

- **Amorces:**

le choix des amorces est crucial.

Elles vont avoir un **double rôle** :

- en s'**hybridant** à l'ADN matrice, elles **délimitent** la région d'ADN à amplifier et avec leur extrémité 3' OH libre servir d'amorce pour l'ADN polymérase (étape 3 du cycle).
- On les obtient grâce à la **synthèse chimique d'ADN** qui permet d'obtenir des oligonucléotides dont l'extrémité 5' n'est pas phosphorylée (5'OH) contrairement aux ADN "dits" naturels.

## Les amorces sens et anti sens

- Des **logiciels** permettent de définir rapidement des amorces dans une **séquence donné** : **Primer 3'** ( logiciel libre disponible sur internet )
- <http://simgene.com/Primer3>
- **Taille** : 20 a 30 nucléotides
- **Amorces** : séquences **exactement complémentaires** du fragment a amplifier .
- **les séquences** des deux amorces du même couple doivent présenter le **maximum de divergences** et plus particulièrement à l'extrémité **3'** , afin d'éviter leur **hybridation**.
- Eviter **la présence d'autocomplémentarité** : hybridation de l'amorce sur elle-même .

# Le choix des amorces de PCR

481 ACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCCGGCACCCGCGTCCGCGCC

541 ATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCAT  
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

Amorce sense (Forward)

601 GAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGA

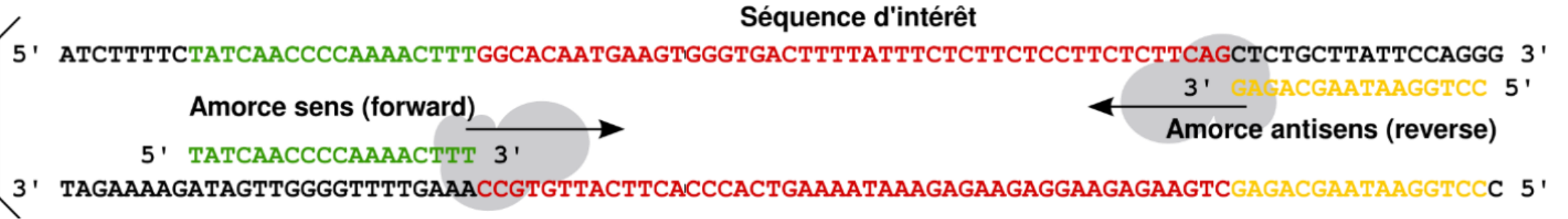
661 AATTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCC

721 TATGAGCCGCCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACA ACTACATGTGTAAC  
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

Amorce anti-sense (Reverse)

