HAL
open science

Production et purification rapide d'une Taq polymérase pour les applications routinières de biologie moléculaire

Jerome Olivares, Bernard Caromel

▶ **To cite this version:**

Jerome Olivares, Bernard Caromel. Production et purification rapide d'une Taq polymérase pour les applications routinières de biologie moléculaire. Cahier des Techniques de l'INRA, 2016, 87, 9 p. ⟨hal-01605626⟩

HAL Id: hal-01605626

https://hal.science/hal-01605626v1

Submitted on 28 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons CC BY-SA 4.0 - Attribution - ShareAlike - International License

Production et purification rapide d'une *Taq* polymérase pour les applications routinières de biologie moléculaire

Jérôme OLIVARES[1] et Bernard CAROMEL[2]

Résumé. Cet article présente un protocole simple, rapide et économique de production et de purification d'une enzyme thermostable de type ADN polymérase (*Taq* polymérase) à destination des manipulations routinières de biologie moléculaire comme la PCR et ses diverses applications.

Mots clés : purification enzymatique, *Taq* polymérase, PCR, génotypage.

Introduction

Les ADN polymérases sont les enzymes les plus utilisées dans le domaine de la biologie moléculaire, en particulier pour les expériences basées sur la PCR (polymerase chain reaction). La première enzyme thermostable de ce type à avoir été caractérisée, et probablement la plus répandue, est issue de la bactérie *Thermus aquaticus* et de ce fait appelée *Taq* polymérase (Chien et al., 1976). Jusqu'à récemment sa production était couverte par un brevet commercial justifiant des coûts de revente relativement élevés par les distributeurs avec pour conséquences pour l'utilisateur final de voir doubler son coût expérimental dans le meilleur des cas. L'extinction du brevet commercial de la *Taq* polymérase a eu pour conséquence de voir les prix de cette enzyme chuter, mais surtout d'offrir la possibilité de se procurer légalement des clones bactériens d'*Escherichia coli* transformés avec un plasmide contenant le gène de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* et par conséquent de pouvoir initier une production particulièrement économique. De nombreux articles ont présenté des méthodes de purification généralement basées sur un principe de précipitation saline et de dialyse (Engelke et al., 1990; Pluthero, 1993), cependant les précipitations chimiques et la longueur des dialyses ont un impact néfaste sur l'activité de la protéine obtenue.

Cet article a pour but de décrire un protocole simple et rapide de culture d'un clone bactérien transformé avec le gène codant la *Taq* polymérase et de purification de l'enzyme produite. La mise en œuvre ne nécessite pas d'équipements (**Annexe 1**) ou de compétences particulières en dehors de ceux que l'on trouve classiquement dans un laboratoire de bactériologie ou de biologie moléculaire. Le protocole décrit permet d'obtenir entre 400 000 et 500 000 unités de *Taq* polymérase.

Obtention d'un clone d'*Escherichia coli* transformé

Longtemps les clones bactériens transformés ont circulé « sous le manteau » de laboratoires en laboratoires, tant et si bien qu'il est fréquent aujourd'hui d'avoir, dans son réseau professionnel, un laboratoire possédant une telle souche, permettant ainsi de passer directement à l'étape de la mise en culture.

Si tel n'est pas le cas, il reste la possibilité d'acheter pour quelques dizaines d'euros un clone bactérien transformé (addgene, United Kingdom, Ref.: pAKTaq, plasmid #25712) et de le remettre en culture (**Annexe 2**). Il est à noter que ce type de Taq ne comporte pas d'activité exonucléasique et que son utilisation est à proscrire dans des applications nécessitant une qualité enzymatique supérieure comme le génotypage par séquençage (GBS) ou la PCR multiplex. Il existe cependant un clone bactérien transformé permettant d'obtenir une Pfu DNA

[1] INRA, Plantes et Systèmes de culture horticoles, 84914 Avignon, France ; jerome.olivares@avignon.inra.fr
[2] INRA, Génétique et Amélioration des fruits et légumes, 84143 Montfavet, France

polymérase (addgene, United Kingdom, Ref.: pET16B.Pfu, plasmid #12509) qui possède cette activité exonucléasique 3'-5' lui conférant la capacité de corriger ses propres erreurs d'incorporation (activité proofreading) (Goldman et al., 1998).

