



TP de L3 de l'Université d'Oran Es-Senia
du 24 au 27 novembre 2007
Faculté des Sciences Département de Biotechnologie

Amplification d'ADN bactérien
PCR-RFLP
Extraction d'ADN sur gel d'agarose
Correction de séquences/Blast
Construction d'arbre phylogénétique

Odile Domergue et Christine Le Roux

LSTM Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
TA A-821 J Campus de Baillarguet 34398 Montpellier cedex 5 France



INRA

IRD



Montpellier
SupAgro



UNIVERSITE MONTPELLIER

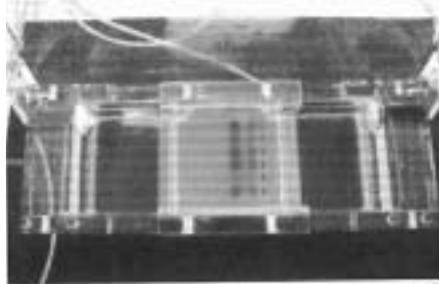
11

Schéma récapitulatif des TP



PCR

Dépôt amplifiats



Electrophorèse

Prélèvement des bandes et extraction des ADN amplifiés à partir de la gélose

ou purification directe des ADN amplifiés

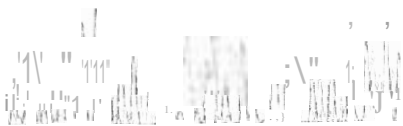
Digestion (3 enzymes)

Migration des RFLP

Analyse des profils

quantification ADN

séquençage



Correction des séquences/ Blast / Arbre phylogénétique

Amplification d'ADN bactérien par PCR

Nous ne verrons pendant ces TP ni l'isolement et la conservation des souches bactériennes, ni l'extraction d'ADN, car **nous** démarrerons par la PCR. Néanmoins, ces deux protocoles sont en annexe. Nous partirons ici soit d'une colonie sur boîte de Pétri, transférée dans un eppendorf contenant de l'eau stérile, soit d'un extrait d'ADN bactérien.



Prélever 1 colonie bactérienne

dans 100 μ l d' H₂O stérile



Principe

La méthode d'amplification d'ADN *in vitro* PCR (Polymerase chain reaction) consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces nucléotidiques, qui permettent la copie du brin qu'elles encadrent, à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante. Chaque couple d'amorces est composé d'un oligomère de 12 à 25 nucléotides, complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin d'ADN à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' du brin antiparallèle. La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et d'ADN polymérase (Taq) isolée de *Thermus a'luaticus*.

La répétition de trois étapes: dénaturation, hybridation et polymérisation, aboutit à une amplification exponentielle de la séquence ciblée.

Conditions d'amplification et amorces utilisées

Les réactions de PCR sont réalisées avec un thermocycleur, en utilisant des programmes différents en fonction du couple d'amorces choisi. Le programme classique (dénaturation, hybridation, polymérisation) est utilisé pour les couples d'amorces spécifiques. Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes 16S rDNA, sont présentées dans le tableau ci-dessous.



L'amplification se fait avec un thermocycleur ; on programme le nombre de cycles d'amplification, la durée et la température de chaque phase de la PCR.

FICHE PCR DU :

Objectifs : Caractérisation " 16S "

Amorces : FGPS6 (114) (5' GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG 3')

FGPS1S09 (33) (5' GGAGAGmAGATCnGGCTCAG 3')

Amplification: 1, 5 Kb

Gel 1% agarose TAE ou THE - Dépôts : 5 μ l

Echantillons	ADN/Souche	Résultats	Conclusion
1	Témoin -		
2	A		
3	B		
4	C		
5	D		
6	E		
7	F		
8	G		
9	H		
10	I		
11	J		
12	K		

Nbre d'échantillons :12	Mix	Nb de cycles: 36		
Volume final (n+1)x 48 μ l	624	T° 94°C	T° 94°C	
Eau (n+1)x 29,75 μ l	386,75	T= 5 min	30 s	T° 72°C
Tampon 5X (n+1)x 10 μ l	130			T° 56°C
DNTPs 2,5 mM (n+1)x4 μ l	52			1 min
Taq Promega (n+1)x 0,25 μ l	3,25			7 min
Primer 1 : 20 μ M (n+1)x2 μ l	26			30 s
Primer 2 : 20 μ M (n+1)x2 μ l	26			T° 4°C

*(n+1) = nombre d'échantillons à amplifier + 1 échantillon supplémentaire.

Ce calcul permet de palier les erreurs de pipetage.

	Stocks	dilutions
dNTPs :	100mM	2,5mM: 1/40 ^{ème} , soit 10 μ l de chacun des dNTPs + 360 μ l d'eau.
Primers :	100 μ M	20 μ M : 1/5 ^{ème} , soit 20 μ l de primer qsp 100 μ l d'eau

Pour réaliser une RFLP ultérieure, l'amplification des ADNs est réalisée dans un volume réactionnel de 50 μL , selon les recommandations du fournisseur (Promega) : ADN: 2 μL , tampon 5X (non coloré) : 10 μL , amorces à 20 μM : 2 μL , dNTPs à 2,5 mM : 4 μL , *Taq* polymérase: 1U, complété à 50 μL avec de l'eau.

