

TD choix d'amorces pour PCR à l'aide d'Oligo 6

Table des matières

Table des matières.....	2
Facteurs influençant la réaction de PCR.....	3
Qualité de la matrice.....	3
Primers.....	3
Choix de la polymérase.....	3
MgCl ₂	3
dNTP.....	3
pH.....	4
Exemple de composition	4
Comment choisir des primers sur le web.....	4
Le logiciel Oligo 6.....	5
fenêtre Upper Primer Duplexes	5
Analyse-composition et T _m	6
Fenêtre PCR.....	7
Analyze – Oligonucleotide Frequency	7
Recherche de primers avec Oligo 6.....	8

Facteurs influençant la réaction de PCR

Qualité de la matrice

La qualité de l'ADN source (matrice) joue un rôle primordial :

- ♦ de fortes quantités d'ARN dans le mélange peuvent chélater les ions Mg^{2+} indispensables à la Taq.
- ♦ Si l'échantillon est mal purifié, il peut contenir des inhibiteurs de polymérases.
- ♦ L'intégrité de la matrice est primordiale (taille et qualité).
- ♦ La quantité doit être de l'ordre de 1 à quelques ng :
 - 500 ng d'ADN génomique maximum.
 - 1–10 ng d'ADN bactérien.
 - 0.1 – 1 ng d'ADN plasmidique.
- ♦ Des quantités moins importantes requièrent une augmentation du nombre de cycles ou une PCR Hot Start.

Primers

C'est le facteur primordial dans toute PCR, leurs caractéristiques doivent être les suivantes :

- ♦ longueur de 18–24 bases.
- ♦ ne pas contenir de structure secondaire interne (épingles à cheveux).
- ♦ contenir 40–60 % de GC.
- ♦ Ne pas avoir d'extrémités 3' complémentaires (sinon formation de dimères de primers).
- ♦ Avoir une T_m de 55–65° C (idéalement > 60°). La T_h est la $T_m - 5^\circ C$.
- ♦ Une concentration de 0.1 à 0.6 μM est généralement idéale. Plus pourrait conduire à une hybridation non spécifique des primers. Moins pourrait entraîner leur épuisement rapide.

Choix de la polymérase

- ♦ On utilise classiquement la Taq mais pour certaines applications elle est trop limitée.
- ♦ On utilise parfois un mélange Taq + Pfu qui, elle, possède une activité d'édition bien supérieure.
- ♦ De nombreuses polymérases existent : de la Taq la plus classique aux Pfu, Vent, etc. (activité d'édition, meilleure processivité, etc.)

1 U de Taq : quantité d'enzyme qui incorpore 10 nmoles de dNTP en 30 min dans un acide insoluble à 72°C.

MgCl₂

- ♦ Le Mg^{2+} forme un complexe soluble avec les dNTP pour produire le substrat nécessaire à la polymérase.
- ♦ Sa quantité est généralement fixée empiriquement : 1 à 5 mM (avec des dNTP à 200 μM)
- ♦ Une trop grande quantité favorise les hybridations non spécifiques (en abaissant la T_m)

dNTP

- ♦ A utiliser en égale quantité pour éviter les erreurs de polymérisation.
- ♦ Penser à augmenter les concentrations de $MgCl_2$ si l'on doit augmenter celles des dNTP
- ♦ La concentration est généralement de 50–500 μM (200 μM en moyenne).

pH

- ♦ 8.3 à 9 est la fourchette optimale pour la Taq.

Tampon PCR : tris-HCl pH 9, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1 % Triton X100, 0,1 % Gélatine (m/v)

Exemple de composition

Pour une PCR sur 50 µL :

	V (µL)	Concentration finale
Tampon PCR 10 X	5	1 X
DNTP 2.5 mM	4	200 ng/µL
Primer 1 (25 µM, 165 ng/µL)	1	0.5 µM
Primer 2 (25 µM, 165 ng/µL)	1	0.5 µM
ADNc	2	
H2O QSP 50 µL	36.5	
Taq-polymerase 5 U/ µL	0.5	0.05 U/µL

On considère que les primers sont des 20-mères.

Composition du tampon 10 X : 100 mM Tris-HCl pH9, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1 % triton X-100, 0.1 % Gélatine (m/v)

Comment choisir des primers sur le web

- 1- aller sur le site du NCBI.
- 2- entrer les mots clés.
- 3- sélectionner la séquence d'intérêt.
- 4- choisir le format Fasta.
- 5- Copier la séquence.
- 6- Aller sur la page suivante :
http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
- 7- coller la séquence.
- 8- fixer les paramètres comme souhaité.
- 9- lancer la recherche.

