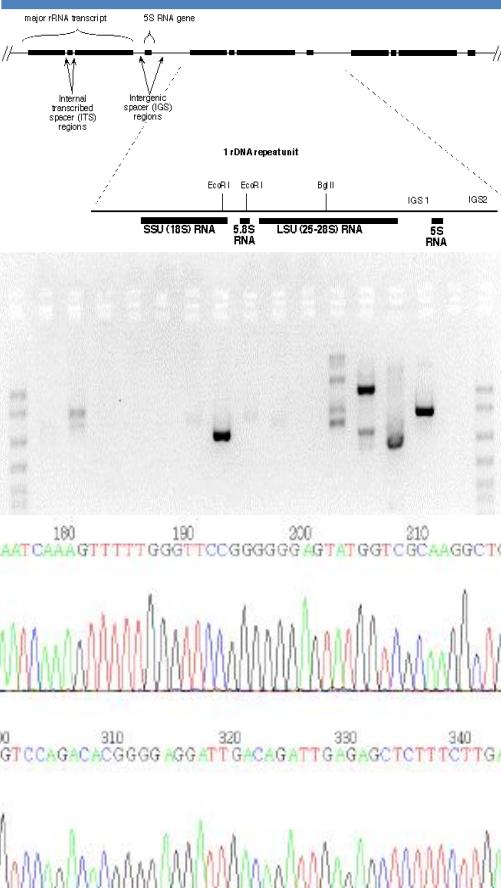




MANUEL DES PROTOCOLES

Techniques de Biologie Moléculaire pour L'Identification de Phytoplancton



Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Invertimos en su futuro



Ministère de l'Energie, des Mines,
de l'Eau et de l'Environnement



TABLE DE MATIÈRES

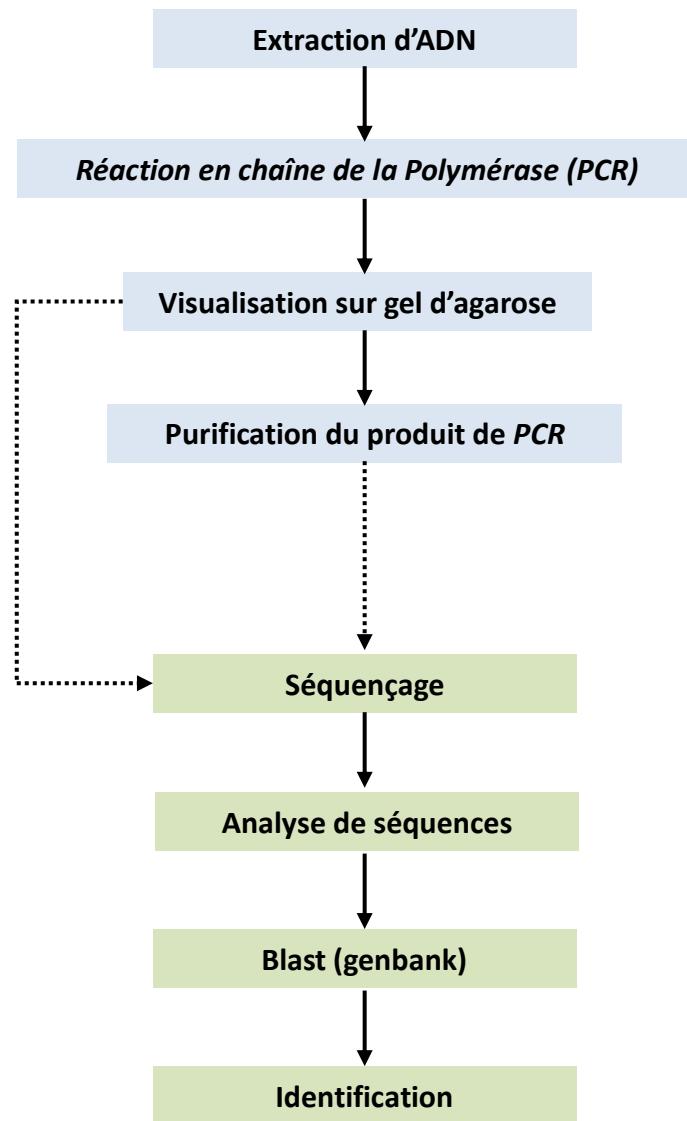
QUELQUES REGLES POUR TRAVAILLER AVEC LA BIOLOGIE MOLECULAIRE	1
SCHÉMA RÉSUMÉ	2
EXTRACTION D'ADN (Méthode CHELEX)	3
REACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMÉRASE (PCR)	4
VISUALISATION DE PRODUIT DE PCR EN GEL D'AGAROSE.....	7
PURIFICATION DE PRODUIT DE PCR	8
ANALYSE DE SÉQUENCES (BLAST)	9
BUFFER (SOLUTION TAMPON) POUR ÉLECTROPHÈROSE EN GEL D'AGAROSE .	13
D'AUTRES BUFFERS.....	14