N.B. : si on ne souhaite pas réaliser de RFLP ultérieurement, mais seulement procéder à du séquençage, l'amplification des ADNs est réalisée dans un volume réactionnel de 25 μL seulement.

Les solutions mères de chacune de ces amorces sont conservées congelées dans du tampon Tris EDTA (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) ("TE") à une concentration de 100 μM .

Le facteur d'amplification: en théorie, pour 30 cycles, il y a un facteur d'amplification de l'ordre de 2^{30} soit un facteur d'un milliard. En pratique, on peut espérer obtenir avec 30 à 40 cycles, un facteur d'amplification de l'ordre de 10^5 à 10^6 .

La température d'hybridation : la température d'hybridation correspond à la température à laquelle l'hybridation des amorces se fait pendant la PCR. Il faut connaître la valeur des températures de fusion des amorces pour déterminer la température optimale d'hybridation. En général, les amorces sont utilisées à une température d'hybridation inférieure de 5°C à leur T_m ou à la T_m la plus faible des deux amorces. Une autre approche plus empirique et qui donne souvent de bons résultats avec des amorces >20 mers (50% GC) est de choisir comme point de départ une température d'hybridation de 54°C ; si des amplifications non spécifiques sont observées, augmenter alors par paliers de 2°C la température d'hybridation.

Calcul du T_m d'un oligonucléotide inférieur à 30 nucléotides: on utilise la relation suivante : $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$, où A, T, G et C correspondent au nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide.

Astuce : la concentration micromolaire (μM) d'un primer est équivalente à des pmoles/ μl . Par exemple: 10 pmoles de primer dans une réaction PCR de 50 μl correspondent à une concentration de 10 pmoles/50 μl = 0,2 pM

Problème d'amplification : - une quantité trop importante d'ADN matrice peut conduire à une amplification aspécifique, voire à une inhibition enzymatique - l'amplification dépend de la qualité et la quantité des amorces utilisées et du ratio matrice-amorce

Le tampon de PCR permet de tamponner le milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la *Taq* DNA polymérase. L'ion Mg^{2+} est un cofacteur essentiel de la *Taq*

Polymérase ; il favorise la stabilité de l'hybridation mais à une trop forte concentration il peut alors conduire à une augmentation des signaux aspécifiques. La concentration optimale de $MgCl_2$ se situe entre 1 et 3 mM. La présence dans le milieu réactionnel de cations bivalents Mg^{2+} et de cations monovalents (K^+ ou NH_4^+) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN. En pratique, la concentration en sel doit cependant rester compatible avec l'activité de l'ADN polymérase.

Après amplification par PCR, les microtubes doivent être retirés du thermocycleur. Si l'analyse des produits de la PCR n'est pas réalisée dans l'immédiat, les amplifiats sont conservés à 4 °C en vue d'une utilisation le jour même ou à - 18 °C en vue d'une utilisation ultérieure.

Les produits d'amplification par PCR sont détectés par coloration au bromure d'éthidium, après électrophorèse en gel d'agarose.

Vérification des amplifiats de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Électrophorèse sur gel d'agarose

Préparer un gel d'agarose à 1% (*p/v*) soit 19 d'agarose pour 100 ml de volume final dans un tampon TBE 1 X (Tris-Borate-EDTA : 130 mM Tris, 45 mM Borate, 2,5 mM EDTA, Naz, pH 9) ou TAE 1 X (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8,3). Le TAE a un plus faible pouvoir tampon, mais il permet une meilleure séparation des fragments de haut poids moléculaire. Plus on souhaite un gel discriminant, plus on augmentera le pourcentage d'agarose : 1ge1 à 0,9/0 aura un bon pouvoir de séparation des bandes d'ADN linéaire double-brin de 500 pb à 7 kb alors qu'un gel à 2% aura un bon pouvoir de séparation des bandes de 100 pb à 2 kb.

Le gel d'agarose est dissout par agitation et chauffage contrôlé, soit sur une plaque chauffante, soit dans un four à micro-ondes (1 à 2 minutes à intensité élevée). Le gel est ainsi amené doucement à ébullition ; il est nécessaire de bien vérifier que le gel d'agarose est complètement dissout (liquide clair, absence de particules en suspension). En cas d'évaporation, ajouter de l'eau bidistillée pour ramener le gel au volume souhaité.

Note : Pour déterminer le volume de gel d'agarose à préparer, il est nécessaire de tenir compte de l'épaisseur moyenne d'un gel (5-10 mm), et des peignes qui peuvent être recouverts jusqu'aux deux-tiers de leur hauteur.

Refroidir le gel d'agarose fondu à une température de 50 à 60 °C et verser dans un support 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 pour qu'il se solidifie.

Lorsque le gel d'agarose est solidifié, retirer le peigne, placer le support contenant le gel dans l'appareil d'électrophorèse et remplir le réservoir de tampon (identique à celui ayant été utilisé pour la préparation du gel) afin de couvrir le gel (4 mm au-dessus du gel).

