

Protocole d'amplification de la région V4-V5 16S rDNA pour l'analyse des bactéries 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 16S**

MIX (en μl)	Cf	1 échantillon			
Buffer Go Taq5X	1X	6		95°C for 5min	32 cycles
MgCl2 25mM	1,5mM	1,8		95°C for 30s	
dNTP 10mM	200μM chq	0,6		50°C for 60sec	
PCR1F_Parada 20μM	0,3μM	0,45		72°C for 60s	
PCR1R_Parada 20μM	0,3μM	0,45		72°C for 10 min	
Go Taq Flexi G2 5u/μL	0,02U/μl	0,12		8°C forever	
H ₂ O		18,58			
volume		28			
<i>volume réactionnel de 30 μl (28 μL mix + 2 μL d'ADN)</i>					

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

Penser à utiliser les mêmes thermocycleurs pour les amplifications

PCR1F : NGS-515F-Y (Amorces Parada et al, 2016 avec adaptateurs Genotoul)

5' CTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA 3'

PCR1R : NGS- 926R (Amorces Parada et al, 2016 avec adaptateurs Genotoul)

5' GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGYCAATTYMTTTRAGTTT 3'

Utiliser la Taq : Go Taq Flexi G2 Promega 500U 5U/μl ref VWR M7805

- 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 TBE1X, 3 peignes de 30 puits, 100V pendant 90-120 minutes, marqueur de taille 100pb. Taille de l'amplicon attendue 412pb
- 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 :

Parada A., Needham D. M., Fuhrman J.A. (2016) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field. *Environ. Microbiol.* 18, 1403–1414 doi.org/10.1111/1462-2920.13023.