

---

---

**Qualité du sol — Estimation de  
l'abondance de séquences de gènes  
microbiens par amplification par  
réaction de polymérisation en chaîne  
(PCR) quantitative à partir d'ADN  
directement extrait du sol**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Soil quality — Estimation of abundance of selected microbial gene  
sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil*

ISO 17601:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/837e9eee-02df-483a-be2f-1f21de376ab0/iso-17601-2016>



**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 17601:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/837e9eee-02df-483a-bc2f-1f21de376ab0/iso-17601-2016>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2016, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5 Matériel d'essai</b> .....	<b>4</b>
5.1 ADN.....	4
5.2 Bactéries.....	4
5.3 Plasmide.....	4
5.4 Enzymes.....	4
5.5 Produits chimiques.....	4
5.6 Produit pour le milieu de culture bactérienne.....	5
5.7 Tampon et réactifs.....	5
<b>6 Appareillage</b> .....	<b>6</b>
<b>7 Mode opératoire</b> .....	<b>6</b>
7.1 Préparation des étalons de qPCR et étalonnage de l'essai de qPCR (tâche 1).....	6
7.1.1 Généralités.....	6
7.1.2 Création de l'amplicon (tâche 1, étape 1).....	7
7.1.3 Préparation des étalons de qPCR (tâche 1, étape 2).....	7
7.1.4 ADN d'isolat, ADN environnemental, ADN artificiel.....	7
7.1.5 Étalonage de la qPCR (tâche 1, étape 3).....	10
7.2 Préparation d'une matrice d'ADN du sol et test d'inhibition (tâche 2).....	11
7.2.1 Généralités.....	11
7.2.2 Préparation de l'ADN du sol (tâche 2, étape 4).....	11
7.2.3 Test d'inhibition (tâche 2, étape 5).....	11
7.2.4 Dilution de la matrice d'ADN.....	12
7.3 Essai de qPCR (tâche 3).....	13
7.3.1 Généralités.....	13
7.3.2 qPCR.....	13
7.4 Validation et examen de l'essai de qPCR (tâche 4).....	13
7.4.1 Généralités.....	13
7.4.2 Validation de l'essai de qPCR.....	13
7.4.3 Calcul du nombre de copies du gène d'intérêt dans l'extrait d'ADN du sol.....	14
<b>8 Examen des étapes critiques de l'essai de qPCR</b> .....	<b>14</b>
<b>9 Expression des résultats de l'essai de qPCR</b> .....	<b>15</b>
<b>10 Étude interlaboratoires internationale</b> .....	<b>15</b>
<b>11 Rapport d'essai</b> .....	<b>15</b>
<b>Annexe A (informative) Description des principales étapes d'un essai de qPCR TaqMan®</b> .....	<b>16</b>
<b>Annexe B (informative) Étude interlaboratoires internationale relative à l'évaluation de la qPCR pour quantifier l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens à partir d'ADN extrait directement du sol</b> .....	<b>18</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>31</b>

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/857e9ccc-02df-483a-bc2f-1f21de376ab0/iso-17601-2016).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

## Introduction

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est un constituant majeur de tous les organismes vivants codant pour les enzymes responsables de leurs activités biologiques. L'étude des séquences d'ADN extrait de différentes matrices environnementales, à l'aide d'approches moléculaires, permet de fournir des marqueurs moléculaires qui peuvent être utilisés pour différencier et identifier clairement différents organismes (bactéries, archées et eucaryotes).

Jusqu'à présent, la plupart des études visant à développer des indicateurs microbiens de la qualité du sol et applicables aux milieux complexes, tels que le sol, étaient biaisées par la nature incultivable de nombreux micro-organismes dans des conditions de laboratoire et par le manque de sensibilité des méthodes de microbiologie classiques. Le développement récent de nombreuses méthodes de biologie moléculaire reposant sur l'amplification des acides nucléiques extraits du sol a permis de proposer une alternative pertinente à la microbiologie pasteurienne permettant de décrire en détail la composition, la richesse et la structure des communautés microbiennes.[2] [3] [4] [5] [6] Les approches reposant sur l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons environnementaux sont désormais bien établies dans le domaine de l'écologie des sols et servent de marqueurs génétiques permettant d'évaluer la diversité microbienne. Les résultats d'analyses moléculaires des communautés et/ou populations microbiennes du sol reposent sur deux paramètres principaux: a) l'extraction d'ADN représentatif de la composition de la communauté microbienne indigène et b) les biais introduits par la PCR, notamment le choix des amorces oligonucléotidiques, la concentration de l'ADN utilisé comme matrice, les erreurs de PCR ou encore la méthode d'analyse post-PCR choisie.[7] [4] [8] [9]

