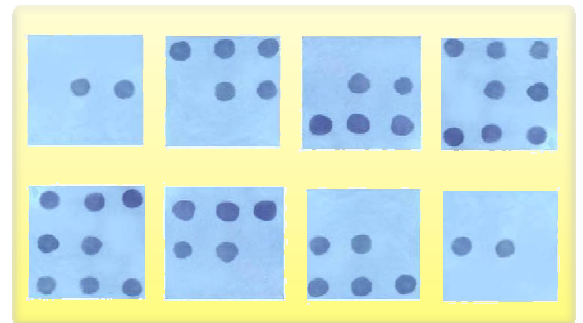


## **INITIATION AUX TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ASSOCIEES A L'HYBRIDATION SUR MEMBRANE**

A partir de l'utilisation d'une

### **TROUSSE DE DETECTION POUR LA RECHERCHE SIMULTANEE DE DEUX PATHOGENES VIRAUX**



**24 ou 48 tests**

**Pour une utilisation *in vitro* uniquement. Stockage du kit entre +2 et +8°C.**

**Skuldtech**

Téléphone : +33 (0)467 419 748 / Fax : +33 (0)467 457 726

Adresse : 134, rue du Curat – Bât. Amarante 34090 Montpellier France

Email : [info@skuldtech.com](mailto:info@skuldtech.com) – Web : <http://www.skuldtech.com/DAVE.html>

# SOMMAIRE

<b><u>PRESENTATION DU KIT MINI-ARRAY ENSEIGNEMENT</u></b>	<b>3</b>
<b>A- OBJECTIFS VISES</b>	<b>3</b>
<b>B- DESCRIPTION, PRINCIPE ET PERFORMANCE DU KIT MINI-ARRAY</b>	<b>3</b>
<b>C- COMPOSITION DU KIT ET MATERIELS NECESSAIRES</b>	<b>5</b>
1. REACTIFS, MATERIELS ET CONDITIONNEMENT	5
2. MATERIELS ET PRODUITS CHIMIQUES NECESSAIRES NON FOURNIS	6
<b><u>PROTOCOLE ET ETAPES POUR L'UTILISATION DU KIT MINI-ARRAY ENSEIGNEMENT</u></b>	<b>7</b>
<b>A- PREPARATION DES ECHANTILLONS (~ 2 HEURES)</b>	<b>8</b>
<b>B- REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR) (~ 2 HEURES 30)</b>	<b>10</b>
<b>C- ANALYSE PAR ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE (CONTROLE DE LA REACTION DE PCR, FACULTATIF)</b>	<b>12</b>
1. PREPARATION D'UN GEL D'AGAROSE A 1,2 % :	12
2. DEPOT DES ECHANTILLONS	13
3. LECTURE DES RESULTATS	13
<b>D- HYBRIDATION ET REVELATION COLORIMETRIQUE (~ 2 HEURES)</b>	<b>14</b>
1. PROTOCOLE D'HYBRIDATION	14
2. PROTOCOLE DE REVELATION COLORIMETRIQUE	14
<b>E- INTERPRETATION ET VALIDATION DES RESULTATS</b>	<b>19</b>
1. INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE	19
2. INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'HYBRIDATION SUR MEMBRANE	20
<b><u>ANNEXES</u></b>	<b>21</b>
<b>TAMPONS D'ELECTROPHORESE</b>	<b>21</b>
<b>TAMPON DE CHARGE COLORE DE DEPOT</b>	<b>21</b>
<b>ACETATE DE SODIUM (3 M)</b>	<b>22</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>22</b>

## **Présentation du kit Mini-Array Enseignement**

### ***A- Objectifs visés***

Afin de répondre aux besoins des enseignants en matière d'initiation aux techniques de biologie moléculaire associées à l'hybridation sur membrane, Skuldtech a adapté son kit Mini-Array (Dual Aqua Vir) permettant la détection de deux pathogènes viraux en une approche guidée et pédagogique de ces techniques.

Grâce au kit Mini-Array version Enseignement permettant la détection de deux ADN viraux, les techniques et notions suivantes sont abordées :

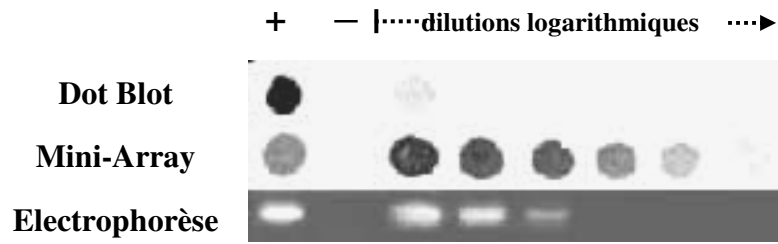
- Extraction et purification d'acides nucléiques,
- Amplification d'acides nucléiques par PCR (principe et mise en œuvre de la Réaction de Polymérisation en Chaîne),
- Analyse de fragments nucléiques par électrophorèse en gel d'agarose,
- Mise en œuvre d'une technique de détection par hybridation moléculaire (à l'aide de sondes « froides ») sur membrane (mini puce à ADN),
- Mise en œuvre d'une analyse ou d'un contrôle,
- Recherche et analyse de séquences nucléiques dans une base/banque de données.

