

Protocole d'amplification de la région V1-V2 18s cDNA pour l'analyse des protistes à partir des échantillons d'huitres

- Une plaque d'ARN extraits à partir des broyats d'huitres (8µl ARN/puits) est préparée et l'ARN est traité à la DNase

Traitement DNase (DNase I, ref 69182-3 VWR)

Préparer le mix DNase

Mix Dnase	1 échantillon	Température ambiante for 15min
reaction Buffer 10X	1	
Dnase	1	
volume	2	
volume réactionnel de 10 µl (8µl ARN + 2µl Mix DNase)		

Ajouter ensuite 0.5µl DNase supplémentaire et incubé de nouveau 10 min

Ajouter 1.1µl de solution stop et incubé 65°C pendant 10min

Congeler la plaque d'ARN à -80°C ou passer à l'étape de reverse transcription directement

- La concentration des ARN traités est mesurée (mesure au Qubit). Une plaque d'ARN (6µl ARN/puits) est préparée et l'ARN est transcrit en ADN complémentaire.

Reverse Transcription

(Invitrogen Superscript IV First-strand synthesis system, ref Fisher 15327696)

Préparer le mix 1 (hybridation des amorces)

Mix 1 (en µl)	1 échantillon	
random hexamers 50ng/µl	1	65°C for 5min
dNTP 10mM	1	puis placer à 4°C sur un rack refroidissant
DEPC H2O	5	
volume	7	
volume réactionnel de 13 µl (6µl ARN + 7µl Mix 1)		

Préparer le mix 2 (réverse transcription)

Mix 2 (en µl)	1 échantillon	23°C for 10min
SSIV Buffer 5X	4	55°C for 10min
DTT 100mM	1	80°C for 10min
RNase Inhibitor	1	puis placer à 4°C sur un rack refroidissant
volume	6	
volume réactionnel de 19 µl (13µl + 6µl Mix 2)		
Ajouter extemporanément 1µl de Superscript IV RT / puits		

Ajouter 1µl RNase H à chaque puits et incubé à 37°C pendant 20min

Congeler la plaque d'ADNc à -20°C en attente de la PCR

- **PCR cDNA 18S**

MIX (en µl)	Cf	1 échantillon	95°C for 5min	
Buffer Go Taq5X	1X	6	95°C for 1min	35 cycles
MgCl2 25mM	1,5mM	1,8	52°C for 30sec	
dNTP 10mM	400µM chq	1,2	72°C for 30s	
PCR1F_Clerissi 20µM	0,32µM	0,48	72°C for 7 min	
PCR1R_Clerissi 20µM	1,6µM	2,4	8°C forever	
Go Taq Flexi G2 5u/µL	1U soit 0,03U/µl	0,2		
H2O		12,92		
volume		25		
volume réactionnel de 30 µl (25 µL mix + 5 µL d'ADN)				

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

Penser à utiliser les mêmes thermocycleurs pour les amplifications.

PCR1F : NGS-V1V2F (Amorces Clerissi et al, 2018 avec adapateurs genotoul)

5' CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACCTGGTTGATCCTGCCA 3'

PCR1R : NGS-V1V2R (Amorces Clerissi et al, 2018 avec adapateurs genotoul)

5' GGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTGTARKCCWMTAYMYTACC 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 TBE 1X, peignes de 30 puits, 100V pendant 90-120 minutes, marqueur de taille 100pb. Taille de l'amplicon attendue 420pb
- 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 :

Clerissi C, Brunet S, Vidal-Dupiol J, Adjeroud M, Lepage P, Guillou L, Escoubas JM, Toulza E., 2018 Protists Within Corals: The Hidden Diversity. Front Microbiol. 9:2043. doi: 10.3389/fmicb.2018.02043.

Protocole d'amplification de la région V3-V4 16s rDNA pour l'analyse des bactéries à partir des échantillons de huitres

- La concentration des ADN extraits à partir des broyats d'huitres 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
- **PCR DNA 16S**

MIX (en μl)	Cf	1 échantillon			
Buffer 5X HF	1X	6		98°C for 5min	
dNTP 10mM	200μM chq	0,6		98°C for 10s	30 cycles
sans DMSO		0		55°C for 30s	
PCR1F_Klindworth 20μM	0,3μM	0,45		72°C for 20s	
PCR1R_Klindworth 20μM	0,3μM	0,45		72°C for 5 min	
Taq Phusion 2U/μl	0,02U/μl	0,3		8°C forever	
H ₂ O		20,2			
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 : S-D-Bact-0341-b-S-17 (Bakt_341F) (Amorces Klindworth et al, 2013 avec adapteurs Genotoul)

5' CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCTACGGGNGGCWGCAG 3'

PCR1R : S-D-Bact-0785 -a-A-21 341F (Bakt_805R) (Amorces Klindworth et al, 2013 avec adapteurs Genotoul)

5' GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTACHVGGGTATCTAATCC 3'

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

- Extemporaneément, 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, peignes de 30 puits, 100V pendant 90-120 minutes, marqueur de taille 100pb. Taille de l'amplicon attendue 464pb.
- 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 :

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41, e1. doi:10.1093/nar/gks808.