

ePRPV Composante 3 - 2011	Action 2: Installation du matériel d'analyses PCR et réalisation d'un test interlaboratoire	Missions COI
Formateur : Emmanuel JOUEN emmanuel.jouen@free.fr	Support documentaire à la formation pratique au diagnostic moléculaire par PCR	Dates: 01/09 au 30/11/2011 Page 1/27

Exemple de la Nested Multiplex PCR de détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, agent pathogène du dépérissement bactérien de l'Oignon (*Allium cepa* L.)



Interlocuteur permanent CIRAD Réunion pour le diagnostic moléculaire :
isabelle.soustrade@cirad.fr

Sommaire

Introduction.....	3
Plantes hôtes.....	3
Découverte du pathovar <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	3
Comment la maladie se propage-t-elle ?.....	4
Le test moléculaire.....	4
Références.....	5
Protocole de diagnostic de <i>Xaa</i> par Multiplex Nested PCR.....	6
Macération.....	6
Extraction de l'ADN avec le kit Qiagen DNeasy® Plant Mini:.....	7
PCR de détection en point final.....	8
1. <i>Echantillons utilisés pendant la formation</i>	8
2. <i>Témoins positifs et négatifs</i>	8
Electrophorèse.....	14
1. <i>Préparation des gels d'agarose</i>	14
2. <i>Electrophorèse</i>	14
3. <i>Révélation au bromure d'ethidium (BET)</i>	15
Liste des figures et tableaux.....	16
Liste des annexes.....	16

Introduction

Le dépérissement bactérien de l'oignon est l'une des contraintes sanitaires majeures de la culture des alliacées. A la Réunion, 1000 tonnes d'oignons sont produites chaque année et 8000 tonnes environ sont importées d'Inde et de Madagascar (source : Armefflor (Réunion)). Contrôler et vérifier le bon état sanitaire des semences importées et produites localement est un préalable au développement de la filière.

La bactérie *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Xaa)[1] provoque chez les alliacées, comme l'oignon, des lésions sur les tissus aériens de la plante qui se met à dépérir. Les bulbes s'amointrissent, ce qui entraîne des pertes de rendement de 10 à 50 %. La maladie a été observée pour la première fois en 1971 à la Barbade (Antilles), puis elle est apparue par vagues successives sur presque tous les continents. Elle a atteint l'île Maurice, puis l'île de la Réunion dans les années 80. *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* est pathogène sur tous les *Allium* testés : oignon (*A. cepa*), ail (*A. sativa*), ciboule (*A. fistulosum* L.), ciboulette (*A. choenoprasum*), poireau (*A. porrum*), échalotte (*A. cepa* var. *ascalonicum*).

Les scientifiques du Cirad à la Réunion ont démontré que la bactérie pouvait être présente dans les semences d'oignon [2] et qu'une proportion de 4 graines infectées sur 10 000 était suffisante pour déclencher une épidémie [3]. De plus, les semences issues de parcelles touchées par la maladie sont contaminées à des taux capables de générer de nouvelles épidémies [4]. Pouvoir garantir la bonne qualité sanitaire des semences commerciales est donc indispensable. D'autant que l'échange de semences est l'agent principal de diffusion de cette maladie émergente.

Plantes hôtes

Xanthomonas axonopodis pv. *allii* est pathogène sur tous les *Allium* testés : oignon (*A. cepa*), ail (*A. sativa*), ciboule (*A. fistulosum* L.), ciboulette (*A. choenoprasum*), poireau (*A. porrum*), échalote (*A. cepa* var. *ascalonicum*).

Découverte du pathovar *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*

Les scientifiques ont d'abord cherché à expliquer l'apparition concomitante de cette bactérie sur plusieurs continents durant la décennie 1970-80. S'agissait-il d'une seule et même espèce pathogène et, dans ce cas, quels sont les facteurs qui ont conduit à son émergence ? Ou était-ce différentes espèces provoquant des symptômes identiques, comme dans le cas des pathogènes de la tomate du genre *Xanthomonas*. Pour le déterminer, une collection internationale de souches de la bactérie a été caractérisée. Tous les clones isolés sur les plants d'oignon se sont avérés appartenir à une seule espèce, *Xanthomonas axonopodis*, plus précisément *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. Cette bactérie est pathogène pour différentes alliacées - oignon, ail, poireau, ciboulette et échalote.

Une étude de diversité génétique a montré que le polymorphisme des souches était variable selon leur origine géographique. Il existe des zones à forte diversité (États-Unis, Afrique du Sud) et des zones à faible diversité (Venezuela, Hawaï, Barbade). Dans la région de l'océan Indien, au moins deux groupes semblent différenciés.

Comment la maladie se propage-t-elle ?

Des températures moyennes journalières supérieures à 20°C sont favorables au développement de la maladie. La dissémination de bactérie se fait par voie aérienne et est favorisée par la pluie, l'arrosage par asperseurs. Le vent peut propager les foyers jusqu'à 25 mètres.

Le test moléculaire

Un test moléculaire de détection (PCR multiplex nested) de la bactérie dans les semences a été élaboré, finalisé en 2006 et publié en 2010 (5).

- Multiplex :

Le terme multiplex fait ici référence au fait que l'on va amplifier dans une même réaction PCR plusieurs fragments d'ADN simultanément.

Ce test PCR de détection des *Xaa* repose sur la détection de 2 marqueurs moléculaires. En effet la diversité génétique des *Xaa* étant importante (cf. figure 1), il n'a pas été possible de trouver un marqueur spécifique de toutes les *Xaa*. Deux marqueurs ont été identifiés (un par AFLP et l'autre par RAPD) comme spécifiques des *Xaa* : une partie des souches possède un marqueur AVR, une autre partie un marqueur PILI et certaines souches possèdent les deux marqueurs (cf. figure 1)

- Nested :

Une nested PCR est composée de 2 étapes : une première PCR (dite primaire) qui aboutit à la synthèse de millions de copies d'un amplicon sur lesquelles on réalisera une seconde PCR (dite nested) avec des amorces qui s'hybrident dans des séquences internes du premier amplicon. Ce type de PCR permet principalement d'augmenter la sensibilité du test mais également sa spécificité.

