

Guide sur le PCR en temps réel (qPCR)

Un service complet est offert par la plateforme de génomique de l'IRIC pour le qPCR incluant l'analyse de votre ARN, la préparation de vos cDNA, le design des essais, la validation et l'analyse de vos résultats. Vous pouvez aussi préparer les réactions vous-même et utiliser par la suite notre appareil Via7 de Life Technologies. Ce document constitue un guide sur les différentes étapes d'une expérience de qPCR.

Si vous avez des questions sur le service ou que vous avez besoin d'aide pour votre expérience de qPCR, vous pouvez contacter Raphaëlle Lambert à raphaelle.lambert@umontreal.ca ou visiter www.genomique.irc.ca

1. Avant de commencer

Il y a plusieurs détails importants dans une expérience de qPCR, et il faut bien planifier avant de commencer si on veut des bons résultats fiables. Voici certains points à considérer.

Contrôles endogènes

Tout d'abord, il vous faudra des contrôles endogènes. Ils sont essentiels car toute l'analyse est basée sur eux. Ils permettent de contrôler la variation entre les échantillons (quantité d'ARN). Ces gènes ne doivent pas varier dans vos échantillons peu importe le traitement. Voici des exemples que nous avons à la plateforme, mais il en existe des dizaines que vous pouvez utiliser : GAPDH, ACTB, TBP, HPRT, PPIA, YWHAZ. Nous recommandons d'utiliser un contrôle endogène qui est exprimé en quantité semblable aux gènes tests, et d'en utiliser idéalement plusieurs. Le 18S n'est pas recommandé, car il est présent en trop grande quantité comparé aux gènes normaux et ce n'est pas un ARNm.

Si vous n'avez aucune idée quel contrôle utiliser, faites d'abord un test avec plusieurs contrôles et choisissez ceux qui varient le moins entre les échantillons. Vous pouvez utiliser le logiciel GeNorm pour déterminer quel contrôle utiliser et combien en utiliser pour réduire au maximum la variabilité entre les échantillons (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Habituellement, un seul contrôle est choisi pour l'analyse. Mais c'est aussi possible de calculer vos résultats avec plusieurs contrôles endogènes, ce qui améliore la précision des résultats.

Échantillon calibrateur

Vous aurez besoin d'un échantillon calibrateur afin de baser les valeurs relatives d'expression sur cet échantillon (exemple : le gène X est exprimé deux fois plus dans l'échantillon Z que dans l'échantillon calibrateur). Cet échantillon représente le contrôle sans traitement ou temps zéro, et les modifications d'expression des gènes seront calculées par rapport à lui. Donc, il doit ressembler le plus possible aux échantillons traités.

Répliquats biologiques

Lorsque vous planifiez votre expérience, gardez toujours en tête qu'il est bon d'avoir des répliquats biologiques de chacun de vos échantillons (au moins trois). Il sera plus facile par la suite d'évaluer vos résultats de façon statistique et d'être certain que ce que vous voyez est réel. Il est important que les 3 répliquats soient faits en même temps : l'extraction d'ARN en même temps, la RT en même temps, etc. Ils doivent être traités de la même façon du début à la fin (dans la mesure du possible). Il faut éliminer le plus possible les variations expérimentales, afin d'observer les variations biologiques réelles.

Si vous planifiez faire des statistiques sur vos résultats, utiliser les répliquats biologiques, et non les répliquats techniques du qPCR. Si vous voulez rassembler des résultats ensemble, ne faites pas trois expériences à trois semaines différentes. Les résultats seront quand même

bons et significatifs, mais d'une semaine à l'autre, les Fold Changes ne seront pas exactement les mêmes. Donc, vous ne pourrez pas les réunir dans une même figure.

Voici un article intéressant sur les étapes du qPCR:

The MIQE guidelines

The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22. Epub 2009 Feb 26

Préparation de l'ARN

Vous devez faire votre propre extraction d'ARN total. Qu'il s'agisse de cellules ou de tissu, une extraction au Trizol ou avec une colonne fonctionne très bien. Aussi, l'extraction d'ARN peut s'avérer plus difficile pour certains tissus, parfois il est préférable d'utiliser une colonne spéciale, ou rajouter une colonne après le trizol, renseignez-vous.

