

Protocole d'amplification du virus OsHV1 à partir des échantillons de huîtres

Quantification d'ADN du virus OsHV-1 par PCR quantitative Sybr® green sur les ADN extraits à partir des tissus (sans TD) d'huîtres. La concentration des ADN extraits est ajustée à 5ng/μl.

| | | | | |
|---|----------------------|--|----------------|------------------|
| MIX (en μl) | 1 échantillon | | | |
| Brilliant III Mix | 10 | | 95°C for 30sec | |
| DP-F 5,5μM | 2 | | 95°C for 20s | 40 cycles |
| DP-R 5,5μM | 2 | | 60°C for 20sec | |
| H ₂ O | 1 | | 95°C for 1min | Courbe de fusion |
| volume | 15 | | 60°C for 30sec | |
| <i>volume réactionnel de 20 μl (15 μL mix + 5 μL d'ADN)</i> | | | 95°C for 30sec | |

DP-F (OsHVDPFor) : 5'-ATT GAT GAT GTG GAT AAT CTG TG-3'

DP-R (OsHVDPRev) : 5'-GGT AAA TAC CAT TGG TCT TGT TCC-3'

Utiliser le kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR MasterMix Ref 600883, Agilent

Effectuer une gamme étalon par dilution de l'ADN plasmidique à 1.10E7 copies ADN/μL fourni par le LNR, LGPMM La Tremblade, Ifremer (dilution de 1.10E5 à 1.10E1, copies/μL)

Le fragment généré est de 197pb.

Publications de référence :

Webb SC, Fidler A and Renault T, 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, 272, 126-139.