Capable de détecter toutes les souches de *Xaa* et de façon plus fiable (seuil de 1 graine sur 27340 avec une erreur de 0,01) que les méthodes classiques, il est désormais utilisable à la Réunion pour contrôler l'état sanitaire des semences importées et produites localement. Cette méthode sera prochainement proposée comme méthode de référence européenne auprès de l'Organisation Européenne de Protection des Plantes (OEPP), cette bactérie ayant été placée sur leur liste d'alerte en 2006.

Ce test peut également être utilisé pour confirmer un diagnostic sur broyat de feuilles présentant des symptômes. Un test multiplex PCR avait été précédemment mis au point pour le diagnostic sur suspension bactérienne après isolement.

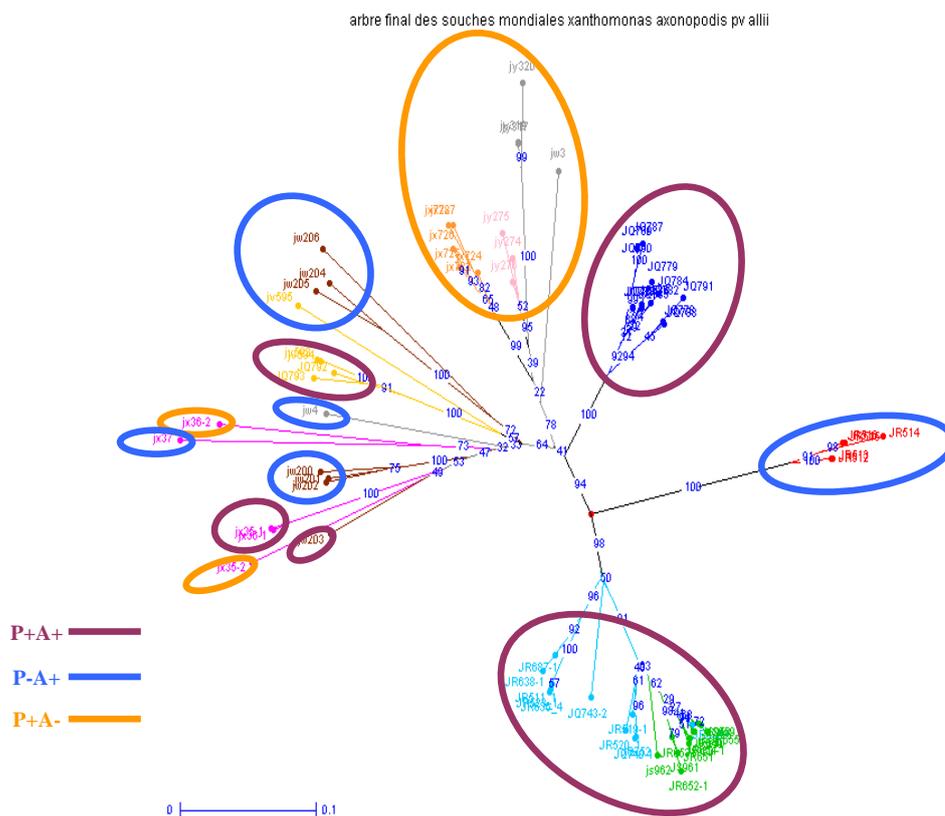


Figure 1. Unweighted neighbor-joining tree obtenu sur des données F-AFLP montrant les relations génétiques entre différentes souches d'une collection mondiale de *Xaa*. Les valeurs de bootstraps sont indiquées au niveau des nœuds. Source : Olivier Pruvost, CIRAD.

Source : site web PRPV (www.prpv.org)

Références

- [1] Roumagnac, P., Gagnevin, L., Gardan, L., Sutra, L., Manceau, C., Dickstein, E. R., Jones, J. B., Rott, P., and Pruvost, O. 2004. *Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (Allium spp.) and their relatedness to different Xanthomonas species*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:15-24.
- [2] Roumagnac, P., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2000. *Detection of Xanthomonas sp. pv. allii, the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium*. Eur. J. Plant Pathol. 106:867-877.
- [3] Roumagnac, P., Pruvost, O., Chiroleu, F., and Hughes, G. 2004. *Spatial and temporal analyses of bacterial blight of onion caused by Xanthomonas axonopodis pv. allii*. Phytopathology 94:138-146.
- [4] Humeau, L., Roumagnac, P., Picard, Y., Robène-Soustrade, I., Chiroleu, F., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2006. *Quantitative and molecular epidemiology of bacterial blight of onion in seed production fields*. Phytopathology 96:1345-1354.
- [5] Robène-Soustrade, I., Legrand, D., Gagnevin, L., Chiroleu, F., Laurent, A. and Pruvost, O. 2010. *Multiplex Nested PCR for Detection of Xanthomonas axonopodis pv. allii from Onion Seeds*. Appl. Environ Microbiol 76:2697-703

Protocole de diagnostic de *Xaa* par Multiplex Nested PCR

Etapes du diagnostic moléculaire par PCR de *Xaa*:

Macération :

Libération dans le tampon de macération des bactéries puis culottage des bactéries dans un tube.

