



Microsynth

PCR Kit pour la détection d'*Erwinia amylovora* (Feu bactérien)

Instructions

Microsynth AG
Schützenstrasse 15
9436 Balgach
Suisse

Tel. ++41 71 722 8333

Fax ++ 41 71 722 8758

administration@microsynth.ch

www.microsynth.ch



PCR Kit pour la détection d'*Erwinia amylovora* (Feu bactérien)

Contenu du kit

	96 PCR tube – Kit Article No. 1000-96	384 PCR tube – Kit Article No. 1000-384	1536 PCR tube – Kit Article No. 1000-1536
Tampon d'extraction d'ADN	1 x 100ml	1 x 400ml	4 x 400ml
PCR tubes	96 tubes	384 tubes	1536 tubes
dNTPs chacun 25mM, 22µl	1 tube	4 tubes	16 tubes
Contrôle positif, 300 µl	2 tubes	2 tubes	6 tubes
1 manuel d'instructions			

Les tubes PCR contiennent un mélange lyophilisé d'amorces, de sels PCR et d'ADN de contrôle interne.

Envoi et température de stockage

Envoi: Température ambiante. Des tests rigoureux effectués par Microsynth ont montré que la stabilité ainsi que la qualité du kit n'étaient en rien influencés après un séjour de 10 jours à température ambiante.

Stockage: Tubes PCR, dNTPs, contrôle positif à -15 to -25 °C
ADN tampon d'extraction à 2 - 8 °C

Stabilité

Aux conditions de stockage mentionnées ci-dessus : 1,5 année minimum

Equipements requis

Blocs de chauffage
Pipettes + pointes à filtres
1.5ml ou 2ml tubes plastiques avec bouchons à vis
Equipement d'électrophorèse (gels d'agarose)
Centrifugeuse
Machine PCR
Hot Start PCR Polymerase

Préface

Microsynth recommande de suivre les instructions générales suivantes pour prévenir d'éventuels risques de contamination croisée lors de la PCR. Bien que nous ayons observé que les problèmes de contamination croisée ne sont pas significatifs dans ce kit, nous recommandons d'utiliser des pointes à filtres pour chaque étape de pipetage. Les trois étapes suivantes sont généralement effectuées dans trois locaux différents.

- Local d'extraction: préparation des plantes et addition du tampon d'extraction, chauffage et dilution
- Local pré-PCR: Addition du mastermix et des extraits d'ADN dans les tubes PCR *
- Local PCR et électrophorèse: machines PCR et électrophorèse sur gel. Après la réaction PCR il est important de ne pas ouvrir les tubes PCR ailleurs que dans ce local (surtout pas dans le local pré-PCR !)

*Il est recommandé d'ajouter le mastermix dans une hotte à flux laminaire et les extraits d'ADN à l'extérieur de la hotte.

Principe

Ce kit est basé sur une réaction PCR nichée (nested PCR) dans un plasmide pEA29 publiée par Maria M. Lopez, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113 Moncada, Spain.

Microsynth a développé ce protocole et les avantages apportés sont les suivants:

- Vitesse: La présence de bactéries *E. amylovora* est détectée dans un laps de temps de 6 heures.
- Pas de précultivation des bactéries *E. amylovora* –PCR directe à partir de branches, feuilles, fruits ou fleurs.
- La réaction PCR comprend 67 cycles. Ce niveau d'amplification particulièrement élevé dépasse de beaucoup les 35 cycles habituels et permet ainsi d'obtenir une très haute sensibilité du test, également si les quantités d'ADN présentes au départ sont très faibles. Pour cette raison, cette méthode n'est pas affectée par la présence d'inhibiteur de PCR (ceux-ci étant fortement dilués).
- Sensibilité: 1 cellule d'*E. amylovora* peut être détectée par ce kit PCR
- Haut niveau de standardisation. Chaque lot de production est contrôlé par Microsynth avec un contrôle positif et doit remplir les conditions de qualité décrites sur la feuille de spécification livrée avec le kit. Ces contrôles permettent d'exclure des variations interlot. La seule source de variation possible se trouve dans la manière dont les échantillons sont prélevés sur les plantes.

Travail de preparation

Dissoudre la poudre du tampon d'extraction d'ADN dans de l'eau stérilisée. La quantité d'eau est indiquée sur le flacon. Laisser reposer 5 minutes afin que la poudre se dissolve complètement et secouer

Avant d'ouvrir, centrifuger pendant 10 secondes le tube contenant les nucléotides, afin qu'aucun liquide ne reste dans le couvercle du tube. Au 22 µl (25 mM de chaque nucléotide), ajouter 198 µl d'eau stérilisée, afin d'obtenir une concentration de 2.5 mM pour chaque nucléotide.

Protocole court

Transférer les petits morceaux (1mm) de plantes infectées dans un tube en plastique (1,5 – 2 ml) se fermant par bouchon à vis. Ajouter 100-1000 µl de tampon d'extraction d'ADN. Les morceaux de plantes infectées doivent être complètement recouverts. Chauffer 20 minutes à 95°C pour extraire l'ADN d'*E. amylovora*.

