



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**DÉTECTION DES *SHIGELLA* SPP. DANS LES ALIMENTS
PAR MÉTHODE D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE (ACP)**

César Bin Kingombe¹, Maria-Lucia Cerqueira-Campos¹, Yvon-Louis Trottier² et Josée Houle²

**¹ Division de la recherche
Direction générale des produits de santé et des aliments
Santé Canada, repère postal : 2204A2
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

Courriel : ckingomb@hc-sc.gc.ca

**² Laboratoire de St-Hyacinthe
Agence canadienne d'inspection des aliments
3499, boul. Casavant Ouest
St-Hyacinthe (Québec) J2S 8E3**

Courriel : trottieryl@inspection.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la détection des *Shigella* spp. viables dans les produits frais et les salades commerciales. La méthode décrite dans le présent document a donné des résultats acceptables pour les épinards, le persil, la salade grecque, la salade de quatre fèves, la salade de pâtes grecque, la laitue romaine, la menthe fraîche, les oignons verts, le celeri, les myes et les fraises. On peut en outre l'utiliser pour déterminer s'il y a conformité avec les articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Lorsque précisé, les méthodes officielles et les méthodes de la DGPSA doivent être utilisées. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-26 datée de février 2004.

2. DESCRIPTION

La méthode décrite dans le présent document a initialement donné des résultats satisfaisants à l'égard de produits artificiellement contaminés (8.1). La procédure initiale a été adaptée et améliorée pour la détection courante des *Shigella* spp. dans les laboratoires diagnostiques.

3. PRINCIPE

Suite à l'enrichissement des échantillons dans le bouillon *Shigella* contenant de la novobiocine, une partie du bouillon d'enrichissement est traitée et soumise à la méthode d'amplification en chaîne par polymérase (ACP) pour amplifier un fragment d'une longueur de 629 paires de bases localisés à l'intérieur des plasmides invasifs de 220-kbp et de l'ADN chromosomique de *Shigella spp.* Les amorces utilisées dans la réaction de l'ACP sont non seulement spécifiques pour les *Shigella spp.*, mais aussi pour le *E.coli* entéroinvasif (EIEC).

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Note : Le surveillant du laboratoire doit veiller à ce que l'analyse décrite dans la présente méthode est effectuée conformément à la norme internationale « ISO/IEC 17025 :2005 (ou dernière révision) : Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais ».

- 6.1 Thermocycleur (Modèle 9700, Applied Biosystems Gene Amp) ou l'équivalent.
- 6.2 Four à micro-ondes ou plaque chauffante.
- 6.3 Support de coulage de gel et réservoir à tampon, appareil d'alimentation et mini-peigne approprié
- 6.4 Table lumineuse à rayons UV à ondes courtes (transilluminateur) pour visualiser l'ADN coloré dans les gels d'agarose
- 6.5 Système de photo documentation (facultatif, pour les dossiers photographiques), y compris un appareil photo Polaroid (manuel ou fixe), hotte et film Polaroid 667 ou l'équivalent.
- 6.6 Pipetteurs réglables dans les gammes de volumes suivants : 0,5 à 10 µL, 10 à 100 µL, 200 à 1 000 µL.
- 6.7 Embouts filtrés pour les pipetteurs susmentionnés.
- 6.8 Thermomixer® (Eppendorf), blocs thermiques ou bain-marie pouvant recevoir des tubes microfuges de 1,5 mL et capable de maintenir une température de 56°C et de 100°C.
- 6.9 Mélangeur vortex.
- 6.10 Sacs à stomacher
- 6.11 Sacs à stomacher avec filtres.
- 6.12 Tubes microfuges (1,5 mL).
- 6.13 Microcentrifugeuse réfrigérante.
- 6.14 Tubes microfuges pour ACP - à paroi mince et d'une capacité de 0,2 mL ou de 0,5 mL (selon le modèle du thermocycleur).
- 6.15 Incubateur normal ou incubateur à CO₂, capable de maintenir une température de 42°C.