Extraction ADN :

Extraire l'ADN des cellules bactériennes recueillies dans le tampon de macération

Réaction PCR :

Amplification par PCR des 2 marqueurs moléculaires des *Xaa* et en Nested PCR (*i.e.* 2 PCR successives)

Electrophorèse et révélation des produits PCR:

Vont permettre de visualiser les produits PCR

Macération

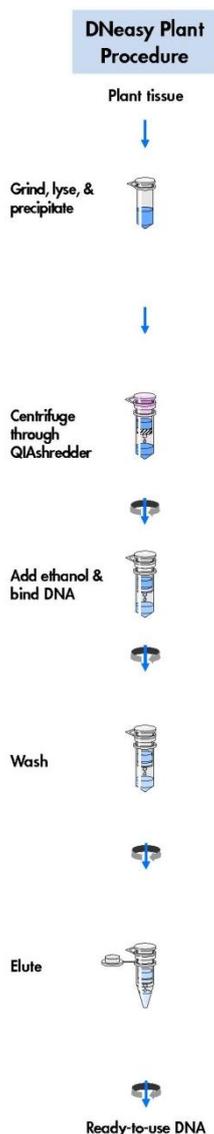
1. Peser 10g de semences d'oignon dans un récipient stérile.
2. Ajouter 50 mL de tampon TRIS stérile pH 7,2. Laisser macérer 48h à 4°C.
3. Au bout de 48h prélever 2mL de macérât et les déposer dans un tube Eppendorf Safelock 2mL.
4. Centrifuger 15 min à 15000 x g et 4°C puis éliminer le surnageant.

Note 1: Les culots obtenus peuvent être stockés à -20°C si nécessaire pour une extraction d'ADN ultérieure.

Note 2: Il aurait fallu en parallèle essayer d'isoler les bactéries sur milieu de culture en étalant les broyats sur milieux généralistes et semi-spécifique (NCTM). Aucune bactérie n'étant importée dans les pays dans lesquels se déroulent les missions il est donc inutile de procéder à cet isolement.

Extraction de l'ADN avec le kit Qiagen DNeasy® Plant Mini:

1. Ajouter aux culots 400 µL du tampon AP1 fourni dans le kit et 4µL de la RNAase A à 100mg/mL fournie. Incuber 10 min à 65°C pour lyser les cellules, mélanger par inversion des tubes 2 à 3 fois durant l'incubation
2. Ajouter au lysat 130 µL du tampon AP2 fourni, vortexer puis incuber 5 min sur glace.
3. Centrifuger le lysat 5 min à 20000g. Puis prélever le lysat et le déposer sur la colonne à bouchon mauve (fournie).



4. Centrifuger 2 min à 20000 x g. Transférer le "flow-through" dans un nouveau tube et ajouter 1.5 volumes du tampon AP3/E fourni (ex: si 450µL de flow-through, ajouter 675µL de tampon AP3/E). Mélanger par pipetage. Prélever 650µL du mélange et le déposer dans une colonne à bouchon blanc placée dans un tube de 2mL (fournie).

5. Centrifuger 1 min à 6000 x g et éliminer le "flow-through". Répéter avec le reste de l'échantillon. Placer la colonne dans un nouveau tube de 2mL (fournie) et ajouter 500µL du tampon AW fourni.

6. Centrifuger 1 min à 6000 x g, éliminer le "flow-through" et réutiliser le tube collecteur dans l'étape suivante.

7. Ajouter 500 µL de tampon AW dans la colonne à bouchon blanc et centrifuger 2 min à 20000 x g pour sécher la membrane.

8. Transférer la colonne dans un tube 2mL et déposer 50 µL de tampon AE directement sur la membrane. Incuber 5 min à température ambiante, puis centrifuger 1 min à 6000 x g pour éluer. Répéter l'opération une seconde fois pour obtenir au final un éluât de 100µL. Les échantillons d'ADN ainsi extraits peuvent être conservés à -20°C.

9. Remplir la fiche d'enregistrement qualité extraction d'acides nucléiques.

PCR de détection en point final

Les ADN des échantillons étant extraits, la PCR de détection peut être maintenant réalisée. La détection PCR sans passer par une phase d'extraction est très délicate, ne serait-ce que par la présence d'inhibiteurs PCR dans le matériel végétal.

Dans le cadre d'analyses d'identification, il est possible de réaliser une PCR directement sur cultures bactériennes, par exemple en lysant thermiquement les cellules bactériennes préalablement à la PCR.

1. Échantillons utilisés pendant la formation

Les semences utilisées pendant cette formation sont des semences exemptes de *Xaa*. Les ADN extraits sur macérâts pendant cette formation ne contiennent donc pas d'ADN de *Xaa*. Ces ADN serviront de témoins négatifs de processus.

Des échantillons ont été préparés à la Réunion en ajoutant des *Xaa* portant au moins l'un des deux marqueurs AVR et PILI et à différentes concentrations dans du macérât de semences saines. L'ADN de ces échantillons artificiellement contaminés ont été extraits avec le même protocole que celui suivi pendant cette formation. La liste des échantillons analysés en PCR est résumée dans le tableau 1.

2. Témoins positifs et négatifs

La norme française XP V03-043 (Juillet 2008) qui concerne les « Exigences générales pour la réalisation d'analyses utilisant la biologie moléculaire pour la détection et l'identification d'organismes pathogènes, d'altération et ravageurs des végétaux et produits dérivés », recommande de préparer un certain nombre de témoins positifs et négatifs, qui sont résumés dans la figure 2.