### ***B- Description, principe et performance du kit Mini-Array***

Il repose sur l'amplification enzymatique de gènes par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). Il utilise des amorces spécifiques des pathogènes recherchés. L'extraction de l'ADN viral se fait par simple clarification. Un ADN témoin positif de la réaction de PCR et de l'hybridation appelé "contrôle interne" est présent dans chaque réaction. La visualisation des produits amplifiés s'effectue par hybridation sur des membranes prêtes à l'emploi, suivie d'une révélation colorimétrique immunoenzymatique.

Le kit fournit les réactifs pour réaliser 24 ou 48 tests. Les analyses peuvent être réalisées en parallèle en **moins de 5 heures**.

Grâce à un seuil de détection très élevé (voir graphique ci-dessous), le kit **Mini-Array** est une méthode très sensible de diagnostic permettant une détection précoce de pathogènes.



**10 000 fois** plus sensible que la méthode de Dot Blot.

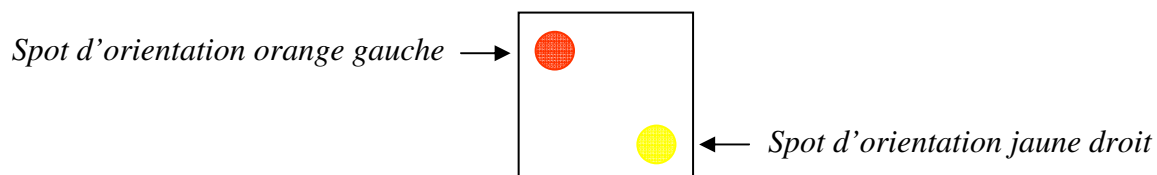
**100 fois** plus sensible que la méthode de détection des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose.

## C- Composition du kit et matériels nécessaires

### 1. Réactifs, matériels et conditionnement

- 25 ou 50 membranes prêtes à l'emploi (*Ready to use Mini-Array Membranes*)

*Schéma représentatif d'une membrane prête à l'emploi avant utilisation. Seuls, apparaissent les spots colorés de l'orientation.*



- 1 ou 2 microplaque(s) de 24 puits
- 25 ou 50 tubes pour PCR (barrettes tubes de 0,2 ml)
- Pince (manipulation des membranes)
- Manuel d'utilisation
- Echantillons positifs et négatifs d'ADN (plasmides) :
  - Hemolymph infected by WSSV : 4 ml
  - Hemolymph infected by IHHNV : 4 ml
  - Not infected hemolymph : 4 ml

Solutions/Réactifs	Quantités		Flacon/Tube
	24 tests	48 tests	
Réactif d'Amplification 1 : Solution A1	1 ml	2 x 1 ml	solution bouchon jaune
Réactif d'Amplification 2 : Solution A2	30 µl	60 µl	solution bouchon rouge
Solution de Lavage 1 : Wash Solution 1 : W1	75 ml	75 ml	solution translucide
Solution de Lavage 2 : Wash Solution 2 : W2	75 ml	75 ml	solution translucide
Solution de Lavage 3 : Wash solution 3 : W3	75 ml	75 ml	solution bleu clair
Anticorps anti-digoxigénine (100X) : Anti-DIG Ab	250 µl	250 µl	solution bouchon bleu
Tampon de dilution de l'anticorps : Antibody Dilution Buffer	14 ml	25 ml	solution bleu foncé
Solution de révélation : TMB Substrate	8 ml	15 ml	flacon opaque
Eau stérile : Sterile water	500 µl	500 µl	solution translucide
Eau distillée : Distilled Water	50 ml	50 ml	solution translucide

**Tous les réactifs et solutions se conservent entre +2 et +8°C.**

## **2. Matériels et produits chimiques nécessaires non fournis**

✦ Les produits doivent être de qualité de biologie moléculaire.

- Thermocycleur
- Micropipettes de 1-10 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl
- Embouts stériles à filtres pour micropipettes
- Microtubes stériles de 1,5 ou 2 ml
- Pilon en plastique pour le broyage des tissus (exemple : VWR, réf. 431-0098)
- Gants non poudrés
- Seringues et aiguilles stériles
- Bain-marie
- Vortex
- Centrifugeuse de paillasse
- Centrifugeuse réfrigérée (> 10000 g)
- Agitateur orbital
- Pompe à vide (facultatif mais recommandé)
- Ethanol pur (min 95%)
- Phénol/chloroforme/alcool isoamylique ultra pur (25:24:1) (noté PCI)
- Acétate de sodium tri-hydraté (mini 99%) 3M, pH 5,2
- Glace

Pour l'analyse par électrophorèse (contrôle de la réaction PCR, étape facultative) :

- Agarose
- Tampon d'électrophorèse: TAE (ou TBE)
- Bromure d'Ethidium (BET)
- Tampon de charge 3X (BSU)
- Appareil d'électrophorèse

**Nous vous recommandons de lire l'ensemble du protocole avant de commencer les essais et de le respecter scrupuleusement.**

**La réaction de PCR génère de grandes quantités d'ADN amplifié. Très peu de molécules d'ADN contaminant suffisent à générer après amplification un résultat faussement positif. Il est donc important de bien séparer la zone d'analyse des produits amplifiés de la zone où sont manipulés les échantillons à analyser.**