QUELQUES REGLES POUR TRAVAILLER AVEC LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

Il faut toujours travailler et manipuler tout le matériel avec des gants, même lorsque l'on prépare le matériel de l'autoclave (surtout des pointes de pipette, tubes eppendorf, etc.). Tout ce matériel doit être stérilisé à l'autoclave. Néanmoins, il ne faut pas travailler en stérilisation.

Afin d'éviter des pollutions, l'extraction d'ADN ne doit jamais se faire dans la même zone où l'on va préparer le mélange pour PCR.

SCHÉMA RÉSUMÉ



EXTRACTION D'ADN (Méthode CHELEX)

- 1- Prendre du réfrigérateur des tubes eppendorf avec 300ul de 10% Chelex*. On prend 1 tube par échantillon.
- 2- Ajouter dans le tube correspondant 50ul de culture ou un peu de culture d'une boîte de Petri (mieux).
- 3- Agiter au vortex pendant 10-15 seg.
- 4- Incuber les tubes à 95°C pendant 30 min (de préférence dans un module d'agitation)
- 5- Agiter au vortex pendant 10-15 seg (Attention ! Les couvercles des tubes eppendorfs peuvent s'ouvrir).
- 6- Centrifuger 5 min à haute vitesse (>10000 rpm).
- 7- Passer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf. La résine Chelex doit être absente : elle inhibe la PCR. Congeler à -20°C.
- 8- Prendre 1ul pour la PCR

* AU PRÉALABLE: peser 1g de « Chelex 100 Molecular Grade Resin » (Biorad, 142-1253) et resuspendre dans 10 ml d'eau milliQ stérile à l'autoclave (10% Chelex). Faire des aliquotes de 300ul dans des eppendorfs stériles et congeler à -20°C.

NOTES:

Parfois l'extraction récente d'ADN ne fonctionne pas bien dans la PCR (c'est-à-dire il n'existe pas d'amplification). Si cette situation se produit, il faut réessayer le lendemain, après avoir congelé l'ADN. En tout cas, il est conseillable de congeler le surnageant (ADN) et ne l'utiliser dans la PCR que le lendemain.

ALTERNATIVE: Utilisez kits d'extraction d'ADN commerciales. Le *Kit DNeasy Blood & Tissue* de Qiagen (<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit>) et le *PowerPlant Pro DNA Isolation Kit* de Mobio (<http://www.mobio.com/plant-dna-isolation/>) fonctionnent très bien. Cependant, il ya d'autre alternative tout aussi viable sur le marché.

REACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMÉRASE (PCR)

Primers pour les dinoflagellés:

Primers ID	Séquences (5'-3')	Gene	Références
D1R LSUB	ACCCGCTGAATTAAAGCATA ACGAACGATTGCACGTCAG	D1-D3	Fraga et al., 2011
G18F LSUB	CAATAACAGGTCTGTGATGC ACGAACGATTGCACGTCAG	3'SSU-ITS1- 5.8S- ITS25'LSU	Vandersea et al., 2012
D8F D10R	CGGGAAAAGGATTGGCTCT ATAGGAAGAGGCCGACATCG	D8-D10	Litaker et al., 2010

Primers pour les diatomées:

Primers ID	Séquences (5'-3')	Gene	Références
Diatoms_C 18S_f Diatoms_D 18S_r	CTGCCCTATCAGCTTGG CGGCCATGCACCACC	16S	Nübel et al. (1997)

Primers pour les cyanobactéries:

Primers ID	Séquences (5'-3')	Gene	Références
CYA106F CYA781R(a) CYA781R(b)	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA GACTACTGGGTATCTAACCCATT GACTACAGGGGTATCTAACCCTTT	16S	Nübel et al. (1997)

Préparation de primers stock (100pM)

Dans chaque tube de *primer* (ou sa respective feuille informative) vient l'indication de la valeur de nm. Exemple : On met 34.5nm, il faut ajouter 345ul d'eau milliQ stérile à l'autoclave pour que la solution soit à 100mM. Stocker à -20°C.

