



HAL
open science

Extraction d'ADN bactérien dans des contenus digestifs de poulets à partir du kit Qiagen QIAamp DNA Mini Kit

Barbara Konsak, Maryse Leconte, Irène Gabriel, Michel Jacques M.J. Duclos

► To cite this version:

Barbara Konsak, Maryse Leconte, Irène Gabriel, Michel Jacques M.J. Duclos. Extraction d'ADN bactérien dans des contenus digestifs de poulets à partir du kit Qiagen QIAamp DNA Mini Kit. 2012. hal-03794456

HAL Id: hal-03794456

<https://hal.inrae.fr/hal-03794456>

Submitted on 3 Oct 2022

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.

 Institut National de la Recherche Agronomique Unité de Recherches Avicoles Unité expérimentale : PEAT		Mode opératoire		N° d'identification : 0083-MO-0172	
				Version : 01	
Extraction d'ADN bactérien dans des contenus digestifs de poulets à partir du kit Qiagen QIAamp DNA Mini Kit					
Date d'émission : 20/2/2012		Dernière mise à jour :		Date de retrait :	
				Nombre de pages : 9	
Rédigé par : Barbara Konsak, Maryse Leconte <i>M. Leconte</i>		Revu par: Irène Gabriel <i>I. Gabriel</i>		Approuvé par: M.D. ROBLET M.Duclos <i>M. Duclos</i>	
Diffusion : Personnels de laboratoires travaillant en écologie microbienne du tractus digestif des volailles. AQRODOC					

Mots clés : Extraction d'ADN, bactéries, contenus digestifs, muqueuses digestives, poulet

SOMMAIRE

- 1 Objet - Domaine d'application**
- 2 Principe**
- 3 Réactifs**
- 4 Appareillage**
- 5 Mode opératoire**
- 6 Hygiène et sécurité**
- 7 Enregistrement et / ou expression des résultats**
- 8 Références bibliographiques**
- 9 Annexe**

1. Objet - Domaine d'application

Extraire l'ADN bactérien de manière quantitative à partir d'échantillons de contenus digestifs de poulet, dans l'objectif de les analyser par empreinte moléculaire ou de les quantifier par qPCR.

Ce protocole d'extraction n'est pas forcément applicable à des milieux digestifs d'autres espèces animales.

2 Principe

Différents protocoles d'extraction d'ADN bactérien dans des milieux biologiques complexes, tels que biofermenteurs, sols, contenus digestifs de différentes espèces animales, sont utilisés. Il peut s'agir de méthodes commercialisées sous forme de kit ou de méthodes manuelles. Compte tenu de la complexité de ces milieux biologiques, elles ont toutes été mises au point de manière empirique, pour un type de milieu biologique déterminé. Ici il s'agit d'une méthode combinant une approche manuelle avec l'utilisation d'un kit, mise au point à partir de la méthode de Yu et Morrison (2004) (Moore et al, 2011). Elle a été testée et validée sur des contenus digestifs de poulet (Jabot, iléon, caeca). Elle ne peut pas être appliquée directement à d'autres milieux biologiques complexes sans être validée auparavant.

Dans une première étape, les parois cellulaires bactériennes sont rompues chimiquement à chaud (70°C) à l'aide d'un détergent et mécaniquement à l'aide de broyage avec des microbilles de verre, cette étape physique contribuant à une nette amélioration de l'extraction d'ADN bactérien (Salonen et al, 2010). Pour cela, deux extractions successives sont effectuées. L'ADN est ensuite purifié. Dans une première étape, les protéines libérées lors des ruptures cellulaires sont hydrolysées en présence de protéinase K, qui est une protéase à large spectre. Dans une seconde étape, l'ADN est lié à une colonne de silice en présence de sels chaotropiques et d'éthanol, les impuretés sont éliminées, puis l'ADN est élué.