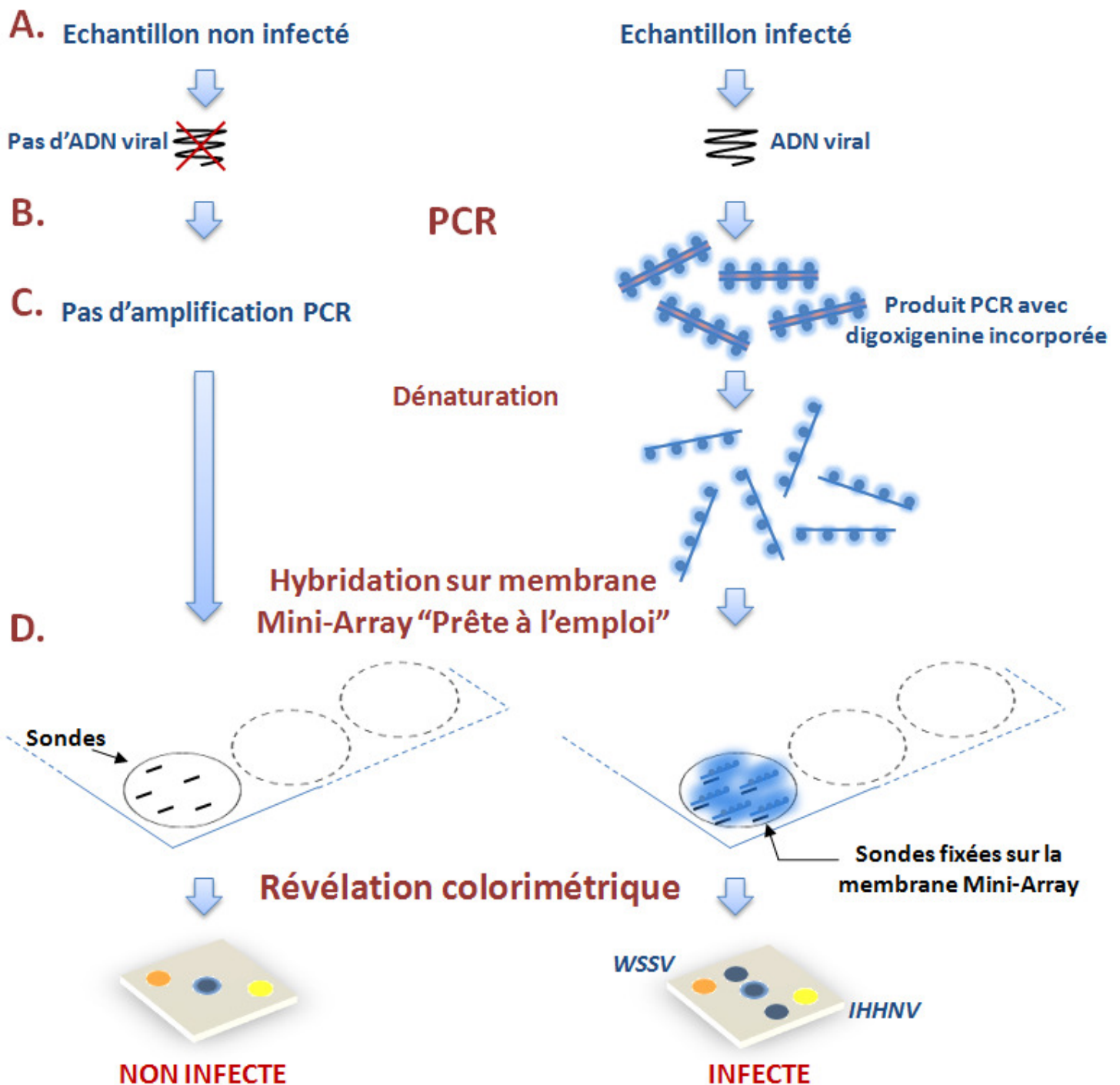
## Protocole et étapes pour l'utilisation du kit Mini-Array Enseignement

**(A)** Préparation des échantillons (2 heures)

**(B)** Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (2 heures 30)

**(C)** Contrôle de la PCR (1 heure)

**(D)** Révélation colorimétrique (2 heures)




## ***A- Préparation des échantillons (~ 2 heures)***

**Utiliser des embouts stériles avec filtres jetables pour chaque pipetage du surnageant. Manipuler soigneusement et éviter les contaminations entre les échantillons.**

Différents échantillons peuvent être utilisés pour effectuer ce protocole :

- ✓ échantillons fournis : inclus dans le kit enseignement,
- ✓ échantillons de tissus : crevettes du marché de type « Gambas » (rayon surgelé).