Préparation de primers de travail (25pM)

Pour l'emploi dans le mélange de PCR il faut préparer les *primers* à 25pM à partir de la solution stock. Pour ceci il faut utiliser la formule suivante :

$$\text{Concentration (initiale)} \times \text{Volume (initial)} = \text{Concentration (finale)} \times \text{Volume (final)}$$

$$100 \times V_{\text{initial}} = 25 \times 50$$

$$V_{\text{initial}} = (25 \times 50) / 100$$

$$V_{\text{initial}} = 12,5 \text{ ul}$$

C'est-à-dire, il faut ajouter 12,5ul de la solution stock (100ul) à 37,5ul d'eau milliQ stérilisée à l'autoclave, pour compléter 50 ul.

Protocole mélange PCR

Il va dépendre de la Taq utilisée. Il faut suivre les instructions du fabricant.
La Taq que l'on a utilisée est la TAKARA EXTAQ HOT START VERSION avec MgCl à 4.5 mM. Vous pouvez utiliser d'autres Taqs.

On prépare le mélange pour la quantité d'échantillons +1

Quantité par échantillon

Réactif	Quantité
Taq	0.125
Buffer	1.875
Dntps	2.0
Primer 1 (25pM)	0.25
Primer 2 (25pM)	0.25
H2O	19.5

1ul d'ADN pour chaque échantillon

Protocole de cycles de PCR (thermocycleur): *Primers pour les dinoflagellés*

Conditions	Cycles
95°C - 5 min	1x
95°C - 30 sec	
54°C - 40 sec	35x
72°C - 1 min	
72°C – 5 min	1x

Protocole de cycles de PCR (thermocycleur): *Primers pour les diatomées*

Conditions	Cycles
95°C - 5 min	1x
95°C - 30 sec	
54°C - 30 sec	35x
72°C - 45 sec	
72°C – 5 min	1x

Protocole de cycles de PCR (thermocyclateur): *Primers pour les cyanobactéries*

Conditions	Cycles
95°C - 5 min	1x
95°C - 30 sec	
54°C - 30 sec	35x
72°C - 45 sec	
72°C – 5 min	1x

Références

- Fraga S, Rodriguez F, Caillaud A, Diogene J, Raho N, Zapata M (2011). *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* 11: 10–22.
- Litaker RW, Vandersea MW, Faust MA, Kibler SR, Nau AW, Holland WC, Mireille Chinain M, Holmes MJ, Tester PA (2011). Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon*, 56 (2010) 711–730
- Nubel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (1997). PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3327–3332.
- Vandersea MW, Kibler SR, Holland WC, Tester PA, Schultz TF, Faust MA, Holmes MJ, Chinain M, Litaker RW (2012) Development of semi-quantitative pcr assays for the detection and enumeration of *Gambierdiscus* species (GONYAULACALES, DINOPHYCEAE). *Journal of Phycology*, 48: 902–915.

VISUALISATION DE PRODUIT DE PCR EN GEL D'AGAROSE

GEL D'AGAROSE 2%	
Agarose	3 gr
TAE 1X	150 ml
Faire chauffer aux microondes jusqu'à ce que le liquide soit transparent (il faut faire bouillir). Attention à ne pas vous brûler les mains avec le récipient qui risque d'être très chaud.	
Agiter et verser dans la boîte avec le peigne. Attendre 30 minutes environ que le gel soit solidifié pour retirer le peigne.	

Mélange pour charger les échantillons dans les puits du gel (mélanger sur parafilm ou dans un tube eppendorf)	
Marqueur de Poids moléculaire	4ul de loading buffer et SG* + 4ul marqueur
Échantillons	4ul de loading buffer et SG* + 4ul d'échantillon
Charger chaque puits avec chaque mélange, commencer avec le marqueur et continuer ensuite avec les échantillons.	

* On prépare avec un mélange de Loading Buffer et SG à 10x (1ul SG concentré + 999 ul TE) que l'on stocke en aliquotes de 500ul au congélateur (-20°C).