Note : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie soient maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 ± 1,0 °C. De même, des températures plus basses de 30 ou 25 °C peuvent être à ± 1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 42,0 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à ± 0,5 °C de variation. Une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

- 6.16 Système de jarres de type GasPak (ou l'équivalent) à génération de CO₂ (Oxoid), si un incubateur à CO₂ n'est pas disponible.
- 6.17 Agitateur magnétique.
- 6.18 Congélateur capable de maintenir une température de -20°C.
- 6.19 InstaGene Matrix™, Bio-Rad (n° de catalogue 732-6030).
- 6.20 Bouillon *Shigella*
- 6.21 Novobiocine.
- 6.22 Tween 20 dans une solution de 1 %.
- 6.23 Amorces *ipaH* (F) et *ipaH* (R) (voir la section 9.1 pour séquence d'ADN).
- 6.24 De plus, les produits chimiques et les réactifs suivants devraient être disponibles.
Voir la liste des tampons individuels et la formulation des réactifs présentées à la section 10 :

- Agarose
- Bleu de bromophénol (pour le colorant de repérage du tampon de dissociation)
- dNTP
- Échelle d'ADN de 100 bp (ou l'équivalent)
- Bromure d'éthidium
- EDTA disodique
- KCl
- Huile minérale (si requis pour certains types de thermocycleurs)
- MgCl₂
- Sucrose
- Tampon d'ACP 10X (concentré)
- ADN-polymérase *Taq*
- Xylène cyanol
- Tris[hydroxyméthyl]aminométhane (p. ex., base Trizma® de Sigma)
- Acide borique
- Eau exempte de DNase et de RNase

7. MARCHE À SUIVRE

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Durant l'entreposage et le transport, garder les unités d'échantillonnage réfrigérées.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Préparer tous les tampons et tous les réactifs tel que précisé à la section 10.

- 7.2.2 Préparer et vérifier l'appropriation à l'usage de tous les témoins. Inclure des témoins positif et de réactif. Une souche de *Shigella sonnei* (ATCC 29930), *Shigella flexneri* (ATCC 29903), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313) ou *Shigella boydii* (ATCC 8700) devrait être incluse à titre de témoin positif.

Note: Les numéros ATCC sont présentés à titre de référence; des souches équivalentes de *Shigella* peuvent également être utilisées.

7.3 Préparation de l'échantillon

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités d'échantillonnage peuvent être combinées. Effectuer les analyses conformément aux instructions suivantes :

- 7.3.1 Afin d'assurer la représentativité de l'unité analytique, agiter les liquides ou les matières fluides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas d'une matière solide, obtenir l'unité d'analytique en prélevant une portion à différents endroits dans l'unité d'échantillonnage. Pour réduire la charge de travail, on peut combiner les unités analytiques. Il est conseillé de regrouper un maximum de cinq unités analytiques.
- 7.3.2 À l'aide de techniques aseptiques, préparer une dilution 1:10 de l'aliment dans un sac à stomacher avec filtre en ajoutant 25 g de l'unité analytique à 225 mL de bouillon *Shigella* contenant 0,5 µg/mL de novobiocine.
- 7.3.3 Masser doucement l'échantillon et garder la suspension à la température ambiante pendant 10 minutes. Mélanger manuellement de temps à autre.

Note: Ne pas utiliser un stomacher ou un mélangeur pour éviter la formation de particules alimentaires excessives qui peuvent nuire à la réaction d'ACP.

- 7.3.4 Verser le surnageant dans un nouveau sac stomacher stérile.
- 7.3.5 Ajuster le pH, au besoin, à $7,0 \pm 0,2$ à l'aide de NaOH 1,0 N ou de HCl 1,0 N stérile.
- 7.3.6 Inclure des témoins positif et de réactif.
- 7.3.7 Placer le sac, avec l'ouverture fermée de façon non-hermétique, dans une jarre munie d'un générateur de CO₂ ou dans un incubateur à CO₂. Incuber à 42°C pendant 20 ± 2 heures.

7.4 Préparation des gabarits

Les gabarits d'ADN sont extraits à l'aide de la trousse InstaGene Matrix™ :

- 7.4.1 Transférer 100 µL d'échantillon (culture ou bouillon d'enrichissement) dans 900 µL d'eau exempte de RNase et de DNase (pour obtenir un volume total de 1 mL) ou directement 1 mL d'échantillon dans un tube microfuge stérile de 1,5 mL.
- 7.4.2 Centrifuger à 4°C pendant 3 minutes à 9 000 x g à 13 000 x g.
- 7.4.3 Retirer le surnageant et resuspendre le culot dans 1 mL d'une solution stérile de Tween-20 (1 %). Mélanger au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
- 7.4.4 Centrifuger à 4°C pendant 3 minutes à 9 000 x g à 13 000 x g.
- 7.4.5 Retirer le surnageant, ajouter 200 µL de matrice InstaGene au culot et mélanger au vortex pendant 10 secondes.