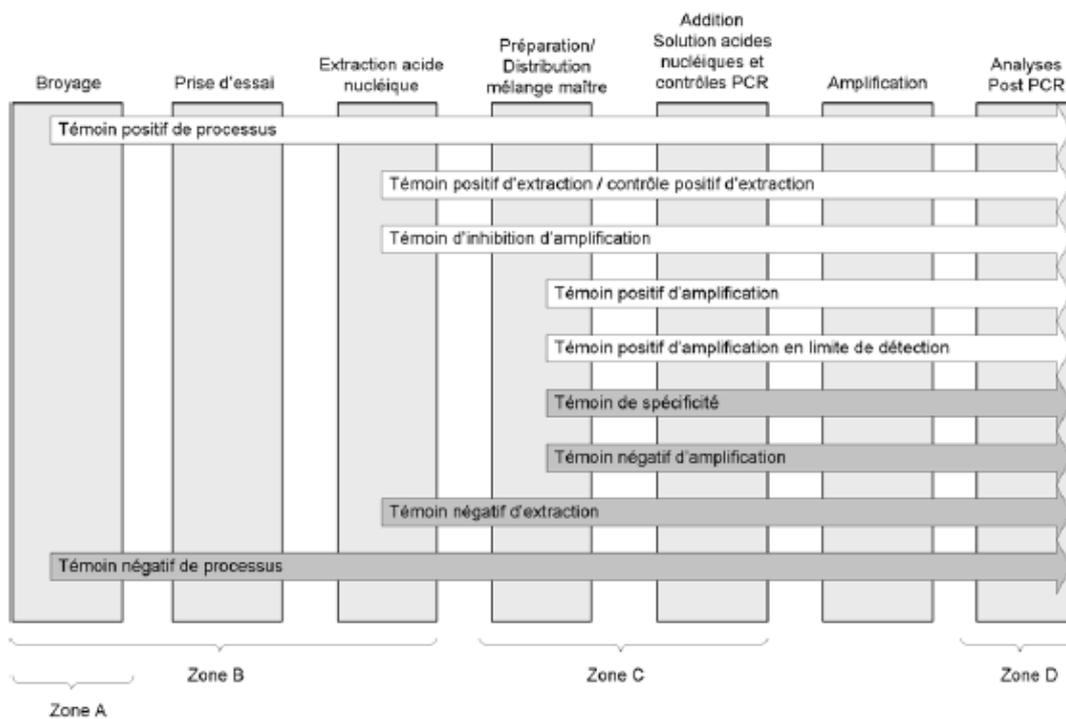


Figure 2. Liste des témoins recommandés par la norme XP V03-43.

Flux d'échantillons et étapes contrôlés par les témoins négatifs et positifs [source: norme XP V03-43].

Nature de l'échantillon			Résultats						Code échantillon
			AVR [+/-]*		PILI [+/-]*		Final [+/-]**		
Souches cibles	CFBP6369(T)	Macérât sain + bactérie 1E+7 CFU.mL ⁻¹							C1
		Macérât sain + bactérie 1E+6 CFU.mL ⁻¹							C2
		Macérât sain + bactérie 1E+5 CFU.mL ⁻¹							C3
		Macérât sain + bactérie 1E+4 CFU.mL ⁻¹							C4
		Macérât sain + bactérie 1E+3 CFU.mL ⁻¹							C5
		Macérât sain + bactérie 1E+2 CFU.mL ⁻¹							C6
		Macérât sain + bactérie 1E+1 CFU.mL ⁻¹							C7
		Macérât sain + bactérie 1E+0 CFU.mL ⁻¹							C8
		ADN extrait de culture pure à 1E+7 CFU.mL ⁻¹							C9
		ADN extrait de culture pure à 1E+6 CFU.mL ⁻¹							C10
		ADN extrait de culture pure à 1E+5 CFU.mL ⁻¹							C11
		ADN extrait de culture pure à 1E+4 CFU.mL ⁻¹							C12
		ADN extrait de culture pure à 1E+3 CFU.mL ⁻¹							C13
		ADN extrait de culture pure à 1E+2 CFU.mL ⁻¹							C14
		ADN extrait de culture pure à 1E+1 CFU.mL ⁻¹							C15
		ADN extrait de culture pure à 1E+0 CFU.mL ⁻¹							C16
	JX35-2	ADN extrait de culture pure à 1E+7 CFU.mL ⁻¹							C17
	JX36-1	ADN extrait de culture pure à 1E+7 CFU.mL ⁻¹							C18

Nature de l'échantillon			Résultats						Code échantillon
			AVR [+/-]*		PILI [+/-]*		Final [+/-]**		
Témoins positifs	T+ de processus	Macérât sain + souche type 1E+7 CFU.mL-1							T+1
	T+ d'extraction	ADN souche type extrait de culture pure à 1E+7 CFU.mL-1							T+2
	T+ amplification	ADN souche type extrait de culture pure à 1E+7 CFU.mL-1 et pré-testé positif en PCR							T+3
	T+ amplification LOD	ADN souche type extrait de culture pure à 1E+3 CFU.mL-1 et pré-testé positif en PCR							T+4
Témoins négatifs	T- de processus	Macérât sain extrait au kit Qiagen							T-1
	T- d'extraction	TRIS extrait au kit Qiagen							T-2
	T- d'amplification	Tampon AE (tampon d'élution d'ADN du kit Qiagen)							T-3
Témoins négatifs de spécificité= Souches non cibles	Autre <i>Xanthomonas</i> ***	ADN extrait de culture pure à 1E+6 CFU.mL-1							T-4
	Autre pathogène de l'oignon****	ADN extrait de culture pure à 1E+6 CFU.mL-1							T-5

Tableau 1. Liste des échantillons analysés pendant la formation PCR ePRPV.

* +: le résultat est dit positif si une bande de la taille attendue est observée et si les témoins négatifs ne présentent pas cette bande

** +: le résultat est dit positif si une bande de la taille attendue est observée au moins pour l'un des deux marqueurs et si les témoins négatifs ne présentent pas une bande correspondant à l'un des deux marqueurs

*** : *Xanthomonas alfalfae* pv. *citrumelonis* (CBP2910), appartient au même sous-groupe génétique 9.2 que les souches *Xaa*.

**** : *Pantoea agglomerans* (LMG2595)

3. Réaction Multiplex Nested PCR

Une Nested PCR se déroule donc en 2 phases : une première PCR dite primaire et une seconde dite Nested (car plus interne au 1^{er} fragment généré).

Une réaction PCR est typiquement composée de Taq polymérase, tampon de réaction, nucléotides, amorces, MgCl₂ auxquels on ajoute la matrice d'ADN.