Mise en culture

Isolement et préparation des solutions : jour 1

Préparer les milieux et solutions (**Annexe 3**), autoclaver le milieu Terrific Broth (TB) et son Tampon pH séparément. En parallèle, réaliser un isolement du clone bactérien transformé (stock glycérolé) sur milieux gélosé Lennox Broth/Ampicilline à 50µg/mL (LB/ampicilline-50) et incuber une nuit à 37°C.

Pré-culture : jour 2

Mélanger les 300 mL de solution Tampon pH avec les 2,7 L de milieu TB, distribuer 4 mL de milieu dans sept tubes de culture de 14 mL et conserver le reste à 4°C. Ajouter 12 µL d'ampicilline à 25mg/mL dans chaque tube de culture. Piquer, à l'aide d'un cure-dent stérile, une colonie blanche isolée sur la boîte gélosée inoculée la veille (LB/Ampicilline-50), puis plonger le cure-dent dans le tube de culture (un cure-dent/tube). Mettre en culture à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant une nuit.

Culture : jour 3

Le matin sous une hotte stérile, prélever et conserver à 4°C, 1 mL de milieu TB pour réaliser un témoin blanc de densité optique (D.O.) pour les dosages au spectrophotomètre. Mettre environ 1 L milieux TB dans trois Erlenmeyer de 3 L. Vérifier que les tubes de pré-culture soient troubles, et ajouter le contenu de deux tubes de pré-culture dans chaque Erlenmeyer avec 3 mL d'Ampicilline à 25 mg/mL par Erlenmeyer (concentration finale = 75 µg/L). Le dernier tube de pré-culture sert à réaliser un nouveau stock glycérolé à 50% du clone de Taq polymérase : prélever 500µL de pré-culture bactérienne, ajouter 500 µL de glycérol pur stérile, homogénéiser et le stocker à - 80°C dans un cryotube jusqu'à la prochaine production.

Mettre en culture à 37°C les Erlenmeyers sous agitation à 200 RPM, prélever 1 mL de culture toutes les heures pour contrôler l'évolution de la D.O. à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Lorsque celle-ci est aux environs de 0,8 on considère que les bactéries sont bien avancées dans la phase exponentielle de croissance. Ajouter alors 10 mL d'IPTG à 100 mM dans chaque Erlenmeyer de culture (concentration finale = 1 mM) pour lancer l'induction de la production de la *Taq* polymérase et poursuivre la culture toute la nuit.

La D.O. en point final le lendemain matin avoisine 5.

Extraction et purification

Extraction : jour 4

Transférer 600 mL de culture dans chacun des quatre flacons à centrifuger de type NALGENE et centrifuger 20 min à 4°C et 4000 g afin de culoter les bactéries. Récupérer les surnageants qui seront détruits par autoclavage. Répéter la centrifugation autant de fois que nécessaire pour traiter tout le volume de culture. Laver le culot de chaque flacon en le reprenant avec 110 mL de Tampon A par une agitation manuelle douce. Centrifuger 20 min à 4°C et 4000 g. Jeter le surnageant dans le flacon à autoclaver.

Pendant la dernière centrifugation (ne pas préparer à l'avance), ajouter 640 mg de Lysozyme à 160 mL de Tampon A (concentration finale = 4 mg/mL). Distribuer 40 mL de Tampon A/Lysozyme dans chaque flacon, et reprendre les culots en faisant des allers-retours avec la pipette et finir en homogénéisant bien à la main. Incuber 30 min à température ambiante en agitant de temps en temps. Transvaser dans huit tubes de type FALCON de 50 mL (20 mL/tube).

Ajouter 1 mL de PMSF à 100 mM à 160 mL de tampon B, distribuer 20 mL de Tampon B/PMSF dans chaque tube puis incuber au bain marie 1 h à 75°C en agitant de temps en temps. Un floculat cotonneux épais avec un surnageant limpide doit se former signe d'une bonne lyse bactérienne. Centrifuger 20 min à la vitesse maximale et récupérer le surnageant dans des tubes Falcon propres. Re-centrifuger 1 ou 2 fois à vitesse maximale pour tasser le floculat et récupérer un maximum de surnageant.