IMPORTANT : La matrice InstaGene doit être mélangée à vitesse moyenne sur un agitateur magnétique pour maintenir la matrice en suspension. Utiliser un embout de pipetteur à large ouverture, par exemple un embout pour pipetteur de 1 000 µL.

- 7.4.6 Transférer le tube dans un bloc thermique ou un bain-marie et incubé à 56°C pendant 15 à 30 minutes.
- 7.4.7 Mélanger le contenu au vortex pendant 10 secondes et placer le tube dans un bloc thermique à 100°C ou un bain d'eau bouillante pendant 8 minutes.
- 7.4.8 Refroidir sur la glace. Mélanger au vortex pendant 10 secondes, puis centrifuger à 4°C pendant 3 minutes à 9 000 x g à 13 000 x g. Passer à l'étape d'amplification ou conserver à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Note: L'utilisation d'une microcentrifuge réfrigérante est fortement recommandée pour éviter la propagation de l'ADN.

Note: Répéter l'étape 7.4.8 si l'on utilise une préparation d'ADN déjà extraite par InstaGene et qui a été conservée au congélateur. Suite à l'extraction de l'ADN, la condensation sur le bouchon du tube microfuge peut être éliminée en centrifugeant le tube pendant quelques secondes à 9 000 x g.

7.5 Méthode de dépistage par ACP

- 7.5.1 Ajouter 5 µL du gabarit préparé (7.4.8) à 45 µL du mélange pour l'ACP.

Note: D'autres volumes peuvent être utilisés en autant que le ratio 1:10 est respecté.

- 7.5.2 Placer les tubes microfuges dans un thermocycleur et procéder à l'amplification en chaîne de la polymérase conformément au programme décrit au point 9.2.

Note : Certains thermocycleurs (modèles plus anciens) nécessitent l'utilisation d'huile minérale stérile dans chaque puits (2 gouttes) et sur la surface de chaque mélange pour ACP (chaque tube). Utiliser un embout de pipetteur différent pour chaque ajout.

- 7.5.3 Après avoir complété la méthode d'ACP, analyser le produit d'ACP (ou amplicon) par électrophorèse sur gel d'agarose. Si nécessaire, les amplicons peuvent être conservés à 4°C jusqu'au moment de l'analyse.

7.6 Électrophorèse sur gel d'agarose

- 7.6.1 Préparer un gel d'agarose 2,0 % (p/v) dans un tampon TBE 0.5 X (Tris-Borate-EDTA). Le gel d'agarose peut être dissout en le mélangeant sur une plaque chauffante ou en le plaçant dans un four à micro-ondes pendant 1 à 2 minutes à intensité élevée. Bien vérifier que le gel d'agarose soit complètement dissout (i.e. liquide clair, absence de particules en suspension).

Note: Pour déterminer le volume d'agarose à préparer, se guider à l'aide des éléments suivants: l'épaisseur moyenne d'un gel est de 5-10 mm, et les peignes devraient être recouvert aux deux-tiers. Il est aussi possible de se référer aux instructions du manufacturier sur la façon de préparer un gel d'épaisseur adéquate.

- 7.6.2 Refroidir l'agarose et ajouter 2 µL de solution de bromure d'éthidium (10mg/ml) par 40 mL d'agarose. Mélanger doucement pour éviter la formation de bulles.

Note: L'ajout de EtBr au gel est facultatif si le gel est submergé dans une solution de EtBr suite à la migration.

NOTE DE SÉCURITÉ: LE BROMURE D'ÉTHIDIUM EST UN MUTAGÈNE PUISSANT : PORTER DES GANTS DOUBLES POUR LE MANIPULER.

7.6.3 Verser dans un plateau de gel en évitant la formation ou le piégeage de bulles d'air. Insérer un peigne pour former les puits et laisser reposer le gel pendant 20 à 30 minutes.

7.6.4 Préparer les échantillons pour l'électrophorèse de la manière suivante: dans des tubes microfuges propres, mélanger 4 µL de colorant de repérage (tampon de dissociation 5x concentré) et 25 µL du produit d'ACP.

