

	Métagénomique ciblée sur MiSeq avec le protocole Tailed PCR - Réalisation de la première PCR amorces spécifiques -	Prérequis / Mode opératoire
		Version : 14.02.2022
		Pages : 1/4

I. Objet et domaine d'application

Le protocole utilisé sur la PGTB pour la préparation des bibliothèques de métagénomique ciblée sur MiSeq est celui développé par Illumina. Ce protocole mis en place pour le 16S peut être appliqué à d'autres régions cibles d'intérêt.

II. Documents de référence

Documents Illumina :

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol

III. Diffusion et confidentialité

Utilisateurs et personnel PGTB



IV. Hygiène et sécurité



Manipuler avec blouse, gants et lunettes de protection.

Attention : le 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix utilisé pour la réalisation de vos premières PCR contient du *tetramethylammonium chloride*. Cette substance est classée mortelle par ingestion, toxique par contact cutané, engendrant un risque avéré d'effets graves pour les organes et est toxique pour les organismes aquatiques.

Le Mix KAPA doit donc être manipulé **avec précaution** (voir la fiche de données de sécurité du produit disponible en ligne et prendre les précautions adéquates pour sa manipulation).

	Rédaction	Emilie Chancerel- IE	
	Approbation	Adline Delcamp - RMQ	



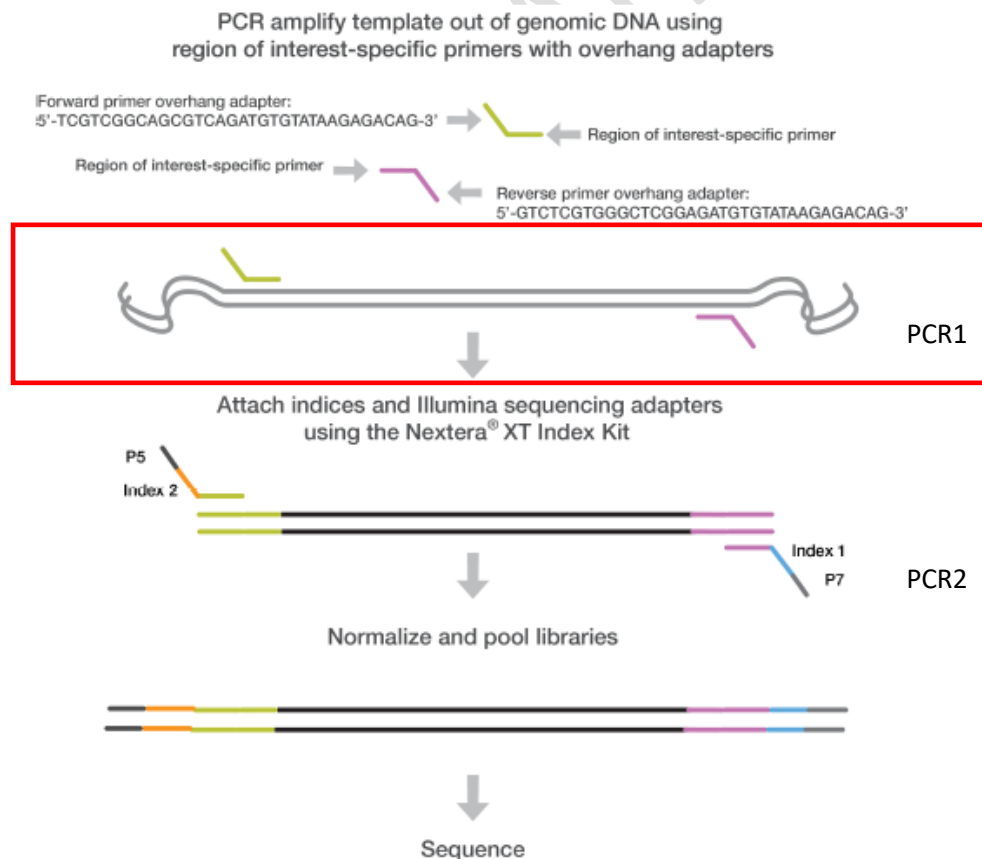
V. Contraintes

Nous recommandons fortement l'utilisation de l'ADN polymérase KAPA pour la réalisation des PCR1 (polymérase ayant une fidélité 100 fois supérieure aux Taq polymérases conventionnelles) ainsi que l'ajout de témoin(s) négatif(s) d'extraction et de PCR1. **Nous demandons également de laisser un puits libre sur chaque plaque pour notre contrôle interne.**

La réalisation de ce mode opératoire nécessite d'avoir été formé sur l'utilisation du spectrophotomètre Biotek pour le dosage de vos ADN et sur le robot Chemagic STAR si vous avez des réplicats de PCR1 à pooler.

VI. Principe de la méthode

Deux PCR successives vont permettre d'amplifier la région ciblée et d'y attacher de chaque côté les adaptateurs et index spécifiques pour chaque échantillon. Ce protocole vous guidera dans la réalisation des premières PCR avec vos amorces spécifiques (PCR1).