Filtrer les surnageants sous vide sur filtres 0,65 µm et récupérer le filtrat dans un tube Falcon propre puis répéter l'opération sur filtre 0,22 µm. Conserver les filtrats à 4°C.

Optionnel : on peut doser le filtrat à ce stade pour vérifier que la *Taq* polymérase est bien présente en quantité, selon le protocole décrit en **Annexe 4.**

Purification : jour 5

Centrifuger les filtrats pendant environ 40 min à 3000 g à l'aide des filtres Jumbosep 300 kD. La masse moléculaire de la *Taq* polymérase étant aux alentours de 100 kD, celle-ci se trouve essentiellement dans le filtrat ; néanmoins notre expérience montre qu'il peut rester une activité enzymatique non négligeable dans la fraction >300 kD probablement liée à un colmatage des filtres. Conserver les premiers filtrats à 4°C, regrouper les fractions supérieures (>300 kD) et les reprendre avec les 100 mL de Tampon A et 100 mL de Tampon B/PMSF restant puis recommencer la filtration avec des filtres 300 kD neufs. Cette deuxième filtration bien que facultative permet de récupérer jusqu'à 50% d'enzyme en plus.

Regrouper les différents filtrats et les centrifuger sur tube filtrant Amicon 50 kD à 3800 g pour concentrer l'enzyme. Regrouper les concentrats situés au-dessus du filtre et doser selon le protocole décrit en **Annexe 4.**

Dosage : jour 6

Réaliser des dilutions en cascade de la Taq polymérase extraite et d'une Taq polymérase commerciale (Gotaq G2 Flexi DNA polymerase Promega, par exemple) pour amplifier un fragment d'une taille représentative des applications routinières auxquelles est destinée cette *Taq* polymérase (**Annexe 4**). Après amplification, déposer 5 µL de chaque produit de PCR sur gel d'agarose. L'intensité des bandes, visualisée après coloration au bromure d'éthidium, permet d'estimer l'activité de la *Taq* polymérase extraite par rapport à celle de la *Taq* polymérase commerciale (**Figure 1**). La dilution de l'extrait se fait avec un volume adéquat de tampon de stockage 2X (concentration finale = 1X) et de glycérol (concentration finale = 40%). Pour finir, ajouter un volume nécessaire de PMSF (concentration finale = 0,5 mM) et de DTT (concentration finale = 1 mM) afin de protéger l'enzyme lors de son stockage.

Nous avons dilué nos 6 mL d'extrait avec 42 mL de glycérol, 48 mL de tampon de stockage 2X, 480 µL de PMSF à 100 mM et 960 µL de DTT à 100 mM pour un volume final de 96 mL.

Aliquoter en fraction de 100 ou 200 µL dans des tubes de 1,5 mL et conserver ainsi idéalement à - 80°C.

Résultats et discussion

Avec cette méthode nous avons obtenu 6 mL d'extrait purifié que nous avons dosé par comparaison avec une *Taq* commerciale en amplifiant par PCR un fragment d'ADN d'environ 1300 pb (**Figure 1**).

