

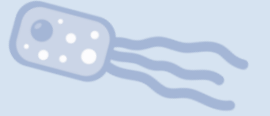
# Introduction à l'extraction d'ADN et l'électrophorèse sur gel d'agarose

BIO1410 Hiver 2025

Microbiologie Environnementale



# Plan de la séance



- Résumé d'une étude avec ADNe
- Théorie et exercices à faire
  - # 1 – Échantillonnage de vos microbiomes
  - # 2.1 – Extraction de l'ADN de bactéries *Escherichia coli*
  - # 2.2 – Électrophorèse sur gel d'agarose
  - # 3 – Observation des colonies sur vos géloses avec le binoculaire
- Explication du rapport



# Plan de la séance



- Résumé d'une étude avec ADNe
- Théorie et exercices à faire
  - # 1 – Échantillonnage de vos microbiomes
  - # 2.1 – Extraction de l'ADN de bactéries *Escherichia coli*
  - # 2.2 – Électrophorèse sur gel d'agarose
  - # 3 – Observation des colonies sur vos géloses avec le binoculaire
- Explication du rapport



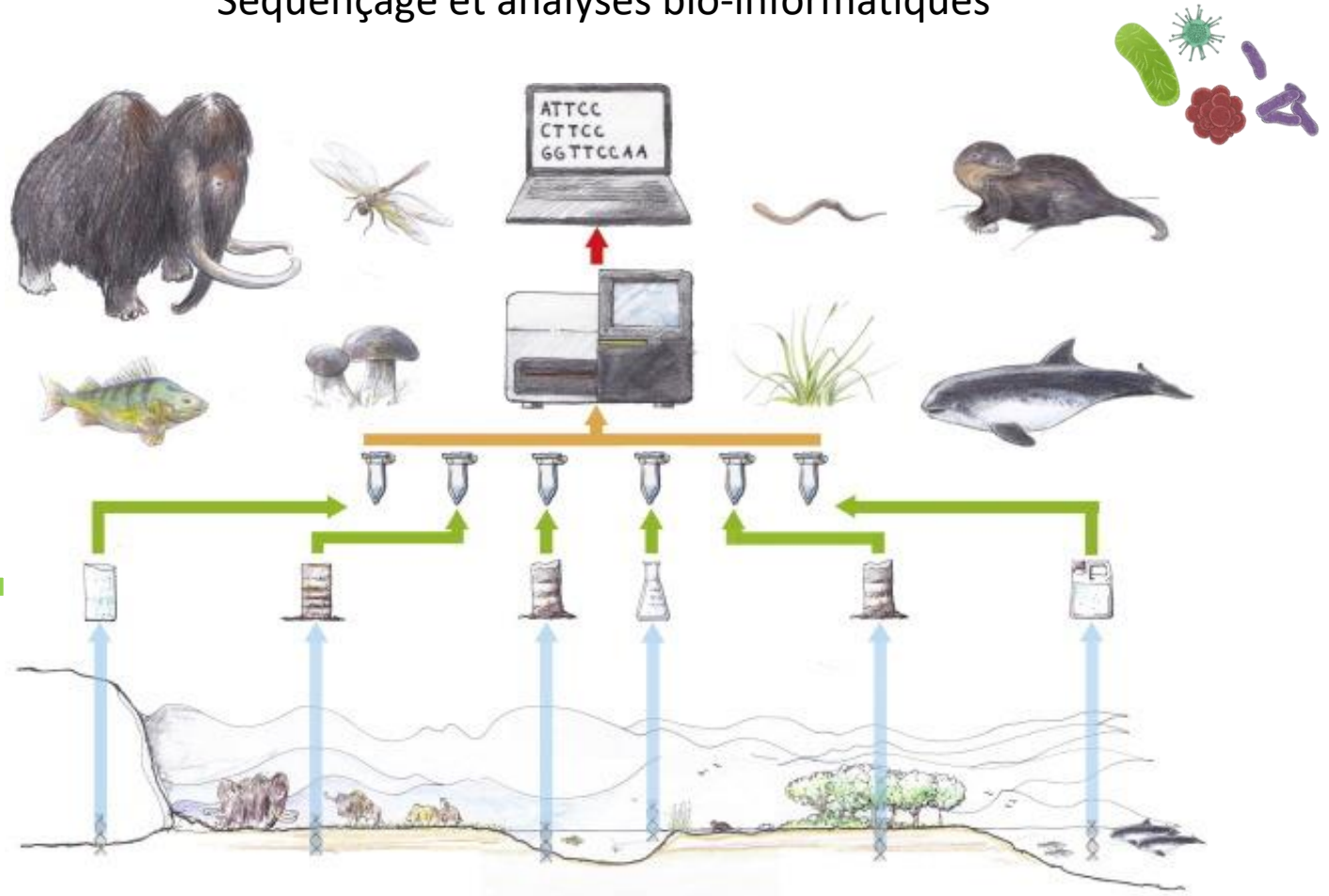
# Résumé



Isolation et cultivation



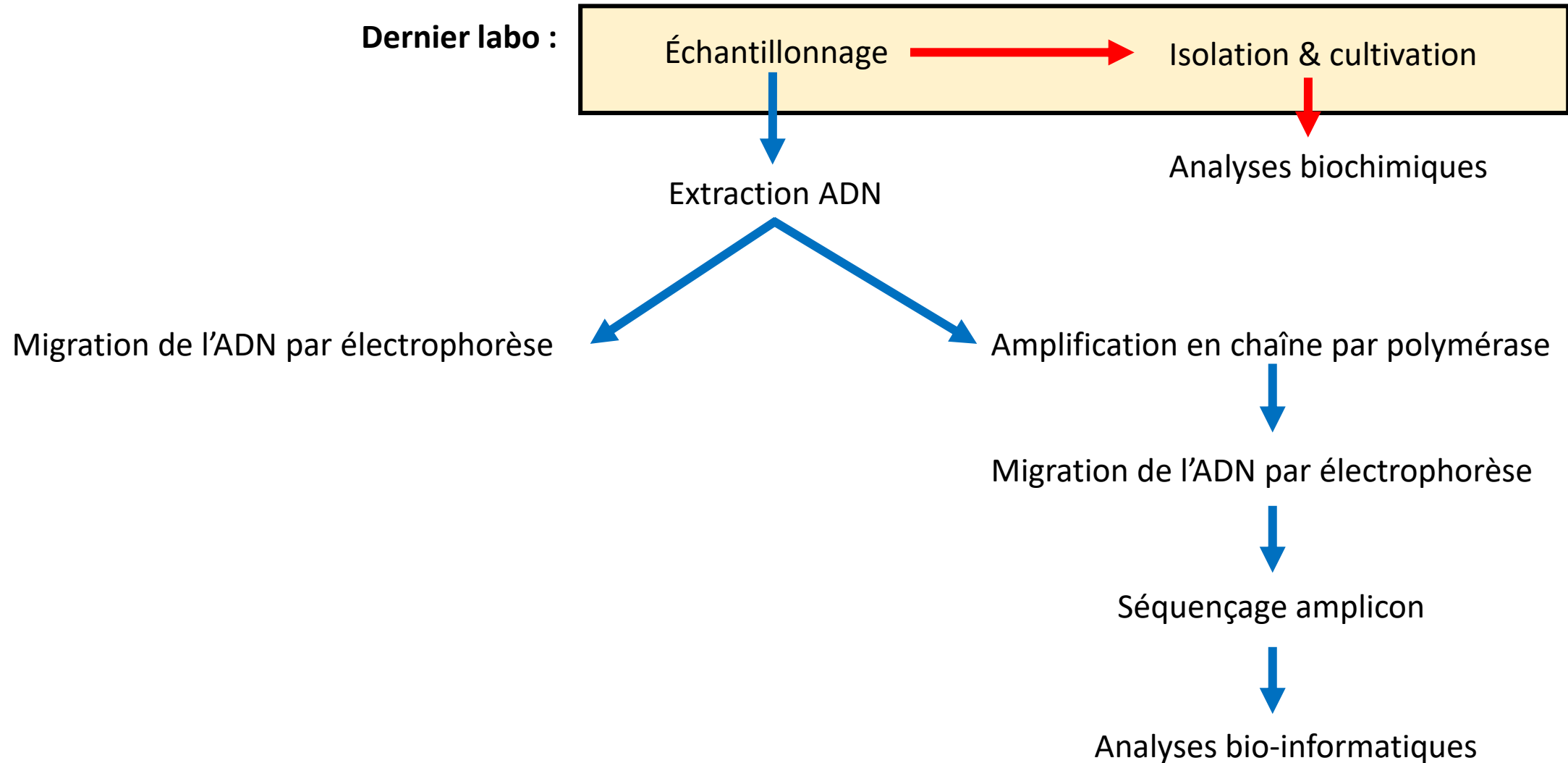
Séquençage et analyses bio-informatiques