Dépôt des amplifiats PCR

Déposer un aliquot, soit 5 μ l de chaque amplifiat, lentement dans chacun des puits du gel submergé de tampon d'électrophorèse. Le tampon Promega (vert) utilisé pour l'amplification des échantillons, contient déjà du tampon de charge. L'utilisation de ce tampon coloré permet un dépôt direct des échantillons. Sinon, les amplifiats d'ADN obtenus avec du tampon d'amplification non coloré sont, avant dépôt dans les puits,

additionnés d'un tampon de charge 1 X (à partir d'une solution 6 X: **50%** glycérol, **0.25%** bleu bromophénol, **0.25%** Xylène cyanol). Le tampon de charge permet d'alourdir les échantillons et de marquer le front de migration.

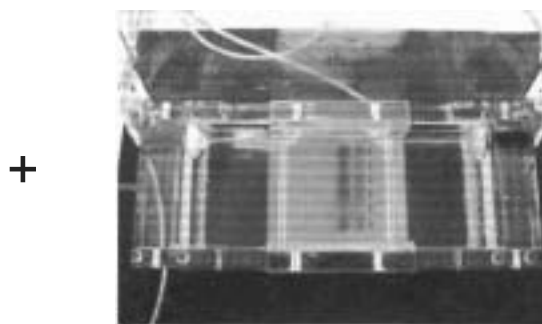
Introduire pour référence dans, au moins l'un des puits des extrémités, **5 μ l** d'un marqueur de poids moléculaire approprié: par exemple le Smart Ladder (Eurogentec) qui permet de vérifier à la fois la taille et la concentration du fragment amplifié.

Migration : il s'agit de l'électrophorèse proprement dite (des amplifiats sur gel d'agarose).

Raccorder le générateur à la cuve d'électrophorèse 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. Les molécules d'ADN sont chargées négativement du fait de la présence de phosphates dans leurs nucléotides. Les molécules se séparent alors en fonction de la facilité avec laquelle elles progressent à travers le gel d'agarose. La séparation est ainsi assurée par l'effet de filtration du gel. Plus une molécule est lourde moins elle migre.

Mettre le gel sous une tension de 5 à 8 V/cm jusqu'à ce que le colorant de repérage atteigne pratiquement l'extrémité du gel (de l'ordre de 100 volts pendant environ 45 minutes). Dans un gel à **1%** d'agarose, le colorant bleu migre à une vitesse identique à celle d'un fragment d'ADN de 3-5kb et le colorant jaune à celle d'un fragment < à 50bp .

Ajuster, en fait, le voltage et la durée de la migration selon le type d'appareil. En fin de migration, couper l'alimentation. Débrancher les fils de la cuve d'électrophorèse. Retirer le gel du support, avec précaution.



Sens de migration

Visualisation des amplifiats d'ADN sous UV, après coloration au Bromure d'éthidium

Mettre des gants jetables, Attention: Le BROMURE D'ÉTHIDIUM est dangereux par contact, inhalation et ingestion. De plus, c'est un mutagène puissant. Pour le manipuler, porter des gants doubles en latex ou des gants simples en nitrile. Ce produit qui a la propriété de s'intercaler entre les paires de base de l'hélice d'ADN, fluoresce lorsqu'il est exposé aux UV : l'ADN amplifié est **ainsi** visualisé.

Préparer deux cuves type photo à fond profilé. Sachant que généralement la concentration du bain de BET pour la coloration est de l'ordre de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, on peut adopter l'une ou l'autre de ces deux procédures:

a, Dans la première: mettre 2 gouttes de solution concentrée de BET (à 10 mg/ml) dans 4 l d'eau (ou de tampon IX de TBE ou TAE): dans la seconde mettre de l'eau distillée.

Retirer soigneusement le gel. Le tremper pendant 10 à 15 minutes dans le bain de bromure d'éthidium dilué. Passer rapidement dans la cuve de décoloration, puis photographier le gel. Si on considère que le volume d'une goutte est de 50 μl , la concentration finale dans le bain sera alors de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de BET.

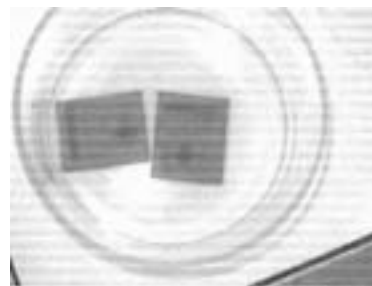
b. Variante: mettre 5 gouttes de solution concentrée de BET (à 10 mg/ml) dans 4 l d'eau (la concentration finale dans le bain sera de 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de BET): laisser colorer 2 min seulement, mais décolorer 20-25 min dans le bain de décoloration avant de photographier le gel, libéré du bruit de fond.

Avantage: permet en visualisant sous UV de savoir si la PCR a marché (= résultats d'amplification par PCR des ADNs), et ce très rapidement,

Observation sous UV :

Mettre des lunettes de protection contre les UV. Attention les UV peuvent endommager les yeux!

Visualiser les fragments d'ADN amplifiés sous lumière ultraviolette (d'un dispositif d'éclairage par transillumination) Vérifier par rapport au marqueur de poids moléculaire que la taille du produit de PCR en bp est bien celle attendue. Vérifier que le témoin eau est négatif.