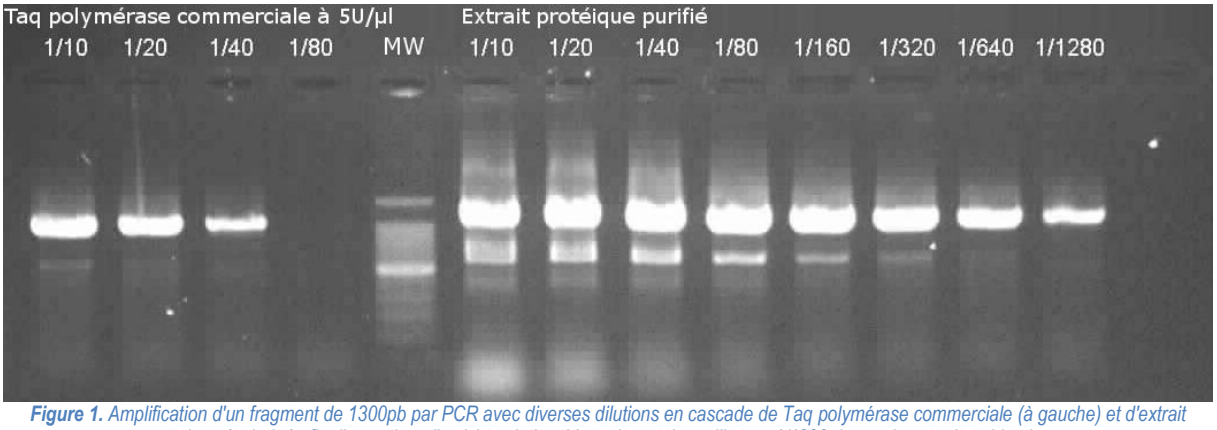

Figure 1. *Amplification d'un fragment de 1300pb par PCR avec diverses dilutions en cascade de Taq polymérase commerciale (à gauche) et d'extrait protéique (à droite) afin d'en estimer l'activité relative. L'extrait protéique dilué au 1/1280 donne des résultats identiques à la Taq commerciale (GoTaq G2 Flexi de Promega) diluée au 1/40, il est donc 32 fois plus concentré.*
MW = Marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder de Promega.(Ref. :G2101)

Notre extrait protéique s'est avéré être aussi actif dilué 1280 fois qu'une *Taq* commerciale (GoTaq G2 Flexi DNA polymérase de Promega) diluée 40 fois. On peut donc le diluer 32 fois pour obtenir une activité équivalente. Dans la pratique, ne connaissant pas la capacité de conservation d'une telle quantité, nous avons choisi de ne diluer que 16 fois nos 5 mL d'extrait et de valider cette dilution par un deuxième dosage. Au final nous avons obtenu 96 mL de *Taq* polymérase purifiée avec une activité légèrement supérieure à 5U/µL que nous conservons à - 80°C depuis 2 ans sans avoir observé à ce jour de perte d'activité. Des tubes contenant une *Taq* polymérase produite avec le même protocole en 2007, et conservés 3 ans à - 80°C puis 3 ans à - 20°C (6 ans au total), ont montré une activité similaire.

Les avantages essentiels de ce protocole par rapport aux autres méthodes plus classiques sont que d'une part, l'enzyme n'est pas altérée par des précipitations chimiques et des modifications de pH pendant la phase d'extraction et d'autre part, la phase de purification ne prend qu'une matinée au lieu des 12 h de dialyses, ceci permettant de préserver au maximum la protéine et son activité. La seule question en suspend reste la présence de fragment d'ADN bactérien dans l'extrait final. Notre fraction comprise entre 50 kD et 300 kD pourrait contenir des fragments d'ADN de taille comprise entre 1,35 kb et 8 kb qui pourraient alors poser des problèmes pour les applications ciblant les bactéries ou des gènes mitochondriaux très conservés comme le 16S ribosomal. Néanmoins il est à noter que l'utilisation de filtres 50 kD permet l'élimination de tous les petits débris d'ADN bactérien de quelques dizaines de paires de bases qui pourraient se comporter comme des amorces et générer des amplifications parasites. Ce problème de risque de contamination par de l'ADN bactérien est commun à toutes les méthodes et même au sein des produits commerciaux (Meier et al., 1993, Corless et al., 2000). Une solution pour y remédier serait d'effectuer un traitement avec une DNAse après la lyse bactérienne suivi d'une inactivation 30 min à 75°C. A ce jour, nos expérimentations ciblant des gènes mitochondriaux comme la COI ou le 16S ne laissent pas supposer de contamination ADN évidente ; considérant nos besoins et objectifs nous avons choisi de ne pas effectuer ce traitement.

Nous utilisons en routine deux types de tampons lors des réactions PCR réalisés avec cette *Taq* polymérase : soit des tampons commerciaux, comme lors du dosage de l'activité (**Annexe 4**), soit un tampon réactionnel préparé avec quelques réactifs courant comme décrit en **Annexe 3**.