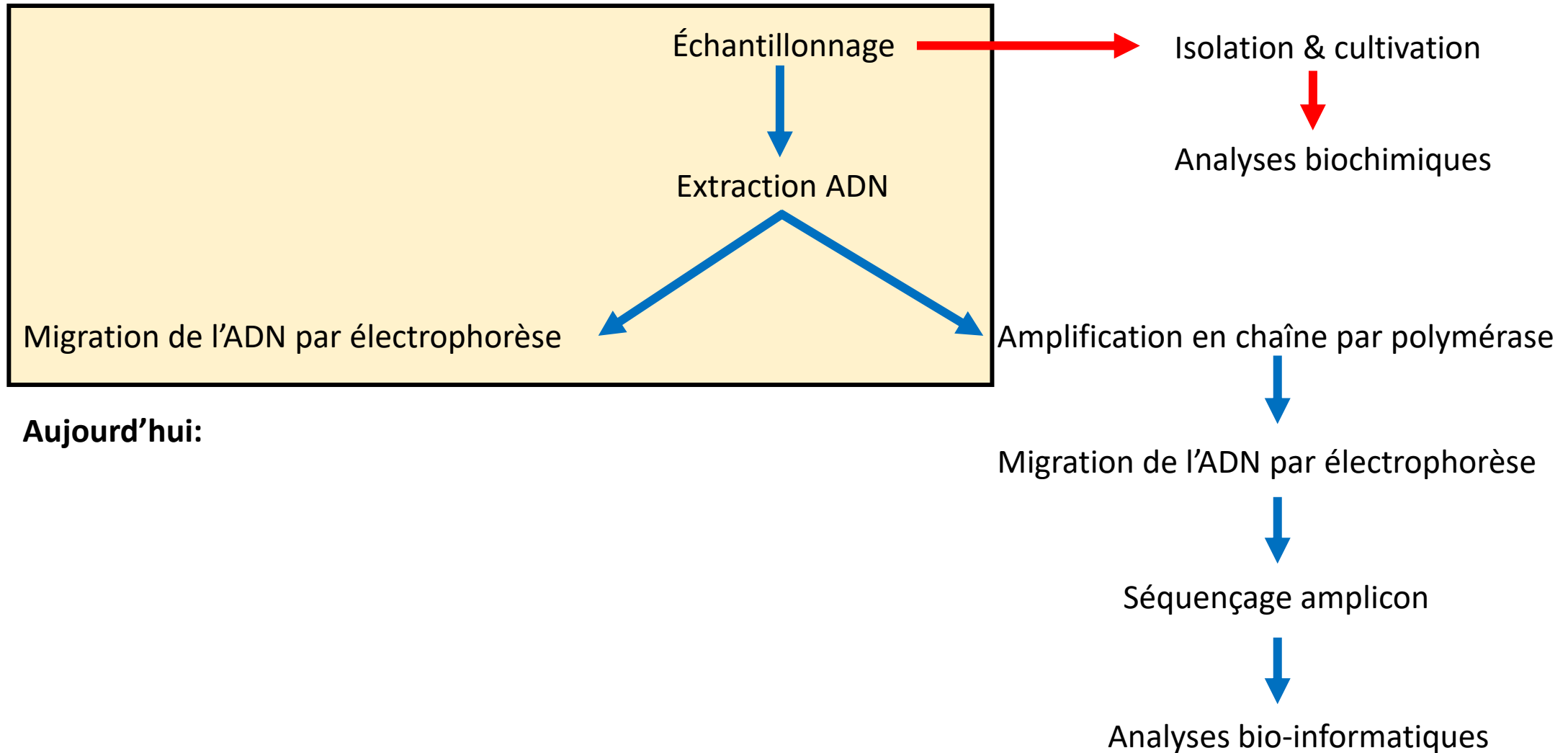
# Résumé



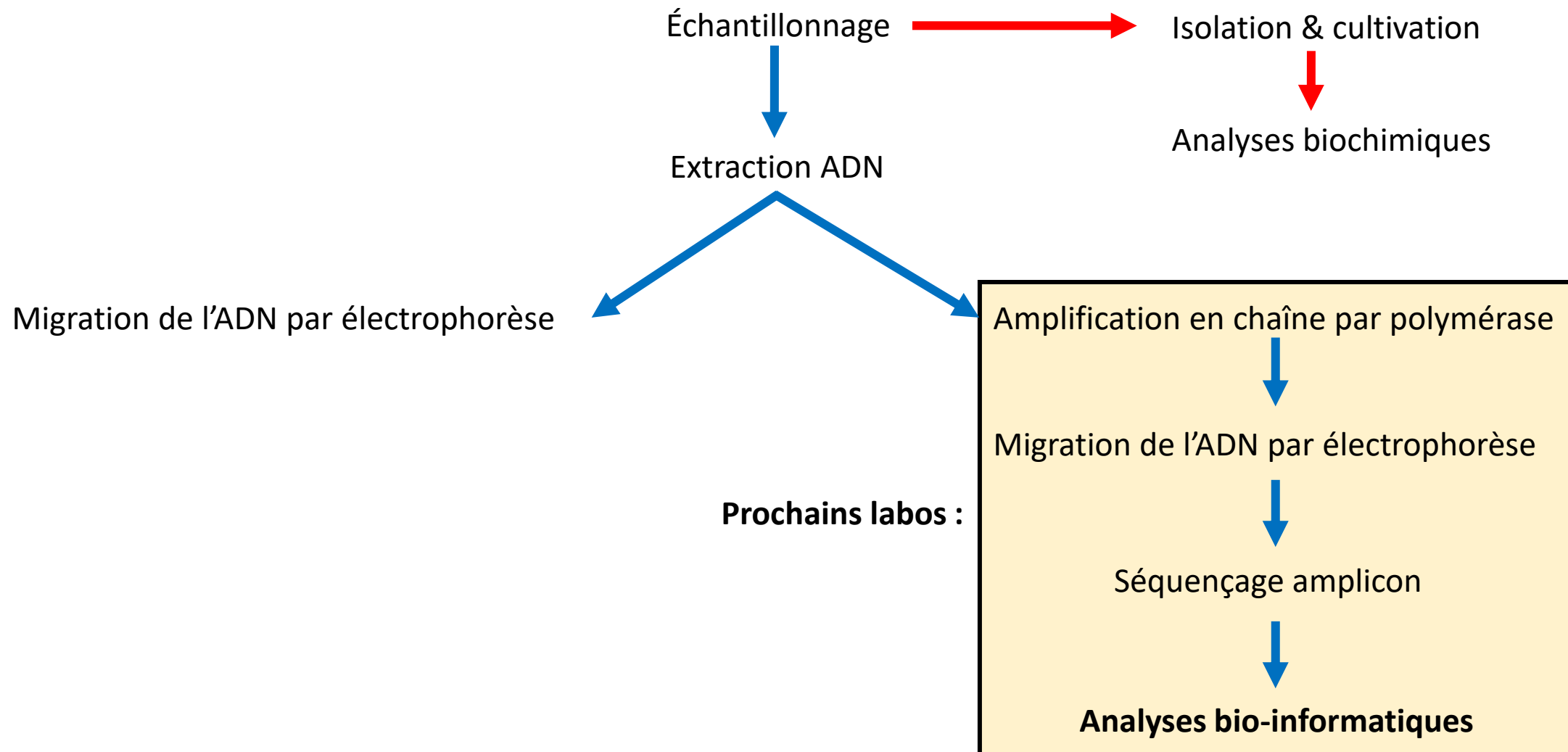
**Dernier labo :**



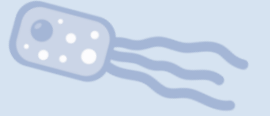
# Résumé



# Résumé



# Plan de la séance



- Résumé d'une étude avec ADNe
- Théorie et exercices à faire
  - # 1 – Échantillonnage de vos microbiomes
  - # 2.1 – Extraction de l'ADN de bactéries *Escherichia coli*
  - # 2.2 – Électrophorèse sur gel d'agarose
  - # 3 – Observation des colonies sur vos géloses avec le binoculaire
- Explication du rapport