De nombreuses études ont été menées avec ces nouvelles méthodes permettant d'améliorer l'extraction, la purification, l'amplification et la quantification de l'ADN des sols.[10] Récemment, l'ISO 11063 décrivant «une méthode pour extraire directement les acides nucléiques d'échantillons de sol», dérivée de la Référence [10], a ouvert de nouvelles perspectives de développement d'approches moléculaires normalisées pour estimer la qualité du sol.[11]

La présente Norme internationale a pour objectif de décrire le mode opératoire utilisé pour mettre en place et réaliser une PCR quantitative afin de quantifier l'abondance de groupes microbiens du sol ainsi que celle de groupes fonctionnels à partir d'extrait d'ADN de sol. La quantification des phyla microbiens du sol ainsi que des groupes fonctionnels par des essais de qPCR peut contribuer au développement d'outils de routine permettant de surveiller la qualité du sol. La répétabilité et la reproductibilité de la méthode d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative ont été évaluées lors d'une étude interlaboratoires internationale (voir [Annexe B](#)). La répétabilité de cette méthode a été évaluée avec succès pour les essais de qPCR ciblant les gènes ARNr 16S ainsi que des gènes codant un marqueur fonctionnel de bactéries dénitrifiantes (le gène nitrite réductase *nirK*). La reproductibilité de cette méthode a révélé un effet de laboratoire qui peut être surmonté en interprétant les résultats de la quantification de l'abondance de groupes microbiens par comparaison, soit en utilisant une référence externe (ADN extrait d'une souche témoin) lors de l'essai de qPCR, soit en calculant un pourcentage de variations entre traitements pour normaliser les données.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 17601:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/837e9eee-02df-483a-be2f-1f21de376ab0/iso-17601-2016>

# Qualité du sol — Estimation de l'abondance de séquences de gènes microbiens par amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative à partir d'ADN directement extrait du sol

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie les étapes principales d'une méthode d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative (qPCR) permettant de mesurer l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens à partir d'un extrait d'ADN du sol qui fournit une estimation de l'abondance de groupes microbiens spécifiques.

Il convient de noter que le nombre de gènes n'est pas nécessairement lié directement au nombre de micro-organismes mesurés. Par exemple, le nombre d'opérons ribosomiques est compris entre une et 20 copies dans différents phyla bactériens. Par conséquent, le nombre de séquences d'ARNr 16S quantifiées dans des extraits d'ADN du sol ne donne pas une estimation exacte du nombre de bactéries contenues dans le sol. Par ailleurs, le nombre de séquences n'est pas nécessairement lié à des micro-organismes vivants et peut comprendre des séquences amplifiées à partir de l'ADN extrait de micro-organismes morts.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)

## 2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 10381-6, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 6: Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation, dans des conditions aérobies, de sols destinés à l'évaluation en laboratoire des processus, de la biomasse et de la diversité microbiens*

ISO 11063, *Qualité du sol — Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol*

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

### 3.1

#### ADN du sol

ADN extrait du biote vivant et mort du sol

EXEMPLE Micro-organismes, plantes, animaux.

### 3.2

#### amplification par réaction de polymérisation en chaîne

#### PCR

méthode permettant l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN en utilisant un jeu spécifique d'amorces oligonucléotidiques

**3.3**  
**amplification par réaction de polymérisation en chaîne quantitative**  
**qPCR**

méthode permettant la quantification dans une *matrice* (3.4) d'ADN du nombre d'une séquence spécifique d'ADN en utilisant un jeu spécifique d'amorces oligonucléotidiques

**3.4**  
**matrice**  
échantillon d'ADN utilisé pour réaliser une réaction de PCR (3.2) afin d'amplifier une séquence spécifique d'ADN

**3.5**  
**amplicon**  
produit de PCR obtenu par PCR (3.2) à partir d'une *matrice* (3.4)

**3.6**  
**vecteur de clonage**  
molécule d'ADN circulaire dans laquelle l'*amplicon* (3.5) est inséré par réaction de ligation, utilisée pour la transformation d'*Escherichia coli* compétente en vue du clonage de l'*amplicon*

**3.7**  
**étalon de qPCR**  
ADN cible cloné utilisé comme *matrice* (3.4) pour la réaction qPCR afin d'établir la courbe d'étalonnage de l'abondance d'une séquence cible en fonction des valeurs du cycle seuil (Ct)