781 AGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGAC

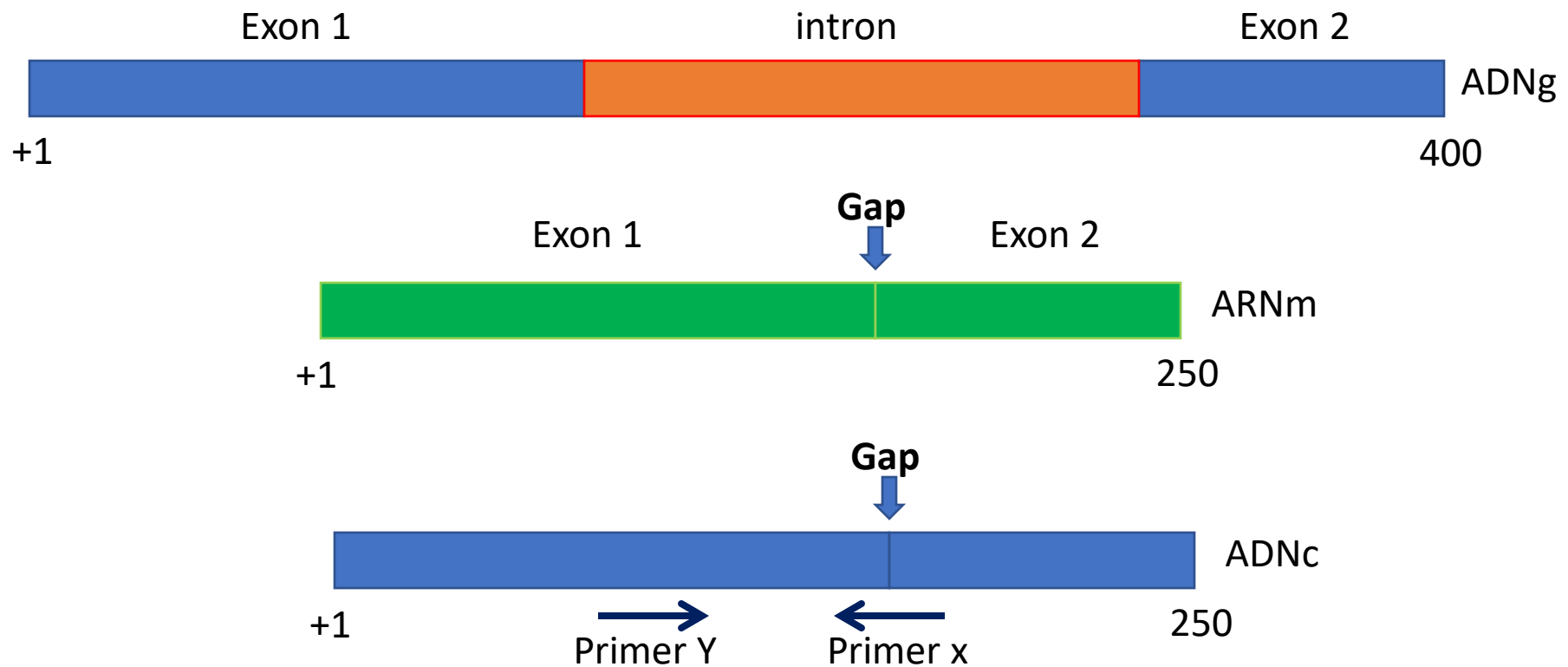
Molécule  
d'ADN  
(double brin)



# Le Choix des amorces de QRTPCR

➤ Comment choisir ses primers (amorces) pour éviter d'amplifier de l'ADN génomique (ADNg)

➤ Comment choisir ses primers (amorces) pour éviter d'amplifier les introns si ils existent?



**Un des primer choisi doit chevaucher deux exons adjacents**

# The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

NCBI Resources How To

NCBI National Center for Biotechnology Information

Nucleotide  Search

**NCBI Home**

Resource List (A-Z)

- All Resources
- Chemicals & Bioassays
- Data & Software
- DNA & RNA
- Domains & Structures
- Genes & Expression
- Genetics & Medicine
- Genomes & Maps
- Homology
- Literature
- Proteins
- Sequence Analysis
- Taxonomy
- Training & Tutorials
- Variation

**Welcome to NCBI**

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.

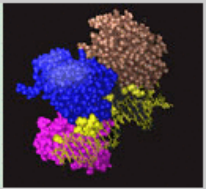
[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [Research](#) | [NCBI News](#)

**Get Started**

- [Tools](#): Analyze data using NCBI software
- [Downloads](#): Get NCBI data or software
- [How-To's](#): Learn how to accomplish specific tasks at NCBI
- [Submissions](#): Submit data to GenBank or other NCBI databases

**3D Structures**

Explore three-dimensional structures of proteins, DNA, and RNA molecules. Examine sequence-structure relationships, active sites, molecular interactions, biological activities of bound chemicals, and associated biosystems.



|| 1 2 3 4 5 6 7 8

**Popular Resources**

- PubMed
- Bookshelf
- PubMed Central
- PubMed Health
- BLAST
- Nucleotide
- Genome
- SNP
- Gene
- Protein
- PubChem

**NCBI Announcements**

Genome Workbench Update released

Genome Workbench 2.7.15

New CDD Release v.3.11 in

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nucleotide Human p53

Search



- NCBI Home
- Resource List (A-Z)
- All Resources
- Chemicals & Bioassays
- Data & Software
- DNA & RNA
- Domains & Structures
- Genes & Expression
- Genetics & Medicine
- Genomes & Maps
- Homology
- Literature
- Proteins
- Sequence Analysis
- Taxonomy
- Training & Tutorials
- Variation

### Welcome to NCBI

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.