Conclusion

Nous avons établi un protocole simple, accessible au plus grand nombre avec des résultats particulièrement intéressants d'un point de vue économique. L'essentiel du coût de production incombe à l'achat des divers filtres. L'investissement initial avoisine les 600 € pour deux productions de 96 mL de *Taq* polymérase à 5 U par µL (par comparaison avec la GoTaq Flexi de Promega), soit 960000 U de *Taq* polymérase, ce qui revient à 62 centimes d'euros pour 1000 U. Ce prix de revient est plus de 1000 fois inférieur aux *Taq* polymérases les moins chères du marché. Le protocole de production, de purification et de dosage s'étale sur cinq jours, mais ne nécessite que trois jours pleins de travail, de l'extraction à l'aliquotage en tubes. Cette *Taq* polymérase remplit parfaitement ses fonctions pour nos manipulations courantes et conserve son activité après plusieurs années de stockage à - 20°C ou à - 80°C.

Références bibliographiques

Chien A, Edgar DB Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile. Thermus aquaticus. J.Bacteriol **127**(3), 1550 - 1557.

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarski EB, Fox AJ (2000) Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. J Clin Microbiol **38** (5) : 1747-1752.

Engelke DR, Krikos A, Bruck M E, Ginsburg D (1990). Purification of Thermus aquaticus DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. Analytical Biochem, 191(2), 396 - 400.

Franck P, Siegwart M, Olivares J, Toubon JF, Lavigne C (2012). Multiple origins of the sodium channel kdr mutations in codling moth populations. PloS one, 7(8), e43543.

Goldman S, Kim R, Hung LW, Jancarik J, Kim, SH (1998). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Pyrococcus furiosus DNA polymerase. Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography, 54(5), 986 - 988.

Meier A, Persing DH, Finken M, Böttger EC (1993) Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. J Clin Microbiol, **31**(3), 646-652.

Pluthero FG (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. Nucleic Acids Res, **21**(20), 4850.

Annexes pages suivantes

Annexes

Annexes 1 : liste des équipements et réactifs

Etuve à 37°C avec agitation.
Centrifugeuse à godets modèle Rotenta 460 ou équivalent.
Spectrophotomètre de paillasse modèle Eppendorf BioPhotometer® D30 ou équivalent.
Système de filtration sous vide ou équivalent.
Bain-marie à 75°C.
Autoclave.
Sept tubes de culture de 15 mL.
Milieux solide en boîte pour isolement Lennox Broth (Euromedex, Ref. : EU0031).
Ampiciline (Sigma-Aldrich, Ref.: A9518), 10 mL à 25 mg/mL.
Trois Erlenmeyers de 3 litres.
Quatre flacons à vis NALGENE de 750 mL (ou équivalent compatible avec les godets de la centrifugeuse).
Filtres membranes Durapore, 0,65 µm pour filtration sous vide. (Merck Millipore, Ref.:DVPP04700).
Filtres membranes Durapore, 0,22 µm pour filtration sous vide. (Merck Millipore, Ref.:GVWP04700).
Kit starter Unités Filtrantes Jumbosep™ + filtres 300kD (Pall Laboratory, Ref.: FD300K65).
Filtre Amicon® Ultra 15 mL (Merck Millipore, Ref.: UFC905008).
Lyzozyme (chicken egg white) (Sigma-Aldrich, Ref.:62970), 640 mg
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), (Promega, Ref. : 24188407), 30 mL à 100 mM.
Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), 3,5 mL à 100 mM dans l'éthanol absolu (Euromedex, Ref. : 1111-D).
Dithiothreitol (DTT), 1 mL à 0,5mM (Euromedex, Ref. : EU0006-D).
Gotaq G2 Flexi DNA polymerase et tampons (Promega, Ref. : M7805).
dNTPs (Promega, Ref. : U1240).
Bovine Serum Albumine (Sigma-Aldrich, Ref.:A4503).

