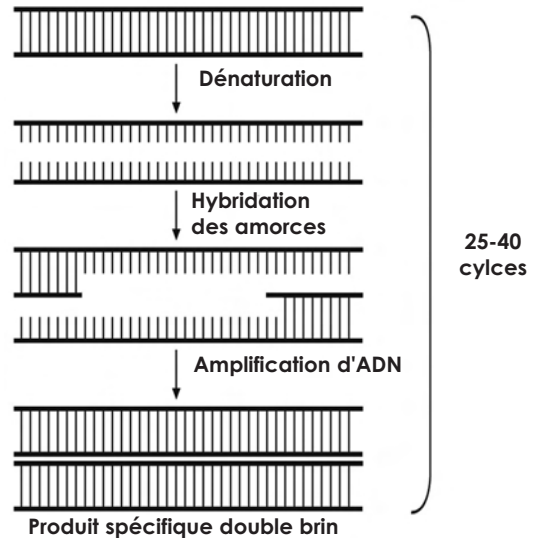


# Optimisez votre protocole de cycles thermiques

La polymérase Chain Reaction est une technique d'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorce. Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est une copie du brin codant et l'autre, une copie du brin non codant. Sous l'action d'une enzyme (l'ADN polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'→3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée (voir schéma). Cette réaction enzymatique dépend de nombreux facteurs.



## Choix de l'amorce

Prenez le temps de choisir la séquence d'ADN sur laquelle vous devez concevoir vos amorces.

Contrôlez l'alignement de la séquence avec des bases de données telles que EMBL Genbank et si possible utilisez un progiciel pour élaborer vos oligonucléotides.

La longueur de votre amorce (pb) et la teneur en GC déterminent sa température d'hybridation. Chaque amorce doit être assez longue pour être spécifique d'une cible et avoir une température de fusion élevée ( $T_m$ ), (18 à 24 pb sont recommandées) avec 40 à 60 % de teneur en GC. Essayez de localiser les bases G ou C dans les régions centrales et 5'.

Si les amorces sont trop courtes, ont une faible teneur en GC ou que les deux amorces présentent une température de fusion différente, la température d'hybridation la plus basse conduira à des produits non spécifiques.

La base modifiée 2-amino-dA (2,6-Diaminopurine 2-desoxyribose) peut être utilisée à la place de l'Adenosine pour augmenter la température de fusion puisque cette dernière forme une liaison hydrogène supplémentaire avec la Thymidine.

## Concentration en $MgCl_2$

La concentration en ion magnésium agit sur la performance des ADN polymérases et de l'hybridation de l'amorce.

L'ion  $Mg^{2+}$  libre a besoin d'être disponible pour l'activité enzymatique mais en trop grand nombre engendre une fidélité réduite et un risque accru d'amplification non spécifique.

De plus, l'ion  $Mg^{2+}$  se lie aux dNTP libres, à l'amorce et à la matrice, réduisant la quantité libre disponible.

L'optimisation de la PCR demande donc qu'un dosage en  $MgCl_2$  soit fait sur chaque amorce. Celui-ci peut être déterminé grâce au thermocycleur à gradient en utilisant la fonction d'optimisation de la température d'hybridation.



# Optimisez votre protocole de cycles thermiques

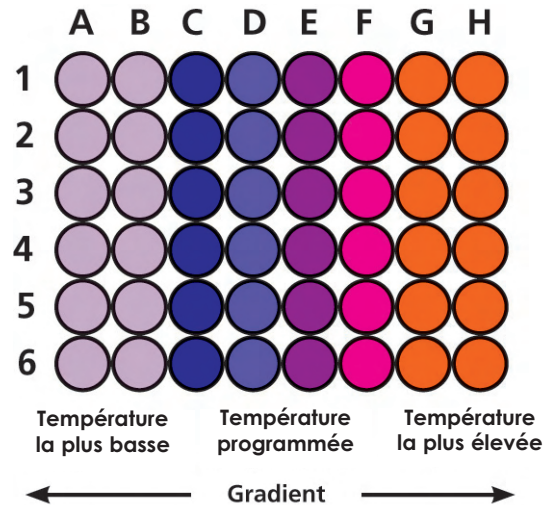
## Température d'hybridation

Le facteur le plus important est la température d'hybridation. La température d'hybridation calculée de vos amorces est en réalité uniquement une ligne directrice pour votre réaction. Il est nécessaire de réaliser un certain nombre de tests pour connaître la température d'hybridation optimale.

Le développement de thermocycleurs à gradient (modèles TC-3000G et TC-512 dans la gamme Techne) vous permettent de connaître les températures d'hybridation optimisées en une seule et même PCR.

Ils permettent de gagner un temps considérable et de réduire les quantités de réactifs et d'amorces coûteux utilisés.

Un gradient de température est programmé sur toute la longueur du bloc autour de la température théorique. La température calculée sera fixée dans la colonne du milieu du bloc et le gradient programmé sera la variation de température entre les deux extrémités du bloc. La colonne de gauche sera la plus froide et celle de droite la plus chaude. (voir schéma)



**Licensed for PCR**

En achetant un appareil PCR Techne, une immunité limitée et non transmissible contre toute poursuite vous est accordée et ceci pour la recherche et le développement interne. Cela est vrai pour tout champs d'application excepté le diagnostic humain in vitro sous patente Applied Biosystems LLC pour les thermocycleurs non « temps réel ».