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

Objectifs

- 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, responsable de laboratoire

Connaissances exigées

Maîtriser les techniques de base de la biologie moléculaire.

Programme établi sur 40 % théorie et 60 % de pratique

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.

Durée : 4 jours

•École de l'ADN, Nîmes

Du 23 au 26 Octobre 2018

2180 €

Référence : BB030

Intervenant : Pr Christian SIATKA, Université de Nîmes - Ecole de l'ADN de Nîmes

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

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,

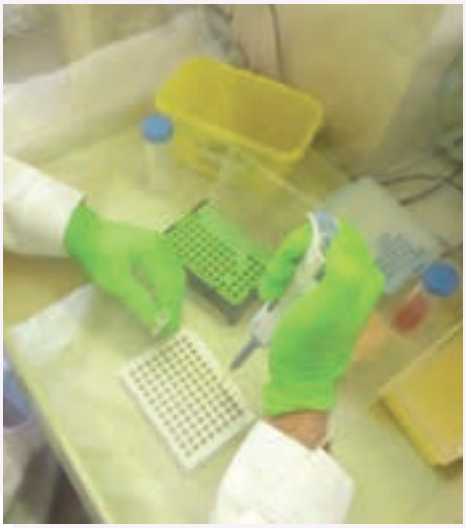
• Mise en place de la méthode par quantification relative avec utilisation du Δ Δ Ct avec et sans gamme standard : extraction et purification d'ARN, contrôle du dosage et pureté, reverse transcriptase, plan de plaque, choix des fluorochromes, qPCR et interprétation des résultats.

• Optimisation de l'ensemble des contrôles et surtout leurs intérêts (référence au MIQE).

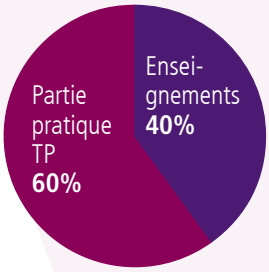
• Principe de détection utilisées : SYBR (EVA) Green, sondes à hydrolyse, Molecular Beacon

Equipement

• CFX96 (Bio Rad), Mini-opticon (Bio Rad), Prime pro real time 48 (Techne)



Répartition de la formation



Durée : 4 jours

• **École de l'ADN**, Nîmes

Du 23 au 26 Octobre 2018

2180 €

Référence : BB030

Intervenant : Pr Christian SIATKA, Université de Nîmes - Ecole de l'ADN de Nîmes