**3.8**  
**témoin négatif**  
**NTC**  
témoin, généralement de l'eau de qualité biologie moléculaire, qui est utilisé comme témoin négatif dans l'essai de qPCR pour vérifier l'absence de contaminant dans le mélange de qPCR

**3.9**  
**cycle seuil**  
**Ct**  
nombre de cycles de qPCR requis pour que le signal fluorescent franchisse la valeur seuil (c'est-à-dire dépasse le bruit de fond)

Note 1 à l'article: La valeur de Ct est inversement proportionnelle à l'abondance de la séquence cible.

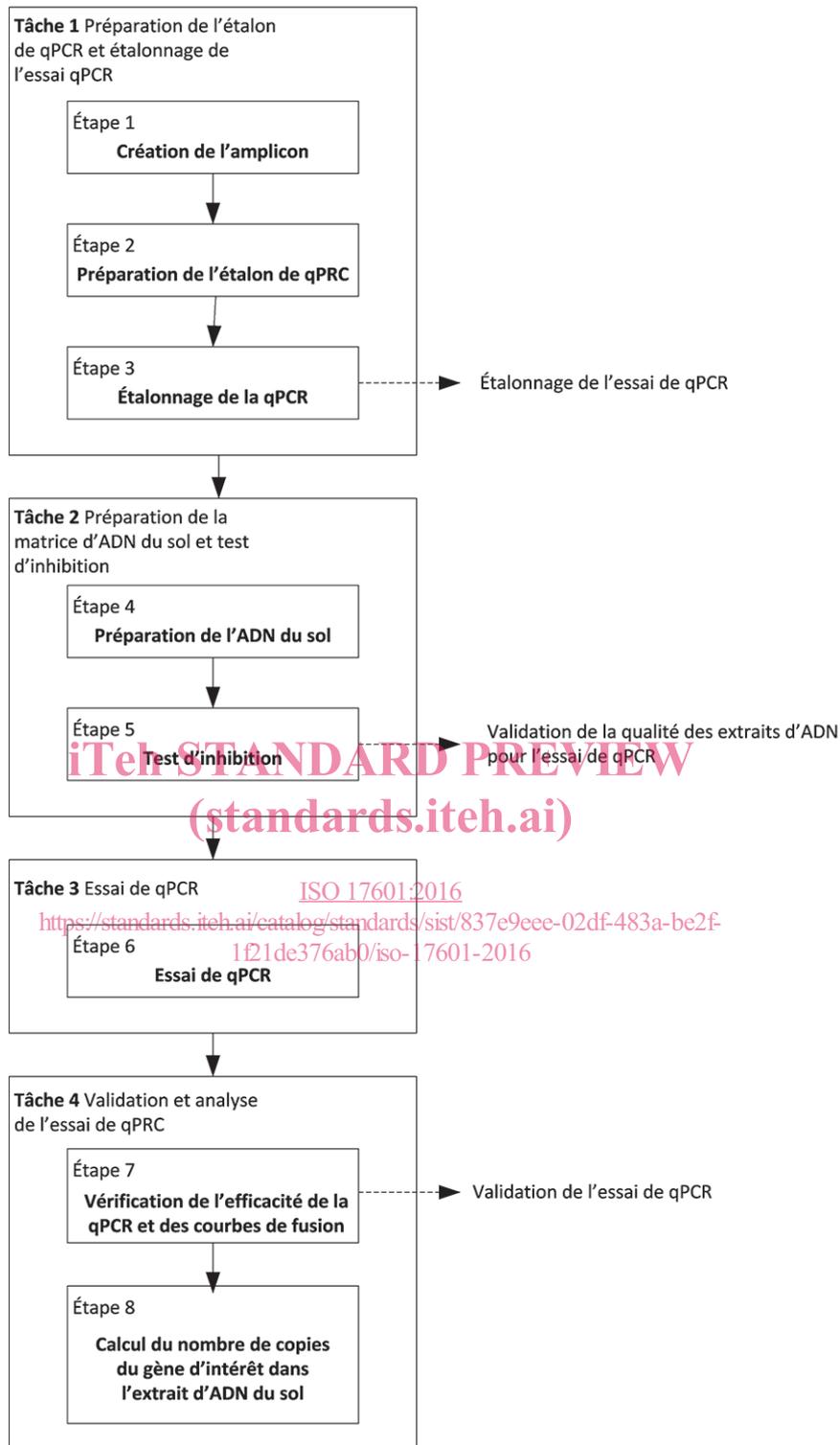
## 4 Principe

La présente Norme internationale décrit l'essai de qPCR utilisant un colorant fluorescent se fixant à l'ADN comme rapporteur. Cet essai de qPCR a été validé lors d'une étude interlaboratoires internationale menée avec le SYBR Green, un colorant fluorescent se fixant à l'ADN double brin et pouvant être détecté en mesurant l'augmentation de fluorescence au cours du cycle.

