

1- Objectif / principe

La Biomasse moléculaire Microbienne (BMM) est estimée par électrophorèse en gel d'agarose 1% en regard d'une gamme d'étalonnage de concentrations connues d'ADN de thymus de veau). C'est une estimation de la fluorescence après coloration au bromure d'éthidium couplée à une analyse d'image qui permet d'évaluer la BMM.

Cette analyse comprend donc trois étapes dont tous les aspects techniques ont été établis

- Electrophorèse en gel d'agarose 1% (contrôle du volume d'agarose, du front de migration, du volume déposé)
- Coloration au BET et prise d'image (contrôle de l'exposition et de la saturation)
- Analyse d'image sous le logiciel ImageQuant TL

Ce document explique la démarche mise au point par la plateforme et les points de vigilance. Il est certainement possible d'adapter ces protocoles à d'autres équipements.

2- Consignes de sécurité

- Port de la blouse et de gants nitrile
- Port de lunette pour la manipulation de l'agarose chaud
- Pour la manipulation du BET : surblouse, manchettes, surchausses et sous sorbonne

3- Matériel et produits nécessaires

Matériel

- Cuves électrophorèse – Bio-Rad gamme *Sub Cell GT system* (cuves, supports, peignes de 20 puits)
- Générateurs
- Imageur
- Sorbonne
- Micropipettes
- Logiciel d'analyse d'Image (ImageQuant TL)
- Bain-marie
- Vortex

Consommable

- Pointes micropipettes
- Parafilm
- Gants
- Microtubes 2mL ; 0,5mL

Produits

- Agarose
- Bleu de dépôt
- Tris-EDTA (TE) 1X
- TBE 1X qualité bio mol (ATTENTION : PAS DE TAE)
- BET ou autre intercalant
- DNA Ladder 1KB - Invitrogen référence Fischer Scientific 11578636
- ADN de thymus de veau – DNA Quantitation Kit, Fluorescence Assay – MERCK SIGMA – référence DNAQF-1KT
- Eau UP

4- Méthode

Partie 1 : ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE 1%

1. Diluer l'ADN brut obtenu après extraction et AVANT purification au 1/5 dans de l'eau UP. La prise d'essai de la dilution doit impérativement être de 10µL pour être représentative de l'échantillon initial.
2. Préparer une gamme d'ADN de thymus de veau à partir du *kit DNA Quantitation Kit Fluorescence Assay* de MERCK-SIGMA. Il est recommandé de vérifier la concentration du tube mère au préalable annoncée à 1mg/mL. Le diluant sera du TE 1X.
 - Préparer un tube à 25ng/10µL et l'incuber 30 minutes à 37°C puis une nuit à 4°C
 - A partir du tube 25ng/µL, préparer 9 points de gamme avec un facteur ¾ dans du TE aux concentrations finales (18,7 ; 14,6 ; 10,55 ; 7,91 ; 5,93 ; 4,45 ; 3,34 ; 2,5ng/µL). Vortexer entre chaque point de dilution.
 - Eliminer les points 10,55 ; 5,93 ; 4,45 et 3,34ng/µL qui ne servaient qu'à faire la cascade de dilutions.
 - Conserver les dilutions à 4°C
3. Préparer du gel agarose 1% avec de l'agarose qualité bio mol et du TBE 1X et couler le gel dans le support adapté pour le protocole. La plateforme utilise le matériel Bio-Rad et les supports de la taille suivantes pour lesquels ont été adaptés : le volume de gel, le nombre d'échantillons et le nombre de peignes 20 puits.
 Un peigne de 20 puits permettra de déposer 5 points de gamme et 12 échantillons séparés et encadrés par 3 marqueurs de taille (DNA ladder 1KB).

Taille gel tray (cm) = support	Nombre de peignes de 20 puits	Nombre de place pour les échantillons
15 x 10	1	12
15 x 20	2	2*12 = 24
15 x 25	3	3*12 = 36

4. Une fois polymérisé, placer le gel dans la cuve électrophorèse dédiée (cuve Bio-Rad) et
 - Déposer 10µL de chaque point de gamme avec 5µL de tampon de charge
 - Déposer 10µL d'ADN brut préalablement dilué avec 5µL de tampon de charge (bleu de dépôt).
 - Encadrer les dépôts de gamme et d'échantillons avec 5µL de marqueur de taille. Il en faut au minimum 1
5. Procéder à une migration à ampérage constant de 70mA sans dépasser 100V dans du TBE 1X pendant 1 à 2 heures. La migration doit atteindre au moins la moitié du gel. Attention, dans le cas où il y aurait 2 peignes sur un seul gel, il faudra veiller à couper le gel en deux après 15 minutes de migration. En effet, des éléments co-extraits migrent plus vite que le front de migration et peuvent « contaminer » les dépôts suivants.