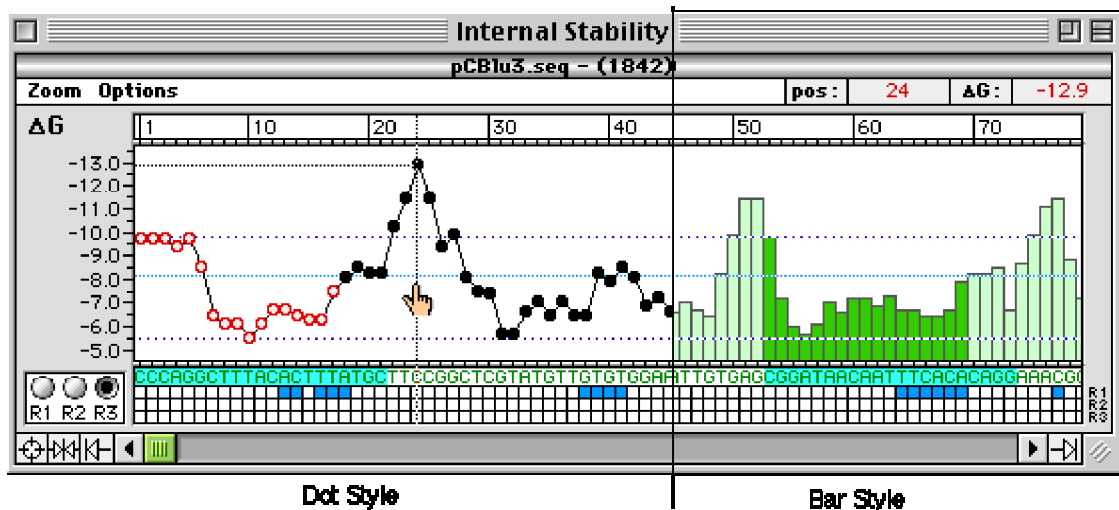
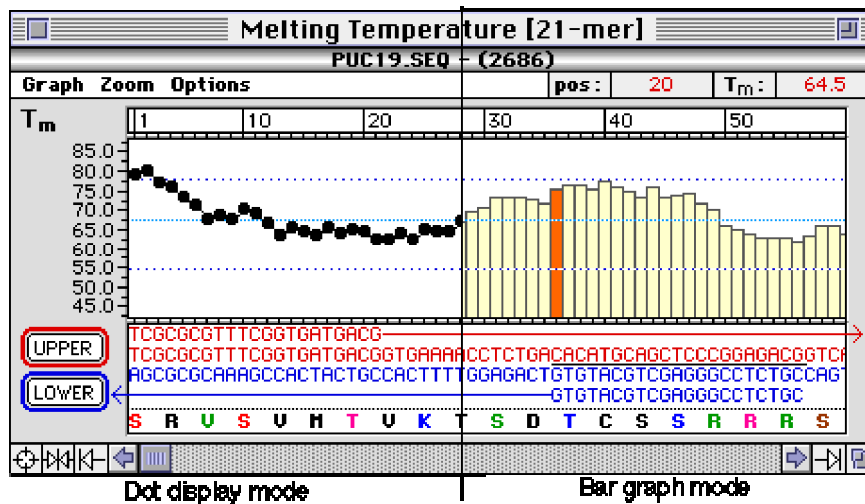
Le logiciel Oligo 6

www.oligo.net

Ce logiciel, dont la première version commerciale remonte à 1989 permet l'analyse et la recherche de primers dans des séquences.

3 fenêtres principales :

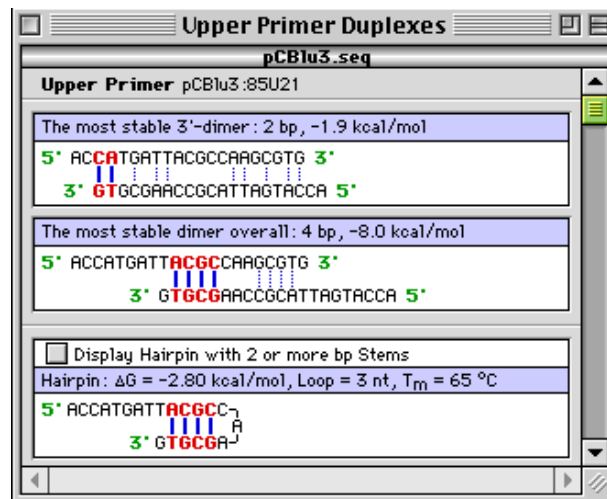
- ♦ courbe de T_m de la séquence.
- ♦ Courbe de l'énergie libre de formation des duplexes de pentamères (Delta G en kcal/mol).
- ♦ Courbe de fréquence des 6-mères.