Si vous ne détectez pas le produit d'une réaction PCR, la première variable à contrôler est la sensibilité de votre méthode de détection. Des quantités d'ADN inférieures à 10 ng sont difficilement détectables en coloration par le bromure d'éthidium. Pour une meilleure détection, il est possible de jouer sur la durée de l'exposition lors de la photographie du gel ou sur la coloration/décoloration du gel.

Photographier le gel pour faciliter l'analyse et l'archivage.

Elimination des déchets : Il est obligatoire de récupérer tous les déchets contenant potentiellement du bromure d'éthidium (gels, bains de teinture, de rinçage, gants, papier filtre, etc.) et de les stocker dans un conditionnement étanche avant de le faire retraiter et décontaminer par une société spécialisée.

Pour les produits liquides, laisser agir une nuit un sachet de décoloration selon les indications du fabricant avant de jeter la solution.

Les emballages devront comporter un étiquetage indiquant lisiblement le nom du produit, sa classe de toxicité et la mention « ATTENTION CANCÉROGÈNE ».

Les amplifiats d'ADN 165 dépourvus de bandes parasites sont utilisés directement pour les réactions de RFLP. Par contre, ceux porteurs de bandes parasites sont prélevés du gel et purifiés sur colonnes du kit Quiagen « Gel extraction ».

Les amplifiats d'ADNs destinés au séquençage font toujours l'objet d'une purification : soit à l'aide du kit Quiagen «PCR purification », soit à l'aide du kit Quiagen « Gel extraction ».

Prélèvement des bandes d'intérêt

Prélèvement des bandes d'intérêt

Porter lunettes + masque + gants. Mettre les UV à 75% de leur puissance afin de minimiser l'effet mutagène de ces derniers. Découper la bande désirée à l'aide d'un scalpel et transférer celle-ci dans un tube eppendorf. Tarer le tube eppendorf et peser les fragments d'agarose + ADN. Mettre le portoir avec les bandes prélevées à 4°C.

L'extraction de l'ADN de l'agarose s'effectuera le lendemain avec le kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), selon les instructions du fabricant.

PCR-RFLP : digestion enzymatique des ADNs amplifiés

Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLPI)

MspI HaeIII efaI

Digestions enzymatiques du :

Objectifs : **PCRIRFLP« 16S»**

Nom de l'enzyme de restriction : **MspI, HaeID, CfoI**

Fabriquant : **Promega.**

PCRdu :

Echantillons	ADN/Souche	Qté d'ADN (µl)	Observations		
			HaeID	MspI	CfoI
1	MVIII	2,5			
2	A				
3	B				
4	C				
5	D				
6	E				
7	F				
8	G				
9	H				
10	1				
11	J				
12	K				
13	MVIII	2,5			

Preparation du mélange réactionnel

Nbre d'échantillons	11	Mix	Migration
Produit PCR	8 à 12 µL	-	60V : 10 min 90V : 2h30'
Tampon JOX	(n+1) x 2 µl		
Enzyme IOU/ut	(n+1) x 0.5 ut		
Eau bidistillée stérile	Qsp 20 µl		
Marqueur VIII (Pb) Eurogentec: 1114/900 / 692 / 501/489 / 404 / 320 /242/190 /147 /124 /110/67/37 100 bp (Promega) : 1500 / 1000 / 900 / 800 / 700/600/500/400 / 300 / 200 / 100			

T
1
1
1

Trois aliquots de chaque amplifiat (ADNr 165) sont indépendamment hydrolysés par l'une des 3 endonucléases de restriction (*MspI*, *HaeIII*, *CfoI*), durant 1 heure à 1h30', à température préconisée par le fournisseur (Promega) : pour ces 3 enzymes, il s'agira de 37°C. Les enzymes de restriction : *MspI*, *HaeIII*, *CfoI*, reconnaissent des sites de restriction spécifiques de 4 à 5 bases.

Le mélange réactionnel se compose de : 8 à 12 μL d'amplifiat d'ADN ($\pm 1 \mu\text{g}$), 0,5 μL d'enzyme (10U/ μL), 2 μL de tampon IOX (spécifique de chaque enzyme), complété à 20 μL avec de l'eau milliQ stérile. Le volume d'amplifiat à digérer est déterminé en fonction de l'évaluation de sa concentration sur gel.

Migration des fragments de restriction Les fragments de restriction, additionnés de 2 μL de bleu de charge 5X, sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 2% , si possible à faible point de fusion (de type Metaphore agarose FMC bioproducts, USA) , sinon avec de l'agarose normal à 1,5% dans du tampon TBE IX.

2,5 μL de marqueur de poids moléculaire à 250 ng/ μL (Marqueur VIII, Eurogentec) sont insérés aux deux extrémités du gel.

