

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 et pour la PCR 18S.
- **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' CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTACGGGNGGCWGCAG 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.