# Exercice #1 – Échantillonnage de vos microbiomes



**[Observer s'il y a des colonies sur vos géloses de la semaine passée]**

**2 échantillons par personne**

Pour la bouche (sous la langue)

- Frotter pendant **5 secondes** un écouvillon sous la langue
- Déposer l'écouvillon dans l'Eppendorf contenant la solution de lyse et bien mélanger pour extraire le plus d'échantillons (frotter contre les parois du tube en écrasant).

Pour la main dominante (paume, entre les doigts et pointe des doigts)

- Trempez un écouvillon stérile dans la solution d'eau physiologique.
- Frotter en tournillant l'écouvillon pendant **5 secondes** sur la paume, entre les doigts et au bout des doigts de la main dominante.
- Déposer l'écouvillon dans l'Eppendorf contenant la solution de lyse et bien mélanger pour extraire le plus d'échantillons (frotter contre les parois du tube en écrasant).



**Identifiez votre échantillon avec votre numéro assigné et L pour langue ou M pour main**

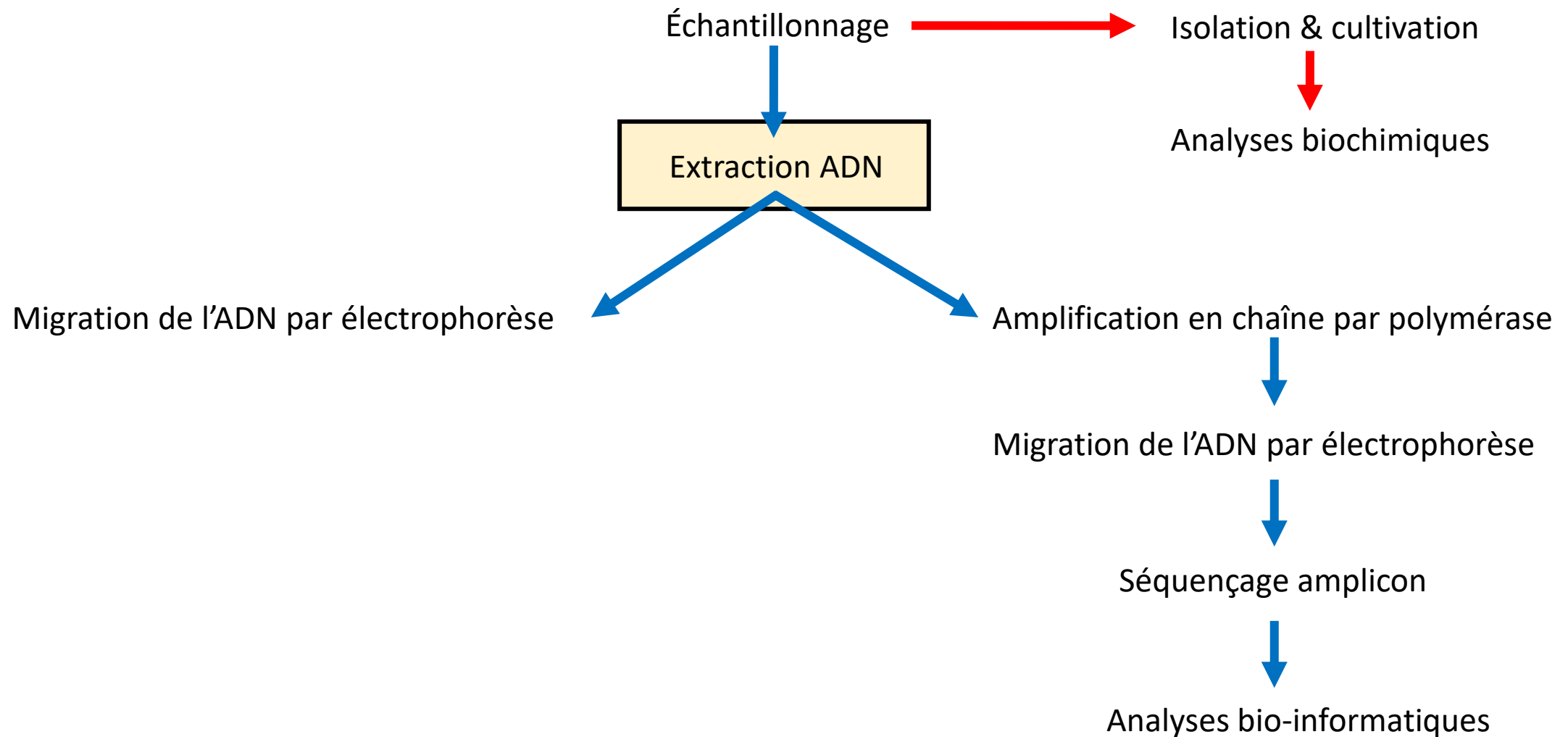
# Plan de la séance



- Résumé d'une étude avec ADNe
- Théorie et exercices à faire
  - # 1 – Échantillonnage de vos microbiomes
  - # 2.1 – Extraction de l'ADN de bactéries *Escherichia coli*
  - # 2.2 – Électrophorèse sur gel d'agarose
  - # 3 – Observation des colonies sur vos géloses avec le binoculaire
- Explication du rapport