La migration est réalisée dans du tampon TBE IX (130 mM Tris, 45 mM Borate, 2,5 mM EDTA, Na₂, pH 9)

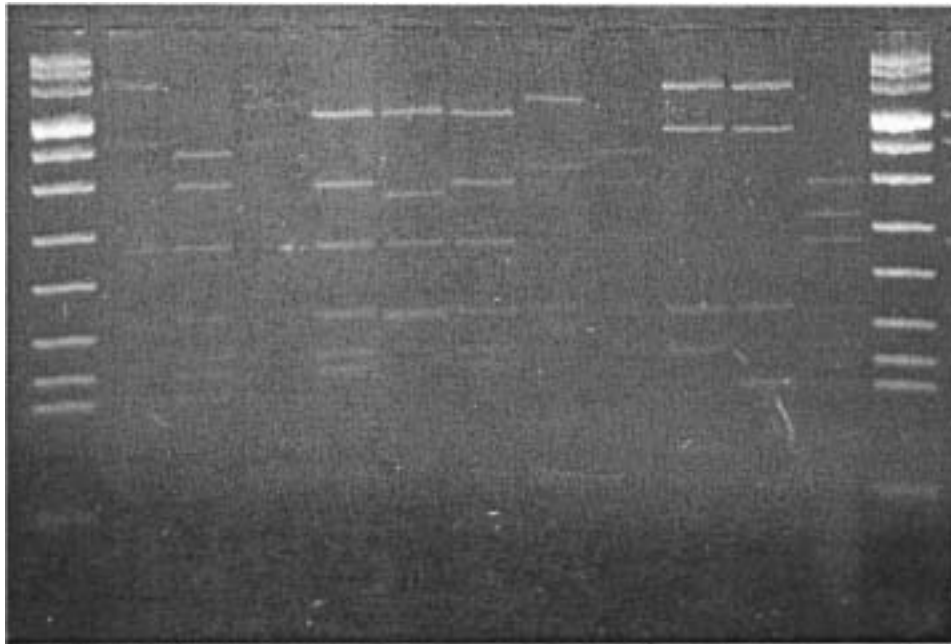
- 15 min à 50 volts (entrée progressive des échantillons dans le gel) puis 3 heures à 90 volts dans le cas d'un gel Metaphore,
- et 15 min à 60 volts (entrée progressive des échantillons dans le gel) puis 1 heure 45' à 80 volts dans le cas d'un gel agarose.

Après coloration dans un bain de bromure d'éthidium, les gels sont visualisés sous UV et saisis (cf : Visualisation des amplifiats d'ADN sous UV, après coloration au Bromure d'éthidiumI.

PCR-RFLP: analyse des résultats

Séquençage: extraction d'ADN sur gel, purification, quantification

1



PCR-RFLP: analyse des résultats

Analyse des profils RFLP

Les données de PCR-RFLP sont analysées par un logiciel d'analyses mathématiques et statistiques: Gel Compar. Ce logiciel permet la saisie, la standardisation, la normalisation et le stockage des données pour le groupement et l'identification des profils d'électrophorèse (Vauterin et Vauterin, 1992). Après intégration des photos de gels dans un fichier d'analyse du logiciel (Gel Compar III 3.0, Applied Maths), chaque profil est converti en une piste contenant un grand nombre de valeurs densitométriques représentées sous forme de pics. La piste du marqueur de poids moléculaire constitue la piste de référence et pour chaque puits, les informations sont stockées et enregistrées. Afin de pouvoir comparer les gels les uns par rapport aux autres, les photos sont normalisées par alignement indirect des profils via un profil de référence. Le groupage se fait par calcul d'une matrice de similarité entre chaque paire de souches. Un dendrogramme est obtenu à partir de la matrice par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average), en utilisant le coefficient de similarité

Dice.

Séquençage: extraction d'ADN sur gel, purification, quantification

1

-raction et purification d'ADN à partir d'un gel d'agarose (Quiaguick Gel Extration kit chez Quiagen)

is ce cas, la totalité de l'amplifiat est soumis à électrophorèse (environ 1h à 100 V) sur gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE ou TAE IX, ensuite coloré au bromure d'éthidium (BET). La bande d'ADN est découpée au scalpel sous ultraviolets ($\lambda=254$ nm) (voir Prélèvement des bandes d'intérêt)

Extrait grâce au kit " *QIAquick gel extraction Kit* ". Cette extraction repose sur la solubilisation du fragment de gel d'agarose, des lavages de l'ADN fixé sur colonne et l'élution de cet ADN purifié.

Protocole :

l'éthanol est ajouté au tampon PE avant utilisation.

Prendre le morceau d'agarose et rajouter 3 volumes de tampon QG pour 1 volume de gel (100 mg = 100 μ L).

Incuber 10 min à 50°C et vortexer toutes les 2 à 3 min jusqu'à solubilisation complète.

Poser sur colonne Quiagen l'agarose solubilisé + ADN (après pipetage d'un volume maximum de 750 μ L) et filtrer par centrifugation 1 min à 13000 rpm.

Si le volume total est supérieur à 750 μ L, répéter l'opération sur la même colonne, après dilution du filtrat issu de chaque étape de filtration. Après cette étape, l'ADN est élué de la colonne.

Prendre le filtrat final, rajouter 0,5 mL de tampon QG sur la colonne, pour enlever les résidus d'agarose, et centrifuger 1 min à 13000 rpm.

Prendre ensuite la colonne avec 0,75 mL de tampon PE, laisser incuber 2 à 5 min et centrifuger 1 min à 13000 rpm.

Centrifuger successivement 2 fois 1 min à 13000 rpm en jetant le filtrat à chaque fois, afin d'éliminer complètement l'éthanol contenu dans le tampon PE.