<b>Echantillons fournis</b>	<b>Echantillons de tissu</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Identifier chaque échantillon à analyser.</li><li>2. Prélever 200 µl de chacun des échantillons (positif et négatif) dans un microtube stérile.</li><li>3. Passer en A5 ci-dessous.</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Identifier chaque échantillon à analyser.</li><li>2. Prélever environ 3 mm<sup>3</sup>  de tissu (branchie, pléopode, hépatopancréas, œil) ou 200 µl d'hémolymphe dans un microtube stérile de 1,5 ml.</li><li>3. Ajouter 300 µl d'eau stérile (du kit) et broyer avec un pilon adapté.</li><li>4. Centrifuger à 10000 g pendant 5 min, puis récupérer 200 µl de surnageant. Noter la taille du culot : si le culot est important, au moment de la PCR, diluer l'échantillon (voir A7 ci-dessous).</li></ol>

**Les étapes suivantes de précipitation de l'ADN viral doivent être réalisées dans la glace à + 4°C.**

5. **Sous hotte chimique**, ajouter 200 µl de PCI (Phénol:chloroforme:alcool isoamylique, 25:24:1) aux 200 µl de surnageant ou de chacun des deux échantillons fournis.

**Attention, le Phénol:chloroforme:(alcool isoamylique) est un produit toxique : il faut se protéger les yeux et la peau (voir tableau « phrases de risques », en fin de document).**

Centrifuger à température ambiante à 6500 g pendant 10 min. Après centrifugation, on observe une phase contenant le phénol/chloroforme, une interface et une phase supérieure

aqueuse. L'ADN se trouve exclusivement dans la phase aqueuse. Prélever 75% de la phase aqueuse dans un nouveau microtube stérile.

6. Ajouter 2,5 volume d'éthanol pur (froid, 4°C) et 0,1 volume d'acétate de sodium (3M, pH 5,2). Vortexer l'échantillon et centrifuger à 4°C à 15000 g pendant 30 min.

Repérer le culot d'ADN. Enlever le surnageant à la pipette. Laver le culot d'ADN avec 0,5 ml d'éthanol à 75% (froid, 4°C). Centrifuger à 4°C à 15000 g pendant 5 min et enlever le surnageant. A la fin de la procédure, sécher rapidement le culot d'ADN (**Attention, bien enlever la totalité de l'éthanol**) et le dissoudre dans 200 µl d'eau stérile préchauffée à 65°C (**Echantillon d'ADN viral**).

7. Si le culot est petit, utiliser pour la PCR, la solution pure d'ADN obtenu en A4.  
Si le culot est gros, faire une solution diluée de A4 au dixième dans de l'eau.

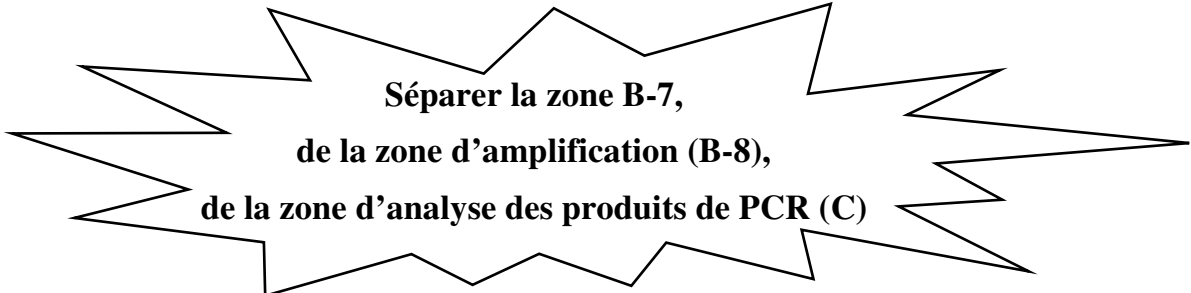
*Remarque : Conservation des ADN obtenus: entre +2°C et +8°C pendant 24 h, à -20°C pendant 6 mois, ou à -80°C pendant 2 ans.*

## ***B- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (~ 2 heures 30)***

La PCR permet d'amplifier les fragments d'ADN recherchés mais également l'incorporation de digoxigénine.

**Utiliser des embouts stériles à filtres pour préparer le mélange réactionnel et pour ajouter les échantillons dans les tubes PCR.**

1. Déterminer le nombre d'échantillons à tester et donc le nombre de réactions de PCR à effectuer : prévoir **n** tubes pour **n** échantillons et **un tube supplémentaire pour le témoin négatif de PCR.**
2. Identifier chaque tube PCR.
3. **Homogénéiser la solution d'amplification A1 au vortex** puis centrifuger brièvement. Prélever dans un microtube stérile  $(n+1) \times 39 \mu\text{l}$  de la **solution d'amplification A1.**
4. **Homogénéiser la solution d'amplification A2 au vortex puis** centrifuger rapidement. Ajouter avec précaution, à l'aide d'une micropipette munie d'un embout stérile :  $(n+1) \times 1 \mu\text{l}$  de la **solution d'amplification A2** à la solution A1 déjà prélevée. Homogénéiser l'ensemble doucement au vortex, puis centrifuger brièvement.
5. Répartir  $40 \mu\text{l}$  du mélange A1 + A2 dans chaque tube PCR.
6. Ajouter avec un embout stérile  $10 \mu\text{l}$  d'eau stérile dans le tube contrôle négatif. Fermer le tube.