Notes : les réactifs nécessaires à la préparation des milieux et tampons sont décrits et détaillés en **Annexe 3.**

Annexes 2 : remise en culture d'un clone bactérien fourni par la société Addgene

Note : ce protocole est une retranscription des préconisations du fournisseur. Possédant déjà un clone transformé nous ne l'avons jamais exécuté.

- Inoculer 1 mL de LB liquide/ampiciline-100 (100 µg/mL) avec la colonie bactérienne reçue du fournisseur ("stab").
- Etaler 100 µL de ce mélange à l'aide d'un râteau sur un milieu gélosé LB agar/ampiciline-100 et mettre en culture une nuit à 37°C.
- Piquer une colonie isolée et la remettre en culture dans un mL de LB liquide/ampiciline-50 une nuit à 37°C.
- Faire des stocks glycérolés à 50% en ajoutant 1 volume de glycérol stérile au même volume de culture.
- Conserver à - 80°C avant mise en production.

Optionnel : Vérifier par PCR la présence du plasmide à partir de la culture bactérienne. Pour cela, diluer 10 µL de culture bactérienne dans 100 µL d'eau milliQ. Incuber à 100°C pendant 5 min. Effectuer une PCR de vérification sur 1µL de cette dilution avec les amorces M13_F / CACGACGTTGTAAAACGAC et M13_R / GGATAACAATTTCACACAGG. Le programme à utiliser est le suivant : 1 cycle à 94°C pendant 5 min, suivi de 35 cycles à 94°C pendant 30 s, 53°C pendant 30 s, 72°C pendant 2 min 30. Terminer par un cycle à 72°C

pendant 10 min. La taille attendue du fragment PCR est de 2596 bp. On peut effectuer un contrôle supplémentaire en séquençant ce fragment et en comparant la séquence obtenue avec la séquence de référence du clone pAKTaq (http://www.addgene.org/browse/sequence/99882/).

Annexes 3 : composition des milieux et tampons

Les quantités décrites sont données pour 3 litres de culture bactérienne.
Le milieu de culture TB et son Tampon pH doivent être autoclavés séparément et mélangés ensuite. Autoclaver 100 mL de glycérol stérile qui serviront à réaliser les stocks glycérolés et à diluer la Taq en fin de production.

Mileux TB (Terrific Broth)	**Q**	**[finale]**	**Fournisseur / Ref.**
Bacto Triptone	36 g	12g / l	BD / 211705
Yeast Extract	72 g	24 g / l	BD / 288620
Glycérol	12 mL	0,4%	Sigma-Aldrich / G5516
H_2O	2688 mL		
Total	2700 mL		

Tampon pH pour milieu TB	Q	[finale]	Fournisseur / Ref.
KH2PO4	6,93 g	17 mM	Sigma-Aldrich / P5379
K2HPO4	37,62 g	72 mM	Sigma-Aldrich / P3786
H2O qsp / Total	300 mL		

Tampon A	Q	[finale]	Fournisseur / Ref.
TRIS HCl [1M] pH 8	13 mL	50 mM	Euromedex / 26-128-3094-B
D(+) Glucose	2,40 g	50 mM	Merck Millipore / 108342
EDTA [0,5 M]	520 µL	1 mM	Euromedex / EU0007
H_2O	246,5 mL		
Total	260 mL		

Tampon B	Q	[finale]	Fournisseur / Ref.
TRIS HCl [1M] pH 8	2,6 mL	10 mM	Euromedex / 26-128-3094-B
KCl [1M]	13 mL	50 mM	Euromedex / P017
EDTA [0,5 M]	520 µL	1 mM	Euromedex / EU0007
TWEEN 20®	1,3 mL	0,5 %	Sigma-Aldrich / P9416
IGEPAL® CA-630	1,3 mL	0,5 %	Sigma-Aldrich / I3021
H_2O	241 mL		
Total	260 mL		