Éviter l'inhibition

Si vous faites une extraction au Trizol, faites bien attention de ne pas transférer de solvant lorsque vous transférer le surnageant après la centrifugation. Les solvants peuvent inhiber la réaction de Transcription Inverse et de PCR. Toujours en prendre moins et en laisser derrière plutôt que de transférer des débris.

Lorsque vous analysez votre ARN au spectrophotomètre, assurez-vous d'avoir un ratio 260/280 entre 1.8 et 2 et un ratio 260/230 de 1.8 ou plus. Les acides nucléiques sont détectés à 260nm, et les protéines, sels et solvants sont détectés à 230 et 280nm.

Éviter la dégradation

Il est très important d'avoir un ARN de très bonne qualité. Aucune dégradation n'est acceptée. Si votre ARN est dégradé, il se retrouve en petits morceaux. Le qPCR pourra amplifier quand même car les essais qPCR sont de petite taille (60-150pb). Mais la dégradation introduit un biais inacceptable dans l'expérience.

Afin d'évaluer l'état de votre ARN, vous pouvez le mettre sur gel (RNase free) ou l'analyser avec notre Bioanalyzer (Fig. 1). Vous devez voir deux bandes (les sous-unités 18S et 28S) et aucune autre bande.

S'assurer d'avoir une bonne quantité

Il faut toujours quantifier votre ARN (spectro, nanodrop) avant de l'apporter à la plateforme ou de faire le cDNA. Pour calculer la quantité d'ARN nécessaire, prévoir environ 25 ng par réaction PCR individuelle.

Exemple : 5 échantillons à faire sur 10 gènes tests + 2 gènes endogènes

12 gènes x triplicata = 36 réactions
36 réactions x 25 ng = 900 ng d'ARN par échantillon

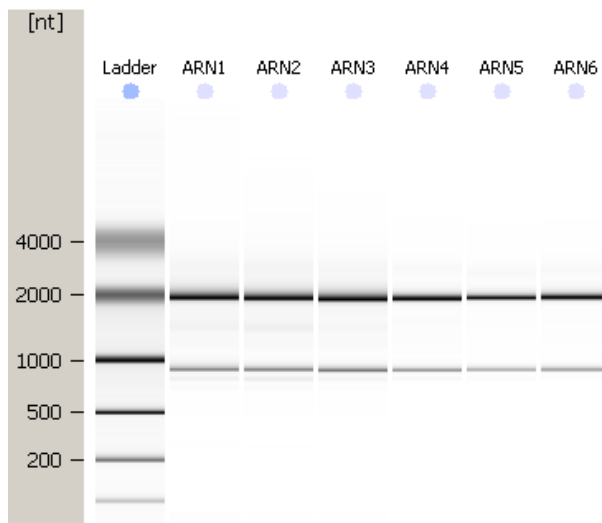


Fig 1. Migration d'échantillons d'ARN total sur un Bioanalyzer de Agilent

2. Synthèse du cDNA à partir de l'ARN total

Avant de faire l'expérience de qPCR comme tel, il faut transcrire l'ARN en cDNA. Il s'agit d'une réaction enzymatique à l'aide de la transcriptase inverse.

Le kit que nous utilisons est le « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » de Applied Biosystems. Plusieurs autres kits existent sur le marché, l'important est d'avoir une réaction faite à l'aide de Random Primers, qui sont des oligonucléotides dégénérés qui s'apparient partout. La RT avec un oligo dT (qui se lie à la queue Poly-A) n'est pas recommandée car elle favorise les essais situés près du 3' de l'ARNm. Un kit qui utilise à la fois un oligo dT and des random primers est bon.

