

Calcul de préparation pour PCR

Généralités

Essentiellement, la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR¹ permet d'amplifier considérablement un fragment d'ADN « matrice » dans un tube. Pour ce faire, une suite de réactions est répétée de manière cyclique. Chaque cycle comporte trois étapes effectuées à des températures spécifiques: (i) *dénaturation* de l'ADN pour séparer les deux brins, résultat obtenu grâce à une température élevée (95°C pendant moins d'une minute en général), (ii) *hybridation*, c'est-à-dire délimitation de la séquence à amplifier sur chaque brin simple, puis démarrage de la duplication à l'aide d'oligonucléotides constituant un couple d'amorces spécifiques aux deux extrémités de la séquence, à une température fonction des amorces et usuellement comprise entre 50°C et 60°C (également appliquée moins d'une minute) ; (iii) *polymérisation*, c'est-à-dire synthèse du brin d'ADN complémentaire à chaque brin simple marqué, à une température de l'ordre de 72°C (pendant une durée dépendant de la longueur de la séquence²). Le travail de polymérisation est « confié » à une enzyme (*ADN polymerase*) comme Taq³. Cette enzyme a besoin d'ions magnésium comme cofacteur pour polymériser l'ADN à partir des désoxyribonucléotides (dNTP) placés dans la solution pour fournir à l'enzyme les molécules de base nécessaires à la synthèse. Une fois l'ADN double brin reconstitué, le cycle recommence⁴. Le nombre de cycles est de l'ordre d'une trentaine et varie selon la quantité d'ADN matriciel.

Ces réactions se font en solution en présence d'un tampon qui stabilise le pH du mélange.

Données

Les paramètres

Les données sont:

- le volume v de préparation voulu dans chaque tube, en μl ,
 - le nombre T de tubes anticipé, sans unité,
 - le nombre p de couples d'amorces (*primers*) employés (typiquement 1 ou 2), sans unité,
 - les concentrations finales a_i d'amorçage souhaitées dans la préparation, en $\mu\text{M/l}$ (micromolaire),
 - la concentration finale c de chlorure de magnésium souhaitée, en mM/l (millimolaire)
 - la concentration finale d de dNTP souhaitée, en $\mu\text{M/l}$ (micromolaire),
 - les concentrations micromolaires A_i de chaque solution d'amorçage fournie, en $\mu\text{M/l}$,
 - la concentration millimolaire C de la solution de chlorure de magnésium fournie, en mM/l ,
 - la concentration millimolaire D de la solution de dNTP fournie, en mM/l
 - la dilution x de la solution tampon, en X (exemple 5X ou 10X),
- et, le plus important,
- la concentration finale de polymérase voulue dans le tube, en unités/ μl ,
 - la concentration de la polymérase (Taq) fournie, en unités/ μl .

1 D'après l'anglais *polymerase chain reaction*.

2 Différentes pratiques existent à ce sujet. L'ordre de grandeur est de une minute par kilobase.

3 De *Thermus aquaticus*, bactérie résistante à la température à l'origine des premières enzymes utilisées.

4 Pour plus de détail, voir les références [1] et [3], par exemple.

Valeurs par défaut

Pour ces données, les valeurs par défaut sont:

| Paramètre | Notation | Valeur par défaut |
|--|---|-------------------|
| Volume de chaque tube | v, en μl | 50 |
| Nombre de tubes | T | 1 |
| Nombre de paires d'amorces | p | 1 |
| Concentrations finales amorces | a_1' , en $\mu\text{M/l}$ | 0,4 |
| | a_1'' , en $\mu\text{M/l}$ | 0,4 |
| | a_2' , en $\mu\text{M/l}$ | -- |
| | a_2'' , en $\mu\text{M/l}$ | -- |
| Concentration finale MgCl_2 | c, en mM/l | 1,25 |
| Concentration finale dNTP | d, en $\mu\text{M/l}$ | 200 |
| Concentration finale polymerase ADN (Taq) | Taq, en unités/ μl (u/ μl) | 0,025 |
| Concentrations fournies amorces | A_1' , en $\mu\text{M/l}$ | 50 |
| | A_1'' , en $\mu\text{M/l}$ | 50 |
| | A_2' , en $\mu\text{M/l}$ | -- |
| | A_2'' , en $\mu\text{M/l}$ | -- |
| Concentration fournie MgCl_2 | C, en mM/l | 25 |
| Concentration fournie dNTP | D, en mM/l | 2,5 |
| Dilution de solution tampon | x, en X | 5 |
| Concentration fournie polymerase ADN (Taq) | T, en u/ μl | 5 |

Calculs des volumes

Tampon

Il est d'abord possible de calculer le volume de solution tampon nécessaire dans chaque tube. Puisque la solution tampon initiale doit être diluée x fois, le volume de tampon nécessaire est

$$v_t = v/x.$$

Avec les valeurs par défaut, $v_t = 50 \mu\text{l}/5 = 10 \mu\text{l}$.