Tampon de stockage 2X	Q	[finale]	Fournisseur / Ref.
TRIS HCl [1M] pH 8	3 mL	40 mM	Euromedex / 26-128-3094-B
KCl [1M]	15 mL	200 mM	Euromedex / P017
EDTA [0,5 M]	30 µL	0,2 mM	Euromedex / EU0007
TWEEN 20®	375 µL	0,5%	Sigma-Aldrich / P9416
IGEPAL® CA-630	375 µL	0,5%	Sigma-Aldrich / I3021
H_2O	57 mL		
Total	75 mL		

Tampon réactionnel 10X (Incluant $MgCl_2$ et BSA)	Q	[finale]	Fournisseur / Ref.
TRIS HCl [1M] pH 9	2 mL	100 mM	Euromedex / 26-128-3094-B
KCl [1M]	4 mL	500 mM	Euromedex / P017
$MgCl_2$ [25 mM]	12 mL	15 mM	Promega / A3513
BSA [10 mg/mL]	2 mL	1 mg/mL	Sigma-Aldrich / A4503
Total	20 mL		

Pour des raisons de précisions liées notamment au taux d'humidité de la poudre lors de la pesée, il est conseillé d'utiliser du chlorure de magnésium en solution commerciale

Annexes 4 : dosage et ajustement de l'activité enzymatique

Le dosage réalisé est une estimation empirique par comparaison d'un résultat de PCR obtenu avec une Taq polymérase commerciale (Gotaq G2 Flexi DNA polymerase de Promega dans notre cas) et l'extrait purifié. Le choix de la nature et de la taille du fragment à amplifier est un choix personnel, nous avons choisi une portion de 1363 pb du gène du canal sodium d'un insecte, *Cydia pomonella* (L.) (*Lepidoptera: Tortricidae*), qui est représentatif des applications routinières auxquelles nous destinons cette *Taq* polymérase.

Préparer une dilution en cascade de *Taq* polymérase commerciale à 5U/µL :

2µL *Taq* +18 µL H_2O = 1/10e
→ 10 µL + 10µL H_2O = 1/20e
→ 10 µL + 10 µL H_2O = 1/40e
→ 10 µL + 10 µL H_2O = 1/80e

Préparer de la même manière une dilution en cascade de *Taq* polymérase purifiée :

2µL *Taq* +18 µL H_2O = 1/10e
→ 10 µL + 10µL H_2O = 1/20e
→ Etc...
→ 10 µL + 10 µL H_2O = 1/1280e

Dans le cas où l'on veut doser l'extrait brut après lyse bactérienne une gamme 1/2-1/4-1/8-1/16e est suffisante.

Préparer un mix pour les 12 dilutions :

Produit	**1 échantillon**	**12 échantillons**	**Concentration finale**
Tampon Promega 5X	2,40 µL	28,8 µL	1 X
$MgCl_2$ Promega [25 mM]	0,72 µL	8,64 µL	1,5 mM
dNTP Promega [4 mM]	0,60 µL	7,20 µL	200 µM
Amorce F [25µM]	0,20 µL	2,4 µL	0,4 µM
Amorce R [25µM]	0,20 µL	2,4 µL	0,4 µM

ADN référence [10 ng/µ]	1 µL	12 µL	
BSA [10mg/mL]	0,12	1,44	0,1 mg/mL
H_2O	4,76 µL	57,12 µL	
Total	10 µL	120 µL	

Distribuer 10 µL de mix sur 2µL de chaque dilution de *Taq* polymérase (utiliser des barrettes PCR) et placer dans un thermocycleur pour lancer la PCR sur 35 cycles selon les spécifications du fragment choisi pour le test.

Nous avons utilisé les amorces SKdr-F / GGCCGACACTTAATTTACTCATC et SKdr-R3 / GCAATCCCACATGCTCTCTA, (Franck et al., 2012), avec les conditions en thermocycleur suivantes : 95°C pendant 3 min puis 35 cycles de {95°C pendant 30 s, 56°C pendant 45 s, 72°C pendant 1min 30 s} et 72°C pendant 10 min.

Déposer 5 µL de produit PCR sur gel d'agarose à 1 ou 2%. Après révélation, estimer à l'œil quelle dilution de l'extrait donne un résultat équivalent à la plus faible dilution de la *Taq* commerciale et en déduire le facteur de dilution à appliquer (**Figure 1**).