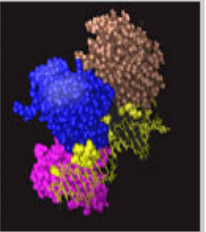
[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [Research](#) | [NCBI News](#)

### Get Started

- [Tools](#): Analyze data using NCBI software
- [Downloads](#): Get NCBI data or software
- [How-To's](#): Learn how to accomplish specific tasks at NCBI
- [Submissions](#): Submit data to GenBank or other NCBI databases

### 3D Structures

Explore three-dimensional structures of proteins, DNA, and RNA molecules. Examine sequence-structure relationships, active sites, molecular interactions, biological activities of bound chemicals, and associated biosystems.



|| 1 2 3 4 5 6 7 8

### Popular Resources

- PubMed
- Bookshelf
- PubMed Central
- PubMed Health
- BLAST
- Nucleotide
- Genome
- SNP
- Gene
- Protein
- PubChem

### NCBI Announcements

Genome Workbench Update released

Genome Workbench 2.7.15

New CDD Release v.3.11 in



NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide human p53

Save search Limits Advanced

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide human p53

Save search Limits Advanced

[Display Settings](#): Summary, 20 per page, Sorted by Default order

**i** Found 8593 nucleotide sequences. Nucleotide (8362) EST (196) GSS (35)

## Results: 1 to 20 of 8362

<< First < Pre

- [Homo sapiens mRNA for P53, complete cds](#)
  1. 2,451 bp linear mRNA  
Accession: AB082923.1 GI: 23491728  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)
- [Homo sapie... p53 \(p53\) gene, exon 8 and partial cds](#)
  2. 137 bp linear DNA  
Accession: JF923573.1 GI: 349734071  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)
- [Homo sapiens p53 \(p53\) gene, exon 4 and partial cds](#)
  6. 279 bp linear DNA  
Accession: JF923569.1 GI: 349734063

## Homo sapiens mRNA for P53, complete cds

GenBank: AB082923.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gi|23491728|dbj|AB082923.1| Homo sapiens mRNA for P53, complete cds
CGTGTCTTCCACGACGGTGACACGCTTCCCTGGATTGGCCAGACTGCCTTCCGGGTCACTGCCATGGAGG
AGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAAACTACT
TCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGAT
ATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGGC
TGGCCCCGTCACCAGCAGCTCCTACACCGGGGGCCCCGTCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCGTGCATCTTC
TGTCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCC
AAGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTG
TGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTC
ACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCC
CCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTC
GACATAGTGTGGTGGTCCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAATA
CATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACTGGAAGAC
TCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCATGTTTGTGCCTGTCTCTGGGAGAGACCGGC
GCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGGACACTAAGCG
AGCACTGTCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACC
CTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCCTTGGAACTCAAGGATG
CCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCCTGAAGTCCAAGGAGGCTCAGTC
TACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGACATTCTCACTTCTT
GTTCCCACTGACAGCCTCCACCCCCATCTCTCCCTCCCCTGCCATTTTGGGTTTTGGGTCTTTGAACC
CTTGCTTGAATAGGTGTGCGTCAGAAGCACCCAGGACTTCCATTTGCTTTGTCCCGGGCTCCACTGAA
CAAGTTGGCCTGCACTGGTGTGTTTGTGTTGGGAGGAGGATGGGGAGTAGGACATACCAGCTTAGATTTT
AAGGTTTTTACTGTGAGGGATGTTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTTGCAGTTAAGGGTTAGTTTACAAT
CAGCCACATTCTAGGTAGGGGCCACTTCCCGTACTAACCAGGGAAGCTGTCCCTCACTGTTGAATTTT
CTCTAACTTCAAGGCCATATCTGTGAAATGCTGGCATTGTCACCTACCTCACAGAGTGCATTGTGAGGG
TTAATGAAATAATGTACATCTGGCCTTGAACCACCTTTTTATTACATGGGGTCTAGAACTTGACCCCTT
GAGGGTGCTTGTCCCTCTCCCTGTTGGTGGTGGGTTGGTAGTTTCTACAGTTGGGCAGCTGGTTAGGT
AGAGGGAGTTGTCAAGTCTCTGCTGGCCAGCCAAACCCTGTCTGACAACTCTTGGTGAACCTTAGTAC
CTAAAAGGAAATCTCACCCATCCACACCCCTGGAGGATTTTCTCTTGTATATGATGATCTGGATCCA
CCAAGACTTGTTTTATGCTCAGGGTCAATTTCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
CTGGGTCTCGCTTTGTTGCCAGGCTGGAGTGGAGTGGCGTGATCTTGGCTTACTGCAGCCTTTGCCTCC
CCGGCTCGAGCAGTCTGCCTCAGCCTCCGGAGTAGCTGGGACCACAGGTTTATGCCACCATGGCCAGCC
AACTTTTGCATGTTTTGTAGAGATGGGGTCTCACAGTGTGCCCAGGCTGGTCTCAAACCTCTGGGCTCA
GGCGATCCACCTGTCTCAGCCTCCAGAGTGTGGGATTACAATTGTGAGCCACCACGTCCAGCTGGAAG
GGTCAACATCTTTTACATTCTGCAAGCACATCTGCATTTTACCCCCACCTTCCCCTCCTTCTCCCTTTT
TATATCCATTTTTTATATCGATCTCTTATTTTACAATAAAACTTTGCTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

