

Détection des coronavirus par RT-PCR en point final

OBJET

Détection qualitative des coronavirus humains par amplification d'un fragment du gène ORF1b codant pour la polymérase.

DOCUMENT DE REFERENCE

Stephensen C. et al. (1999) *Virus Research* 60 : 181-189. *Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay.*

CONTENU

- Réactifs utilisés
- Amorces utilisées
- Mode opératoire

REACTIFS UTILISÉS

- **OneStep RT-PCR Kit.** Qiagen. Réf : 210212
- **RNase Inhibitor.** Applied Biosystems. Réf : N8080119
- H₂O pour PCR

AMORCES UTILISÉES

Noms	Séquences (5'3')	Positions*	Sens
2Bp	ACT CAR WTR AAT YTN AAA TAY GC	104-126	+
4Bm	TCA CAY TTW GGA TAR TCC CA	335-354	-

* positions sur le génome de la souche Coronavirus OC43 (n° d'accèsion GenBank AF124989).

MODE OPERATOIRE

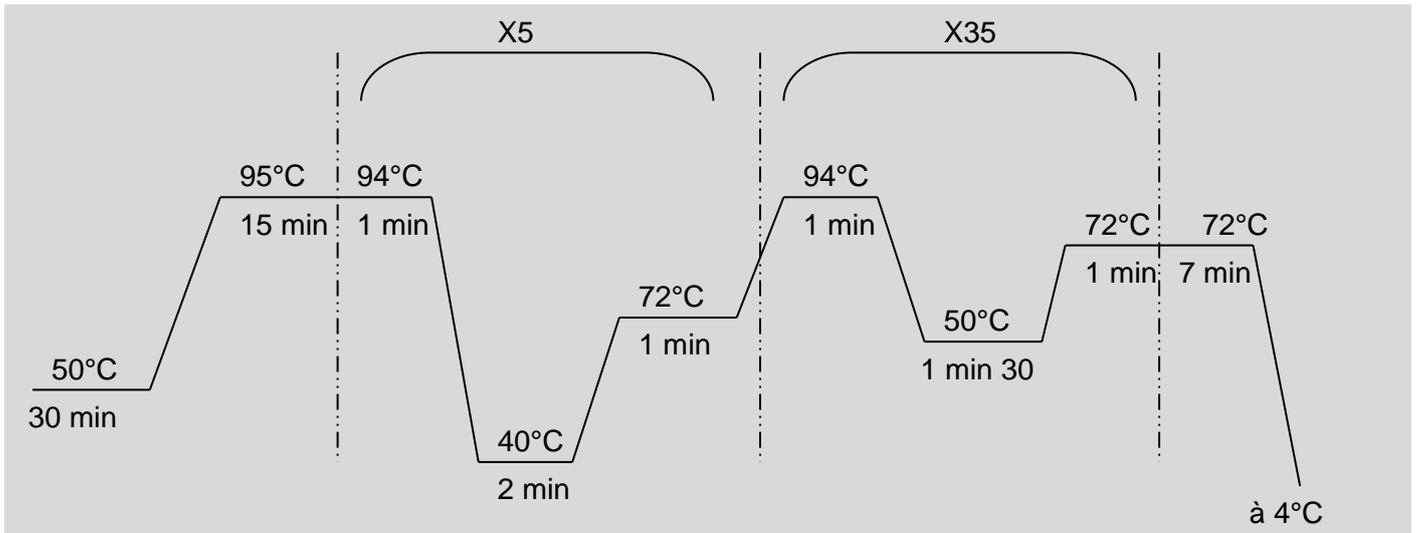
1. Extraction de l'ARN viral

L'extraction est réalisée sur automate NucliSENS® EasyMAG™ de bioMérieux.

2. Mélange réactionnel

RT-PCR	Concentration initiale	Volume en µL
H ₂ O		19
Tampon	5X	10
Solution Q	5X	10
dNTP	10 mM	2
RNase inhibitor	20 U/µL	1
Mélange enzymatique		2
2Bp	20 µM	1,5
4Bm	20 µM	1,5
ARN		3
Volume total		50

3. Cycle d'amplification



Taille attendue des amplicons : 251 paires de bases