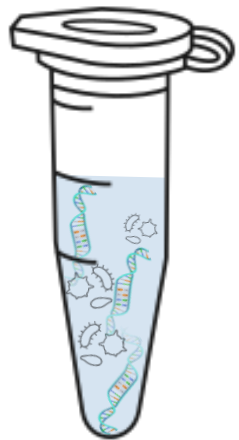
# Résumé



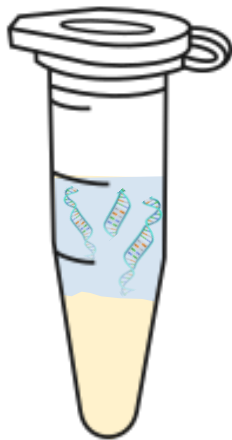
# 5 étapes de l'extraction de l'ADN



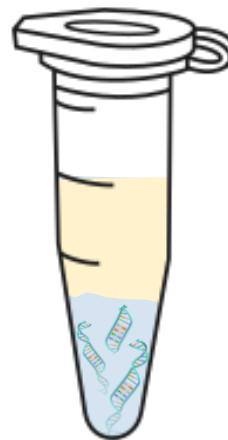
1. Lyse des cellules (chimique / physique / enzymatique)
2. Séparation de l'ADN des débris cellulaires (protéines, inhibiteurs, autres acides nucléiques)
3. Isoler l'ADN
4. Purification (élimination d'autres contaminants possibles)
5. Éluion



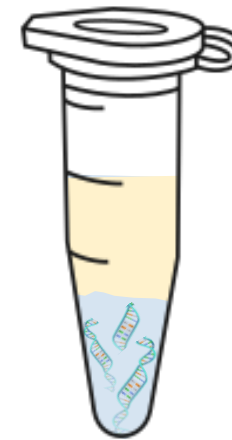
Universal Buffer Digestion



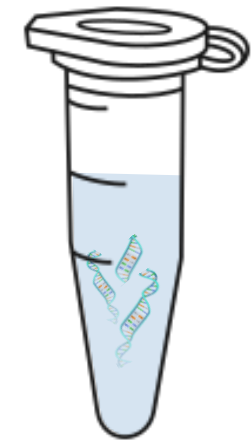
Buffer PB



Isopropanol



Éthanol



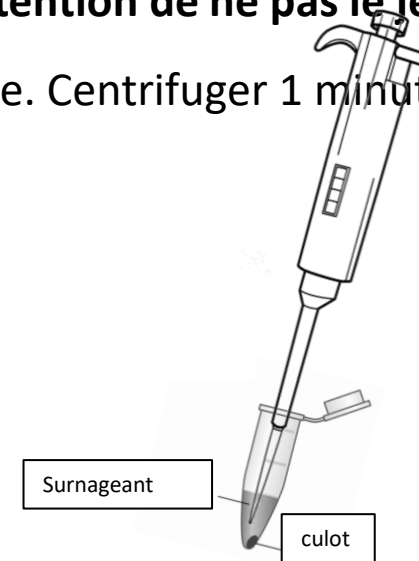
Buffer TE

# Exercice #2.1 – Extraction de l'ADN (*E. coli*)



La **lyse chimique** des cellules aura préalablement été effectuée.

1. Ajouter **200 µl** (P200) de **Buffer PB**, mélanger en inversant le tube (**identifié**), incuber à -20°C pendant 5 minutes. (**Séparation de l'ADN**)
2. Centrifuger 5 minutes à 12, 000 x g. Transférer le surnageant (P200) dans un nouveau tube Eppendorf (**identifié**). (**ne pas transférer le culot --> débris cellulaires**)
3. Ajouter **600 µl** (P1000) d'**isopropanol**. Mélanger en inversant 5 fois le tube. Incuber à température ambiante de 2 à 5 minutes. Centrifuger 5 minutes à 12, 000 x g, jeter le surnageant (P200) dans un bécher. (**Isolation de l'ADN par précipitation**) Le culot (=ADN) sera très petit, faites attention de ne pas le jeter.
4. Ajouter **1 ml** (P1000) d'**éthanol**. Mélanger en inversant 10 fois le tube. Centrifuger 1 minutes à 12, 000 x g, jeter le surnageant (P200). (**Purification**)
5. Répéter l'étape 4.
6. Laisser sécher le culot 5 minutes à température ambiante (couvercle ouvert).
7. Ajouter **100 µl** (P200) de **buffer TE** au culot. (**Élution**)