Note: Pour les volumes de réaction d'ACP plus petits (tubes d'ACP de 200 µL), où 2 µL du gabarit préparé sont ajoutés à 20 µL du mélange pour ACP (ou 2,5 µL à 22,5 µL), l'échantillon peut être préparé en ajoutant 3 µL de colorant de repérage à 10 µL d'échantillon d'ACP.

Note: Pour les thermocycleurs qui utilisent de l'huile minérale, si l'échantillon a été prélevé sous la couche d'huile dans les tubes d'ACP, il faut essuyer l'embout du pipetteur après chaque prélèvement d'échantillon sous la couche d'huile.

7.6.5 Lorsque le gel d'agarose est prêt, retirer le peigne, placer le plateau contenant le gel dans l'appareil d'électrophorèse et remplir le réservoir de tampon TBE 0,5 X afin de couvrir le gel (profondeur de 4 mm). Ajouter lentement environ 10 µL d'échantillon (7.6.4) dans chacun des puits du gel submergé. Pipeter un échantillon d'ADN de taille moléculaire prédéterminée (p. ex., échelle d'ADN de 100 bp) dans un puits vide qui permettra la différenciation des produits de l'ACP dans la plage prévue. Inclure des témoins positif et de réactif.

Note: Le volume des puits peut varier de 10 à 20 µL selon l'utilisation de différents peignes et « préparations » de gel.

7.6.6 Brancher l'appareil au bloc d'alimentation en veillant à raccorder la cathode (-, noir) située à la partie supérieure (près des puits d'échantillon) et l'anode (+, rouge) située à la partie inférieure (l'extrémité) du gel. Appliquer environ 100 volts au gel (environ 30 mA par gel pour les mini gels) pendant environ 50 minutes ou jusqu'à ce que le colorant de repérage s'étende sur une distance d'environ deux tiers de la longueur du gel.

7.6.7 Retirer le gel du plateau et regarder les bandes d'ADN en les exposant aux rayons ultraviolets (ondes courtes) d'un dispositif d'éclairage par transillumination. Il est possible de photographier les gels à l'aide d'un film Polaroid 667 pour faciliter l'analyse ainsi qu'à des fins de conservation de dossiers.

Note: Si le EtBr n'a pas été ajouté directement au gel, il faut retirer le gel du plateau et colorer l'ADN en le plaçant dans une solution de EtBr (10 µg/ml) pendant 15 minutes. Retirer le gel de la solution de EtBr à l'aide d'une spatule de prélèvement de gel, rincer brièvement à l'eau et regarder les bandes d'ADN en les exposant aux rayons ultraviolets.

NOTE DE SÉCURITÉ: LES RAYONS ULTRAVIOLETS PEUVENT ENDOMMAGER LES YEUX : PORTER DES LUNETTES DE SÉCURITÉ

7.7 Lecture des résultats de la méthode d'ACP :

7.7.1 L'amplicon (produit d'ACP) généré des séquences du gène *ipaH* de *Shigella* spp. par la méthode d'ACP est un fragment d'ADN à double brin d'une longueur de 629 bp. Par

conséquent, un test d'ACP positif est révélé par la présence d'un fragment d'ADN d'une longueur de 629 bp qui apparaît comme une bande intense sur le gel d'agarose coloré au EtBr. La taille moléculaire de la bande peut être vérifiée en comparant sa migration à celle d'un marqueur d'ADN de taille moléculaire prédéterminée (p. ex., échelle d'ADN de 100 bp) analysé sur le même gel.

Note: Une réaction positive (c.-à-d., amplicon d'une longueur de 629 bp) peut en outre être générée par des espèces bactériennes appartenant au groupe *Escherichia coli* entéroinvasif (EIEC).

- 7.7.2 Un résultat négatif pour la méthode d'ACP ne montre habituellement pas de bande visible sur le gel d'agarose coloré à l'aide de EtBr. Même si cette situation est extrêmement rare, un échantillon qui démontre des bandes, qui ne correspondent pas à un amplicon d'une longueur de 629 bp, (produits d'amplification non spécifiques) est considéré comme négatif.
- 7.7.3 Une bande d'une longueur de 629 bp doit apparaître dans le puits du témoin positif. L'absence d'une bande de témoin positif invalide l'épreuve et les échantillons doivent faire l'objet d'une nouvelle analyse.
- 7.7.4 La présence, dans le puits du témoin négatif ou du blanc de réactif, d'une bande correspondant à l'amplicon d'une longueur de 629 bp indique des problèmes de contamination par l'huile minérale (si utilisée) ou par le mélange d'ACP. Dans ces cas, l'épreuve est considérée comme suspecte et l'ensemble des réactifs susmentionnés sont alors tenus pour des sources possibles de contamination et doivent être jetés. Il faut analyser de nouveau les échantillons avec de nouveaux réactifs.
- 7.7.5 Tout échantillon d'essai montrant une bande distincte d'une longueur de 629-bp est présumé positif. Dans ce cas, il faut tenter d'isoler la bactérie présente dans le bouillon d'enrichissement à l'aide de la méthode de culture (voir MFLP-25).