La méthode vise à mesurer l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens à partir d'un extrait d'ADN du sol. La méthode comprend quatre tâches et huit étapes, comme résumé à la [Figure 1](#). Selon la Référence [1], les trois étapes critiques devant être validées pour chaque essai de qPCR sont telles qu'indiquées à la [Figure 1](#).

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/837e9eee-02df-483a-be2f-1f21de376ab0/iso-17601-2016>



**Figure 1 — Principales tâches et étapes critiques permettant d'estimer l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens par un essai de qPCR**

La présente Norme internationale décrit l'essai de qPCR basé sur l'utilisation d'un colorant fluorescent se fixant à l'ADN double brin qui a été validé par une étude interlaboratoires internationale utilisant le

qPCR SYBR Green<sup>®1)</sup>. L'[Annexe A](#) fournit des informations sur l'essai de qPCR TaqMan<sup>®2)</sup> qui n'a pas fait l'objet d'une étude interlaboratoires internationale. La première tâche comporte trois étapes décrivant la création d'un amplicon optimal pour la qPCR (étape une), la préparation d'étalons de qPCR (étape deux) et le mode opératoire d'étalonnage de l'essai de qPCR (étape trois). La deuxième tâche comporte deux étapes supplémentaires décrivant les modes opératoires de préparation des échantillons d'ADN du sol (étape quatre) et d'essai pour détecter la présence d'inhibiteurs de qPCR dans les échantillons d'ADN du sol (étape cinq). La troisième tâche comporte une seule étape décrivant le protocole pour réaliser l'essai qPCR (étape six). Enfin, la quatrième tâche comporte deux étapes, l'une décrivant la procédure de validation des essais de qPCR (étape sept) afin de vérifier la qualité de l'essai de qPCR, et l'autre décrivant les différentes options permettant de calculer le nombre de copies de la séquence du gène d'intérêt à partir du cycle seuil (Ct) obtenu par l'analyse des courbes d'amplification par qPCR (étape huit).

## 5 Matériel d'essai

### 5.1 ADN

**5.1.1 ADN**, extrait d'isolats bactériens et fongiques purs en utilisant des modes opératoires d'extraction classiques ou en utilisant un kit commercial pour extraire l'ADN génomique.

**5.1.2 ADN du sol**, extrait d'aliquotes de sol conformément à l'ISO 11063.

### 5.2 Bactéries

**5.2.1 Souche d'*Escherichia coli***, habituellement utilisée pour le clonage d'un produit de PCR.

### 5.3 Plasmide

**5.3.1 Vecteur de clonage**, habituellement utilisé pour le clonage d'un produit de PCR dans une souche d'*Escherichia coli* compétente.

### 5.4 Enzymes

**5.4.1** Taq polymérase.

**5.4.2** T4 ADN ligase.

**5.4.3** Protéine T32 codée par le gène correspondant du phage T4.

**5.4.4** Albumine de sérum de bovin (n° CAS 9048-46-8).

### 5.5 Produits chimiques

**5.5.1 Ampicilline sodique**, C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>S (n° CAS 69-52-3).

---

1) SYBR Green est une marque déposée de Molecular Probes. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