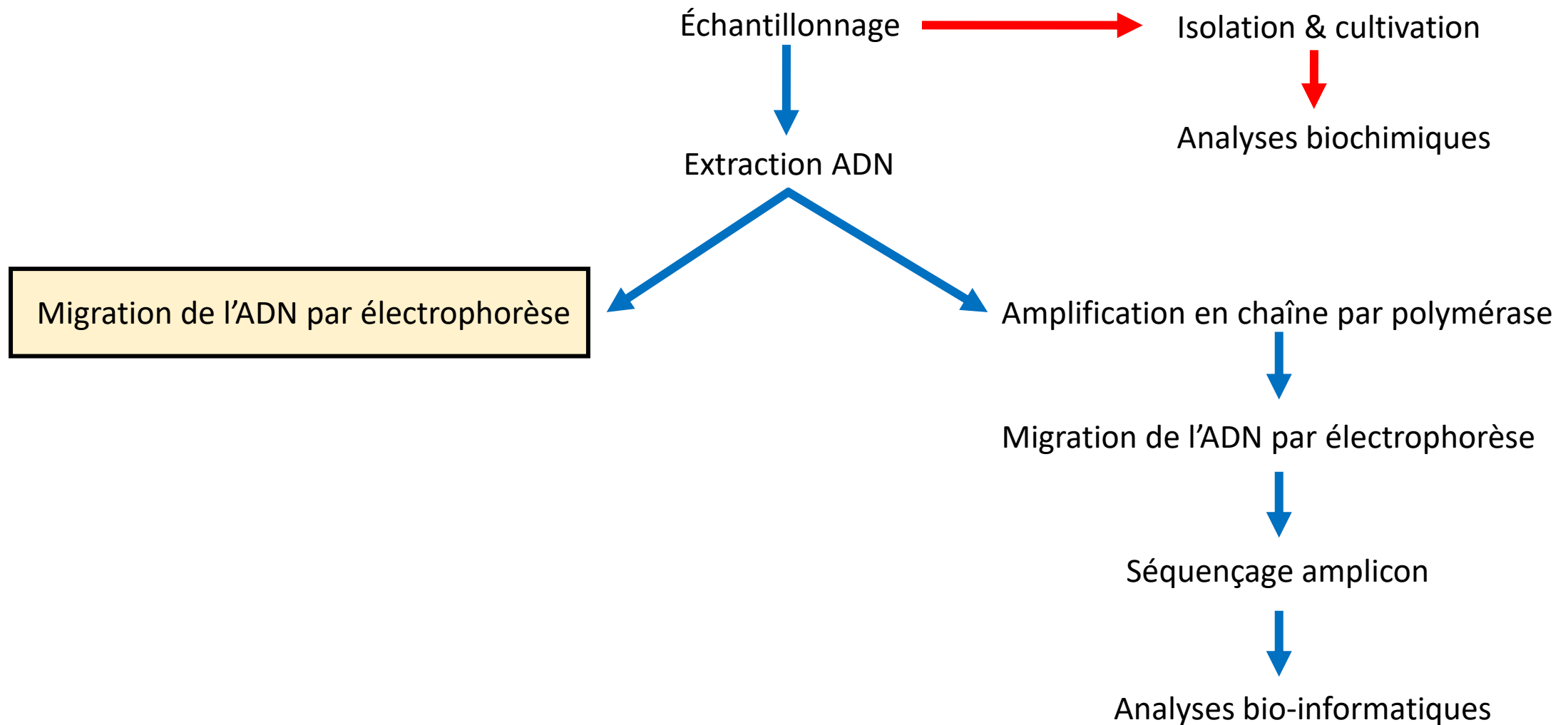
# Plan de la séance



- Résumé d'une étude avec ADNe
- Théorie et exercices à faire
  - # 1 – Échantillonnage de vos microbiomes
  - # 2.1 – Extraction de l'ADN de bactéries *Escherichia coli*
  - # 2.2 – Électrophorèse sur gel d'agarose
  - # 3 – Observation des colonies sur vos géloses avec le binoculaire
- Explication du rapport



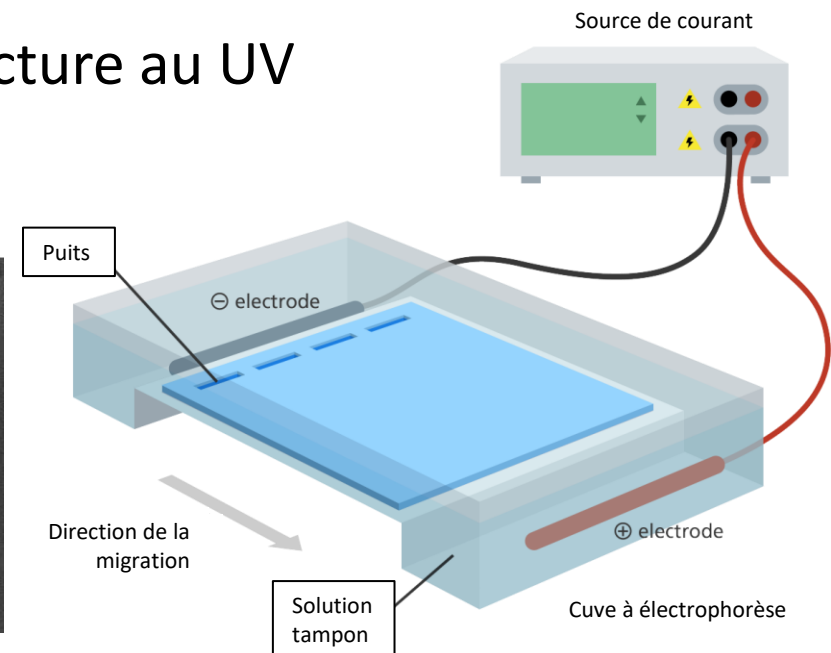
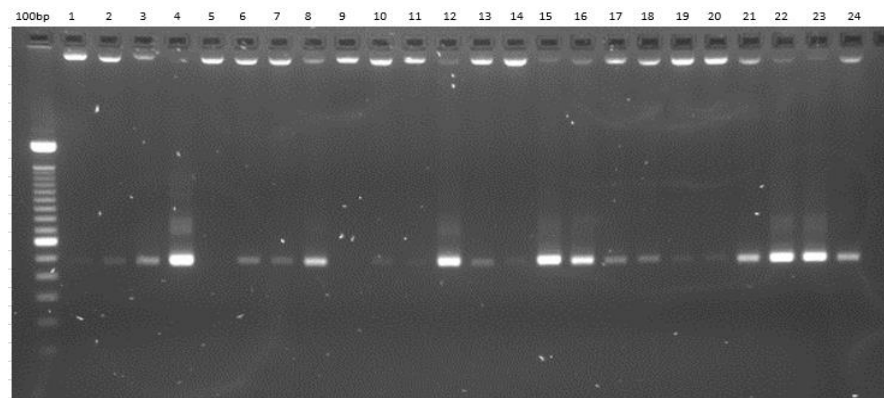
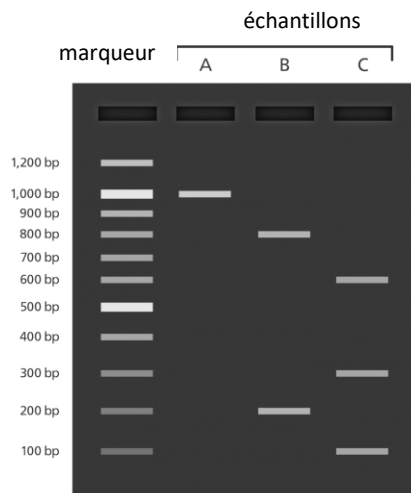
# Résumé



