

1- Objectif / principe

Les échantillons de sols dédiés à cette analyse sont conservés congelés et lyophilisés à -40°C au Conservatoire de Ressources Génétiques (CRG) de la plateforme.

L'objectif de ce mode opératoire est d'extraire l'ADN génomique total à partir de 1 g de sol équivalent sec (lyophilisé) grâce à une lyse mécanique couplée à une lyse chimique.

La lyse est mécanique et est réalisée par broyage mécanique dans un broyeur en présence de billes et la lyse chimique se fait en présence d'un tampon d'extraction contenant les produits suivants : de l'EDTA qui permet de chélater la majorité des cations bivalents (Mg^{2+}) et cofacteur de nombreuses DNAses; du Tris pH 8,0 qui tamponne la solution, du NaCl qui limite les dénaturations partielles possibles de l'ADN à 70°C et libère de nombreuses interactions ADN - protéines; et le SDS qui facilite la lyse des membranes et la dénaturation des protéines. Pour séparer l'ADN des protéines dénaturées, la déprotéinisation consiste à précipiter les protéines en présence d'une forte concentration en sel. Cette méthode présente deux avantages : les interactions ADN - protéines sont bien détruites et les produits ne sont pas toxiques (contrairement aux solvants organiques, phénol et chloroforme). Les précipités sont séparés par centrifugation à haute vitesse. Le surnageant limpide contient les ADNs. Une précipitation à l'isopropanol et un lavage à l'éthanol permet d'éliminer et récupérer un ADN dit brut c'est-à-dire contenant encore des éléments polluants (protéines, sucres, macromolécules phénoliques, acides humiques...).

2- Consignes de sécurité

- Porter obligatoirement une blouse fermée et des gants
- Utiliser obligatoirement un masque à poussières pour peser les microbilles de silice
- Manipuler l'acétate de potassium, l'isopropanol et l'éthanol sous sorbonne

3- Matériel et produits nécessaires

Matériel

- Balance de précision
- Unité de filtration + pompe à vide (facultatif) ou becher (pour la préparation du tampon)
- Micropipettes et/ou pipeteur électrique
- Centrifugeuse pour tubes 15mL – 1,5mL – 2mL
- **Broyeur Fast-Prep avec adaptateur pour tubes de 15mL**
- Vortex
- Bain-marie
- Etuve

Consommable

Parafilm, gants, masque à poussières, papier aluminium, tubes Falcon 15mL, seringues et filtre 0,2 μ m OU filtres 0,22 μ m GSTF en microcellulose pour unité de filtration, microtubes 1,5mL, tubes 5mL, pointes 10mL-5mL, pipette plastique (10 à 50mL selon le besoin pour la préparation du tampon), pointes micropipettes

Solutions à préparer ou à commander

- SDS 20%
- NaCl 1M
- Tris-HCl 1M pH8
- EDTA 0,5M pH8
- Ethanol absolu pour préparer de l'éthanol à 70%
- Isopropanol (qualité Bio Mol)
- Acétate de potassium 3M pH5,5

Références spécifiques à commander

- billes de céramique, lysing matrix D, MPBiomedicals, référence 6540434
- billes de silice, lysing matrix B, MPBiomedicals, référence 6540428
- billes de verre 4mm, Dutscher, référence 2515667

4- Méthode

Remarques préliminaires :

- Récupérer vos échantillons de sol et les maintenir dans de la glace pendant toute la manipulation
- Régler le bain-marie à 70°C avant de peser et de préparer le tampon d'extraction.
- Placer l'éthanol à 70% et l'isopropanol à -20°C

Phase d'extraction : Broyage/Lyse (LABORATOIRE 801)

IMPORTANT : Les sols doivent être sortis et conservés dans de la glace le temps des pesées pour éviter de modifier le milieu biologique qu'ils contiennent.

- 1- Dans un tube Falcon 15ml, ajouter :
 - 2g de billes de 0,1mm en silice (autoclavées à sec) !! Porter un masque à poussières !!
 - 2,5g de billes de 1,4 en céramique (autoclavées à sec)
 - 4 billes de verre de 4 mm de diamètre en verre (autoclavées à sec) à l'aide d'une pince
- 2- Peser 1g de SOL EQUIVALENT SEC sur une feuille de papier aluminium puis les transvaser dans les tubes Falcon 15ml contenant les billes.
- 3- Préparer dans un bécher/tube ou une unité de filtration le tampon de lyse en bonnes proportions (prévoir minimum 20% de volume en plus pour les pertes).