**Séparer la zone B-7,  
de la zone d'amplification (B-8),  
de la zone d'analyse des produits de PCR (C)**

7. Pour chaque essai, ajouter avec un embout stérile,  $10 \mu\text{l}$  d'échantillon (solution d'ADN viral obtenue en A7) aux  $40 \mu\text{l}$  de mélange réactionnel.

8. Dès que tous les tubes ont été préparés, réaliser l'amplification par PCR en programmant le thermocycleur comme ci-dessous :

1 cycle	95°C 5 min
40 cycles	95°C 30 sec
	60°C 30 sec
	72°C 1 min
1 cycle	72°C 3 min
Pause (hold)	10°C ∞

En fin de PCR, prélever 5 µl de chaque amplifiat/amplicon pour vérifier par électrophorèse en gel d'agarose la réaction de PCR.

Conserver les échantillons entre +2°C et +8°C.

## ***C- Analyse par électrophorèse en gel d'agarose (contrôle de la réaction de PCR, facultatif)***

### ***Migration électrophorétique des amplicons sur gel d'agarose : séparation des fragments d'ADN et coloration au bromure d'éthidium (BET)***

Cette étape a pour but de séparer dans un champ électrique des fragments d'ADN en fonction de leur taille (ADN génomique ou ADN plasmidique, digérés par des enzymes de restriction ou produit d'amplification PCR). La séparation se fait dans une matrice d'agarose, polymère linéaire extrait d'algues.

Le bromure d'éthidium (BET) est la molécule la plus communément utilisée pour colorer l'ADN dans un gel d'agarose. Le BET s'intercale entre les doubles brins d'ADN et d'ARN. Sous illumination Ultra-Violette (254 à 312 nm), le complexe BET/ADN double brin est visualisé en couleur orange.

#### **1. Préparation d'un gel d'agarose à 1,2 % :**

- ✓ Peser 1,2 g d'agarose, ajouter 100 ml de TAE 0,5X ou TBE 0,5X (composition cf. annexes).
- ✓ Faire fondre au four à micro-onde (par courtes périodes de chauffage) en mélangeant doucement de temps en temps, en prenant garde d'éviter une trop forte évaporation.
- ✓ Refroidir jusqu'à une température voisine de 55°C en agitant modérément (avec un barreau aimanté sur un agitateur magnétique), tout en évitant la formation de bulles.
- ✓ Introduire le BET à la concentration finale de 0,1 µg/ml.  
**Attention, le BET est un produit potentiellement mutagène, il faut se protéger les yeux et la peau et travailler dans une pièce réservée (voir le tableau phrases de risques en fin de document).**
- ✓ Couler le gel.
- ✓ Attendre qu'il polymérise.

## **2. Dépôt des échantillons**

Déposer 5 µl de chaque échantillon de PCR additionnés de 5 µl d'H<sub>2</sub>O et de 5 µl de BSU 3X (tampon coloré de dépôt, composition cf. annexes). Déposer également un ADN marqueur de poids moléculaire.

Faire migrer.

## **3. Lecture des résultats**

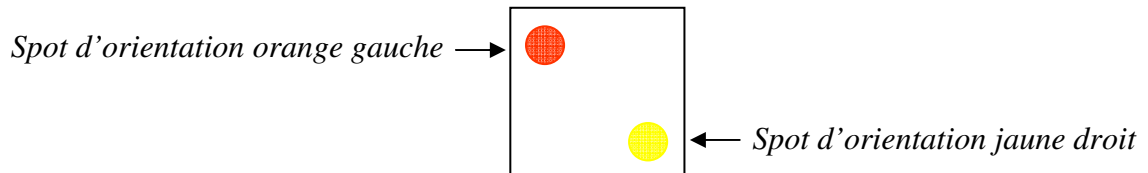
La lecture du gel d'électrophorèse se réalise sur une plaque UV, soit en lecture directe, soit avec une prise d'images si le matériel nécessaire est disponible.

## D- Hybridation et révélation colorimétrique (~ 2 heures)

### 1. Protocole d'hybridation

Pour chaque essai, le dépôt des produits de PCR sur les membranes Mini-Array doit se faire avec un embout stérile.

1. Déposer à l'aide de la pince les membranes dans les puits d'une plaque 24 puits en les orientant selon le schéma suivant :



**Veillez tout au long du protocole à ce que les membranes ne se retournent pas.**

2. Identifier chaque puits.
3. Dénaturer les produits de PCR restant par chauffage (programmer le thermocycleur 10 min à 95°C) et refroidir immédiatement sur de la glace pendant 5 min.
4. Déposer doucement la totalité des produits de PCR dénaturés (45 µl restant) **sur** leurs membranes respectives en utilisant un embout **stérile** par essai.  
ATTENTION de ne pas toucher les membranes avec l'embout.
5. Laisser hybrider pendant 15 à 20 min à température ambiante, sans agitation.
6. Pendant ce temps, chauffer la solution de lavage 1 (W1) au bain-marie à 60°C. et l'y maintenir tout le temps de son utilisation (ne pas s'inquiéter si à froid (+4°C), il existe un précipité, ce dernier disparaît en chauffant).

### 2. Protocole de révélation colorimétrique

Commentaires : ♦ Lors des étapes de lavage, l'utilisation d'une pompe à vide est recommandée pour enlever les solutions des différents puits. Vous pouvez aussi les éliminer en utilisant une micropipette (sans changer l'embout entre chaque pipetage).