A

**Délimiter la position des « gaps » en retrouvant la séquence des exons**

# <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>

Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence.

Select the [Task](#) for primer selection

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, [Mispriming Library \(repeat library\)](#))

<input checked="" type="checkbox"/> Pick left primer, or use left primer below	<input type="checkbox"/> Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below	<input checked="" type="checkbox"/> Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

- [Sequence Id](#)  A string to identify your output.
- [Targets](#)  E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [ and ]: e.g. ...ATCT[CCC must flank the central CCCC.
- [Overlap Junction List](#)  E.g. 27 requires one primer to overlap the junction between positions 27 and 28. Or mark the [source sequence](#) with -: e.g. ...ATCTAC-' must overlap the junction between the C and T.
- [Excluded Regions](#)  E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.
- [Pair OK Region List](#)  See manual for help.
- [Included Region](#)  E.g. 20,400: only pick primers in the 400 base region starting at position 20. Or use { and } in the [source sequence](#) to mark the beginning e.g. in ATC{TTC...TCT}AT the included region is TTC...TCT.

# Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence.

Select the [Task](#) for primer selection

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ...)  
[Mispriming Library \(repeat library\)](#)

```
CGTGCTTTCACGACGGTGACACGCTTCCCTGGATTGGCCAGACTGCCTTCCGGGTCACCTGCCATGGAGG
AGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACACTACT
TCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCTCAAGCAATGGATGATTGATGCTGTCCCCGGACGAT
ATTGAACAATGGTTCACCTGAAGACCCAGGTCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGTCCCCGCG
TGGCCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACGGGGCCCTGCACCAGCCCCCTCTGGCCCCCTGCATCTTC
TGTCCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGCTCTGGGCTTCTTGCAATCTGGGACAGCC
AAGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTG
```

<input checked="" type="checkbox"/> Pick left primer, or use left primer below	<input type="checkbox"/> Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below	<input checked="" type="checkbox"/> Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

[Sequence ID](#)  A string to identify your output.

[Targets](#)  E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [ and ]: e.g. ...ATCT[CCC must flank the central CCCC.

[Overlap Junction List](#)  E.g. 27 requires one primer to overlap the junction between positions 27 and 28. Or mark the [source sequence](#) with -: e.g. ...ATCTAC- must overlap the junction between the C and T.

