

3.3 Variations sur un thème de PCR

Salut ! Dans la dernière vidéo, nous avons vu comment il s'est produit PCR, une technique très utile pour amplifier les fragments d'ADN désirés. Après avoir été inventé, variantes ont été développées pour la technique qui se multiplient leurs applications. C'est ce que nous allons voir dans cette vidéo.

RT-PCR

Vous vous souviendrez que la PCR est une technique d'amplification de l'ADN. Mais il y a beaucoup de virus qui ont un ARN génomique. Vous voulez dire que la technique ne vaut pas pour eux? Oui, ça OK, si vous entrez un petit pas. Après isolement et purification des ARN, utilisation de la transcriptase inverse ou RT pour synthétiser une molécule d'ADN complémentaire à partir de l'ARN pour la PCR classique. Sont actuellement disponibles auprès d'une enzyme polymérase recombinante dérivée de *Thermus thermophilus*, qui a la double fonction: Il synthétise l'ADN de l'ARN, agissant comme RT, et synthétise l'ADN de l'ADN comme la PCR classique. Il est résistant à la chaleur, donc toutes les réactions peuvent être effectuées à haute température, évitant les problèmes de la température inférieure à 42°C. Cette technique est appelée RT-PCR.

Nested PCR

Bien que la PCR est très sensible, parfois, il y a très peu d'ADN spécifique (ce que l'on veut détecter) dans l'échantillon à analyser, et vous devrez faire une deuxième amplification en utilisant le premier produit d'amplification comme un moule. Cette technique est appelée PCR nichée et emploie deux paires d'amorces, une externe et une interne à la première. Une caractéristique de cette technique c'est qu'après la première amplification (20 cycles), le produit est dilué, et peut donc éliminer les inhibiteurs présents dans l'échantillon original. En revanche, a l'inconvénient que, besoin de plus de manipulation, il y a un risque accru de contamination avec l'ADN étranger.

PCR Multiplex

Une autre variante de la PCR est appelée Multiplex. Il consiste à utiliser différentes paires d'amorces, chacune d'entre elles est spécifique à un autre virus. Si elles peuvent être détectées dans la même réaction de plusieurs pathogènes différentes, par exemple, différents virus respiratoires.

qPCR ou real time (rt)PCR

Une technique finale que nous verrons c'est la PCR quantitative ou en temps réel. Elle est abrégée comme qPCR ou rtPCR, mais vous ne pas se confondre avec la RT-PCR que nous avons déjà vu. Contrairement à la PCR classique, amplification de la molécule d'ADN surveille le problème au cours de chaque cycle d'amplification et pas à la fin. Ce résultat est obtenu par le biais de réactif fluorescent, fluorochromes appelés, qu'il existe deux types. Oh, et aussi parce qu'il y a des thermocycleurs qui ont un capteur pour mesurer la fluorescence pour quelques brèves secondes dans un temps spécifique de chaque cycle.

Le premier type de fluorochrome est pris en sandwich entre l'ADN double brin. Le plus couramment utilisé est un appelé SYBR Green. Le problème est qu'il peut aussi être inséré entre non-spécifiques structures formées par les amorces, interférer avec la mesure. Il a l'avantage que le même réactif, le fluorochrome, peut être utilisé avec toutes les paires d'amorces (et donc baisse des coûts), mais une séquence ne peut être détectée par tube.

Le deuxième type de fluorochrome est constitué à la fin d'une courte séquence d'ADN oligonucléotide de cet hybride spécifiquement avec la séquence à amplifier, à qui s'appellera

«sonde». À l'autre extrémité, la sonde a une molécule appelée «extincteur». Il s'agit d'un inhibiteur de la fluorescence. Lorsque la sonde est libre ou lâche n'émet pas de fluorescence, mais quand hybride avec la cible de l'ADN, l'état d'avancement de la sonde courte de Taq polymérase (parce que le Taq a activité exonucléasique), séparant l'extincteur du fluorochrome, et ce dernier émet à fluorescence d'être touché par un rayon laser. Comme la PCR il va par le nombre de molécules d'ADN, amplification augmenter les moules afin que les sondes seront joindra. Ce système est plus spécifique que l'autre, étant donné que la sonde est spécifique et en plus, sondes avec des couleurs différentes, peuvent être marqués ce qui peut détecter des cibles multiples dans le même tube et qu'il devienne un multiplex.

Ils comprennent souvent différentes dilutions d'un contrôle positif, afin de déterminer par comparaison avec les la concentration de l'ADN dans le problème de l'échantillon. Les valeurs déclarées sont habituellement représentés dans un Graphique logarithmique en fluorescence à chaque cycle. Le nombre de cycles au cours de laquelle la fluorescence dépasse le seuil cycle est appelé seuil ou Ct. Plus Ct signifie que l'échantillon prend plus de temps pour atteindre ce seuil et donc il a moins concentration d'ADN initiale.

Dans cette vidéo, nous avons vu la plus utilisée des variantes de la PCR: la RT-PCR, imbriquée, la PCR multiplex et quantitative. La PCR et toutes les variantes sont beaucoup utilisées. Assurez-vous que vous comprenez tout avant de continuer. Vous voir dans la vidéo ci-dessous !

Je vous remercie pour votre attention.