2) TaqMan est une marque déposée de Roche Molecular Systems, Inc. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- 5.5.2 **Acide borique**,  $\text{BH}_3\text{O}_3$  (n° CAS 10043-35-3).
- 5.5.3 **Solution de désoxynucléotides**, dNTPs.
- 5.5.4 **Agent intercalant SYBR Safe®** permettant de visualiser l'ADN sur gel.
- 5.5.5 **Sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)**,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (n° CAS 6381-92 6).
- 5.5.6 **Glucose**,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  (n° CAS 50-99-7).
- 5.5.7 **Acide chlorhydrique**,  $\text{HCl}$  (n° CAS 7647-01-0).
- 5.5.8 **IPTG, Isopropyl-bêta-D-Thiogalactopyranoside** (n° CAS 367-93-1).
- 5.5.9 **Chlorure de magnésium**,  $\text{MgCl}_2$  (n° CAS 7786-30-3).
- 5.5.10 **Sulfate de magnésium**,  $\text{MgSO}_4$  (n° CAS 7487-88-9).
- 5.5.11 **Eau de qualité biologie moléculaire**,  $\text{H}_2\text{O}$ .
- 5.5.12 **Chlorure de potassium**,  $\text{KCl}$  (n° CAS 7447-40-7).
- 5.5.13 **Chlorure de sodium**,  $\text{NaCl}$  (n° CAS 7647-14-5).
- 5.5.14 **Tris[hydroxyméthyl]aminométhane**,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$  (n° CAS 77-86-1).
- 5.5.15 **X-Gal, bromo-5-chloro-4-indolyl-3-bêta-D-galactopyranoside** (n° CAS 7240-90-6).
- 5.6 Produit pour le milieu de culture bactérienne**
- 5.6.1 **Bacto tryptone®<sup>3)</sup>**, digestat enzymatique de caséine.
- 5.6.2 **Extrait de levure en poudre** (n° CAS 8013-01-2).
- 5.7 Tampon et réactifs**
- 5.7.1 **Solution d'ampicilline**, 2 g d'ampicilline sodique dans 4 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  stérilisée à l'aide d'un filtre de  $0,22 \mu\text{m}$ . Compléter à 20 ml avec  $\text{H}_2\text{O}$  stérilisée, préparer des aliquotes de 1 ml et conserver à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- 5.7.2 **EDTA**,  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 186,10 g d'EDTA dans 1 000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , en ajustant le pH à 8,0 à l'aide de  $\text{NaOH}$  ( $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).
- 5.7.3 **Agent intercalant SYBR Safe™** permettant de visualiser l'ADN sur gel, diluer 10 000X de SYBR Safe™ dans un tampon TBE  $\times 1$ .

---

3) Bacto tryptone est la marque déposée d'un produit fourni par Difco Laboratories. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

**5.7.4 Solution mère d'IPTG**, 1 g d'IPTG dans 8 ml de H<sub>2</sub>O. Après l'avoir mélangée soigneusement, la solution est complétée à 10 ml et stérilisée dans un poste de sécurité microbiologique. Préparer une aliquote de 1 ml d'IPTG et la conserver à - 20 °C.

**5.7.5 Milieu LB solide**, 10 g de Bacto tryptone®, 5 g d'extrait de levure, 5 g de chlorure de sodium et 15 g de gélose, dans 1 000 ml de H<sub>2</sub>O. Après autoclavage pendant 20 min à 120 °C, 1 ml d'une solution mère d'ampicilline à 100 mg·ml<sup>-1</sup> est ajouté au milieu LB et étalé dans des boîtes de Petri (20 ml) dans un poste de sécurité microbiologique. 100 µl de solution d'IPTG sont étalés sur le milieu LB solide-ampicilline. Lorsque la solution d'IPTG a pénétré le milieu LB-ampicilline, 20 µl de solution X-Gal sont étalés sur le milieu LB solide-ampicilline. Le milieu LB solide est conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

**5.7.6 Milieu SOC**, 20 g de Bacto tryptone®, 5 g d'extrait de levure, 0,58 g de NaCl, 0,95 g de MgCl<sub>2</sub>, 2,46 g de MgSO<sub>4</sub> et 3,60 g de glucose dans 1 l de H<sub>2</sub>O. Stériliser à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C. Préparer des aliquotes de 950 ml et les conserver à - 20 °C.

**5.7.7 Tris-HCl**, 1 mol·l<sup>-1</sup>, 121,14 g de Tris dans 1 000 ml de H<sub>2</sub>O, en ajustant le pH à 8,0 avec du HCl 4 mol/l.

Tampon TBE × 10, pH 8,0, 108 g de base Tris, 55 g d'acide borique et 40 ml d'EDTA 0,5 mol·l<sup>-1</sup> (pH 8,0) dans 1 000 ml de H<sub>2</sub>O.

**5.7.8 Tampon TBE × 1**, 100 ml de tampon TBE × 10 dans 900 ml de H<sub>2</sub>O.

**5.7.9 Tampon TE × 10**, pH 8,0, 100 ml de Tris-HCl 1 mol·l<sup>-1</sup> à pH 8,0, 20 ml d'EDTA 50 mmol·l<sup>-1</sup> à pH 8,0 dans 880 ml d'eau de qualité biologie moléculaire.