[Excluded Regions](#)  E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

[Pair OK Region List](#)  See manual for help.

[Included Region](#)  E.g. 20,400: only pick primers in the 400 base region starting at position 20. Or use { and } in the [source sequence](#) to mark the beginning and end of the included region: e.g. in ATC{TTC...TCT}AT the included region is TTC...TCT.



## Bad Primers:

- Tm P1 et P2 = plusieurs degrés de différences (Eviter les écarts de plus de 2 à 3°C)

- Eviter les primers avec région poly A/T ou région poly G/C

Ex: AAAAAATTTCGCATCCGAT   GGAAAATTTACATCCGAT   AAGGCGCGCGCATCCGAT

- % G/C largement supérieur ou inférieur à 50

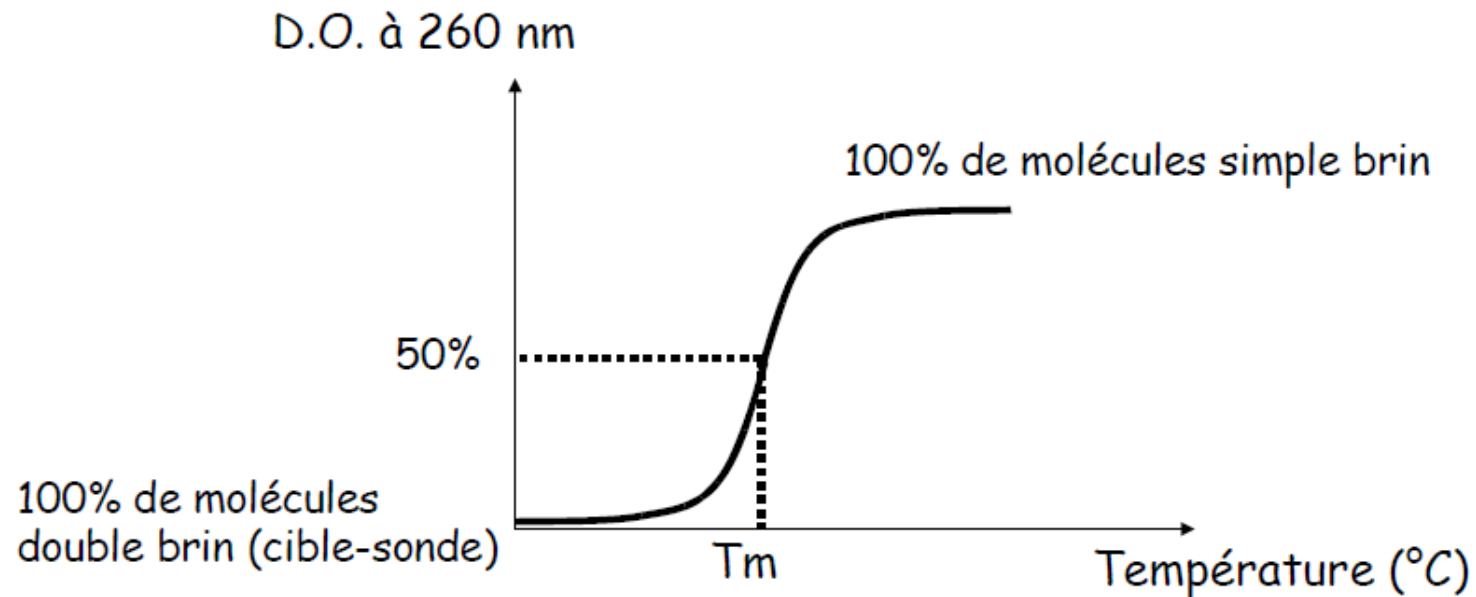
- Formation de « hairpin »

## La température de fusion de l'ADN ( $T_m$ ) :

- C'est une température, appelée également Température de demi-dénaturation ( $T_m$ )
- Correspond à l'ouverture ou au déroulement de 50% de la chaîne de l'ADN chauffé. C'est l'effet hyperchromique.
- L'effet hyperchromique correspond à la rupture des liaisons hydrogènes (liaisons faibles) et la séparation des 2 chaînes entraîne une augmentation dans l'absorption d'U.V de 40% à 260 nm.