Lorsque vous faites une série de RTs, il est intéressant de prévoir un échantillon noRT (no reverse transcriptase). Cet échantillon contient l'ARN et tous les ingrédients de la RT sauf l'enzyme. Normalement, ce contrôle devrait être négatif/pas d'amplification, ou une amplification très tardive (>10 cycles après les autres échantillons). Par contre, si l'échantillon d'ARN est contaminé avec de l'ADN génomique, il amplifiera. Évidemment, la plupart des essais sont faits pour ne pas détecter l'ADN génomique (inter-exons), mais parfois il est impossible de faire un essai inter-exon, et de toute façon la présence d'ADN génomique n'est pas souhaitée. Il est possible de traiter l'ARN à la DNase s'il est contaminé.

Si vous surexprimez un gène dans vos cellules, n'oubliez pas la présence du vecteur dans votre ARN total. Si le vecteur contient la séquence codante du gène, vous allez amplifier cette séquence avec votre essai qPCR et le signal peut fausser les résultats. Faites un traitement à la DNase et un contrôle noRT. Notez qu'il est parfois difficile de se débarrasser d'un vecteur.

Préparer une RT selon vos besoins. Avec 2ug, vous pourrez tester jusqu'à 20 gènes. Avec 5ug, vous pourrez tester jusqu'à 60 gènes. Si vous arrivez juste dans votre quantité d'ARN, mettre le maximum d'ARN que vous pouvez et faites un test ensuite.

Recette de la RT selon la quantité d'ARN dans chaque réaction

Composantes	2ug	5ug
10X Reverse Transcript Buffer	2 µl	5 µl
10X Random primers	2 µl	5 µl
25X dNTPs	0.8 µl	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase enzyme (50U/µl)	1 µl	2.5 µl
ARN (2ug ou 5ug)	x µl	x µl
H ₂ O (compléter)	x µl	x µl
Total	20 µl	50 µl

Mettre les échantillons à 25°C pour 10 min et ensuite à 37°C pour 2 heures. Lorsque la réaction est terminée, conserver les échantillons à -20°C.

La seule façon de vérifier si la RT a bien fonctionné, c'est de l'amplifier par qPCR. Un premier test pourrait par exemple être avec différents contrôles endogènes. Les courbes devraient sortir à un Ct connu pour ces gènes et devraient être groupées ensemble (si vous avez mis la même quantité d'ARN dans chaque réaction).

3. Design des essais qPCR

Pour chacun des gènes que vous voulez tester, il faut faire un essai qPCR. Il existe deux principales technologies : le SYBR Green qui s'intercale dans l'ADN double-brin et le Taqman qui fonctionne avec une sonde fluorescente. Nous préférons utiliser la technologie Taqman, car elle nécessite moins de mise au point et est plus spécifique, mais les deux techniques sont valables.

Ne jamais faire confiance à des oligos provenant d'un article. Nous recommandons de toujours faire le design vous-même. Si vous devez absolument utiliser des oligos d'une publication, il faut toujours vérifier s'ils détectent le bon gène, si la taille de l'amplicon est normale, et toujours refaire une validation avant de les utiliser (courbe standard et courbe de dissociation si c'est en SYBR).

Nous possédons la librairie de sondes UPL (Universal probe library de Roche) pour l'humain et la souris (#1 à #110), et il est possible d'utiliser ces librairies pour faire des essais chez d'autres espèces. Cette technologie est basée sur le principe TaqMan sauf que la taille des sondes est limitée à 8 nucléotides (certains additifs sont ajoutés afin d'augmenter le Tm de la sonde). Ces petites sondes se fixent à plusieurs endroits dans le génome, mais lors de l'essai qPCR, on combine cette sonde aux 2 amorces et l'essai est très sensible et spécifique. Cette librairie permet de détecter 99% des gènes humain et souris.

Si vous êtes à l'IRIC et que vous voulez faire vos essais vous-même, vous avez la possibilité d'utiliser notre librairie de sondes UPL. Si vous n'êtes pas à l'IRIC et que vous voulez faire vos essais vous-même, nous suggérons d'utiliser le SYBR Green car le prix d'une sonde Taqman individuelle spécifique est assez élevé (autour de 125\$ par gène). Le design d'un essai SYBR suit les mêmes recommandations qu'un essai Taqman sauf qu'il n'y a pas de sonde, et le mix qPCR à utiliser lors de la réaction finale doit contenir du SYBR Green.