**5.7.10 Tampon TE × 1**, 100 ml de tampon TE × 10 dans 900 ml de H<sub>2</sub>O.

**5.7.11 Solution X-gal**, 250 mg de X-Gal dans 5 ml de diméthylformamide. Après homogénéisation, préparer des aliquotes de 0,5 ml et les conserver à - 20 °C.

## 6 Appareillage

Utiliser un matériel de laboratoire courant, notamment pipettes, centrifugeuse, poste de sécurité microbiologique, hotte chimique, système d'électrophorèse horizontale et les éléments suivants.

**6.1 PCR quantitative**, permettant de quantifier en temps réel des amplicons générés à partir de diverses matrices d'ADN, avec une limite de détection théorique d'une copie d'une séquence d'ADN cible dans la prise d'échantillon analysée.

**6.2 Spectrophotomètre**, permettant de quantifier l'ADN double brin à 260 nm.

**6.3 Spectrofluorimètre**, permettant de quantifier l'ADN double brin.

NOTE Un seul de ces deux appareils est requis pour estimer la concentration d'ADN.

## 7 Mode opératoire

### 7.1 Préparation des étalons de qPCR et étalonnage de l'essai de qPCR (tâche 1)

#### 7.1.1 Généralités

L'essai de qPCR est basé sur la quantification des amplicons à la fin de chaque cycle de PCR en utilisant un colorant d'ADN qui émet une fluorescence lorsqu'il est intercalé dans le double brin des amplicons.

Le but de cette tâche est de décrire la définition d'un amplicon approprié en vue d'un essai de qPCR (étape une), de la préparation d'un étalon de qPCR (étape deux) et de l'étalonnage de l'essai de qPCR (étape trois).

## 7.1.2 Création de l'amplicon (tâche 1, étape 1)

### 7.1.2.1 Généralités

La première étape vise à créer un jeu d'amorces oligonucléotidiques. Il peut être conçu *in silico* à l'aide de différents programmes en utilisant la séquence du gène microbien d'intérêt devant être quantifiée par qPCR à partir d'extraits d'ADN de sol. La spécificité des amorces doit être vérifiée *in silico* en comparant leurs séquences à des séquences connues disponibles dans la base de données Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Seules les amorces spécifiques pour le gène cible doivent être prises en compte. Les principaux paramètres à considérer pour la conception d'un jeu d'amorces oligonucléotidiques en vue d'un essai de qPCR sont indiqués ci-après.

### 7.1.2.2 qPCR

- La longueur optimale de l'amplicon est comprise entre 100 pb et 250 pb.
- La longueur optimale des amorces est comprise entre 18 pb et 25 pb, avec une teneur en GC de 50 % et une température de fusion comprise entre 58 °C et 65 °C.
- Il convient que les cinq nucléotides au niveau de l'extrémité 3" de chaque amorce ne contiennent pas plus de deux bases G et/ou C.
- Éviter la succession de nucléotides identiques, en particulier pour la guanine.
- Il convient de vérifier et d'éviter l'auto-complémentarité 3" de l'amorce, indiquant sa tendance à former des dimères avec elle-même.
- Éviter la conception d'amorces comportant plus de quatre mésappariements car une dégénérescence trop importante de l'amorce contribue à la fluctuation des résultats de qPCR.

## 7.1.3 Préparation des étalons de qPCR (tâche 1, étape 2)

L'étape 2 de la tâche 1 décrit le mode opératoire utilisé pour générer des étalons de qPCR ciblant une séquence du gène microbien d'intérêt à partir de différentes matrices d'ADN (isolat bactérien ou fongique pur, ADN environnemental ou ADN artificiel). Elle indique également le mode opératoire utilisé pour insérer l'étalon de qPCR dans un vecteur de clonage, transformer *Escherichia coli* et purifier les plasmides recombinants contenant l'étalon de qPCR en vue de leur utilisation ultérieure pour des essais de qPCR.

## 7.1.4 ADN d'isolat, ADN environnemental, ADN artificiel

### 7.1.4.1 Généralités

La première étape de la préparation d'étalons de qPCR repose sur l'extraction de matrices d'ADN connues pour contenir le gène microbien d'intérêt. Elle peut être réalisée à partir de différentes matrices telles que les suivantes:

- a) cultures pures de microorganismes;

L'ADN est extrait de cellules prélevées dans une culture fraîche de microorganismes en utilisant des protocoles d'extraction d'ADN génomique classiques.

- b) ADN artificiel.