## Fusion de l'ADN, notion de $T_m$ ( $T_m$ = melting temperature)

= température de fusion ( $T_m$ = melting temperature) de l'hybride qui représente la température pour laquelle 50% des hybrides sont dissociés en molécules monocaténares.





## Plusieurs facteurs peuvent influencer la valeur de la Tm :

**la composition en bases** : la complémentarité des deux brins de l'ADN est maintenue grâce à l'appariement entre G et d'une part et A et T d'autre part. Mais le nombre de liaison hydrogène n'est pas le même pour chaque couple de base.

Composition en base; riche à 50 - 60% GC

$$T_m = [(A+T) \times 2 \text{ °C}] + [(G+C) \times 4 \text{ °C}]$$

**la longueur des fragments des ADN** : La Tm devient plus grande si la longueur de l'ADN l'est aussi : un ADN long contient plus de liaisons à dissocier qu'un ADN plus court.

**la nature du milieu de l'ADN:** les sels sous forme de cations monovalents, lorsqu'ils sont ajoutés aux fortes concentrations (>1M) n'influencent pas les valeurs de Tm. Par contre, aux faibles concentrations, la Tm diminue. D'autres substances telles que le formamide (agent déstabilisant des liaisons hydrogènes) peuvent abaisser la Tm lors des hybridations. Dans ce cas, la Tm est estimée selon la formule suivante (pour 100 pb):  $\Delta T_m = -0,6 \times (\% \text{ formamide})$ .

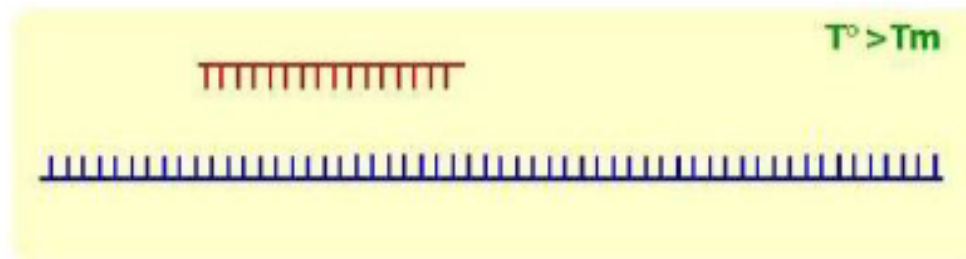
**les mésappariements :** De manière générale, l'abaissement de la Tm est de 1°C pour une valeur de 1% de mésappariement (mismatch)

**NB:** on peut utiliser une formule qui regroupe tous ces paramètres à la fois pour des fragments de taille inférieure à 100 pb:

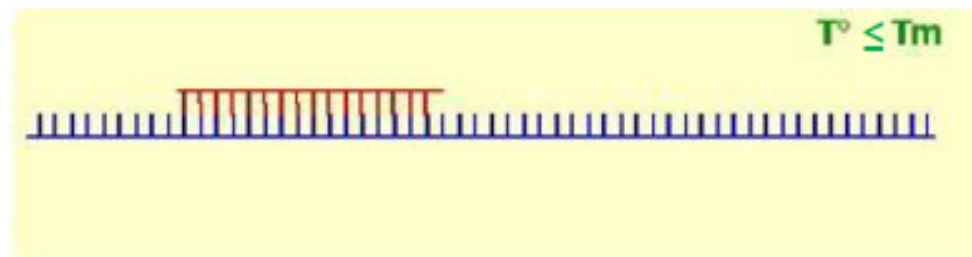
$$T_m = 16,6 \log [M] + 0,41 (\%G+C) + 18,5 - (\% \text{ mismatch}) - (675/\text{longueur en bases}) - 0,65 (\% \text{ de formamide})$$