Prendre la colonne sur un nouvel eppendorf. Ajouter 30 μ L d'eau ultrapure ou de tampon EB sur la colonne, attendre 1 minute puis éluer l'ADN par centrifugation 1 min à 13000 rpm.

Poser sur gel d'agarose 4 μ L d'extrait, parallèlement à 5 μ L de marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder Eurogentec) déposés à l'une des extrémités du gel et faire migrer environ 1 h à 100 volts. La concentration d'ADN est estimée après

électrophorèse en comparaison aux 5 μ L de marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder Eurogentec).

Extraction et purification d'ADN à partir de l'amplifiat (Quiaguick PCR Purification kit)

Dans ce cas, c'est seulement un aliquot de l'amplifiat qui a été soumis à électrophorèse,

1. Ajouter 5 volumes de tampon PBI à 1 volume d'amplifiat PCR.
2. Vérifier que la couleur du mélange est jaune. Si cette couleur est orange ou violette, ajouter 1/10ème du volume initial d'Acétate de sodium 3M, pH 5 et mélanger. La couleur doit virer au jaune.
3. Déposer l'échantillon sur la colonne QIAquick et centrifuger 30 à 60 sec à 13000 rpm.
4. Vider le tube collecteur et déposer la colonne sur le même tube.
5. Laver la colonne avec 750 μL de tampon PE et centrifuger 30 à 60 sec.
6. Vider le tube collecteur et centrifuger la colonne 1 min.
7. Déposer la colonne QIAquick sur un tube eppendorf de 1,5 ml propre.
8. Eluer l'ADN en déposant 50 μL de tampon EB (100mM Tris, pH 8,5) ou d'eau (pH 7-8,5) au centre de la membrane et en centrifugeant 1 min à 13 000 rpm.
Afin d'augmenter la concentration de l'ADN, éluer avec 30 μL de tampon d'élution ou d'eau: attendre 1 min après ajout du tampon et avant centrifugation..

Quantification de l'ADN

Cette estimation est indispensable après extraction d'ADN à partir d'un matériel biologique. Elle s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm. Une unité de densité optique correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ ou à l'absorption d'une solution d'ADN simple brin (ou d'ARN) à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$.

Sans spectrophotomètre, nous pouvons estimer les quantités d'ADN par dépôt d'un aliquot sur gel d'agarose. Après électrophorèse, l'intensité de la bande est comparée à celles des bandes du SmartLadder d'Eurogentec (5 μL déposés), sachant que chaque bande de cette échelle correspond à une quantité différente d'ADN (voir fiche du SmartLadder).

Principe de la réaction de séquence La réaction de séquence repose sur une PCR réalisée en présence d'une seule amorce et de didéoxynucléotides tri-phosphate (ddNTPs). L'incorporation aléatoire d'un ddNTP à la chaîne en cours de synthèse empêche la liaison phosphodiester en 3' et entraîne un arrêt de l'élongation du brin.

TP Oran demi-journée 4

Séquençage: correction de séquences, Blast, construction d'un arbre phylogénétique

Analyse de séquences **et** Phylogénie (sur Mac OS X)

Logiciels à utiliser sur Mac OS X : 4Peaks/ Word/ ClustalX /NJplot/ PowerPoint

Dans le séquençage selon la technique de Sanger on utilise des amorces ou des désoxynucléosides triphosphates marqués à des fluorochromes. Les ddNTPs*, associés aux fluorochromes spécifiques de chacune des bases (A, T, C, G) permettent une détermination des séquences, sous forme de pics colorés.

L'utilisation de logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique ; chaque base élémentaire étant représentée par une couleur différente .

Après le séquençage effectué par MacroGen, on reçoit les séquences sous différents formats: .ab1 / .ab1.phd.l / .pdf / .txt

Télécharger le logiciel « 4Peaks »

dans « 4Peaks » faire Fichier/ Ouvrir/ ouvrir une séquence à corriger sous le format: .ab1 / corriger la séquence/

Faire Fichier/ Sauvegarder sous...format SCF

Faire Fichier/ Exporter sous...format .txt

Faire / Editer/ sequences Blast/nucleotide/ (la séquence est automatiquement sauvegardée) / data base / others/ faire « Blast »/ on obtient l'affichage de la séquence la plus proche dans ncbi (une base de données consultable par internet et qui contient énormément de séquences disponibles) , avec le n° d'accession, la description, le score et le pourcentage d'identité

En cliquant sur le n° d'accession, on a accès à d'autres renseignements et on peut éventuellement accéder à l'article s'il existe.

phylogénétique, compiler dans « word » toutes les séquences sous..farmat .txt avec cette présentation ci-dessous (impérativement !)