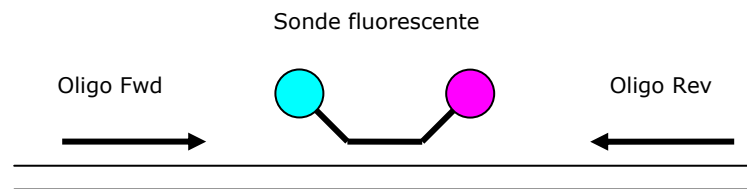


Fig2. Essai qPCR en Taqman

L'essai qPCR Taqman consiste en deux oligonucléotides spécifiques et une sonde fluorescente. Lors de l'amplification, la sonde est dégradée par la Taq polymérase et la fluorescence est libérée. En solution, la fluorescence (rose) est captée par le quencher (bleu) et n'est pas émise.

Voici le lien pour faire le design d'essais avec la librairie UPL :

www.universalprobelibrary.com

Si vous faites vos propres essais avec la librairie UPL, voici quelques points à surveiller :

- Taille entre 60 et 125 pb
- Sélectionner un essai qui chevauche deux exons. L'intron doit être d'une taille supérieur à 500pb pour éviter son amplification si votre échantillon contient de l'ADN génomique. Le logiciel vous indique les introns à l'aide d'un triangle inversé.
- Noter la séquence des oligos et le numéro de la sonde (#1 à #110)

4. Validation des essais / Courbe standard

Pour chacun des essais qPCR, il faut faire une courbe standard afin de vérifier 3 choses :

- 1- Est-ce que l'essai fonctionne?
- 2- Est-ce que le gène est présent dans mes échantillons?
- 3- Est-ce que l'efficacité de la réaction PCR est de 100%?

Resuspendre les oligonucléotides à 100 uM. Puis, faire un mélange des deux oligos : 25ul de l'oligo forward et 25ul de l'oligo reverse pour obtenir un mix à 50uM.

Pour faire la courbe standard, vous pouvez utiliser 4 dilutions en série: 1:5, 1:25, 1:125 et 1:625. On peut faire cette expérience en duplicata. Il est plus pertinent de faire les dilutions avec un cDNA (ou un mix de plusieurs cDNA) semblable à celui qui sera utilisé dans l'étude subséquente. Si ce n'est pas possible, vous pouvez utiliser un cDNA universel (comprenant plusieurs tissus différents). Il est important que le premier point de la courbe soit une dilution. Ne pas utiliser un cDNA « non dilué ». Premièrement parce que le cDNA est précieux, et deuxièmement parce que la solution de RT contient des inhibiteurs pour le PCR et il se produit toujours un peu d'inhibition dans la réaction PCR lorsque ces inhibiteurs sont en trop forte concentration.

Si votre essai est en SYBR, il vous faudra faire une courbe de dissociation (melt curve). Elle doit donner un seul pic (pour un seul produit PCR).

Comment savoir si mon essai est bon?

1- Aspect général des courbes PCR

Lorsque vous regardez les résultats, la première chose à regarder est à quel cycle l'essai sort. La première dilution doit sortir à un cycle respectable (environ 20-30). Si le gène sort à un cycle tardif (30-35), il y a de très bonnes chances que les résultats soient de mauvaise qualité. Il faut voir au moins 3 points de la courbe. Les duplicata doivent être beaux et ensemble, et les courbes doivent être belles et pas brouillées. Le plus tard une courbe sort, le plus de variations il y aura entre les répliquats.