Electrophorèse
100 volts
400 milliampères
250 watts
Elle met environ 30 min. Surveiller afin d'éviter le débordement des échantillons.

PURIFICATION DE PRODUIT DE PCR

On peut utiliser différents protocoles et enzymes. On utilise l' « Illustra ExoStar 1-Step » de GE Healthcare Life Sciences.

On utilise 1 ul pour chaque 10 ul de PCR

Protocole dans le thermocycleur :

37°C – 30min

80°C – 15 min

Note: ce service peut être chargé dans le service de séquençage
(Ex. : Macrogen : <http://www.macrogen.com/eng/>)

Envoyer le produit de PCR à une entreprise de séquençage, suivant leurs instructions d'expédition. Macrogen (<http://www.macrogen.com/eng/>) dispose d'un excellent rapport qualité / prix.

ANALYSE DE SÉQUENCES (BLAST)

Une fois que vous avez obtenu les séquences, procédez comme suit:

Accéder à Blast (Basic Local Alignment search Tool): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
Choisir « nucléotide Blast » (rouge)

The screenshot shows the NCBI BLAST homepage. At the top, there's a banner for 'DELTABLAST'. Below it, the 'Basic BLAST' section has a heading 'Choose a BLAST program to run.' with a red arrow pointing to the 'nucleotide blast' link. Other options listed are 'protein blast', 'blastx', 'tblastn', and 'tblastx'. To the right, there's a 'News' sidebar with a 'Tip of the Day' section.

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

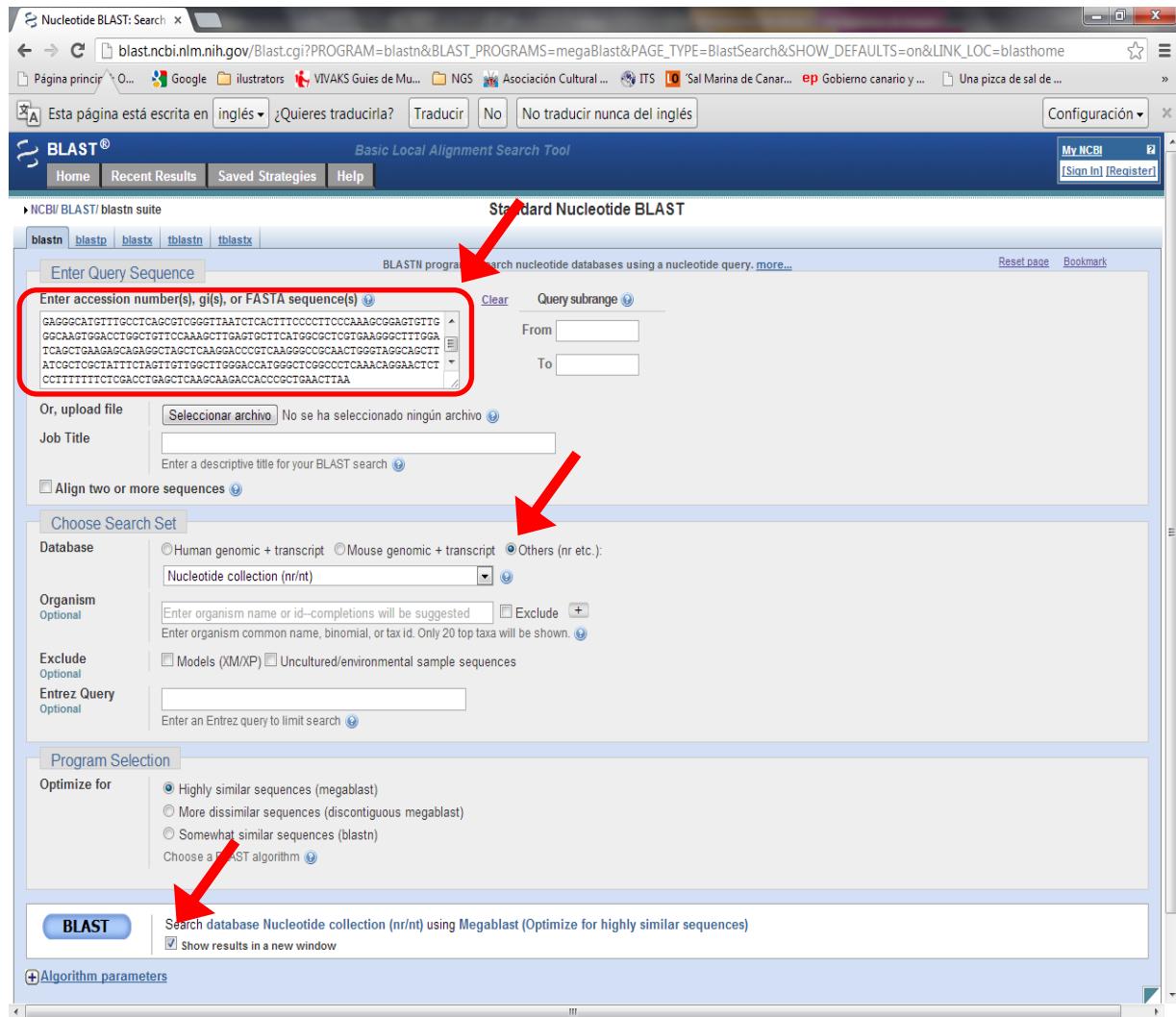
- [nucleotide blast](#) Search a nucleotide database using a nucleotide query
Algorithms: blastn, megablast, discontiguous megablast
- [protein blast](#) Search protein database using a protein query
Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast
- [blastx](#) Search protein database using a translated nucleotide query
- [tblastn](#) Search translated nucleotide database using a protein query
- [tblastx](#) Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