Ce protocole présente l'avantage par rapport à d'autres protocoles, de conduire, dans le cas des types d'échantillons testés, à de plus fortes quantités d'ADN bactérien extrait, de l'ADN de meilleure qualité (DO260/DO280) pour effectuer des PCR, par rapport à d'autres méthodes développées pour des fèces humains comme le Stool Mini kit de Qiagen très couramment utilisé (Li et al, 2003) ou une méthode développée par Furet et al (2009) avec le kit de G'Nome, et d'être rapide (18 à 36 éch /j), répétable, et relativement peu coûteux (en 2011 : 4.13 €/éch)

3 Réactifs et petits matériels

3.1. Réactifs

- Qiagen QIAamp DNA Mini Kit conservé à température ambiante (Ref 51 306). Il contient des colonnes de silice QIAamp, des tubes de récupération des éluats, les tampons AL, AW1, AW2, AE*, une solution de protéinase K (600 mAU/ml, 40 mAU/mg de protéines) en quantité insuffisante.
 - * Le tampon AE est composé de 10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0
- Protéinase K (Qiagen 19133 ; > 600 mAU/ml, ~ 20 mg/ml ; 10 ml)
- SDS (dodécylsulfate de sodium) (Qualité biologie moléculaire ; Qbiogene SDS00250)
- EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) (qualité biologie moléculaire ; Sigma E5134,)
- NaCl (qualité biologie moléculaire ; VWR Prolabo 443827W)
- Tris (trishydroxyméthylaminométhane) (qualité biologie moléculaire ; Sigma T8524)
- Ethanol 100 % (qualité analyse 99.5% ; Prolabo) ;
- Billes de verre (0.10 à 0.25 mm ; 500 g ; VWR 412.0067) à mettre dans un pot de verre et à autoclaver
- H₂O ultrapure (filtrée à 0.22 µm) autoclavée
- NaOH 1 M
- HCl 37% (VWR Prolabo)

3.2. Petit matériel

- Epprouvettes
- Flacons autoclavés
- Seringues stérile de 20 ml (Terumo) et filtres stérile à 0.22 µm (Sartorius)
- Microtubes à vis (avec joint) stérile en polypropylène de 2 ml sans jupe (Starstedt® ; ref 72.693.005)
- Microfuge en polypropylène de 1,5ml sans ADN et sans ARN (Axigen)
- Microfuge en polypropylène de 2 ml non stérile avec bouchon sécurisé (Eppendorf® ; ref 0030.123.344) A autoclaver
- Tube à essai stérile en polypropylène de 15 ml (Falcon® ; ref 62.554.002)
- Cônes stériles (avec filtre de préférence en particulier pour le pipetage du SDS)
- Jeu de pipettes spécifiques

4 Appareillage

- pH mètre
- Bloc agitateur chauffant
- Etuve à 37°C
- Bain-marie à 70°C avec portoir pour tubes de 2 ml
- Vortex
- Broyeur / Homogénéiseur (Mini-Beadbeater Retsch® MM301)
- Centrifugeuse réfrigérée (16,000 x g ; 4°C)

5 Mode opératoire

Les manipulations doivent être effectuées avec des gants sous une hotte chimique (produits nocifs : Tampons AW1 et AL, et protéinase K), sur une pailasse propre, nettoyée à l'alcool.

5.1. Préparation des solutions

Toutes les solutions suivantes étant autoclavées ou filtrées à 0.22µm, se conservent à température ambiante (environ 1 an)

- 10% SDS

Peser 20g de SDS (Attention: utiliser un masque)

Ajouter 200ml d'eau ultrapure

Chauffer à 50-60°C sur le bloc chauffant pour solubiliser le SDS

Filtrer avec une seringue de 50 ml et un filtre à 0.22µm

Rq : Ne pas autoclaver sinon la solution mousse

- EDTA, pH 8, 0,5M (MM : 372,2 g.mol⁻¹)
Peser 9,305 g d'EDTA
Ajouter 50 ml d'eau ultrapure
Chauffer à 50-60°C sur le bloc chauffant pour dissoudre
Ajuster le pH avec NaOH 1 M
Autoclaver

- Tris-HCl, pH 8, 1M (MM : 121,1 g.mol⁻¹)
Peser 6,05 g
Ajouter 50 ml d'eau ultrapure.
Ajuster le pH avec de l'HCl concentré (37%)
Autoclaver