Pendant ce temps, ajouter 24µl de mastermix (H₂O, dNTPs, et polymerase) aux tubes PCR du kit de Microsynth.

Centrifuger l'extrait d'ADN pendant 10 secondes et diluer 1 µl de surnageant dans de l'eau stérilisée.

Ajouter 1µl d'extrait d'ADN dilué au 24µl des tubes de réactions PCR (ci-dessus)

Démarrer la réaction PCR (env. 3 heures)

Charger 5 µl sur un gel d'agarose (1.5 %) et laisser migrer pendant 30 minutes.

Interprétation: La bande la plus basse correspond au fragment de 139 bp et représente le contrôle interne. Cette bande doit toujours être visible. En cas d'absence, une interprétation des résultats est impossible. La présence d'un second fragment de 383 à 399 bp indique la présence d'*E. amylovora*.

Protocole détaillé

a) Récolte des échantillons.

Des petits morceaux en provenance des plantes soupçonnées sont collectés dans des tubes en plastique de 1.5-2 ml avec bouchon à vis. Lors de cette étape, il est important de travailler soigneusement et le nettoyage des couteaux utilisés est primordial. Un test négatif utilisant des plantes non infectées doit également être effectué.

L'âge du matériel n'est pas important pour ce kit PCR. Chez Microsynth, nous avons obtenu des résultats très significatifs sur des tiges complètement séchées et conservées depuis 5 mois. Il est toutefois plus facile de distinguer les bactéries sur du matériel frais.

b) Extraction de l'ADN d'*E. amylovora*

Ajouter 100-1000 µl du tampon d'extraction d'ADN fourni dans le tube contenant l'échantillon. Cette quantité n'est pas critique, mais les morceaux de plantes doivent être complètement recouverts de tampon. Mettre le tube dans un bloc chauffant pendant 20 minutes à 95°C. Après dix minutes agiter le tube rapidement, remettre à nouveau sur le bloc chauffant pour 10 minutes et à nouveau agiter à la fin. Au cas où le tampon deviendrait visqueux pendant la phase de chauffage, diluer simplement avec un peu de tampon supplémentaire. La solution peut être translucide, jaune ou brune. L'ADN bactérien si présent sera extrait. Après cette extraction, centrifuger (20 secondes à 10 – 17krpm). Prendre 1 µl de surnageant et diluer dans de l'eau stérilisée. Dépendant du type de matériel (fleurs délavées avec peu de bactéries ou tiges avec beaucoup de bactéries) une dilution d'un facteur 10, 100, 1'000 ou 10'000 devra être faite. Cette dilution est le résultat de longues investigations chez Microsynth. Pour les tiges, nous avons observés des résultats optimaux avec une dilution

d'un facteur 1'000. Des extraits non-dilués contiendront des inhibiteurs de la PCR ainsi que des sels en trop grande quantité dans le tampon d'extraction, c'est pourquoi, l'extrait doit au minimal être dilué d'un facteur 10.

c) Amplification PCR.

Les tubes PCR livrés dans le kit, contiennent sous forme lyophilisée les sels, les primers ainsi qu'un ADN de contrôle. Le rôle de l'ADN de contrôle est d'indiquer le succès de la réaction PCR ainsi que l'absence d'agents inhibiteurs de la réaction. Les nucléotides sont dans un tube séparé. La Taq-Polymerase n'est pas incluse dans le kit. Microsynth a testé plusieurs Taq-Polymerase et toutes ne donnent pas des résultats optimaux dans ce test. Nous recommandons d'utiliser seulement les enzymes testées et mentionnées dans la liste ci-dessous.

Préparer un mastermix contenant l'eau, les dNTPs et la PCR polymerase. Le volume du mastermix doit être calculé en fonction du nombre d'échantillons, des contrôles positifs et des contrôles négatifs.

Mastermix pour 1 tube:

21.7 µl eau stérilisée

2 µl nucléotides dilués (2.5mM chacun)

0.3 µl Taq-Polymerase 5 unités par µl

Ajouter 24 µl de ce mastermix dans chaque tube PCR, mélanger sur vortex, et ajouter 1µl d'extrait d'échantillon ou 1 µl de contrôle pour un volume final de 25µl. Mélanger doucement et centrifuger au cas où du liquide serait présent dans le couvercle.

Conditions des cycles de la PCR:

Etape 1	94 °C	12 mins
Etape 2	94 °C	30 secs
Etape 3	72 °C	60 secs
Etape 4	Retour à l'étape 2, 25x	
Etape 5	94 °C	30 secs
Etape 6	56 °C	30 secs
Etape 7	72 °C	45 secs
Etape 8	Retour à l'étape 5, 40x	
Etape 9	15 °C	infini
Etape 10	fin	

(temps total 3 heures)

d) Electrophorèse sur gel d'agarose.