Specialized BLAST

Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)

- Make specific primers with [Primer-BLAST](#)
- Search [trace archives](#)
- Find [conserved domains](#) in your sequence (cds)
- Find sequences with similar [conserved domain architecture](#) (cdart)
- Search sequences that have [gene expression profiles](#) (GEO)
- Search [immunoglobulins](#) (IgBLAST)
- Search using [SNP flanks](#)
- Screen sequence for [vector contamination](#) (vecscren)
- Align two (or more) sequences using BLAST (bl2seq)

Introduire la séquence à analyser, choisir « others » et sélectionner « Nucléotides collections », marquer « Show results in other window »(rouge):



Cliquer sur « BLAST » (l'angle inférieur gauche)

Le résultat est une liste de séquences rangées par similitude de la plus grande à la plus petite :

The screenshot displays two windows of the NCBI BLAST search results. The top window shows a 'Graphic Summary' of the distribution of 100 blast hits on the query sequence. The bottom window shows a detailed table of sequences producing significant alignments.

Graphic Summary:

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores: <40 (black), 40-50 (blue), 50-80 (green), 80-200 (red), >=200 (purple).

Query sequence length: 668 letters.

Descriptions:

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
GQ337903.1	Dunaliella salina strain MSI-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1234	1234	100%	0.0	100%
DQ116741.1	Dunaliella salina strain OUC66 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1234	1234	100%	0.0	100%
DQ116740.1	Dunaliella salina strain OUC38 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1234	1234	100%	0.0	100%
DQ116743.1	Dunaliella salina strain Israel 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1229	1229	100%	0.0	99%
DQ116742.1	Dunaliella salina strain Inner-mongolia 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1229	1229	100%	0.0	99%
DQ116739.1	Dunaliella salina strain OUC36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1229	1229	100%	0.0	99%
DQ116738.1	Dunaliella salina strain CUC21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1229	1229	100%	0.0	99%
JX134754.1	Dunaliella sp. ABRINW-G1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1182	1182	95%	0.0	100%
JQ080301.1	Dunaliella sp. ABRINW-UB internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1182	1182	95%	0.0	100%
FJ164063.1	Dunaliella sp. ABRINW-U1/1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1182	1182	95%	0.0	100%
EU932917.1	Dunaliella salina strain CCAP 19/39 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1179	1179	100%	0.0	99%
KC477401.1	Dunaliella salina strain MSI-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1173	1173	95%	0.0	99%
JX014241.1	Dunaliella salina strain MSI-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1171	1171	96%	0.0	99%
JN797804.1	Dunaliella salina 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1157	1157	98%	0.0	98%
EF473746.1	Dunaliella salina strain CCAP 19/18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1133	1133	99%	0.0	98%
JN797806.1	Dunaliella sp. MBTD-CMFRI-S089 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1120	1120	90%	0.0	100%
DQ377085.1	Dunaliella bardawil strain UTEX 2538 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1110	1110	90%	0.0	99%
DQ116747.1	Dunaliella sp. hd10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	981	981	100%	0.0	93%
DQ116745.1	Dunaliella primolecta 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	981	981	100%	0.0	93%
DQ116744.1	Dunaliella bardawil 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	981	981	100%	0.0	93%
JN797805.1	Dunaliella sp. MBTD-CMFRI-S086 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	976	976	98%	0.0	94%
DQ116746.1	Dunaliella parva 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	976	976	100%	0.0	93%
EF473748.1	Dunaliella tertiolecta strain CCAP 19/27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	970	970	99%	0.0	93%