♦ Lors du lavage, la vitesse d'agitation de l'agitateur rotatif doit être suffisante pour obtenir une rotation des membranes dans les puits. N'hésitez pas à augmenter la vitesse d'agitation pour obtenir un lavage plus stringent.

**En agitation faible :** sans rotation des membranes dans les puits.

**En agitation forte :** avec rotation des membranes dans les puits.

**Sans agitation.**

♦ **ATTENTION la membrane est fragile : ne jamais déposer la solution directement sur la membrane, mais la déposer sur le bord du puits.**

7. Ajouter directement 0,5 ml de la **Wash solution 1 (W1)** (pré-chauffée au bain-marie à 60°C). Placer la microplaque sur l'agitateur rotatif et laver 1 min à température ambiante, en agitation forte.

Répéter 2 fois cette étape de lavage.

8. Laver 3 fois 1 min avec 0,5 ml de la **Wash solution 2 (W2)** à température ambiante en agitation forte.

9. Préparation de la solution d'anticorps : elle s'effectue au dernier moment.

Diluer 100 fois l'anticorps **anti-Digoxigénine** (Anti-DIG Ab) dans le **Antibody Dilution Buffer** (tampon de dilution de l'anticorps) : par réaction, préparer 5 µl de l'anticorps dans 500 µl du tampon de dilution.

Cette solution diluée n'est stable que peu de temps à +4°C, et doit donc être utilisée dans l'heure suivant sa préparation.

10. Ajouter 450 µl de la **solution d'anticorps** par puits.

Incuber 30 min à température ambiante avec une agitation faible.

11. Eliminer la solution d'anticorps.

12. Laver 3 fois 1 min à température ambiante avec 0,5 ml de la **Wash solution 3 (W3)** en agitation forte.

13. Ajouter 300 µl de la **solution de révélation TMB** (TMB Substrate), préalablement portée à température ambiante.

Incuber entre 15 et 20 min à température ambiante et à l'obscurité (surtout **ne pas agiter** et ne pas excéder le temps de révélation).

NB : La solution de TMB peut, dans certains cas, présenter des particules blanchâtres, mais ceci n'altère pas son efficacité. MAIS, si le TMB est bleuté il ne faut pas l'utiliser : il y a une contamination du TMB par l'anticorps, le substrat est donc épuisé.

14. Eliminer la solution de TMB.

15. Laver les membranes à l'eau distillée (0,5 ml) pendant 5 min en agitation forte (utiliser l'eau distillée fournie dans le kit).
16. Bien enlever l'eau distillée.
17. Procéder à l'interprétation des résultats (voir partie E).
18. Les membranes Mini-Array peuvent être scannées pour être archivées,  
Ou conservées au congélateur,  
Ou, après séchage, être conservées sous scotch et à l'abri de la lumière.

## **Suivi des étapes réalisées**

### ***A- Préparation des échantillons (~ 2 heures)***

- Extraction et purification d'ADN

### ***B- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (~ 2 heures 30)***

- Mélange des solutions A1 et A2
- Ajout de l'ADN de l'étape A
- PCR

### ***C- Contrôle de la réaction PCR (facultatif)***

- Préparation gel et cuve pour l'électrophorèse
- Mélange du produit PCR et du tampon de charge (de dépôt)
- Migration
- Lecture

### ***D- Hybridation et révélation colorimétrique (~ 1 heure)***

#### **Protocole d'hybridation**

- Dénaturation de l'ADN amplifié par PCR
- Dépôt du produit PCR dénaturé sur la membrane

#### **Protocole de révélation colorimétrique**

- Chauffage de la solution de lavage W1
- Lavage avec la solution de lavage W1
- Lavage avec la solution de lavage W2
- Dilution et incubation avec l'anticorps
- Lavage avec la solution de lavage W3
- Révélation au TMB
- Lavage à l'eau distillée
- Lecture

Tableaux pour l'identification des échantillons à analyser sur microplaque.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>A</b>						
<b>B</b>						
<b>C</b>						
<b>D</b>						

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>A</b>						
<b>B</b>						
<b>C</b>						
<b>D</b>						

## ***E- Interprétation et validation des résultats***

### **1. Interprétation des résultats de l'électrophorèse en gel d'agarose**

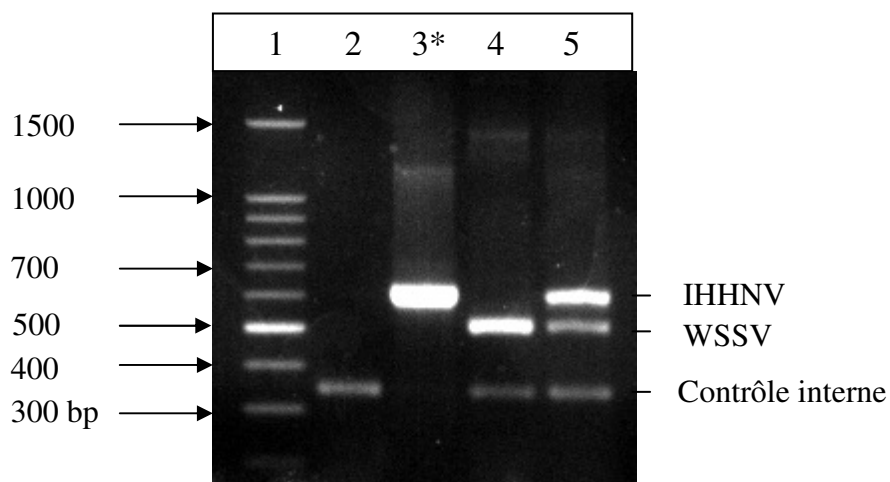
Puits 1 : Echelle de poids moléculaire (Promega, 100 pb).

