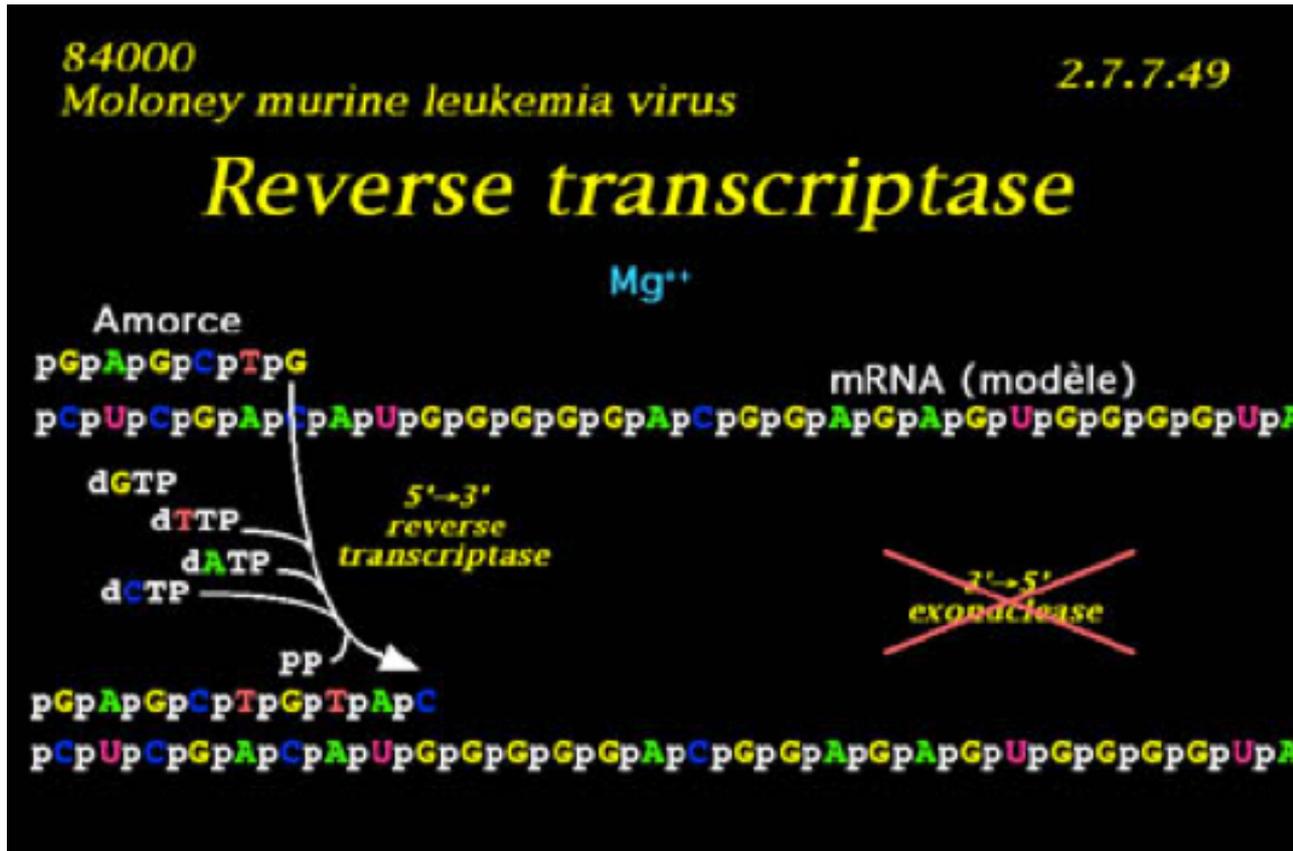


Techniques d'Analyse Moléculaire



Dr AMIROUCHE A.

Licence Biochimie (2020/2021)

Chapitre 3

A-

1- Principe

2- Dessin Des Couples d'amorces Références

2- RT - Reverse transcriptase (Transcription inverse)

3- Quantification de l'ADNc (RT-qPCR)

2- RT - Reverse transcriptase (Transcription inverse)

Principe

Quantifier l'expression d'un gène d'intérêt revient à mesurer la quantité de son ARN messenger présent dans un tissu donné. Au préalable, il est nécessaire de réaliser une étape de transcription inverse.

