative) permet de quantifier la quantité de matériel génétique introduit au début de la PCR. On l'utilise pour déterminer la **charge virale** (=nombre de copies de virus), **l'expression d'un ARN** (peu ou beaucoup transcrit dans la cellule), ou le **nombre de copies** d'un gène.

→ On n'oublie pas l'étape de reverse transcriptase pour toute PCR sur de l'ARN.

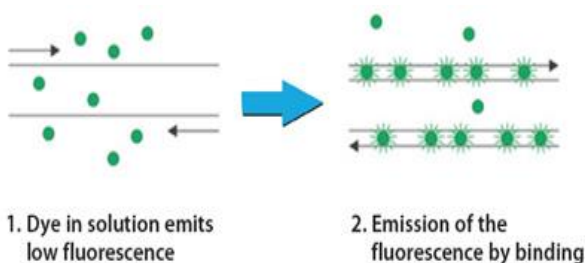
+++En PCR classique on utilise le **bromure d'éthidium** pour rendre l'ADN amplifié fluorescent **sous lampe UV** (visualisation des produits par électrophorèse sur gel d'agarose).///En PCR quantitative on utilise le **SYBR Green**+++

Le bromure d'éthidium et le SYBR Green sont des **agents intercalants**.

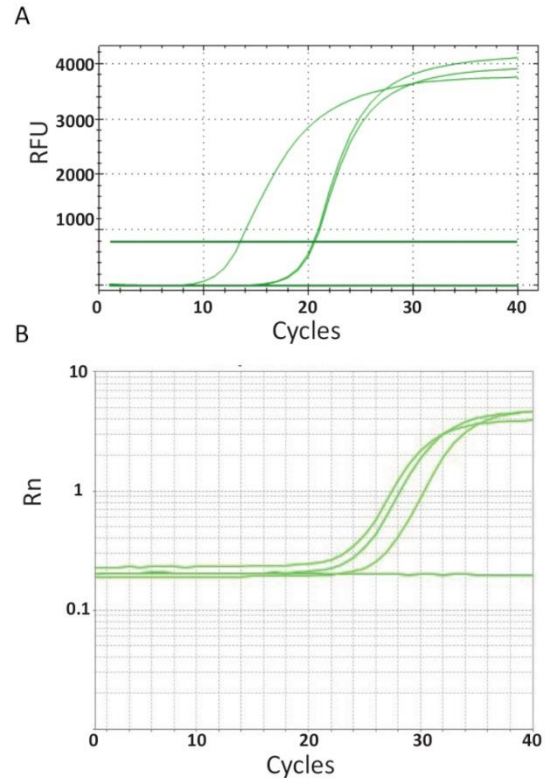
En PCR quantitative on mesure la fluorescence du mélange PCR à **chaque cycle** ( 35-40 fois) après chaque étape d'**élongation** .

Le SYBR Green s'intercale dans l'ADN **après** hybridation des amorces et **avant** l'élongation.

Le SYBR Green n'est fluorescent **que** s'il se trouve dans un **ADN double brin**.



**L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN produit.**



La courbe de l'intensité de la fluorescence dessine une sigmoïde ( 1 plateau inférieur : fluorescence trop faible pour être détectée / 1 plateau supérieur : système saturé, les réactifs manquent, la PCR s'arrête / 1 phase d'augmentation **exponentielle** de la fluorescence).

La quantité d'ADN est donnée par la position de la phase exponentielle : si la fluorescence est rapidement détectable ( au bout de peu de cycles ) alors la quantité d'ADN au départ est grande.

→ La partie verticale de la courbe est décalée vers la gauche.

Il y a une relation **linéaire** entre la quantité d'ADN et le nombre de cycle avant détection de la fluorescence.

ADN x10 -> fluorescence détectée 3,3 cycles plus tôt.

PCR en temps réel/quantitative.**2-Les sondes TaqMan:**

Les sondes TaqMan remplacent l'agent intercalant SYBR Green.

Les sondes TaqMan se comportent comme un **primer/amorce**.

Les sondes TaqMan sont des séquences d'ADN simple brin composées :

-d'un **quencher en 5'**

-d'un **fluorophore en 3'**

-> le quencher **empêche** le fluorophore d'être fluorescent lorsqu'ils se retrouvent à proximité( milieu réactionnel)

Cependant la Taq Polymérase possède une activité **exonucléasique** qui détache le quencher (dégradation de la sonde) et laisse seulement le fluorophore hybridé sur l'ADN.

→ Le fluorophore peut alors s'exprimer, l'ADN est fluorescent.

A la fin de l'élongation toutes les sondes hybridées sont fluorescentes : une mesure de la fluorescence **en fin d'élongation** rend compte de la quantité d'ADN.

Les sondes TaqMan donnent aussi la courbe sigmoïde exponentielle.

Fin !

C) Sondes Taqman