2- Courbe standard

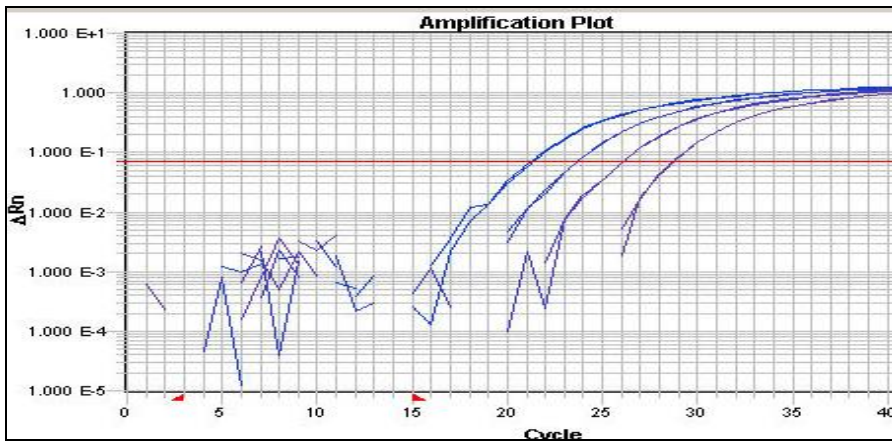
La pente de la courbe standard doit se situer idéalement à -3.33 (efficacité de 100%). Dans la pratique, nous acceptons une pente entre -3.1 et -3.6 (90% à 110% d'efficacité).

L'important, c'est d'avoir une efficacité similaire pour tous les essais qu'on veut comparer ensemble. Donc, le gène test et le gène endogène doivent avoir une pente similaire (entre 90 et 110% d'efficacité). Si l'essai n'est pas assez efficace, il sortira un peu plus tard, et cette petite différence peut faire varier les résultats finaux. Il ne faut pas oublier que 1 cycle de différence équivaut déjà à un fold change de 2.

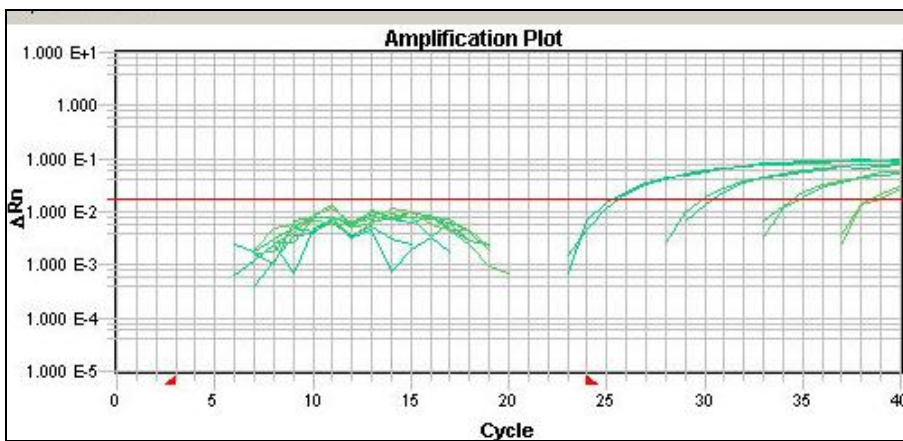
Si la pente n'est pas acceptable, vous pouvez tenter de refaire la courbe une deuxième fois et si elle n'est toujours pas belle, essayez d'autres oligos (un nouvel essai), ne perdez pas votre temps à mettre au point une paire d'oligos. Si vous avez seulement 1 ou 2 gènes, nous suggérons de commander peut-être deux paires d'oligos dès le départ, afin d'avoir plus de chance d'en avoir un bon et ainsi sauver du temps.

Souvenez-vous que chaque essai qPCR a sa propre personnalité. Deux essais pour le même ARNm ne sortiront pas nécessairement au même cycle et n'auront pas la même efficacité. En plus, tout ceci dépend des échantillons que vous testez. Et n'oubliez pas que parfois, il est possible qu'un gène ne soit pas être exprimé dans vos échantillons.