<u>Concentrations finales</u>	<u>Proportions de tampon (pour 1 ech) :</u>	<u>Rôles des produits :</u>
Tris-HCl 100 mM pH 8	0.5 mL Tris 1 M pH8	Rôle tamponneur à pH8
EDTA 100 mM pH 8	1 mL EDTA 0,5 M pH8	Chélateur des cations
NaCl 100mM	0.5 mL NaCl 1 M	Interactions ADN-prot
SDS 2%	0.5 mL SDS 20%	Lyse membranaire
H ₂ O UP	2.5 mL H ₂ O UP	Dilueur

A l'aide d'une seringue et d'un filtre adapté (0,2µm) **OU** d'une pompe à vide sur une unité de filtration autoclavable (+ filtres autoclavables 0,2µM), filtrer la totalité du tampon

- 4- Ajouter **5 mL** de tampon par échantillon et mettre du parafilm pour sceller le bouchon.
- 5- Agiter immédiatement le tube pour éviter la création d'un « bouchon » de sol et décoller le sol et les billes du fond.
- 6- Réaliser la lyse mécanique par séries de 12 échantillons dans l'agitateur FastPrep à 4 m/sec pendant 90 secondes soit 3 fois 30 secondes = 1run. **ATTENDRE 5 minutes entre chaque run.**
- 7- Après avoir vortexé les tubes, réaliser la lyse chimique en incubant les échantillons au bain-marie à 70°C pendant 30 min, avec agitation au vortex au bout de 15 et 30 minutes.
- 8- Centrifuger à 7000 g pendant 5 min à 20°C minimum
- 9- Récupérer **TOUT le surnageant à la pipette** dans un nouveau tube de **5mL**, homogénéiser, puis prélever 1 mL du lysat vers un tube de 1,5ml. Le reste du lysat peut être conservé à -20°C pour des réextractions futures.

Déprotéinisation

- 8- Ajouter 1/10^{ème} du volume (soit 100µl) d'acétate de potassium 3M pH5,5 à 1mL de lysat obtenu à l'étape précédente. Homogénéiser rapidement par retournement les tubes et les incubent 10 min directement dans la glace.
- 9- Centrifuger à 14000g pendant 5 min à 4°C, récupérer le surnageant dans un tube de 2 mL.

Précipitation de l'ADN

- 10- Ajouter 900µl d'isopropanol à -20°C et agiter doucement les tubes par retournement.
- 11- Placer les tubes à -20°C pendant 30 min minimum.

A cette étape, l'extraction peut être interrompue (pas plus d'une nuit) et être reprise plus tard.

Lavage du culot d'ADN

- 12- Centrifuger à 13000 rpm pendant 30 min à 4°C.
- 13- Eliminer le surnageant avec précaution à la pipette
- 14- Laver le culot d'ADN : ajouter 400 µL d'éthanol 70° à -20°C et centrifuger à 13000rpm pendant 5 min à 4°C.
- 15- Eliminer l'alcool de la même façon qu'à l'étape 13. Les restants d'alcool sur les parois des tubes sont éliminés en plaçant les culots d'ADN (tubes ouverts) à l'étuve (laboratoire 809) à 60°C maximum pendant 10-15 min ou plus si nécessaire (jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'alcool).

Reprise du culot d'ADN brut

- 16- Ajouter 200 µL d'H₂O UP sur le culot SANS le resuspendre. Laisser les tubes à 4°C (plusieurs heures et jusqu'à une nuit) pour mieux dissoudre le culot, puis homogénéiser à l'aide d'une micropipette en aspirant et refoulant la solution très délicatement (il faut éviter de faire des bulles pour ne pas casser les acides nucléiques).

Un ADN dit 'brut' est obtenu. Il est fragile et se conserve mal. Il faut veiller à le conserver et le manipuler correctement. La plateforme GenoSol préconise d'aliqoter cet ADN et de le stocker à -20°C en évitant les cycles de congélation-décongélation. LE stockage à 4°C ne peut pas excéder 48h sans quoi il commence à se dégrader.

5- Référence(s) bibliographique(s)

[Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management](#)

S Dequiedt, NPA Saby, M Lelievre, C Jolivet, J Thioulouse, B Toutain, ...
Global Ecology and Biogeography 20 (4), 641-652

[Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure](#)

S Terrat, R Christen, S Dequiedt, M Lelièvre, V Nowak, T Regnier, ...
Microbial biotechnology 5 (1), 135-141

[Evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure](#)

P Plassart, S Terrat, B Thomson, R Griffiths, S Dequiedt, M Lelievre, ...
PloS one 7 (9), e44279

[Biogeography of soil bacteria and archaea across France](#)

B Karimi, S Terrat, S Dequiedt, NPA Saby, W Horigue, M Lelièvre, ...
Science advances 4 (7), eaat1808

[Mapping and predictive variations of soil bacterial richness across France](#)

S Terrat, W Horrigue, S Dequiedt, NPA Saby, M Lelièvre, V Nowak, ...
PloS one 12 (10), e0186766

[Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity](#)

L Ranjard, S Dequiedt, NC Prévost-Bouré, J Thioulouse, NPA Saby, ...
Nature communications 4, 1434

