

**Protocole d'amplification de la région V4 18s rDNA pour l'analyse des  
protistes à partir des échantillons d'eau  
(EL, EAA)**

- La concentration des ADN extraits est mesurée (mesure au Picogreen) et ajustée à 5ng/μl. Une plaque d'ADN (30μl ADN/puits) est préparée. Cette plaque est congelée à -80°C et utilisée pour la PCR 16S et pour la PCR 18S.
- **PCR DNA 18S**

MIX (en μl)	Cf	1 échantillon			
Buffer HF 5X	1X	6		98°C for 30sec	
DMSO	3%	0,9		98°C for 10s	12 cycles
dNTP 10mM	200μM chq	0,6		53°C for 30sec	
PCR1F_Stoeck 10μM	0,35μM	1,1		72°C for 30s	18 cycles
PCR1R_Soeck 10μM	0,35μM	1,1		98°C for 10s	
Phusion HF 2u/μL	0,02U/μl	0,3		48°C for 30sec	
H <sub>2</sub> O		18		72°C for 30s	
<b>volume</b>		<b>28</b>		72°C for 10 min	
<i>volume réactionnel de 30 μl (28 μL mix + 2 μL d'ADN à 0-5 ng/μl)</i>				8°C forever	

On effectue un triplicat de PCR en microplaques pour chaque échantillon.

Penser à utiliser les mêmes thermocycleurs pour les amplifications

**PCR1F : NGS-TAREuk454FWD1** (Amorces Stoeck et al, 2010 + adaptateur Genotoul)

5' CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TCC AGC ASC YGC GGT AAT TCC 3'

**PCR1R : NGS-TAREukREV3** (Amorces Stoeck et al, 2010 + adaptateur Genotoul)

5' GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAC TTT CGT TCT TGA TYR A 3'

Utiliser la Taq : Phusion HF ThermoScientific 500U 2U/μl ref VWR F-530L

- Extemporément, après la PCR, préparer les plaques pour « observation des amplicons sur gel d'agarose » : 1μl de bleu de dépôt + 5μl d'amplicon / puits et congeler à -20°C. Le reste des plaques PCR est précieusement conservé à -80°C
- Observation des amplicons (6μl/puits) sur gel d'agarose 1%, grand gel de 200ml TBE 1X, 3 peignes de 30 puits, 100V pendant 90-120 minutes, marqueur de taille 100pb. Taille de l'amplicon attendue 430pb.
- Si PCR négative, cela signifie souvent qu'il y a inhibition de PCR. Diluer de nouveau les ADN concernés au 1/5 (au 1/10 si besoin) et refaire PCR en triplicat et gel associé.

*Publications de référence :*

Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M.D.M., Breiner, H.W., and Richards, T.A. (2010) Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. Mol Ecol 19: 21–31.