Puits 2 : Echantillon négatif, seule est observable une bande d'environ 350 pb correspondant au contrôle interne.

Puits 3 : Echantillon positif : présence du virus IHHNV : amplification d'une bande spécifique d'environ 600 pb.

Puits 4 : Echantillon positif : présence du virus WSSV : amplification d'une bande spécifique d'environ 500 pb. Amplification d'une bande de 350 pb correspondant au contrôle interne.

Puits 5 : Echantillon positif : présence des virus IHHNV et WSSV: amplification de 2 bandes spécifiques de 600 pb et de 500 pb. Amplification d'une bande de 350 pb correspondant au contrôle interne.



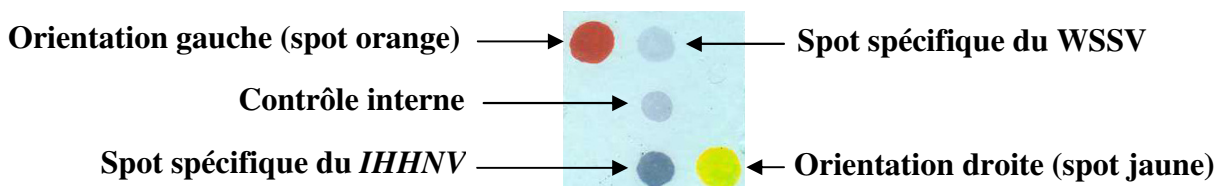
**\* Remarques :** dans le puits 3, on peut remarquer l'absence de l'amplicon du contrôle interne. Ce phénomène peut se produire dans le cas où les échantillons sont fortement infectés. En effet, la PCR multiplex est une PCR compétitive dans laquelle l'avantage de l'amplification aux séquences cibles des virus a été donné. L'absence du spot sur la membrane ou dans le gel d'agarose n'implique pas pour autant une non-validation de la PCR.

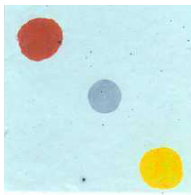
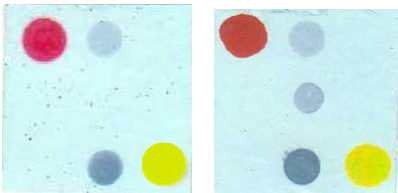
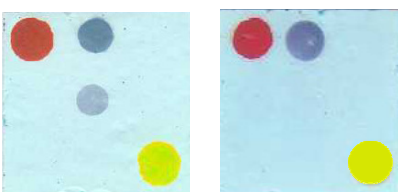
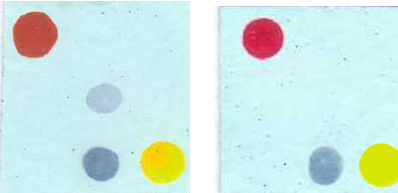

## 2. Interprétation des résultats de l'hybridation sur membrane

Les spots orange et jaune donnent l'orientation de la membrane pour l'interprétation des résultats. Le spot central correspond au contrôle interne de PCR (contrôle positif).

### Validation du test

Le test est considéré comme valide si le spot correspondant au contrôle interne de PCR se révèle sur la membrane.



<p><b><u>Non infecté</u></b> <b><u>&amp; témoin négatif</u></b> <b><u>(correspondant à l'eau)</u></b></p>		<p>La PCR est validée : contrôle interne positif.</p> <p>L'échantillon est <b>non infecté</b>.</p> <p>Pas de contamination.</p>
<p><b><u>WSSV &amp; IHNV</u></b> <b><u>positifs</u></b></p>		<p>L'échantillon est <b>doublement positif</b>.</p>
<p><b><u>WSSV positif</u></b></p>		<p>L'échantillon est positif uniquement pour le virus WSSV.</p>
<p><b><u>IHNV positif</u></b></p>		<p>L'échantillon est positif uniquement pour le virus IHNV.</p>
<p><b><u>Non déterminé</u></b></p>		<p>L'échantillon est <b>inhibé</b> si aucun spot n'apparaît sur la membrane. Il est conseillé de refaire le test en utilisant l'échantillon dilué au dixième dans de l'eau stérile.</p>

## Annexes

Possibilité d'achat de produits prêts à l'emploi de qualité « biologie moléculaire ».

### *Tampons d'électrophorèse*

TBE 0,5 X : 0,045 M Tris-borate, 0,001 M EDTA (conservation à température ambiante pendant 6 mois)

<b>TBE 5X</b>	
<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Tris base	54 g
EDTA 0,5 M pH 8	20 ml
Acide borique	27,5 g
Eau Ultra Pure	qsp 1 l

Dilution dans de l'eau Ultra Pure au 1/10<sup>ème</sup>.