Avec [M] = la concentration en ions Na+

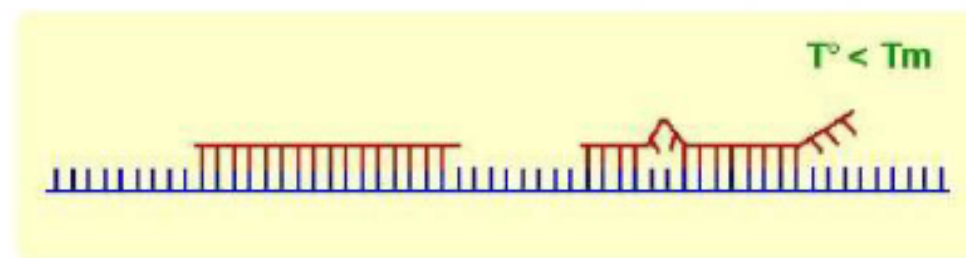
Désapparièrent



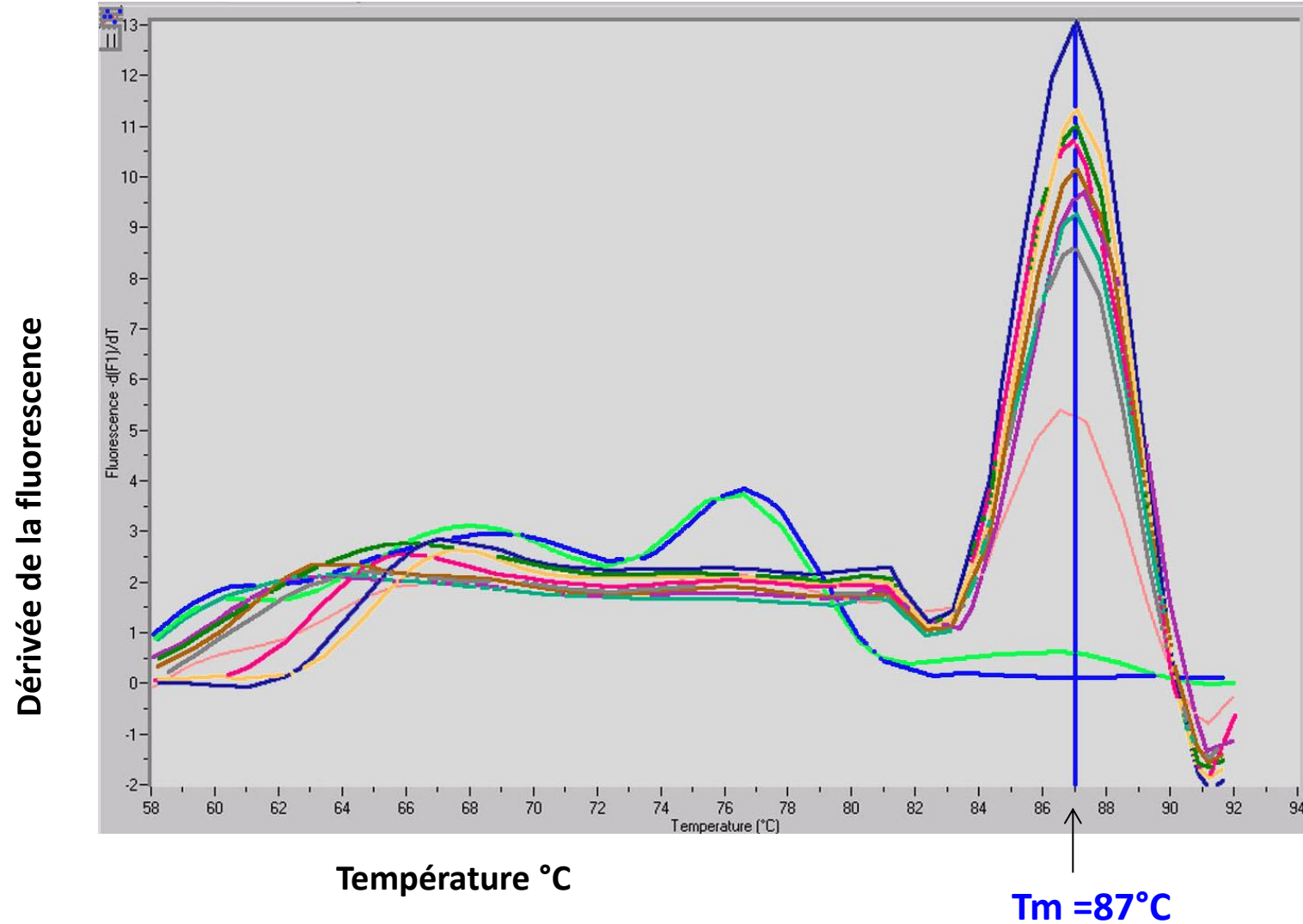
➔ Appariement (match)