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Lampel, K. A., J.A. Jagow, M. Trucksess et W. E. Hill. 1990. Polymerase chain reaction for Detection of Invasive *Shigella flexneri* in foods. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1536-1540.
- 8.2 Lampel, K. CFSAN, FDA Survey of Domestic Fresh Produce, Domestic Produce Sampling Assignment - FY 00/01 DOEP # 00-16. United States Food and Drug Administration, Office of Plant, Dairy Foods and Beverages. Division of Virulence Assessment, Virulence Mechanisms Branch, HFS-327, (202) 205-4515.
- 8.3 Andrews, Wallace H., 1998. U.S. FDA Chapitre VI de l'ouvrage intitulé « Bacteriological Analytical Manual », 8^e édition, Food and Drug Administration, Washington, D.C.
- 8.4 Hartman, A. B., M. Venkatesan, E. V. Oaks, et J.M. Busyee. 1990. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. J. Bacteriol **172**:1905-1915.

9. AMORCES D'ACP ET PROGRAMME DE CYCLES DE TEMPÉRATURE

9.1 Amorces d'ACP

Dépistage par ACP : Les séquences d'oligonucléotides utilisées comme amorces pour l'ACP ont été élaborées à partir de la séquence des nucléotides publiée du gène *ipaH*, codant pour le plasmide invasif et situé sur le chromosome de *Shigella* (8.4). Les séquences d'amorces suivantes sont requises pour l'amplification du fragment d'une longueur de 629 bp :

ipaH (F) - avant - 28 bases = 5'-GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C-3'
ipaH (R) - arrière - 26 bases = 5'-GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC-3'

Note: La synthèse des amorces peut habituellement être confiée à une université locale, ou de plus, plusieurs entreprises biotechnologiques offrent aussi un service de synthèse sur mesure. Prière de communiquer avec les auteurs pour obtenir de l'aide à cet égard.

9.2 Programme des cycles de température

Il faut programmer le thermocycleur selon les paramètres suivants :

Étape 1	Dénaturation	5 minutes	95°C (polymérase <i>Taq</i> ordinaire)
		15 minutes	95°C (polymérase <i>Taq</i> pour « démarrage à chaud »)
Étape 2	35 cycles de :		
	Étape 2.1 Dénaturation	15 secondes	95°C
	Étape 2.2 Attachement	30 secondes	68°C
	Étape 2.3 Extension	30 secondes	72°C
Étape 3	Élongation finale	10 minutes	72°C

Note : L'utilisation de thermocycleurs autres que les modèles susmentionnés peut affecter le rendement de la méthode d'ACP; l'utilisateur devra peut-être optimiser les paramètres en fonction des différents modèles.

10. RÉACTIFS

10.1 Mélange pour réaction d'ACP

Les mélanges pour réaction d'ACP peuvent être préparés et des aliquots de 45 µL distribués d'avance dans des tubes microfuges de 0,5 ml et stockés à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation (peuvent se conserver jusqu'à un an). Les solutions-mères peuvent également être stockées à -20°C jusqu'au moment de l'emploi. La formule suivante permet de préparer une grande quantité équivalant à 20 amplifications, lorsque des aliquots de 45 µL sont distribués dans des tubes individuels.

Note: Les tampons, l'eau distillée, les embouts de pipetteur et tout autre matériel qui touchent les échantillons ou les réactifs d'ACP doivent être stériles ou stérilisés à l'autoclave à l'avance pour en retirer les DNases et/ou tout autre contaminant. Pour éviter des problèmes de contamination, tous les réactifs doivent être préparés dans une hotte à flux laminaire qui n'a jamais été exposée à un *Shigella* spp. ou à des produits d'ACP. Pour prévenir toute amplification non spécifique, le mélange doit être préparé en plaçant tous les réactifs sur de la glace ou sur un plateau réfrigérant. En outre, à des fins de commodité pour certains thermocycleurs et dans le but de réduire le coût des réactifs, il est possible d'utiliser 20 µL du mélange d'ACP dans des tubes de 200 µL.