- PCR primaire

La réaction PCR primaire de la multiplex nested PCR allii est donnée dans le tableau 2. Calculer au préalable le volume nécessaire pour analyser nos 27 échantillons, en prenant une marge de précaution de 10% :

	Nombre d'échantillons <input type="text" value=""/>			
	Conc stock	Conc tube	Vol 1 échantillon (µL)	échantillons (µL)
Eau DNA free	-	-	12,5	
Tampon Promega	5X	1X	5	
dNTPs	10 mM each	100µM each	0,25	
PXaa1U (=197U)	10µM	0,2µM	0,5	
PXaa1L (=893L)	10µM	0,2µM	0,5	
PXaa2U (=Avr419U)	10µM	0,2µM	0,5	
PXaa2L (Avr1393L)	10µM	0,2µM	0,5	
MgCl ₂	25mM	3mM	3	
Taq Promega	5U/µL	1,25U	0,25	
ADN			2	
Vol final			25µL	

Tableau 2. Mix PCR Primaire allii.

Une fois le mix PCR réalisé, l'aliquoter en déposant 23µL par puits sur la plaque PCR. Ajouter ensuite 2µL d'ADN de chaque échantillon. Appliquer un film aluminium adhésif et placer la plaque PCR dans le thermo-cycleur. Lancer la réaction PCR avec les conditions données dans le tableau 3. Remplir les fiches d'enregistrement d'amplification PCR et de plan de plaque PCR.

94°C	5min	
95°C	1min	
63°C	1min	x 40 cycles
72°C	2min	
72°C	5min	
taille avr	995 pb	
taille pili	697 pb	

Tableau 3. Conditions PCR Primaire allii.

Une fois une réaction PCR terminée, les amplifiats peuvent être conservés soit à 4°C pour une courte durée, soit à -20°C pour conservation à plus long terme. Dans notre contexte, les amplifiats nous serviront de matrice pour l'étape de Nested-PCR et seront migrés sur gel, nous les conserverons donc à 4°C en attendant ces étapes.

- PCR Nested

La réaction PCR de la nested PCR allii est donnée dans le tableau 4. Calculer au préalable le volume nécessaire pour analyser nos 27 échantillons, en prenant une marge de précaution de 10% :

			Nombre d'échantillons	
	Conc stock	Conc tube	Vol 1 échantillon (µL)	X échantillons (µL)
Eau DNA free	-	-	12,5	
Tampon Promega	5X	1X	5	
dNTPs	10 mM each	100µM each	0,25	
NXaa1U (=424U)	10µM	0,2µM	0,5	
NXaa1L (=870L)	10µM	0,2µM	0,5	
NXaa2U (=Avr957U)	10µM	0,2µM	0,5	
NXaa2L (=Avr1341L)	10µM	0,2µM	0,5	
MgCl2	25mM	3mM	3	
Taq Promega	5U/µL	1,25U	0,25	
ADN			2	
Vol final			25µL	

Tableau 4. Mix PCR Nested allii

Une fois le mix PCR réalisé, l'aliqoter en déposant 23µL par puits sur la plaque PCR. Ajouter ensuite 2µL de primaire de chaque échantillon. Appliquer un film aluminium adhésif et placer la plaque PCR dans le thermo-cycleur. Lancer la réaction PCR avec les conditions données dans le tableau 5. Remplir la fiche d'enregistrement d'amplification PCR et de plan de plaque PCR.

95°C	5min	
94°C	30s	x 30 cycles
57°C	30s	
72°C	40s	
72°C	5min	
taille avr	401 pb	
taille pili	447 pb	

Tableau 5. Conditions PCR Nested allii

Electrophorèse

Les réactions PCR sont terminées. Il va donc maintenant falloir visualiser le résultat des ces réactions PCR. Pour cela nous allons faire migrer les amplifiats PCR sur des gels d'agarose, puis les visualiser sous UV.

1. Préparation des gels d'agarose

Le pourcentage d'agarose est choisi principalement en fonction de la taille des produits PCR. Plus la taille est petite, plus le pourcentage d'agarose sera important. Typiquement ce pourcentage varie entre 1 et 4%. Pour notre Multiplex Nested PCR nous allons utiliser un gel à 1.5% w/v pour les produits de la PCR primaire, et 3% pour ceux de la PCR nested.

Pour cela, peser la masse nécessaire d'agarose et ajouter la à 100 ou 300 mL (selon taille du gel) de tampon TAE ou TBE 1X préalablement disposés dans un erlen (100mL petit gel, 300 mL grand gel). Passer le tout au four à micro-ondes le temps nécessaire pour que le liquide devienne entièrement transparent. Faire attention à la sortie du four à micro-ondes de n'agiter l'erlen que lorsque celui-ci sera tourné vers un mur afin qu'aucune projection de tampon bouillant ne vous atteigne ou l'un de vos collègues. Couler le gel encore liquide mais pas bouillant (<60°C) dans une cuve à électrophorèse, puis placer un peigne adapté. Une fois la prise en masse faite, conserver le gel à 4°C si nécessaire, sinon lancer l'électrophorèse.

2. Electrophorèse

Recouvrir le gel d'agarose de tampon de migration (TAE ou TBE 1X). Déposer directement les produits PCR (10µL) dans les puits formés par le peigne en n'oubliant pas de réserver des puits pour les marqueurs de taille et les témoins. Il aurait fallu ajouter du bleu de charge si le tampon PCR n'en avait pas déjà contenu. Ajouter les marqueurs de taille 100pb et/ou 1kb (5-10µL). Brancher les fils au générateur (les fragments d'ADN étant chargés négativement ils vont migrer vers le pôle positif) et lancer l'électrophorèse avec une tension de 100V et une durée d'1h30. Suivre le front de migration régulièrement (le colorant bleu Promega migre comme un fragment de 4kb sur gels d'agarose 0.5-1.4% et le jaune comme un fragment de 10pb).

3. Révélation au bromure d'ethidium (BET)

Pour révéler les produits PCR nous allons utiliser le BET qui pour rappel est un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce sous les UV. **Le BET étant potentiellement cancérigène et tératogène, revêtir une blouse en coton dédiée à la manipulation du BET et enfiler des gants en nitrile.**

Placer les gels 15 min dans un bac contenant une solution de BET à 2 µg/mL. Placer ensuite les gels dans un bain d'eau pour rinçage pendant 15 minutes. Placer enfin les gels sur le transilluminateur UV, se protéger les yeux et allumer les tubes UV. Observer la présence de bandes ou non pour les témoins négatifs et positifs, vérifier la qualité des marqueurs de taille et enfin observer les résultats obtenus pour nos échantillons. Prendre une photo et l'imprimer. Remplir la fiche qualité d'enregistrement des conditions et résultats de l'électrophorèse.