- NaCl, 5M (MM : 58,44 g.mol⁻¹)
Peser 14,61 g
Ajouter 50 ml d'eau ultrapure.
Autoclaver

- Solution de lyse (400ml= 307 extractions)

Dans une bouteille autoclavée

Mélanger : 160 ml de SDS 10%

40 ml d'EDTA (0.5M)

20 ml de Tris-HCl (1M)

40 ml de NaCl (5M)

140 ml d'eau ultrapure

Mettre cette solution la veille de son utilisation (ou la maintenir pendant les jours d'extraction) dans une étuve à 37°C (précipitation des sels à température ambiante)

5.2. Préparation des tubes d'échantillons

Numéroter les différents tubes pour chaque échantillon : microtube à vis Starstedt ® de 2 ml, microtube stériles de 2 ml, tube stériles Falcon de 15 ml, colonne QIAamp avec son tube, microfuge stérile (1,5ml) pour le stockage

5.3. Rupture chimique et mécanique, inhibition des nucléases

- Allumer le bain-marie à 70°C

- Mettre 0.4 g de billes de verre dans chaque microtube à vis Starstedt ® de 2 ml

* Peser cette quantité à l'aide d'un tube de 1.5 ou 2 ml marqué au niveau de 0.4 g

- Ajouter l'échantillon initialement conservé à -70°C

Maintenir l'échantillon dans la glace pilée et prélever l'échantillon homogénéisé en grattant avec une spatule en métal nettoyée à l'alcool entre 2 échantillons

Déposer l'échantillon dans le tube (Attention les quantités d'échantillon sont très faibles et certains échantillons comme les contenus de caeca sont collants)

Rq : Si les échantillons n'ont pas été homogénéisés manuellement au moment des prélèvements, laisser décongeler puis homogénéiser avant prélèvement (A ne pas faire si l'échantillon a déjà été homogénéisé car modification de l'échantillon à chaque cycle de congélation / décongélation ; ruptures cellulaires et activations enzymatiques)

Quantités à prélever : quantités limitées à cause de la saturation des colonnes de silice lors de l'étape de purification de l'ADN (Salonen et al, 2010)

	Contenu digestif
Jabot	25 mg
Iléon	50 mg
Caeca	25 mg

- Après avoir bien agité manuellement la solution de lyse à 37°C, ajouter 1 ml dans chaque tube (Attention à la mousse due au SDS)

- Vortexer vigoureusement le tube dans les 2 sens jusqu'à une parfaite homogénéisation de l'échantillon (jusqu'à 1 à 2 min si nécessaire) ; Vérifier que l'échantillon est bien dans le liquide (Attention à cette étape, l'échantillon étant de très faible taille)

- Mettre l'échantillon dans le Broyeur / Homogénéiseur pendant 3 min à vitesse maximum (Fréquence de 30 / sec pour le Retsch® MM301)

- Chauffer au bain marie à 70°C pendant 15 min

- Centrifuger 5 min à 16,000 x g à 4°C (Faible température pour mieux conserver l'ADN)

- Récupérer le surnageant avec une pipette et le mettre dans un microfuge stérile de 1,5ml à température ambiante (voir dans la glace ?)

- Au culot rajouter 300 µl de la solution de lyse à 37°C

- Vortexer vigoureusement jusqu'à la re-suspension des billes de verre dans lesquelles se trouve l'échantillon (10-30 sec)

- Mettre l'échantillon dans le Broyeur / Homogénéiseur pendant 3 min à vitesse maximum (Fréquence de 30 / sec pour le Retsch® MM301).

- Chauffer au bain marie à 70°C pendant 15 min

- Centrifuger 5 min à 16,000 x g à 4°C.

Rq : Après cette centrifugation, penser à mettre la centrifugeuse à température ambiante pour sa prochaine utilisation avec les colonnes de silice

- Récupérer le surnageant et le mettre avec le premier à température ambiante (voir dans la glace ?)

- Vortexer les deux surnageants pour homogénéiser (quelques sec) à température ambiante (voir dans la glace ?)

