

## Amplification par PCR des VNTR de *Staphylococcus aureus*

### • Préparation du mélange réactionnel

Le mix va contenir les différents éléments nécessaires à l'amplification de l'ADN :

- une solution tampon contenant du  $MgCl_2$
- les dNTP
- les amorces ou primers qui bornent le fragment que l'on souhaite amplifier
- l'enzyme Taq polymérase
- de l'eau distillée

Le mélange va être préparé pour un nombre déterminé de réactions :  $n + 2$  (pour les erreurs de pipetage). Le tableau suivant donne les valeurs de chaque réactif pour une et pour cent réactions.

Réactifs	Volume ( $\mu$ l) par réaction de 15 $\mu$ l	100 tubes ( $\mu$ l)
Tampon10X ( $MgCl_2$ )	1.5	150
dNTP	1	100
Amorces 10 $\mu$ M (mélange sens et antisens)	1.5	150
Taq E (5U/ $\mu$ l)	0.12	12
Eau distillée	9	900
Total	13.0	1300

13 $\mu$ l de ce mélange va être réparti dans des barrettes PCR ou des plaques 96 puits. On ajoute ensuite 2 $\mu$ l d'ADN purifié concentré à *1ng/ $\mu$ l*. On lance ensuite la réaction PCR en programmant le thermocycleur de la manière suivante :

94°C 5min  
94°C 30sec  
60°C 30sec  
72°C 45sec  
72°C 10min

} 35 cycles

La température est ensuite maintenue à 20°C.

Les produits PCR peuvent ensuite être conservés à +4°C en attendant de réaliser la migration sur gel.

Avant la migration, 2 $\mu$ l de solution de dépôt (colorant bleu plus glycérol) sont ajoutés dans chaque réaction.

- **Détection et analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose**

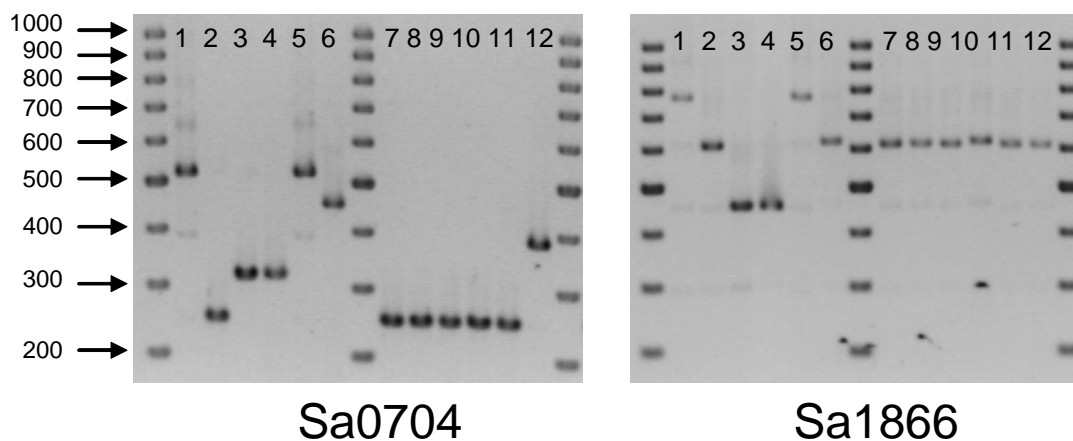
La migration des produits PCR se fait dans un gel d'agarose à 2% sur une distance de 20cm.

Pour un grand nombre d'échantillon à déposer, nous utilisons des grands gels avec deux peignes de 50 puits.

On dépose 2 à 3µl de produit PCR et 2µl de marqueurs de poids moléculaires (100-1000pb). Les volumes à déposer peuvent être modifiés en fonction de l'efficacité de la PCR.

On fait ensuite migrer ces produits PCR à environ 8Volts/cm.

A la fin de la migration, le gel est coloré dans un bain de BET (0,5-1,0 µg/ml) pendant 30 minutes. On visualise ensuite nos produits PCR sous lampe UV et on prend une photo.



**Exemple de gel pour les marqueurs 0704 et 1866**