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Dendrogramme AFLP d'une collection mondiale de <i>Xaa</i>	5
Figure 2. Liste des témoins PCR de la norme XP V03-43.....	9

Tableau 1. Liste des échantillons analysés pendant la formation PCR.....	11
Tableau 2. Mix PCR primaire allii	112
Tableau 3. Conditions PCR primaire allii.....	12
Tableau 4. Mix PCR Nested allii.....	13
Tableau 5. Conditions PCR Nested allii.....	13

Liste des annexes

Annexe 1. Fiche qualité enregistrement extraction acides nucléiques
Annexe 2. Fiche qualité enregistrement amplification PCR ADN
Annexe 3. Fiche qualité enregistrement plan de plaque PCR
Annexe 4. Fiche qualité enregistrement électrophorèse

Institut	Enregistrement	N° ENR-XXX-X
Biologie moléculaire	Fiche de manipulation - Extraction d'acides nucléiques (ADN ou ARN)	Date d'application : XX :XX/XXXX Page 1/1

Date		Opérateur	
Organisme recherché		Matrice	
Référence du test			
Type d'extraction	<input type="checkbox"/> ADN	<input type="checkbox"/> ARN	
<i>Si disponible:</i> Référence des échantillons:			

1) Témoins d'extraction :

Type de témoin	Témoin(s) sain(s)	Témoin(s) positif(s)
Nature et références		

2) Broyage :

Détail	Référence des consommables
	Type de tampon :
	Référence du tampon :
	(n° de livraison ou n° de fabrication)

3) Extraction:

Type d'extraction	Détail	Référence des consommables
<input type="checkbox"/> Extraction Kit	<input type="checkbox"/> DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) <input type="checkbox"/> QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) <input type="checkbox"/> RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) <input type="checkbox"/> Autre : Volume d'éluion : <input type="checkbox"/> 50µL <input type="checkbox"/> 100µL <input type="checkbox"/> 200µL	Référence du kit :
<input type="checkbox"/> Autre	(Préciser)	

Commentaires éventuels	
-------------------------------	--

Institut	Enregistrement	N° ENR-XXXX-X
Biologie moléculaire	Fiche de manipulation – Amplification d’ADN PCR point final	Date d’application : XX/XX/XXXX Page 1/1

Date		Opérateur	
Organisme recherché		Matrice	
Référence du test			
<i>Si disponible:</i> Référence des échantillons:			
Amorces cibles (5’ → 3’)			

1) Témoins d’amplification :

Type de témoin	Témoin(s) sain(s)	Témoin(s) positif(s)
Nature et références		

2) Mélange réactionnel

Nbre de puits :

Volume réactionnel µL

Réactifs	N° livraison	[Sol mère]	[puits]	Vol. d'un puits (µL)	Vol. Mix (µL)
Eau					
Buffer		X	X		
MgCl ₂		mM	mM		
dNTPs (mix)		mM	mM		
Amorce cible F		µM	µM		
Amorce cible R		µM	µM		
Taq		U/µL	U/puits		
Autre :					

contrôle de calcul:

ADN				
Tot				µL

3) Amplification (joindre le plan de plaque en annexe)

Thermocycleur	Température (°C)	Durée	Cycles	
<input type="checkbox"/> () <input type="checkbox"/> () <input type="checkbox"/> Autre :	T°C dénaturation initiale :		X	
	T°C dénaturation. :			
	T°C hybridation :			
	T°C élongation :			
	T°C élongation finale :			X
	T°C conservation :	12°C	∞	X

Commentaires éventuels	
-------------------------------	--

Institut	Enregistrement	N° ENR-XXXX-X
Biologie moléculaire	Plan de plaque PCR	Date d'application : XX/XX/XXXX Page 1/1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Commentaires éventuels	
-------------------------------	--

Rédigé par :

Revu par :

Approuvé par :

Institut	Enregistrement	N° ENR-XXXX-X
Biologie moléculaire	Fiche de manipulation – Electrophorèse Petit Gel	Date d'application : XX/XX/XXXX Page 1/2

Date		Opérateur	
Organisme recherché		Matrice	
Référence du test			
<i>Si disponible:</i> Référence des échantillons:			
Nombre de paires de bases attendu		Marqueur de taille	<input type="checkbox"/> 100pb <input type="checkbox"/> 1kpb
			n° de livraison :

Electrophorèse

Gel d'agarose	<input type="checkbox"/> 1 % (soit 1g pour 100mL) <input type="checkbox"/> 1,5 % (soit 1,5g pour 100mL) <input type="checkbox"/> 2 % (soit 2g pour 100mL) <input type="checkbox"/> autre :	Référence Agarose : (n° de livraison) Référence Tampon TAE : (n° de livraison ou n° de fabrication)
Volume de dépôt/puits	<input type="checkbox"/> 10µL <input type="checkbox"/> autre :	Migration
		<input type="checkbox"/> 1h à 100 volts <input type="checkbox"/> autre :

Validation des résultats (à partir des valeurs des témoins):

Type de témoins	Résultats attendus		Résultats obtenus	
Témoin(s) sain(s)	<input checked="" type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif
Témoin(s) positif(s)	<input type="checkbox"/> négatif	<input checked="" type="checkbox"/> positif	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif
Mix PCR	<input checked="" type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif
Autre	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif

Commentaires éventuels	
-------------------------------	--

Rédigé par :

Revu par :

Approuvé par :