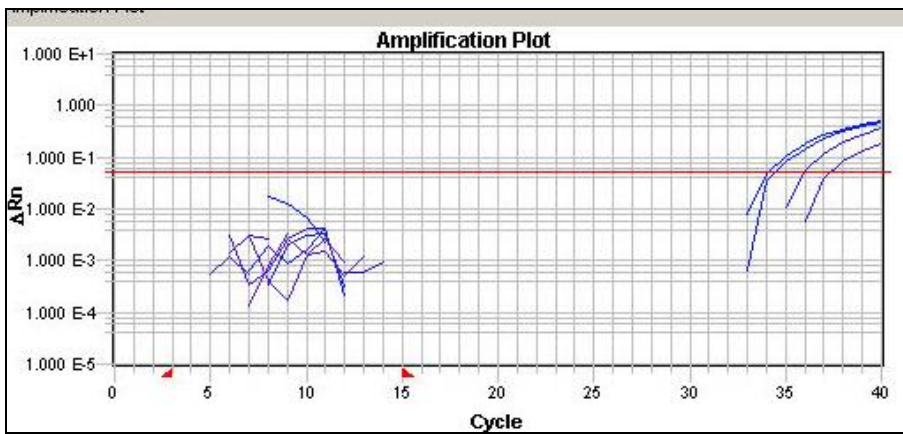
Exemples de courbes qPCR pour faire une courbe standard



Essai parfait, pente de -3.3



Efficacité PCR très faible, 70%



Ici, les courbes sortent trop tard, et les duplicata ne sont pas suffisamment ensemble. Soit les oligos ne fonctionnent pas bien, soit le gène n'est pas assez exprimé.

Intervalle des valeurs acceptables pour l'efficacité d'un essai qPCR

Pente	Amplification	Efficacité (%)
-3.60	1.8957	89.57
-3.55	1.9129	91.29
-3.50	1.9307	93.07
-3.45	1.9492	94.92
-3.40	1.9684	96.84
-3.35	1.9884	98.84
-3.30	2.0092	100.92
-3.25	2.0309	103.09
-3.20	2.0535	105.35
-3.15	2.0771	107.71
-3.10	2.1017	110.17

$$\text{Amplification} = 10^{(-1/\text{pente})}$$

$$\text{Efficacité} = [10^{(-1/\text{pente})}] - 1$$

5. Réactions qPCR

Toutes les réactions sont faites en duplicata technique pour tous les échantillons et pour tous les gènes, même si vous avez des triplicata biologiques.

Ne pas oublier le contrôle noRT et rajouter un contrôle NTC (no template control) en remplaçant le cDNA avec de l'eau.

Il est important de diluer la réaction de RT (min 1:2, max 1:10), car les réactifs de la RT peuvent causer de l'inhibition dans la réaction de qPCR.

Nous utilisons des plaques de 384 puits et une réaction totale de 10 µl. Le qPCR Master Mix que nous utilisons est le *Taqman Fast qPCR MasterMix* de Applied Biosystems (Roche, Qiagen et Invitrogen sont aussi des bons choix). Les mix qPCR « fast » permettent d'utiliser un programme PCR plus rapide (1h plutôt que 1h30 pour 40 cycles).

Recette pour les essais Roche avec la librairie UPL

Composantes	Pour 1 réaction	[] initiale	[] finale
2X qPCR Master Mix	5 µl	2X	1X
Amorces (mix de F et R)	0,05 µl	50 µM	250 nM
Sonde UPL (diluée 1/10)	1 µl	1 µM	100 nM
cDNA (environ 5-25ng)	1.5 µl	---	---
H ₂ O	2.5 µl	---	---
total	10 µl		

Recette pour les essais en SYBR

Composantes	Pour 1 réaction
2X SYBR Master mix	5 µl
Amorces (mix de F et R)	0.05 µl
cDNA (environ 5-25ng)	1.5 µl
H ₂ O	3.45 µl
total	10 µl

Programmes qPCR FAST et régulier

	95°C	95°C	60°C
Fast	3 min	5 sec	30 sec
Normal	10 min	15 sec	1 min

40 cycles

Pour l'analyse de résultats, voir document « How to deal with qPCR results ».