Amorces

Les nombres de micromoles des amorces de chaque paire nécessaire dans chaque tube sont $v \cdot a_i'$ et $v \cdot a_i''$. Le nombre de litres de solution initiale voulu est donc respectivement $v \cdot a_i' / A_i'$ et $v \cdot a_i'' / A_i''$. Les volumes nécessaires de solution initiale de chaque amorce sont donc:

Calculs de base pour la PCR

$$v_{A_i'} = v \cdot a_i' / A_i' \text{ et } v_{A_i''} = v \cdot a_i'' / A_i''.$$

Avec les valeurs par défaut, $v_{A_i'} = v_{A_i''} = 50 \mu\text{l} \cdot 0,4 / 50 = 0,4 \mu\text{l}$.

Chlorure de magnésium

De même, le volume de solution initiale de MgCl_2 nécessaire pour chaque tube est :

$$v_{\text{MgCl}_2} = v \cdot c / C.$$

Avec les valeurs par défaut, $v_{\text{MgCl}_2} = 50 \mu\text{l} \cdot 1,25 / 25 = 2,5 \mu\text{l}$.

dNTP

De même, le volume de solution initiale de dNTP nécessaire pour chaque tube est :

$$v_{\text{dNTP}} = v \cdot d / D.$$

Avec les valeurs par défaut, $v_{\text{dNTP}} = 50 \mu\text{l} \cdot 200 / 2500 = 4 \mu\text{l}$.

Polymerase ADN (Taq)

Le nombre d'unités voulues dans chaque tube est $v \cdot \text{Taq}$. Le volume de solution de polymérase à **injecter dans chaque tube** est donc :

$$v_{\text{Taq}} = v \cdot \text{Taq} / T.$$

Avec les valeurs par défaut, $v_{\text{Taq}} = 50 \mu\text{l} \cdot 0,025 / 5 = 0,25 \mu\text{l}$.

Complément aqueux

Le volume d'eau dans chaque tube est le complément des constituants précédents au volume de chaque tube:

$$v_{\text{dH}_2\text{O}} = v - (v_t + v_{A_i'} + v_{A_i''} + v_{\text{MgCl}_2} + v_{\text{dNTP}}).$$

Avec les valeurs par défaut, $v_{\text{dH}_2\text{O}} = 50 - (10 + 0,4 + 0,4 + 2,5 + 4 + 0,25) \mu\text{l} = 32,45 \mu\text{l}$.

Hors ADN-polymérase, le volume de préparation à placer dans chaque tube est donc:

$$v_p = v - v_{\text{Taq}}.$$

Avec les valeurs par défaut, $v_p = 50 - 0,25 \mu\text{l} = 49,75 \mu\text{l}$.

Prélèvements totaux

Pour avoir les volumes totaux à prélever pour élaborer la préparation sans polymérase (celle-ci étant ajoutée tube par tube), il suffit de multiplier chaque volume élémentaire par le nombre T de tubes.

Calcul des températures

Le succès de la PCR est sensible à l'ajustement de la température d'hybridation qui doit autoriser les conditions thermodynamiques juste favorables à l'accrochage des amorces, sans pour autant favoriser des hybridations non spécifiques des amorces en réduisant trop l'agitation moléculaire. Elle doit donc être assez basse mais pas trop [2].

En pratique, l'expérience montre qu'il est souvent judicieux de la choisir de 5°C inférieure à la température T_m^5 de demi-dénaturation⁶. Cette dernière dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces. Pour calculer la T_m d'un oligonucléotide inférieur à 30 nucléotides, l'expression suivante est utilisée :

$$T_m = (A + T).2^\circ C + (G + C). 4^\circ C$$

où A, T, G et C sont respectivement les nombres de ces bases dans l'oligonucléotide.

Pour des brins plus longs, des formules plus complexes existent, comme la suivante [2] :

$$T_m = 81,5^\circ C + 16,6 \log (M) + 0,41 (\%G + \%C) - 500/L - 0,6f - 1,5m$$

avec

M : concentration molaire en ions monovalents,

L : longueur de l'amorce (en base),

f : pourcentage de formamide,

m : pourcentage de mauvais appariement.

Par cette formule, il apparaît par exemple que, toutes choses égales par ailleurs, une séquence d'ADN de 700 bases a une T_m inférieure de $(-500/700) - (-500/30) = 17,6^\circ C$ à celle d'une séquence de 30 bases, ce qui donne une idée des intervalles d'optimisation possibles.

Références

[1] <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/index.htm>

[2] http://www.med.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20081103022214cdubourgPCR_2008.pdf

[3] <http://www.gazettelabo.fr/2002archives/pratic/1998/24PCR.htm>

5 De l'anglais « *melting temperature* » (ou « température de fusion »), définie comme la température à laquelle la moitié de l'ADN en solution est sous forme de simple brin).

6 Ceci permet donc d'avoir plus de la moitié des amorces qui s'hybrident.