fenêtre Upper Primer Duplexes

Les informations de la fenêtre Upper Primer Duplexes :

- Le dimer de primer en 3' le plus stable.
- L'alignement (dimer) de primer le plus stable.
- La structure en épingle à cheveux la plus stable, si elle existe.
- Les valeurs de stabilité interne pour le plus grand duplex (en gras) pour chaque alignement et pour la structure en épingle à cheveux sont exprimées en kcal/mol et en T_m pour l'épingle à cheveux..



Analyse-composition et T_m

Plusieurs températures sont données : en fonction de différentes concentrations et de différents tampons.

T_d la température de dissociation sur filtre = T_m de 100 pM oligo dans 1M sels.

Lower Primer Composition

pCBlu3.seq

Lower Primer pCBlu3:287L21

$T_d = 63.7^\circ$ [nearest neighbor method]
 $T_m = 73.4^\circ$ [%GC method]
 $T_m = 62^\circ$ [$2(A+T)^\circ + 4(G+C)^\circ$ method]

$T_m(\text{RNA})[1\text{M Na}] = 83.7^\circ$ [%GC method]
 $T_m(\text{DNA:RNA})[1\text{M Na}] = 77.5^\circ$ [%GC method]

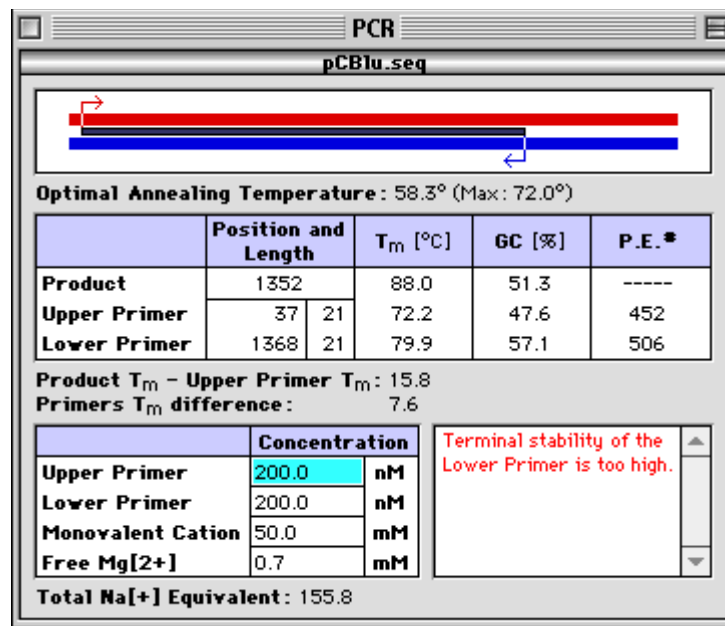
$A_{260}/A_{280} = 1.93$ [single strand]
 $Mr = 6.6\text{K}$ [one strand]
 $Mr = 13.0\text{K}$ [two strands]
 $\mu\text{g}/\text{OD} = 47.4$ [dsDNA]

Base	Number	%
A	6	[28.6%]
C	4	[19.0%]
G	6	[28.6%]
T	5	[23.8%]
A + T	11	[52.4%]
G + C	10	[47.6%]

[mM]	xSSC	0%	10%	50%
1	0.006	27.4	20.9	-5.1
10	0.06	44.0	37.5	11.5
50	0.3	55.4	48.9	22.9
165	1	63.4	56.9	30.9
330	2	67.7	61.2	35.2
500	3	70.1	63.6	37.6
1000	6	73.4	66.9	40.9