Attention : Veillez à commander au préalable les amorces spécifiques pour votre projet (cf. IX. La commande des amorces) ainsi que le Mix 2X KAPA HiFi HotStart (Références KK2601 et KK2602 chez Roche) nécessaire à la réalisation de la première PCR.

VII. Matériels nécessaires

Matériel courant de laboratoire : pipettes, pointes, vortex, centrifugeuse à tube et à plaques, tubes classiques. Plaques PCR 96 demi-jupées et films fortement adhésif recommandés :

Format	Fabricant	Références
Plaques 96	4TITUDE	4TI-0770/C, 4TI-0900/C
	THERMOFISCHER	AB-0800, AB-1400, AB-2400
Films	4TITUDE	4Ti-0500
	THERMOFISCHER	AB-0558

VIII. Réactifs nécessaires

H2O MilliQ, amorces, 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix.

IX. La commande des amorces

A vos amorces spécifiques doivent être ajoutées des séquences universelles qui vont permettre lors d'une 2ème PCR l'hybridation des adaptateurs et index de séquençage

Lorsque vous passerez commande de vos amorces, pensez **absolument** à ajouter les séquences universelles suivantes (en vert ci-dessous):

Amplicon PCR Forward Primer =

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGXXXXXXXXXXXXXXXXXX 3'

5' Séquence universelle 1 – Amorce spécifique Forward

Amplicon PCR Reverse Primer =

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGXXXXXXXXXXXXXXXXXX 3'

5' Séquence universelle 2 – Amorce spécifique Reverse

Remarque : Les séquences universelles forward et reverse sont différentes

Attention : Si vous mettez au point vos propres amorces, Illumina recommande de cibler une région qui permet un chevauchement d'au moins 50 pb au milieu des séquences en paired-end. Exemple : pour un run en 2x300pb, la taille de l'insert ne doit pas dépasser 550 pb.

Vous pouvez en ligne vérifier le design de vos amorces sur le site d'IDT : <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Le calcul du Tm doit se faire sur la base des amorces spécifiques (sans la séquence universelle) et elle doit être comprise entre 60 et

65°C. Pour l'analyse des hairpin et des dimères, la séquence entière (amorce spécifique + séquence universelle) doit être prise en compte.

Enfin, lors de la commande de vos amorces, la purification standard dessalée est suffisante.

	Métagénomique ciblée sur MiSeq avec le protocole Tailed PCR - Réalisation de la première PCR amorces spécifiques -	Prérequis / Mode opératoire
		Version : 14.02.2022
		Pages : 4/4

X. Réalisation de la première PCR (PCR1)



Il s'agit de l'amplification de la région cible avec vos amorces spécifiques avec séquence universelle (Amplicon PCR primers). Les ADN doivent être standardisés à 5ng/μL. Penser à ajouter des témoins négatifs d'extraction et de PCR. **Merci de laisser un puits vide pour notre contrôle interne.**

- a) Dans une plaque PCR demi-juppée 96 puits, préparer le mélange réactionnel selon les conditions ci-dessous :

Par puits :

ADN (5 ng/μL) : 2.5 μL
 Amplicon PCR Forward Primer 1 μM : 5 μL
 Amplicon PCR Reverse Primer 1 μM : 5 μL
 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix : 12.5 μL
Total : 25 μL



- b) Sceller la plaque avec un film fortement adhésif pour PCR et mettre dans un thermocycleur :

95°C	3 min	} 30 à 35 cycles
95°C	30 sec	
55-65°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	
8°C	∞	

Remarque : La dénaturation initiale de 3 min à 95°C peut être allongée à 5 min pour les régions riches en G/C (> 70%). Le Mix 2X KAPA HiFi HotStart a une concentration en sels supérieure aux mix PCR conventionnels. Pour les cibles riches en G/C, augmenter la température de dénaturation à 98°C. La température d'hybridation des amorces est également différente (supérieure) par rapport aux mix PCR « classiques ». Un gradient de température est recommandé pour trouver la température d'hybridation optimale.

- c) Si vous avez réalisé des réplicats de PCR1 : pensez à pooler en équivolument les échantillons similaires. Le programme « NGS pooling » peut être utilisé pour réaliser cette étape au robot Chemagic STAR.
- d) Vérifier sur gel d'agarose la taille des amplicons et l'absence de bandes non-spécifiques
- e) Envoyer par mail la photo du gel d'agarose à pgtb@inrae.fr avant d'envoyer vos plaques PCR.
- f) Après validation du gel d'agarose par la PGTB, suivre les modalités d'envoi précisées dans le document « I-Envoi des échantillons-Shipping samples » et envoyez vos plaques PCR avec *a minima* 20 μl de produits PCR par puits.

Remarque : Pour toute modification du protocole ci-dessus, envoyer un mail à pgtb@inrae.fr pour mentionner les changements réalisés afin de valider ensemble la suite du protocole.

	Rédaction	Emilie Chancerel- IE	
	Approbation	Adline Delcamp - RMQ	