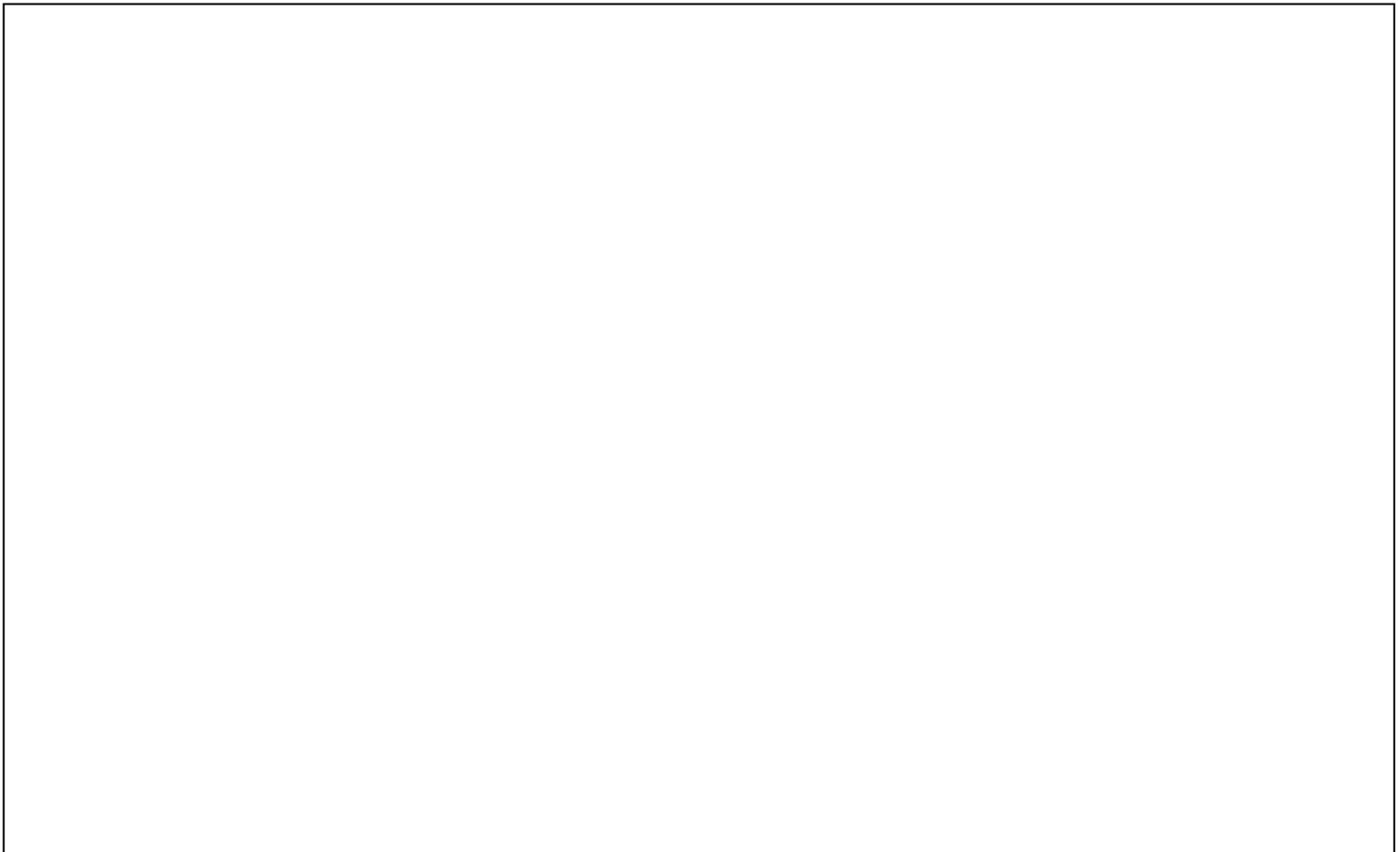
Institut	Enregistrement	N° ENR-XXXX-X
Biologie moléculaire	Fiche de manipulation – Electrophorèse Petit Gel	Date d'application : XX/XX/XXXX Page 2/2

Résultats

Puits du gel d'électrophorèse

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N° Echantillon																				
Résultat Echantillon																				
Résultat contrôle interne																				
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N° Echantillon																				
Résultat Echantillon																				
Résultat contrôle interne																				

Photo du gel



Rédigé par :

Revu par :

Approuvé par :

Institut	Enregistrement	N° ENR-XXXX-X
Biologie moléculaire	Plan de plaque PCR	Date d'application : XX/XX/XXXX Page 1/1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Commentaires éventuels	
-------------------------------	--

Rédigé par :

Revu par :

Approuvé par :

Institut	Enregistrement	N° ENR-XXXX-X
Biologie moléculaire	Fiche de manipulation – Amplification d'ADN PCR point final	Date d'application : XX/XX/XXXX Page 1/1

Date		Opérateur	
Organisme recherché		Matrice	
Référence du test			
<i>Si disponible:</i> Référence des échantillons:			
Amorces cibles (5' → 3')			

1) Témoins d'amplification :

Type de témoin	Témoin(s) sain(s)	Témoin(s) positif(s)
Nature et références		

2) Mélange réactionnel

Nbre de puits :

Volume réactionnel µL

Réactifs	N° livraison	[Sol mère]	[puits]	Vol. d'un puits (µL)	Vol. Mix (µL)
Eau					
Buffer		X	X		
MgCl ₂		mM	mM		
dNTPs (mix)		mM	mM		
Amorce cible F		µM	µM		
Amorce cible R		µM	µM		
Taq		U/µL	U/puits		
Autre :					

contrôle de calcul:

ADN				
Tot				µL

3) Amplification (joindre le plan de plaque en annexe)

Thermocycleur	Température (°C)	Durée	Cycles	
<input type="checkbox"/> () <input type="checkbox"/> () <input type="checkbox"/> Autre :	T°C dénaturation initiale :		X	
	T°C dénaturation. :			
	T°C hybridation :			
	T°C élongation :			
	T°C élongation finale :			X
	T°C conservation :	12°C	∞	X