Principe

Les transcriptases réverses sont des DNA polymérase qui peuvent synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc ou cDNA) en prenant un ARN comme matrice, pour former un hybride ADN:ARN. Elles catalysent donc la réaction inverse de la transcription, d'où le nom de transcriptases réverses.

Les transcriptases réverses sont produites par des cellules infectées par des rétrovirus, virus à ARN qui font synthétiser un ADNc par la cellule-hôte afin de permettre leur réplication.

La transcriptase réverse est utilisée pour l'étude des ARN. Après la synthèse de l'ADN complémentaire, on détruit l'ARN matrice, puis on soumet l'ADNc à l'amplification par la PCR, qui fournit une grande quantité d'ADNc hybridé avec une copie ADN de la séquence de l'ARN de départ

1) Synthèse de l'ADNc

La synthèse d'ADNc est catalysée par des *transcriptases inverses* (*reverse transcriptase RT* en anglais). Ces enzymes sont des **ADN polymérase ARN dépendantes**, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire (cf. tableau ci-dessous). Cela correspond effectivement à l'«**inverse**» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN.

ARN matrice	Appariement	ADNc synthétisé
A	avec	T
U	avec	A
G	avec	C
C	avec	G

Les transcriptases inverses sont issues de **rétrovirus** dont elles sont une des principales caractéristiques.

Exemples : la transcriptase inverse du Virus du Myéloblastome Aviaire (AMV), celle du Virus de la Leucémie Murine (Mo-MLV ou Mu-LV).

Protocole

› *Extraction et purification de l'ARN :*

1. Se référer à la fiche technique spécifique du tissu d'intérêt (muscle, tissu adipeux ou tumeur).

› *Mesure de la concentration en ARN :*

1. Se référer à la fiche technique.

› *Préparation du calibrateur pur :*

Le calibrateur est un mélange de l'ARN de tous les échantillons. Il est spécifique de chaque tissu de chaque étude. Il est utilisé pour établir la courbe d'efficacité.

1. Prélever un même volume de chaque échantillon d'ARN à étudier.
2. Transférer chaque volume prélevé dans un même tube Eppendorf 0.5 ml stérile pour constituer le calibrateur pur.

› *Dilution des échantillons et du calibrateur :*

1. Avec de l'eau RNase-free ou de l' ΔH_2O autoclavée, ramener tous les échantillons d'ARN à une concentration de 200 ng d'ARN/ μ l.

84000

Moloney murine leukemia virus

2.7.7.49

Reverse transcriptase

Mg⁺⁺



Protocole

› *Extraction et purification de l'ARN :*

1. Se référer à la fiche technique spécifique du tissu d'intérêt (muscle, tissu adipeux ou tumeur).

› *Mesure de la concentration en ARN :*

1. Se référer à la fiche technique.

› *Dilution des échantillons et du calibrateur :*

1. Avec de l'eau RNase-free ou de l' $\Delta\text{H}_2\text{O}$ autoclavée, ramener tous les échantillons d'ARN à une concentration de 200 ng d'ARN/ μl .

› *Transcription de l'ARN en ADNc (RT+)* :

C'est la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN à l'aide d'une polymérase ARN dépendante (iScript™ Reverse Transcriptase).

1. Préparer les tubes selon le tableau suivant pour chaque échantillon d'ARN, y compris le calibrateur (pour ce dernier, prévoir plusieurs tubes) :

	<i>RT+</i>
Tampon 5x, μl	4
iScript™ Reverse Transcriptase, μl	1
Eau RNase-free, μl	13
Volume échantillon ARN, μl	2
Volume total, μl	20
Concentration en ARN de chaque échantillon, ng/ μl	200
Quantité d'ARN de chaque échantillon, ng dans un volume final de 20 μl	400

Utiliser le Mastercycler[®] gradient pour réaliser la RT+. Programmer le selon les paramètres suivant :

- Activation de l'enzyme iScript[™] Reverse Transcriptase : 5 minutes à 25°C.
- Elongation : 30 minutes à 42°C.
- Inactivation de l'enzyme iScript[™] Reverse Transcriptase: 5 minutes à 85°C.
- Maintien et conservation des échantillons dans le Mastercycler[®] gradient : à 4°C, puis à -20°C.

Mastercycler