ANNEXES

BUFFER (SOLUTION TAMPON) POUR ÉLECTROPHÈROSE EN GEL D'AGAROSE

TAE 1 X (Solution de Travail)	
TAE 50 X (Solution Stock)	20 ml
Eau distillée	980 ml
Utiliser récipient de stérilisation à l'autoclave de la couleur foncée ou revêtu en platine. Conserver à 4°C	

TAE 50 X (Solution Stock)*	
TRIS base	121 gr
Acide acétique glacial	28.55 ml
0.5 M EDTA (ph 8.0)	50 ml
Eau MiliQ	Compléter jusqu'à 500 ml
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Conserver à la température ambiante	

EDTA 0.5M pH 8.0 50X (100 ml)*	
EDTA	18.6 gr
Eau MiliQ	70 ml
Eau MiliQ	Compléter jusqu'à 100 ml
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Conserver à la température ambiante	

***Alternative:** Acheter du TAE 10X commercial (ex.: Sigma T8280, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8280?lang=es®ion=ES>). Ajouter 100ml de ce réactif dans 900ml d'eau milli-Q. Stocker à 4°C

D'AUTRES BUFFERS

TE pH 8.0 – (100 ml)	
EDTA 0.5M pH 8.0	0.2 ml
TRIS HCL 1M pH 8.0	1 ml
Eau MiliQ	100 ml
Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 20 minutes. Conserver à la température ambiante	

EDTA 0.5M 50X pH 8.0 (100 ml)*	
EDTA	18.6 gr.),
Eau MiliQ	70 ml.
Eau MiliQ	Compléter jusqu'à 100 ml
Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 20 minutes. Conserver à la température ambiante	

TRIS HCL 1M pH 8.0 (500ml)*	
TRIS base	60.55 gr
Eau MiliQ	400 ml
Eau MiliQ	Compléter jusqu'à 500 ml
Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 20 minutes. Conserver à la température ambiante	

***Alternative:** Acheter du «Tris EDTA Buffer 100x concentrated » (ex.: Sigma T9285; <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t9285?lang=es®ion=ES>). Ajouter 1ml de ce réactif dans 99ml d'eau milliQ stérilisée à l'autoclave. Conserver à la température ambiante

0127_OMARCOST_2_A

Ce manuel a été développé dans le cadre du projet Omarcost (<http://www.omarcost.org/web/guest>), qui est cofinancé par le programme Poctefex (<http://www.poctefex.eu/>).

Institutions participantes :

Instituto Tecnológico de Canarias, SA (ITC)
Playa de Pozo Izquierdo, s/n
35119 Santa Lucia, Las Palmas, Espagne

Instituto Español de Oceanografía (IEO)
c/ General Gutiérrez nº 4
38003 Santa Cruz de Tenerife, España

Gestión del Medio Rural de Canarias, S.A.U.
Avda. Alcalde Ramírez Bethencourt, nº 17;
Trasera Edificio Torremar (Local Bajo)
35004 Las Palmas de Gran Canaria, Espagne

Centro Regional del Institut National de Recherche Halieutique en Agadir (INRH)
Quartier industriel
80004, Agadir, Marruecos

Secrétariat d'Etat auprès du Ministère de l'Energie et des Mines, de l'Eau et de l'Environnement chargé de l'Eau et de l'Environnement
Avenue Hassan I - Dakhla
BP 799 – Agadir, Maroc

Université Hassan II, Faculté des Sciences Aïn Chock
Km 8, Route d'El Jadida
BP 5366 Casablanca CP 20100, Maroc

Université Mohamed V Agdal - Institut Scientifique, Rabat
Département de Zoologie & Ecologie Animale
Avenue ibn Batouta, BP 703, Rabat, Maroc

Université Ibn Zohr (UIZ)
Faculté Polydisciplinaire de Taroudant
8106, Agadir, Maroc