# Migration de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose



- L'ADN est chargé négativement et va donc migrer vers le pôle positif
- Les molécules de plus petites tailles vont migrer plus rapidement et loin
- Permet de séparer des molécules chargées en fonction de masse moléculaire
- Utilisée pour vérifier la présence d'ADN et estimer la masse moléculaire (échelle de marqueur de taille)
- Ajout d'un colorant au gel pour permettre la lecture au UV



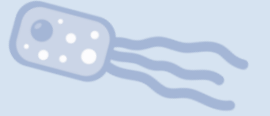


## Exercice #2.2 – Migration de l'ADN par électrophorèse sur gel

- Déposer **10 µl** de votre **ADN** dans le tube Eppendorf contenant le **colorant**.
- Les démonstrateurs déposeront **10 µl** de **marqueur de taille** dans le premier puit du gel de votre paillasse.
- Pipeter le **12 µl** de votre mélange **ADN – colorant** et le déposer dans un des puits du gel en faisant bien attention de ne pas déchirer le gel.

Les démonstrateurs s'occuperont du reste des étapes (voir protocole).

# Plan de la séance



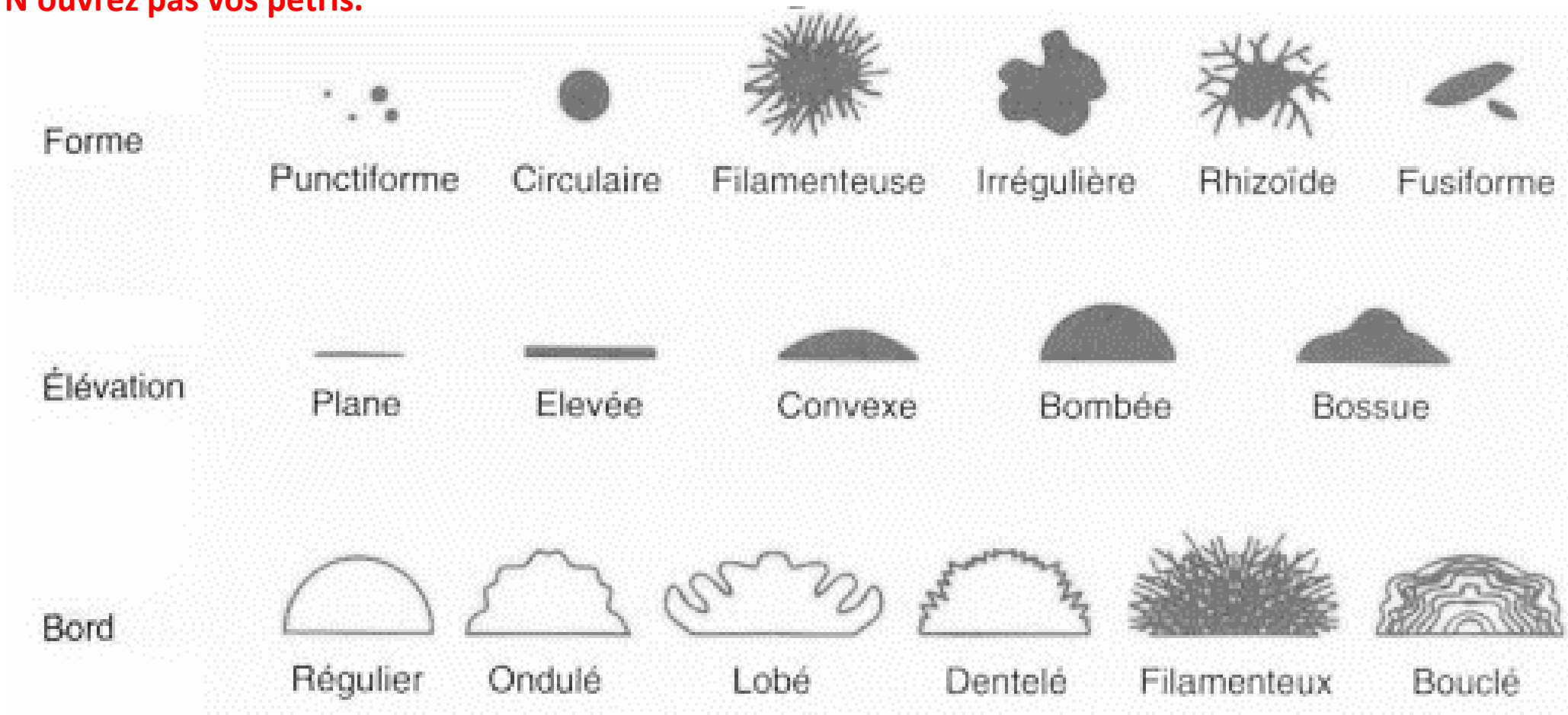
- Résumé d'une étude avec ADNe
- Théorie et exercices à faire
  - # 1 – Échantillonnage de vos microbiomes
  - # 2.1 – Extraction de l'ADN de bactéries *Escherichia coli*
  - # 2.2 – Électrophorèse sur gel d'agarose
  - # 3 – Observation des colonies sur vos géloses avec le binoculaire
- Explication du rapport