<nom de la sequence 1

```
ctaaggatgg ttcttcagaa gcttgcttct atcgaaccgt ttagaaaca
tcagtggcca acggtcgtca ggatcgttga gctgcattgg cgggatttcg
ccgtcttcgt ttctctttct tcgcggacga acacgcgctg gggctgcaac
cttgacagaat ccctggctct tgactggata tgcgtaggg gctttagct
cagttggta gagcgcgcgc ttgataagcg tgaggtcgga
```

<nom de la sequence2

```
gccaacagat cgccagatcg ttgagctgca ttggcgggat ttcgccgtct
tcgtttctct ttcttcgagg acgaacacgc gctgggcctg catcaagcag
gaccacggg ccctgacggg atatgctgta ggggcttgta gctcagttgg
ttagagcgcg cgcttgataa gcgtgaggtc ctaaggatga tccttcagcg
agctcacgct cactatcgga tcgttttaga aacattcagg
```

<nom de la sequence3

```
ggccaacagt ttcaggattg ttgagctcca ttggcgggat ttcgccgtct
tcgtttctct ttcttcgagg acgaacacgc gccaggggct gagcgcgttg
cgatgcatcg acttcacgtc gggcgcgcgc cggcatgtct ctcgtgtag
gggctttag ctcagttggt tagagcgcgc ctaaggatga tccttcagcg
agctcacgct cactatcgga tcgttttaga aacatcagt
```

Ne pas mettre un titre trop long à ce fichier word, éviter les ponctuations et les espaces, sinon l'alignement ne se fera pas.

Enregistrer sous « texte seulement » ou sous « texte seulement avec saut de ligne »

7. Rajouter à cette liste des séquences de référence (des représentants des souches types de chaque espèce) et une séquence éloignée qui servira à enraciner votre arbre ultérieurement.

8. Pour faire l'alignement: Ouvrir « ClustalX » / Faire File/Load sequences/ aller chercher le fichier fasta contenant toutes les séquences/ faire Choose/ les séquences apparaissent dans ClustalX/Faire Alignment/ Alignment parameters/ Choisir Pairwise ou multiple Alignment parameters/ La matrice Blosum est à utiliser pour des séquences d'organismes éloignés taxonomiquement et les matrices Pam et Gonnet pour des organismes proches/ Faire Do complete alignment/ Align/ une fois l'alignement réalisé, on obtient un fichier .aln

(NB: sur mon micro, je ne peux parfois pas faire Align à partir du fichier fasta qui se trouve dans un dossier/ la solution c'est de mettre le fichier fasta sur le bureau)

9. Construction des arbres phylogénétiques :

Toujours sous ClustalX , faire Trees/ Bootstrap N-J Tree/ on obtient un fichier .phb

10. Ouvrir « Njplot » / File/ Open: aller chercher le fichier .phb/ Travailler la présentation de l'arbre en choisissant le «new outgroup » et en faisant basculer les branches avec « swapnodes » / afficher les valeurs de bootstrap/

Faire save plot / on obtient un fichier .pict/

11. Ouvrir « PowerPoint »/ Fichier/ Nouvelle présentation/ faire Insertion/ Image/ à partir d'un fichier/ Tous les fichiers/ chercher le fichier .pict /Faire Edition/Image/ ceci est une image...voulez-vous le convertir...dessin Microsoft Office/ Oui/ Travailler la présentation de l'arbre

Analyse de séquences et phylogénie (sur PC)

Logiciels à utiliser sur PC: Chromas (gratuit)

Sur PC, il est possible d'utiliser Chromas Pro (démonstration de 60 jours). Après téléchargement de Chromas Pro sur PC et ouverture du logiciel, cliquer sur File, New, Sequencing project. Cliquer ensuite sur File, Project, Add files, importer les séquences, corriger et sauvegarder en cliquant sur les noms des séquences analysées. Assembler les séquences en cliquant dans Project, Assemble all, après sélection des séquences à assembler. Exporter les séquences sous format Fasta en faisant Export to editor.

La séquence nucléotidique est déterminée par BLAST en comparaison à des banques de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) et l'ensemble des séquences consensus est aligné avec des souches de référence issues de GenBank, à l'aide du logiciel Clustal X (Applied Biosystems). Après vérification et correction de l'alignement avec le logiciel Genedoc, un arbre phylogénétique est construit en utilisant le logiciel Paup 4.

Bibliographie :

- Pour les schémas : compte-rendu du TP de génétique de Fabien Jonchère et Vincent Houvet V.F.R Sciences d'Angers. Années 2005-2006 houvet.vincent.free.fr/index_fichiers/compterendutpgenet.doc
- <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>
- <http://www.promega.com/faq/gotaq.html>
- <http://spiral.univ-lyon1.fr/polycops/BiologieMoleculaire/BiologieMoleculaire-5.html>
- <http://www.gazettelabo.fr/2002archives/pratic/1998/24PCR.htm>

Annexes

- Annexe 1 Manipulation du bromure d'éthidium
- Annexe 2 Isolement et la conservation des souches bactériennes
- Annexe 3 Extraction d'ADN à partir d'une colonie bactérienne
- Annexe 4 Milieux de culture
- Annexe 5 Fiche PCR 16S
- Annexe 6 Fiche PCR ITS
- Annexe 7 Décontamination du BET
- Annexe 8 Fiche toxicologique du bromure d'éthidium
- Annexe 9 Fiche du marqueur de poids moléculaire « SmartLadder »
- Annexe 10 Fiche du marqueur de poids moléculaire « Marqueur VIn »
- Annexe 11 Fiche mise en collection d'une souche bactérienne

Annexe 1 Manipulation du bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium est une molécule s'intercalant entre les bases de l'ADN, utilisée en biologie moléculaire pour sa fluorescence sous lumière UV. Il va se lier à l'ADN lors de la coloration du gel d'agarose mais aussi à l'ADN de l'utilisateur si celui-ci ne se protège pas lors de la manipulation, car c'est un agent mutagène puissant.