5.4. Purification de l'ADN

Effectuée à l'aide des colonnes de silice QIAamp et des réactifs fournis dans le kit Qiagen QIAamp DNA Mini Kit

5.4.1. Hydrolyse des protéines

- Pour chaque échantillon, préparer un micro tube stérile de 2 ml avec 800µl de tampon AL et 60 µl de protéinase K (Ou préparer un mélange des 2 réactifs pour l'ensemble des échantillons)
- Ajouter 800µl du surnageant précédent et vortex (quelques sec)
- Chauffer à 70°C pendant 10 min

5.4.2. Gel filtration sur colonne de silice

- Pour chaque échantillon, préparer un tube stérile Falcon de 15 ml * avec 800 µl d'éthanol pur
- * Tube plus grand que le volume total pour pouvoir laisser le cône de 1 ml à l'intérieur
- Transvaser le contenu du tube de 2 ml dans le tube de 15 ml
- Vortexer (quelques sec)

Rq : A cette étape, il est possible de congeler l'échantillon à -20°C pour continuer le protocole ultérieurement (après-midi ou lendemain)

5.4.2.1. Liaison de l'ADN à la colonne de silice

- Numéroter les tubes contenant les colonnes QIAamp (Crayon résistant à l'alcool)
- Prendre 650 µl* (ou 615 µl pour faire 4 x 615 µl) du tube Falcon et déposer sur une colonne QIAamp avec son tube
- * Volume maximal réel que l'on peut mettre sur une colonne (et non pas 700 µl comme indiqué par le fournisseur)

Et laisser le cône dans le tube en le refermant bien

- Centrifuger 1 min à 16,000 x g à température ambiante
- Eliminer le filtrat et remettre la colonne sur le même tube
- Répéter ces deux étapes (4 fois au total), afin de déposer sur la colonne le volume total présent dans le tube Falcon® de 15 ml soit 2.460 ml (800µl + 60µl + 800µl + 800µl = 4 x 615 µl)
- Transférer la colonne* dans un nouveau tube de récupération des éluats fournis dans le kit
- * Attention à ne pas entrainer les gouttes de filtrat

5.4.2.2. Elimination des impuretés

- Ajouter 500 µl de tampon AW1 sur la colonne
- Centrifuger 1 min à 16,000 x g à température ambiante
- Eliminer le tube de récupération avec l'éluat

- Transférer la colonne dans un nouveau tube de récupération des éluats fournis dans le kit

- Ajouter 500 µl de tampon AW2
- Centrifuger 1 min à 16,000 x g à température ambiante
- Eliminer le tube de récupération avec l'éluat

- Remettre un nouveau tube de récupération des éluats fournis dans le kit

- Sécher la colonne en centrifugeant 5 min à 16,000 x g à température ambiante
- Eliminer le tube de récupération avec l'éluat

5.4.2.3. Elution de l'ADN

- Transvaser la colonne* dans un microfuge stérile (1,5ml) qui sera le tube de stockage de l'ADN
- * Attention à ne pas entrainer les gouttes d'éluat pour ne pas contaminer l'échantillon avec le tampon d'élution précédent
- Ajouter 200 µl de tampon AE
 - Incuber à température ambiante pendant 5 min
 - Centrifuger 1 min à 16,000 x g à température ambiante
- Récupérer l'éluat contenant l'ADN

Rq : Conservation de l'échantillon à -20°C

5.5. Contrôle de la pureté de l'ADN au Nanodrop

Peut être effectué directement après l'extraction (pas de dilution nécessaire) ou après congélation

Utiliser le tampon AE pour le blanc et ajouter 2 µl* d'échantillon pur

* Le volume au Nanodrop peut être réduit à 1.3µl

5.5.1. Rapport DO_{260 nm} / DO_{280 nm}

La mesure de ce rapport permet de déterminer s'il y a une contamination par des protéines. Un ADN pur doit avoir un rapport DO_{260 nm} / DO_{280 nm} compris entre 1,8 et 2,2. On considère donc que lorsque ce rapport est égal à 2 la solution est dépourvue de protéines

5.5.2. Rapport DO_{260nm} / DO_{230nm}

La mesure de ce rapport permet de déterminer la contamination par des composés organiques (guanidine ...) absorbant à 230 nm.

