

# PCR triplex HA Grippe A/B CNR-Vir

Développée sur la base du protocole OMS (<https://cdn.who.int/default-source/influenza>)

Version du 23/12/2024

## Amorces et sondes

– PCR HA

nom	séquence
GRswH1-60Fw	5' – AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT – 3'
GRswH1-240Rv	5' – GTTCCACAATGTAGGACCATG – 3'
GRswH1-180Probe(-) FAM *	FAM – 5' – CAGCCAGCAATGTTACATTTACC – 3' – BHQ-1
GRswH1-180dProbe(-) FAM *	FAM – 5' – CAGCCAGCAATGTTACATTGACC – 3' – BHQ-1
GRAH3-1070Fw	5' – ATGGTTGGGAGGGAATG – 3'
GRAH3-1217_Rv	5' – TGCTTGAGTGCTTTTGAG – 3'
GRAH3-1144dbProbe(-) Atto647N	Atto6467N – 5' – CTGCTGCTTGCTCTTCCCT – 3' – BHQ-3
GRBHA-188Fw	5' – AAACCAGAGGGAAACTATGCC – 3'
GRBHA-270Rv	5' – CCCAGAYGTAACAGGTCTGACTT – 3'
GRBHA Bvic HEX	HEX – 5' – CAGACCAAATGCACAGGGAAAATACC – 3' – BHQ-1

Taille de l'amplicon **GrAH1** : 186 paires de bases // Taille de l'amplicon **GrAH3** : 95 paires de bases //  
Taille de l'amplicon **GrBHAVic** : 96 paires de bases

\* Les sondes GRswH1 sont mélangées 50/50

## Composition du mix

Concentration des amorces 500nM pour chacune

Concentration des sondes 200nM pour chacune

N.B. : Il y a deux sondes H1p : chacune est à 100 nM final, pour une concentration finale totale de sonde de 200 nM.

Le mix réactionnel pour chaque point contient : 15 µl de mix et 5 µl d'échantillon

L'enzyme utilisée est la SuperScript III Platinum™ One-Step qRT-PCR (Thermo Fischer Scientific REF : 10104912) avec son tampon 2X.

Prémix RT-qPCR Triplex H1-H3-Bvic				
Réactifs		Conc Initiale	Conc Finale	Volume (µL)
Tampon 2X		-	1X	10
MgSO <sub>4</sub>		50 mM	0,6 mM	0,24
H2O		-	-	3,64
Amorce 1 Fw	GRswH1-60Fw	100 µM	0,5 µM	0,1
Amorce 1 Rv	GRswH1-240Rv	100 µM	0,5 µM	0,1
Amorce 2 Fw	GRAH3-1070Fw	100 µM	0,5 µM	0,1
Amorce 2 Rv	GRAH3-1217_Rv	100 µM	0,5 µM	0,1
Amorce 3 Fw	GRBHA-188Fw	100 µM	0,5 µM	0,1
Amorce 3 Rv	GRBHA-270Rv	100 µM	0,5 µM	0,1
Sonde 1	GRswH1-180Probe(-) FAM	100 µM	0,1 µM	0,02
Sonde 1	GRswH1-180dProbe(-) FAM	100 µM	0,1 µM	0,02
Sonde 2	GRAH3-1144dbProbe Atto647N	100 µM	0,2 µM	0,04

# PCR triplex HA Grippe A/B CNR-Vir

<b>Sonde 3</b>	<b>GRBHA-Vic HEX</b>	100 µM	0,2 µM	0,04
<b>Enzyme</b>	<b>Superscript III RT/Platinum Taq Mix (2UI/µL)</b>	2 UI/µL	0,8 UI/µL	0,4
<b>échantillon</b>	<b>ARN élué dans 100 µL</b>			5
<b>Total</b>				<b>20</b>

## Programme

	Température	Durée	Cycles
<b>RT</b>	50°C	15 min	1
<b>Dénaturation</b>	95°C	2 min	1
<b>Amplification</b>	95°C	15 sec	50x
	60°C	40 sec	
<b>Cooling</b>	40°C	30 sec	1

Toutes les amorces et sondes décrites ont été validées sur nos équipements :

- *LightCycler480 (Roche)*
- *QuantStudio5 (ThermoFisher)*

Ce protocole est à revalider sur vos équipements dans vos conditions de manipulation.

## Contrôle positif

Pool de surnageants de culture inactivés ou transcrits synthétiques dilués pour obtenir un Ct entre 25 et 30.