Précautions indispensables :

- Toutes les manipulations utilisant le BET (bains de coloration et de rinçage, cuves de migration en tampon au BET) se font obligatoirement dans la salle BET.
- Le port de la BLOUSE et de GANTS en nitrile dans la salle BET est obligatoire.
- Aucun matériel extérieur à cette salle ne doit y être ajouté, et aucun matériel contenu dans cette salle ne doit en être retiré car tout y est potentiellement contaminé !
- Manipulez vos gels dans les bains de coloration et de rinçage à l'aide des pelles métalliques
- Révélation sous UV : Pour découper des bandes, il faut porter le masque et les lunettes et ne pas trop s'approcher de la table UV et ne pas rester trop longtemps !!! De plus, on positionne alors les UV non pas sur l'intensité maximale mais moindre. LES UV CAUSENT DES BRULURES OCCULAIRES ET CUTANÉES GRAVES.
- Ne manipulez les masques de protection que sur l'extérieur de la visière (sans pour autant la salir), NE TOUCHEZ AUCUNE PARTIE EN CONTACT AVEC VOUS POUR NE PAS VOUS CONTAMINER.
- D'une manière générale, minimisez le temps pendant lequel vous laissez la lampe UV allumée, à plus forte raison si vous découpez des bandes car vous vous exposez (LE PRELEVEMENT DE BANDES NE S'EFFECTUE QU'UNE FOIS QUE VOUS ETES SEUL DANS LA SALLE, afin de n'exposer personne d'autre).
- Après usage, la table UV est rincée à l'eau et essuyée, papier et gants sont jetés dans le septibox tandis que le gel est jeté dans la poubelle jaune. Les déchets liquides (bains BET, premier rinçage à l'eau) sont stockés dans les bidons blancs. Le bac BET commun

doit être conservé à l'abri de la lumière (couvercle) car le BET est photosensible.

- Pensez à récupérer votre photo de gel une fois vos gants contaminés enlevés! EVITEZ DE CONTAMINER IES BAGUES DE REGLAGE DE IA CAMERA, IES BOUTONS DE REGLAGE DE L'IMAGEUR, L'INTERRUPTEUR DE IA SAIIE ET IA POIGNEE DE IA PORTE, manipulez-les autant que possible avec des gants non contaminés.

Annexe 2 Isolement et la conservation des souches bactériennes

Les nodosités, induites au niveau des racines de la légumineuse, sont détachées et désinfectées 3 min à l'hypochlorite de calcium 70% à 5g/L. Elles sont ensuite rincées au minimum 3 fois à l'eau distillée stérile et chacune est broyée en tube eppendorf à l'aide d'un pilon en plastique. Après ajout de 300 µL d'eau stérile, les rhizobia sont isolés en boîte de Petri à 28°C, sur milieu YEM gélosé (Vincent, 1970). Les souches sont ensuite purifiées par isollements successifs et sont conservées à -80°C, dans du milieu YEM liquide, additionné de glycérol à la concentration finale de 20% (v/v) (voir fiche en annexe).

Annexe 3 Extraction de l'ADN

Une colonie isolée est repiquée en masse sur milieu TV gélosé ou YEM modifié (mannitol remplacé par du maltose). L'utilisation de maltose comme source carbonée diminue l'accumulation de polysaccharides et permet, ainsi, une meilleure extraction de l'ADN bactérien. Après incubation 48 heures à 28°C, le tapis bactérien est lavé 2 fois à l'eau milliQ stérile et la densité optique est mesurée. A 100 µL de suspension bactérienne DO (620) = 2, est ajouté 100 µL de Tris-Cl (10mM, pH : 8,3) et 20 µL de protéinase K (Boehringer) à 1 mg/ml. Le mélange est mis à incuber 2 heures à 55°C et la protéinase K est ensuite dénaturée 10 min à 100°C. L'ADN est stocké à - 20°C.

Annexe 4 Milieux de cultures bactériennes

Milieu YEM : extrait de levure : 0,4 g ; solution minérale de Bergensen 10 M : 100 ml ; mannitol: 10 g / qsp 1 litre

Le milieu est ajusté au pH : 6,8 et stérilisé.

Solution minérale de Bergensen IOM : KCl : 1 g ; FeCl₃ : 0,02 g ; CaCl₂, 2H₂O : 0,53 g ; Na₂HPO₄, 12H₂O : 4,5 g ; MgSO₄, 7H₂O : 1 g/ qsp 1 litre

Milieu TY : Bacto tryptone : 5 g ; Yeast extract : 3 g / qsp 1 litre.

Une solution de CaCl₂, 2H₂O stérilisée par filtration, est ajoutée à une concentration finale de 0,9 g/l après stérilisation des milieux (autoclavage 20 min à 120°C). Les milieux solides sont additionnés d'agar : 15 g/l avant stérilisation.