Commentaires éventuels	
-------------------------------	--

Institut	Enregistrement	N° ENR-XXXX-X
Biologie moléculaire	Fiche de manipulation – Electrophorèse Petit Gel	Date d'application : XX/XX/XXXX Page 1/2

Date		Opérateur	
Organisme recherché		Matrice	
Référence du test			
<i>Si disponible:</i> Référence des échantillons:			
Nombre de paires de bases attendu		Marqueur de taille	<input type="checkbox"/> 100pb <input type="checkbox"/> 1kpb
			n° de livraison :

Electrophorèse

Gel d'agarose	<input type="checkbox"/> 1 % (soit 1g pour 100mL) <input type="checkbox"/> 1,5 % (soit 1,5g pour 100mL) <input type="checkbox"/> 2 % (soit 2g pour 100mL) <input type="checkbox"/> autre :	Référence Agarose : (n° de livraison) Référence Tampon TAE : (n° de livraison ou n° de fabrication)
Volume de dépôt/puits	<input type="checkbox"/> 10µL <input type="checkbox"/> autre :	Migration <input type="checkbox"/> 1h à 100 volts <input type="checkbox"/> autre :

Validation des résultats (à partir des valeurs des témoins):

Type de témoins	Résultats attendus		Résultats obtenus	
Témoin(s) sain(s)	<input checked="" type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif
Témoin(s) positif(s)	<input type="checkbox"/> négatif	<input checked="" type="checkbox"/> positif	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif
Mix PCR	<input checked="" type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif
Autre	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif	<input type="checkbox"/> négatif	<input type="checkbox"/> positif

Commentaires éventuels	
-------------------------------	--

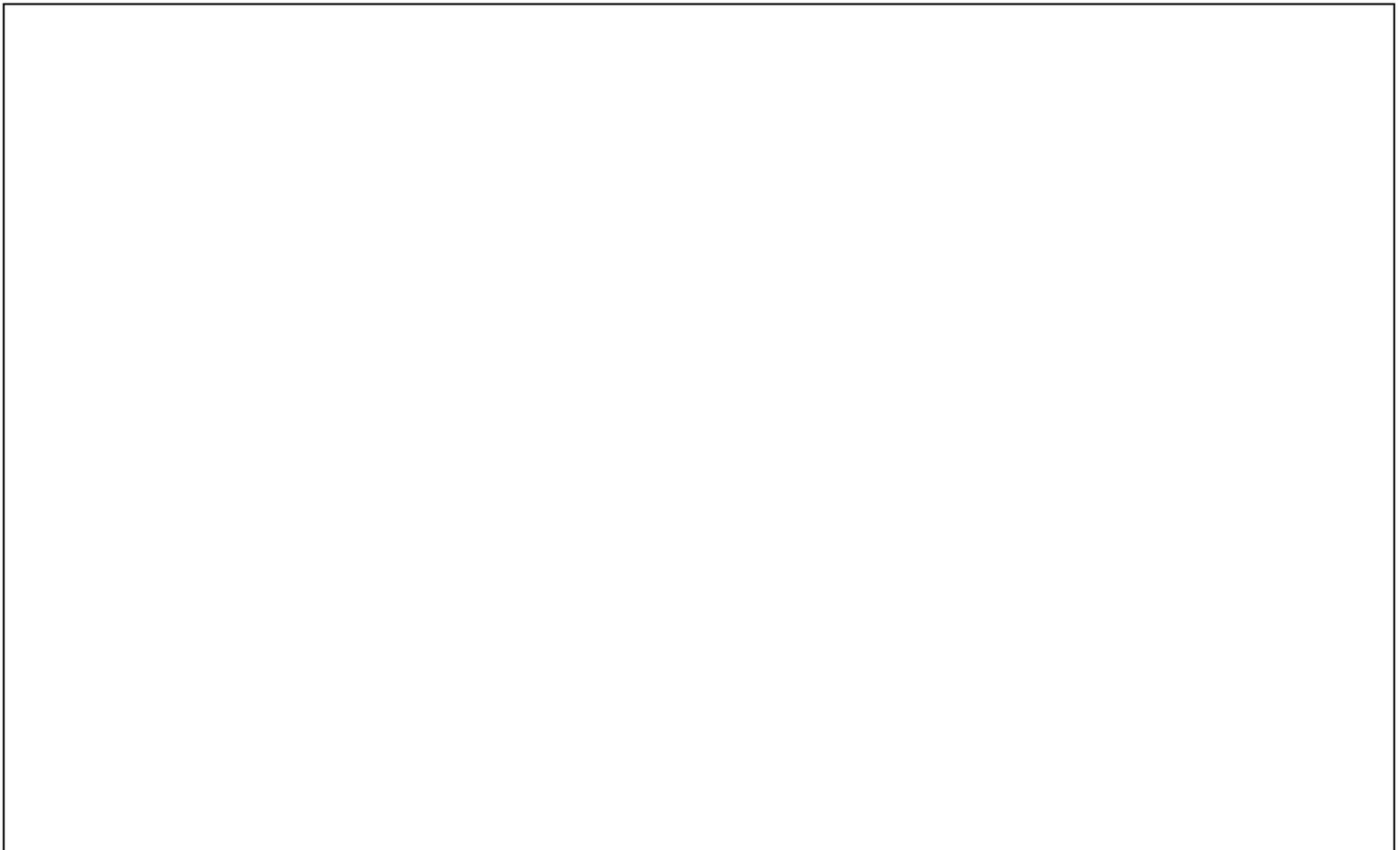
Institut	Enregistrement	N° ENR-XXXX-X
Biologie moléculaire	Fiche de manipulation – Electrophorèse Petit Gel	Date d'application : XX/XX/XXXX Page 2/2

Résultats

Puits du gel d'électrophorèse

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N° Echantillon																				
Résultat Echantillon																				
Résultat contrôle interne																				
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N° Echantillon																				
Résultat Echantillon																				
Résultat contrôle interne																				

Photo du gel



Rédigé par :

Revu par :

Approuvé par :