➔ Mismatch

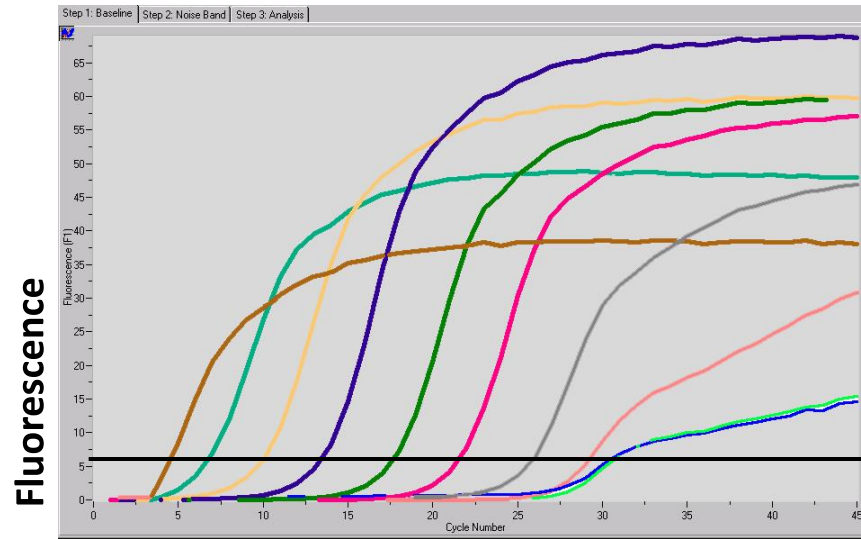


# Analyse de la courbe de fusion (Chimie SYBR Green)



# SYBR Green

## Courbe d'amplification

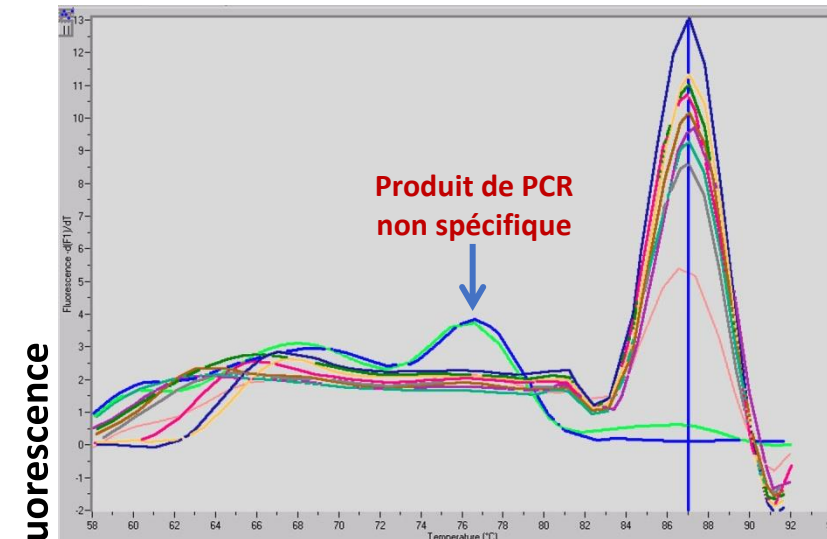


Nombre de cycles



Ct : quantification

## Courbe de fusion



Température °C



Tm : spécificité du produit  
d'amplification