mism. #	T_m	mism. #	T_m
0	63.7	3	46.5
1	58.0	4	40.8
2	52.3	5	35.1

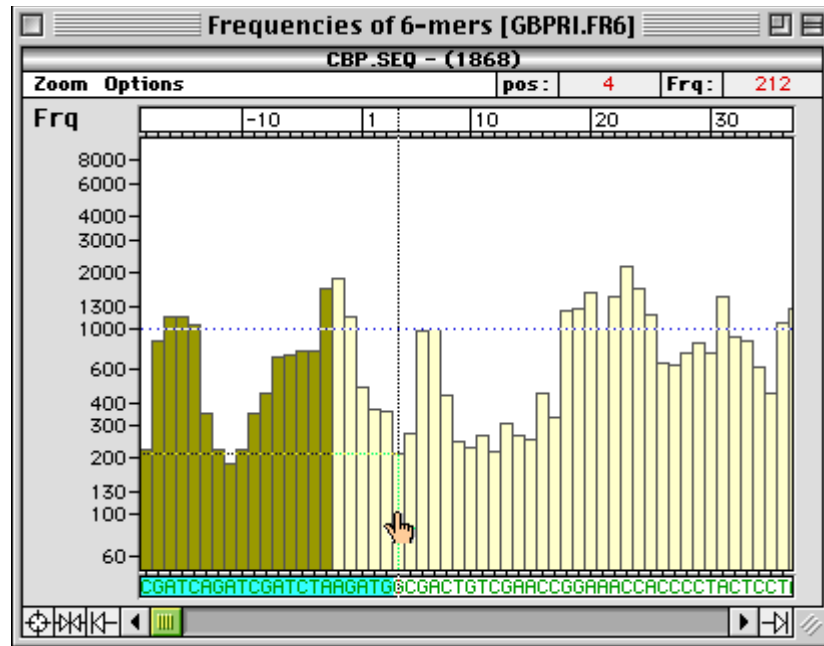
Fenêtre PCR



Les facteurs de la PCR sont résumés dans cette fenêtre. On peut changer les concentrations en sels pour améliorer l'efficacité. PE : Primer Efficiency, valeur calculée permettant d'estimer la qualité des primers. Plus elle est élevée, plus les primers sont fiables.

Analyze – Oligonucleotide Frequency

Cette fenêtre montre la fréquence relative de chaque sous-séquence (6- ou 7-mère) dans la séquence initiale. Les primers ayant des extrémités 3' « communes » par rapport à un sous-ensemble d'une banque spécifique (GenBank) ont plus de chances d'avoir des sites de misappariement. Les tables de fréquences sont localisées dans un répertoire et peuvent être choisies par l'utilisateur, par exemple la table de fréquence pour les séquences GenBank de primates. Elles contiennent les fréquences normalisées de chaque 6- ou 7-mère. Cela permet de choisir des primers ayant statistiquement peu de sites de misappariement, surtout lorsque la PCR sera réalisée sur de l'ADN génomique.



Recherche de primers avec Oligo 6

Menu **Search**, choisir **For Primers and Probes**

Fixer les paramètres puis lancer la recherche.

Un liste est créée si des primers remplissent les conditions requises.

En général, on trie par GC % (un GC % faible permettra une amplification plus facile. Puis on sélectionne par Ta : plus la Ta est élevée, plus les primers seront stables lors de l'hybridation).

1 UDO \rightarrow 50 $\mu\text{g/mL}$ d'ADN

1 unité de polymérase : quantité d'enzyme qui incorpore 10 nmoles de dNTP en 30 min. dans un acide insoluble à 72 °C

Pour des oligonucléotides jusqu'à 20-mères : on utilise la formule classique

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Pour des oligonucléotides plus longs :

Calcul de la T_m par la technique du nearest-neighbor :

$$T_m = [\Delta H \times 273.15 + 16.6 \log[\text{sels}]] / (A + \Delta S) + R \ln(Ct/4)$$

H (cal mol^{-1}) : somme de l'enthalpie de changement des nearest-neighbors pour la formation des hybrides (>0).

A ($\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$) : constante pour l'initiation d'hélice qui est égale à $-10.8 \text{ cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ pour des séquences non complémentaires et $-12.4 \text{ cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ pour des séquences complémentaires.

S ($\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$) : est la somme de l'entropie de changement des nearest-neighbors pour la formation des hybrides (>0).

R est la constante molaire des gaz : $1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$.

Références :

Breslauer K.J et al. (1986) : « Predicting DNA duplexe stability from the base sequence ». PNAS 83, 3746–3750.

Freier S.M. et al. (1986) : « Improved free energy parameters for predictions of RNA duplexe stability ». PNAS 83, 9373–9377.

Schildkraut C. et al. (1965) : « Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. Biopolymers 3, 195–208.

Question : On cherche à amplifier une séquence de 500 pb environ entre 200 et 700. Effectuer une recherche et reporter les primers obtenus, la T_a , la T_m de chaque primer et schématiser la séquence ainsi que les sites d'hybridation en considérant que les concentrations sont celles données en exemple dans ce poly.

Ampli de 501 pb (218 à 698)

T_m upper : 74.1 °

T_m lower : 78.8 °

T_a opt : 61.7 °

Avec primers à 500 mM et Mg^{2+} à 1.5 mM.