Composantes d'ACP	Concentration initiale	Solutions-mères requises pour 20 tubes de réaction	Volume par tube	Concentration finale
Eau distillée (exempte de DNase et de RNase)	NA	450,0 µL	22,5 µL	NA
Tampon d'ACP	10 X	100,0 µL	5,0 µL	1 X
MgCl ₂ (*)	25 mM	100,0 µL	5,0 µL	2,5 mM
Amorce A (IpaH-f)	10 pmoles/µL	100,0 µL	5,0 µL	1 µM
Amorce B (IpaH-r)	10 pmoles/µL	100,0 µL	5,0 µL	1 µM
dNTP	10 mM	20,0 µL	1,0 µL	0,2 mM
ADN-polymérase <i>Taq</i>	5 U/µL	10,0 µL	0,5 µL	2,5 U
Tween 20	NA	20,0 µL	1,0 µL	2,0%
Volume total	NA	900 µL	45 µL	NA
Volume distribué par tube	NA	45 µL	NA	NA
Gabarit	NA	5 µL	NA	NA

(*) Certains tampons disponibles dans le commerce contiennent 15 mM MgCl₂, mais d'autres n'en contiennent pas; si tel est le cas, il faut ajouter du MgCl₂ pour obtenir une concentration finale de 2,5 mM.

10.2 **Tampon d'ACP 10 X (disponible dans le commerce; accompagne en général la trousse *Taq* polymérase)**

Le tampon d'ACP concentré 10 X contient habituellement 500 mM KCl et 200 mM Tris-HCl (pH 8.4).

10.3 **Huile minérale (pour certains cycleurs thermiques)**

Stériliser l'huile minérale à l'autoclave dans une bouteille de verre (il est normal que l'huile devienne trouble en refroidissant). Préparer des aliquots de 1 mL dans des tubes microfuges stériles de 1,5 mL. Conserver à la température ambiante.

10.4 **Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 10X (disponible dans le commerce)**

Base Trizma	108,0 g
Acide borique	55,0 g
EDTA disodique	7,5 g

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à un volume de 800 mL, dissoudre, puis ajouter de l'eau pour obtenir un volume total de 1,0 L.

Ce tampon est utilisé par la suite à une dilution 1:20 avec de l'eau distillée pour obtenir le tampon de travail TBE 0.5 X.

Le pH du tampon TBE 0.5 X devrait être de 8.3. Ne pas ajuster le pH.

10.5 Colorant de repérage / tampon de dissociation (aussi disponible dans le commerce).

Bleu de bromophénol	0,025 g	0,25 % (p/v)
Xylène cyanole	0,025 g	0,25 % (p/v)
Sucrose	4,0 g	40 % (p/v)
Eau distillée stérile	10 mL	

Bien mélanger tous les ingrédients, filtrer et conserver à 4°C.

10.6 Marqueur d'ADN de taille moléculaire prédéterminée

Même si différents fournisseurs offrent plusieurs types de préparations d'ADN de taille moléculaire prédéterminée, le marqueur d'ADN de l'échelle de longueur de 100 bp présente une gamme utile de tailles de fragment d'ADN et facilite « l'estimation de la taille » des amplicons d'ACP. Une solution-mère de ce marqueur est préparée comme suit : combiner 50 µL d'échelle d'ADN de 100 bp, 41,5 µL de colorant de repérage et de 158 µL de tampon TBE 0,5 X. Conserver à -20°C. Utiliser 5 µL par gel.

10.7 ADN-polymérase *Taq*

Les entreprises Qiagen ou Invitrogen Molecular Biology offrent de l'ADN-polymérase *Taq* de bonne qualité. L'ADN-polymérase *Taq* vendue par d'autres fournisseurs peut également être acceptable, mais nos laboratoires ne les ont pas mis à l'essai et leur utilisation peut affecter le rendement de la méthode d'ACP; l'utilisateur devra peut-être rajuster certains paramètres. L'ADN-polymérase *Taq* pour « démarrage à chaud » a démontré des résultats de bonne qualité pour utilisation courante et peut prévenir la formation de dimères-d'oligos («primer-dimer») ou de produits amplifiés non spécifiques.