Durant l'amplification PCR, préparer un gel d'agarose (1.5%) contenant de l'éthidium bromide ou un marqueur intercalant similaire. Dans le cas où plusieurs gels par semaine / par mois, sont utilisés, nous recommandons de préparer un gel plus grand et d'en sectionner chaque fois la taille désirée. Le gel non utilisé peut facilement être stocké pendant plusieurs semaines dans l'obscurité, enveloppé dans une feuille plastique. Les deux fragments PCR d'intérêt sont courts et une distance de séparation sur le gel de 45 mm est largement suffisante. Charger 5µl de la réaction PCR sur le gel et laisser migrer jusqu'à ce que le bleu de bromophénol de la réaction PCR migre de 26 mm depuis le puits (normalement 30 minutes à 200 Volts, 140mA). Les deux bandes PCR se situent aux alentours du bleu de bromophénol. Conseil: Le tampon d'électrophorèse peut être utilisé jusqu'à 5 fois avant d'être remplacé.

e) Interprétation des résultats

Le contrôle positif montrera une forte bande d'ADN d'*E. amylovora* à 399bp et une bande plus faible à 139bp (contrôle interne).

Le contrôle négatif ne montrera qu'une seule bande correspondant au seul fragment de 139bp. Si le fragment de 399 bp est visible, une contamination croisée a eu lieu pendant l'expérience. Dans ce cas, il n'est pas possible d'interpréter les réactions PCR faites simultanément avec ces contrôles.

Vos échantillons montreront toujours une bande correspondant au fragment de 139bp. Si cette bande n'est pas visible, une inhibition de la réaction PCR a eu lieu. Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être interprétés et la réaction PCR doit être répétée en augmentant la dilution de l'extrait d'ADN. Généralement une dilution de 1 : 1'000 donne de bons résultats.

Des variations de 8bp pour le Feu bactérien ont été observées au niveau mondial. Donc la taille de vos fragments peut varier.

Si le fragment de 381 - 399bp est présent, votre échantillon contient la bactérie *E. amylovora*

Si le fragment de 381 - 399bp est absent, votre échantillon ne contient pas la bactérie *E. amylovora*

Les fragments d'ADN d'*E. amylovora* peuvent être séquencés si des investigations supplémentaires sont nécessaires. Le fragment court de 139bp n'interfère pas dans le processus de séquençage. Cependant il est recommandé d'éliminer avec une colonne de purification les primers et les nucléotides avant de procéder au séquençage. Microsynth propose des tels services de purification et de séquençage sur demande.

Appendix 1: Taq Polymerases recommandées

FastStart Taq DNA Polymerase, Roche, No de commande 12 158 264 001 (50 Unités; No de commande différents pour les grandes quantités)

HotStar Taq DNA Polymerase, Qiagen, No de commande 203203 (250 Unités) or 203205 (1000 Unités)

AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, No de commande N808-0240 or N808-0241

Les Taq Polymerase suivantes ont été testées chez Microsynth et ne fonctionnent pas avec ce système

Taq DNA Polymerase, Roche, No de commande 11 146 165 001 (100 Unités; No de commande différents pour les grandes quantités)

Taq DNA Polymerase, Qiagen, No de commande 201203

Taq DNA Polymerase, Invitrogen, No de commande 18038

Taq DNA Polymerase recombinant, Invitrogen, No de commande 10342

Taq DNA Polymerase, Sigma, No de commande D1806 and D8187

Taq DNA Polymerase, Promega, No de commande M1661

Taq DNA Polymerase, Amersham No de commande 27-0799

Appendix 2: Ce kit PCR a été testé avec succès avec des échantillons provenant des pays suivants :

Canada, Chypre, Tchéquie, Egypte, France, Grèce, Irlande, Nouvelle Zélande, Slovaquie, Espagne, Suède, Suisse, Hollande, Turquie, Royaume Uni, USA

Appendix 3: Hôtes testés pour le Feu bactérien:

Crataegus, Cotoneaster, Eryobotria, Malus, Pyracantha, Pyrus

Appendix pour analyses à haut débit (high throughput) racks spéciaux et 1ml –tubes

Pour des analyses à haut débit, Microsynth fournit des tubes préremplis avec de l'eau stérilisée ainsi que des racks spéciaux. Ceux-ci facilitent l'étape de dilution des extraits.

Par rack, mettre jusqu'à 24 extraits et tubes pour dilution (rack à 24 puits).

Centrifuger le rack rapidement (5 sec. 1000rpm) pour éliminer le liquide pouvant encore être présent dans le couvercle.

Faire les dilutions en utilisant une pipette à 8 canaux.

Mélanger les dilutions (pour bien mélanger des tubes plein, les bulles d'air doivent bouger dans tout le tube).

Centrifuger le rack rapidement à nouveau.

Transférer 1 µl de l'extrait dilué dans les tubes PCR (pipette à 8 canaux).

Matériel nécessaire :

Pipette 8 canaux extensible (Matrix)

Rotor de centrifugeuse pour plaques microtitres.

Vos commentaires

Vos commentaires nous intéressent. N'hésitez pas à nous en faire part.

Sur demande Microsynth peut développer un kit basé sur la PCR en temps réel

Version 1.05