TAE 1 X : 0,04 M Tris-acétate, 0,001 M EDTA (conservation à température ambiante pendant 6 mois)

<b>TAE 50X pH 8,3</b>	
<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Tris base	242 g
EDTA 0,5 M pH 8	100 ml
Acide acétique glacial 100%	57,1 ml
Eau Ultra Pure	qsp 1 l

Dilution dans de l'eau Ultra Pure au 1/50<sup>ème</sup>.

### *Tampon de charge coloré de dépôt*

BSU 3X (Bleu, Saccharose, Urée) conservation 1 an à température ambiante.

<b><u>BSU 3X</u></b>	
<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Urée	42 g
Saccharose	50 g
EDTA 5 mM pH 8	1 ml
BBP	0,01 g
Eau Ultra Pure	qsp 100 ml

## ***Acétate de sodium (3 M)***

<b>Acétate de sodium 3 M pH 5,2</b>	
<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
NaOAc, 3H <sub>2</sub> O	40,8 g
Eau Ultra Pure	80 ml

- Dissoudre dans 80 ml d'eau ultra pure.
- Ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique glacial.
- Compléter à 100 ml avec l'eau ultra pure.
- Homogénéiser.
- Stériliser la solution sur filtre de 0,22 µm de diamètre.
- Aliquoter et conserver à -20°C.

## ***Abréviations***

TBE: Tris Borate EDTA

TAE: Tris Acétate EDTA

BSU: Bleu Saccharose Urée

BBP: Bleu de bromophénol

EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique

BET: Bromure d'éthidium

WSSV: White spot syndrome virus

IHHNV: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus













PCI: Phénol chloroforme alcool isoamylique

PCR: Polymerase chain reaction

ADN: Acide désoxyribonucléique

TMB: Tétraméthylbenzidine

**Tableau des phrases de risques**

Produits	Formule chimique	Toxicité	Protection	Phrase de risque et de sécurité	Lien internet
Phénol (hydroxybenzene, benzenol)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	Toxique 	Cutanée, respiratoire, oculaire   LUNETTES	R24/25-34 S26-28-36/37/39-45 <a href="http://trainin.e.itsilo.it/actrav_cdrrom2/fr/05b/ie/nfrn0070.html">http://trainin.e.itsilo.it/actrav_cdrrom2/fr/05b/ie/nfrn0070.html</a>	
Chloroforme (chloroform, trichloromethane)	CHCl <sub>3</sub>	Irmitant 	Cutanée, respiratoire, oculaire  GANITS	R22-38-40-48/20/22 S36/37 <a href="http://trainin.e.itsilo.it/actrav_cdrrom2/fr/05b/ie/nfrn0027.html">http://trainin.e.itsilo.it/actrav_cdrrom2/fr/05b/ie/nfrn0027.html</a>	
Ethanol (alcool éthylique, Ethyl alcool)	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	Inflammable 	Cutanée, respiratoire, oculaire  TABLIER	R11-20/21/22-36/37/38 S7-16-24/25/26 <a href="http://trainin.e.itsilo.it/actrav_cdrrom2/fr/05b/ie/nfrn0044.html">http://trainin.e.itsilo.it/actrav_cdrrom2/fr/05b/ie/nfrn0044.html</a>	
Bromure d'éthidium (BET, Ethidium bromide)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> Br	Irmitant 	Cutanée, respiratoire, oculaire 	R23-68 S36/37-45 <a href="http://www.chim.ucl.ac.be/CHIM/secureite/ethidium.pdf">http://www.chim.ucl.ac.be/CHIM/secureite/ethidium.pdf</a>	
Alcool isoamylique	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O/CH <sub>3</sub> CH(C H <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	Irmitant 	Cutanée, respiratoire, oculaire  	R 10-20 S (2-)24/25 <a href="http://trainin.e.itsilo.it/actrav_cdrrom2/fr/05b/ie/nfrn0798.html">http://trainin.e.itsilo.it/actrav_cdrrom2/fr/05b/ie/nfrn0798.html</a>	



Travailler sous hotte



Garder les produits chimiques dans des endroits appropriés et fermés à clé



Ne pas allumer de flamme ou d'étincelle près des solvants



Ne pas rejeter les produits dans l'évier



Porter des équipements de protection individuelle (blouse, gants, lunettes)



# Mini-Array

*Version Enseignement*

Pour une meilleure utilisation de notre kit, il est conseillé de récupérer l'ensemble de la documentation disponible. Pour ce faire, accédez à la page web:

<http://www.skuldtech.com/DAVE.html>.

Puis, cliquez sur le lien « student training kit »,

Le nom d'utilisateur et le mot de passe sont les suivants :

*Nom d'utilisateur : DAVE*

*Mot de passe : whitespot*

**Skuldtech**

Téléphone : +33 (0)467 419 748 / Fax : +33 (0)467 457 726

Adresse : 134, rue du Curat – Bât. Amarante 34090 Montpellier France

Email : [info@skuldtech.com](mailto:info@skuldtech.com) - Web : <http://www.skuldtech.com/DAVE.html>