Ce rapport se situe autour de 2 lorsqu'il n'y a pas de contamination. C'est le cas des échantillons de jabot et de caeca.

Cependant, ces composés organiques, gênants pour les réactions enzymatiques, ne le sont pas pour les PCR. Ainsi, malgré la valeur d'environ 1.5 pour des échantillons d'iléon, les PCR sont efficaces.

Rq : Pour certains échantillons, il peut s'avérer nécessaire d'effectuer deux lavages de la colonne de silice avec le tampon AW2 pour une meilleure élimination des impuretés

Rq : Pour de nouveaux types d'échantillons, vérifier la taille de l'ADN avec un gel d'agarose de 1%. La taille apparente doit être supérieure à 21 kb.

5.6. Conservation de l'échantillon

Congeler l'échantillon d'ADN à -20°C

Rq : Il peut être conservé à température ambiante sur de courtes durées (pour des transports d'échantillon entre laboratoires par exemple)

6 Hygiène et sécurité

Les produits sont à éliminer dans des containers pour déchets chimiques.

Tous les travaux doivent être effectués avec une blouse et des gants.

Certains réactifs nécessitent de travailler sous hotte chimique :

Les tampons AW1 et AL contiennent de l'hydrochloride de guanidine (nocif, irritant ; phrases de risques et de sécurité : R22-36/38, S13-26-36-46)

La protéinase K est considérée comme sensibilisante et irritante (phrases de risques et de sécurité : R36/37/38-42/43, S23-24-26-36/37)

Utiliser un masque pour la pesée du SDS (R22, R36/38, S22-26-36)

7 Enregistrement et / ou expression des résultats

Dans une première approximation la quantité d'ADN peut être évaluée à partir de l'absorbance à 260 nm.

Cette absorbance à 260nm est utilisée bien que ne correspondant pas au maximum d'absorbance de l'ADN, car cette longueur d'onde est la plus spécifique des acides nucléiques.

Comme expérimentalement, une solution de 50 µg d'ADN/ml donne une absorbance de 1 unité de DO, la concentration en ADN (µg /ml) se déduit de la DO à 260 nm à partir de la formule : $DO_{260} \times 50$

La quantité d'ADN peut être déterminée par fluorimétrie avec différents colorants.

Pour déterminer la quantité totale de bactéries (ou plus précisément le nombre de copies d'ADNr16S), il est nécessaire d'effectuer une quantification par qPCR avec des amorces universelles All Bacteria.

Pour les calculs de quantités d'ADN ou de bactéries ramenées à la quantité d'échantillon extrait au départ, penser à tenir compte du fait que sur les 1300 µl de solution de lyse utilisée pour l'extraction (1000µl+300µl), seuls 800 µl du surnageant sont utilisés pour les étapes ultérieures de purification.

8 Références bibliographiques

- Furet, J. P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., Corthier, G. (2009). Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol.* 68 (3): 351-362.
- Li, M., Gong, J., Cottrill, M., Yu, H., de Lange, C., Burton, J., Topp, E. (2003). Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *J. Microbiol Methods* 54: 13-20.
- Moore, R. J., Stanley, D., Konsak, B. M., Haring, V. R., Hughes, R. J., Geier, M. S., Crowley, T. M. (2011). Correlations between variable broiler performance and gene expression and microflora in the gut. *Proceedings of the 22nd Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, 14-16th February 2011*: 9-16.
- Salonen, A., Nikkila, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilic-Stojanovic, M., Kekkonen, R. A., Palva, A., de Vos, W. M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of Microbiological Methods* 81(2): 127-134.
- Yu, Z., Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* 36(5): 808-812.

9 Annexe

Protocole : Prélèvement du microbiote du mucus de la muqueuse digestive

Protocole : Gel d'agarose

Protocole : Composition du microbiote bactérien digestif du poulet déterminée par qPCR (N°0083-MO-0173)