# Exercice #3 – Observation des colonies sur vos géloses



- Observez à l'aide de la loupe binoculaire. Décrivez.
- **N'ouvrez pas vos pétris.**



# Plan de la séance



- Présentation des notions théoriques
  - Extraction de l'ADN
  - Électrophorèse sur gel d'agarose
- Protocoles des exercices à faire
  - # 1 – Échantillonnage de vos microbiomes
  - # 2.1 – Extraction de l'ADN de bactéries *Escherichia coli*
  - # 2.2 – Électrophorèse sur gel d'agarose
  - # 3 – Observation des colonies sur vos géloses avec le binoculaire
- Explication du rapport



# Rapport



Remise sur Moodle le **1 avril 2025** (1 par équipe)

Les rapports de laboratoire doivent être soumis en format **Word** sur **Moodle**

Retard dans la remise des travaux

Tout retard, quels que soit le travail et l'unité/cours, sera sanctionné comme suit

**10% de pénalité/jour supplémentaire.**

Aucun document ne sera accepté au-delà de 5 jours après la date prévue de remise

Plagiat. Tout travail écrit soumis fera l'objet d'une recherche systématique sur internet via un logiciel anti-plagiat

- Citer vos sources
- Ne copier pas vos sources mot par mot
- Faites vos propres travaux
- ChatGPT peut être un bon outil (des idées, brève synthèse d'un sujet, traduction [DeepL]), mais il n'est pas des bonnes sources d'information scientifique.

Rappel : l'utilisation de ChatGPT, etc... pour générer en totale ou partielle vos rapports sans le citer tombe sous « l'utilisation totale ou partielle du texte d'autrui en le faisant passer pour sien ou sans indication de référence »

# Rapport



Grille d'évaluation

<b>RESPECT DES CONSIGNES DE MISE EN FORME ET ORTHOGRAPHE</b>	<b>5</b>
<b>APPRÉCIATION GÉNÉRALE</b>	<b>5</b>
<b>RÉFÉRENCES / BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>5</b>

## **RÉSUMÉ - 200 mots max (5 points)**

---

Phrase de mise en contexte	1
Objectif	1
Méthodologie	1
Résultats principaux	1
Conclusions	1

## **INTRODUCTION (15 points)**

---

Mise en contexte (problème à résoudre)	5
Objectifs et hypothèses	5
Méthodologie sommaire	5

# Rapport



## MÉTHODOLOGIE [Il ne faut pas énumérer chaque étape d'une technique] ( 25 points)

---

### Échantillonnage (4 points)

Écouvillonnage	4
----------------	---

### Extraction de l'ADN (4 points)

Principales étapes d'une extraction d'ADN	2
---	---

Description sommaire des principales étapes	2
---	---

### PCR (5 points)

Objectif	1
----------	---

Principales étapes	2
--------------------	---

Région amplifiée et amorces	2
-----------------------------	---

### Séquençage (2 points)

Objectif	1
----------	---

Instrument utilisé	1
--------------------	---



## MÉTHODOLOGIE ( 25 points) (suite)

---

### Traitement bio-informatique des séquences (7 points)

Objectif	1
Principales étapes du traitement des séquences	2
Classification	2
Statistiques utilisées	2

### BLAST (3 points)

Objectif	1
ASV (Variant de séquence d'amplicon   amplicon sequence variant) sélectionné	1
Paramètres de la recherche BLAST	1



# Rapport



## RÉSULTATS (15 points)

**Aucune interprétation ne doit être faite à cette étape, ni présentation des méthodes**

---

### Analyser le microbiome des deux habitats ( 12 points)

Différences de richesse ( <i>boxplot</i> )	4
Différences de composition (ordination, PERMANOVA)	4
Différences de taxons abondants	4

### Classification par BLAST (3 points)

Identification d'un ASV par BLAST	3
-----------------------------------	---

## DISCUSSION (25 points)

---

### Comparer le microbiome (19 points)

Il y a-t-il une différence significative entre les régions / caractéristiques?	6
Comment se compare votre conclusion avec celle de la littérature? (3 études)	6
Pourquoi croyez-vous qu'il y a une différence/similarité? (forces/faiblesses du protocole)	5
Pourquoi certaines séquences ne peuvent être identifiées?	2

### Détaillez l'écologie d'un taxon (6 points)

Description du taxon choisi (gram + / - ; Classification taxonomique ; etc...)	2
Distribution et habitat	2
Adaptations	2

The background of the slide is a dense, repeating pattern of various microorganisms. These include green, multi-lobed amoeba-like cells; green, rod-shaped bacteria with flagella; green, chain-like structures of cocci; and various other smaller, irregular shapes in shades of green and grey. The pattern is scattered across the entire slide, creating a textured, scientific backdrop.

# Questions ?