Partie 2 : COLORATION DU GEL D'AGAROSE 1%

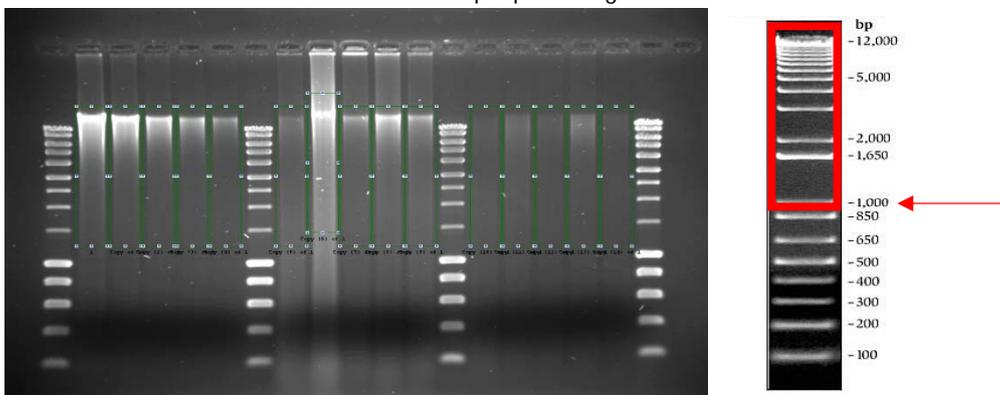
La plateforme a choisi de limiter l'utilisation du BET à une pièce dédiée et de colorer les gels par des bains en conditions contrôlées. Il est possible (selon vos équipements) d'intégrer le BET ou autre intercalant directement au gel. Dans ce cas, aller directement à l'étape 2 de cette partie.

1. Procéder à une coloration du gel sous sorbonne (porter l'équipement de protection adéquat)
 - 15-30 minutes dans un bain d'eau contenant quelques gouttes de BET
 - 5-10 minutes dans un bain d'eau
2. Prendre la photo par peigne de 20 puits.
 - Placer le gel au centre de l'imageur. Les puits doivent être droits, tous visibles et le gel cadré
 - Régler la taille, la netteté et allumer les UV
 - Régler la fluorescence à la limite de la saturation. C'est-à-dire que la fluorescence observée doit être à son maximum sans saturer et prendre la photo.
 - Récupérer la photo au format informatique

Partie 3 : ANALYSE D'IMAGE et ESTIMATION DE LA BIOMASSE MOLEULAIRE MICROBIENNE

La plateforme a choisi de travailler avec le logiciel ImageQuant TL qui permet une estimation précise de la fluorescence. D'autres logiciels d'analyse doivent être utilisables. La gamme servira de vérification dans ce cas.

1. Estimer les valeurs de fluorescence de chaque piste du gel



- Tracer des rectangles IDENTIQUES sur chaque piste (gamme & échantillon). La taille du rectangle sera déterminée par le marqueur de taille entre le poids maximum et le poids de 1000pb.
- Estimer la fluorescence avec la méthode médiane dans chaque rectangle (fonction *Local Median* dans ImageQuant)
- Exécuter la mesure pour obtenir une valeur quantitative par rectangle sous le format Excel.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Name	Volume	Volume + Background	Background	Background	Background	Median Intensity	Average Intensity	Mode Intensity	Std Error	
1	-8981827,00	856065981,0	865047808,0	54501,50	Local Median	54144,00	53935,61	54002,00	835,4	
2	Copy of 1	-21397646,00	843293042,0	864690688,0	54479,00	Local Median	53948,00	53130,86	54233,00	2225
3	Copy (2) of 1	-47689790,00	815548610,0	863238400,0	54387,50	Local Median	53486,00	51382,85	54048,00	4970
4	Copy (3) of 1	-54825974,00	804206346,0	859032320,0	54122,50	Local Median	53103,00	50668,24	54026,00	5724
5	Copy (4) of 1	-80892616,00	777227064,0	858119680,0	54065,00	Local Median	52754,50	48968,44	53321,00	8241
6	Copy (5) of 1	-81205034,00	768034262,0	849239296,0	53505,50	Local Median	52063,50	48389,26	52956,00	7230
7	Copy (6) of 1	-87232145,00	754102895,0	841335040,0	53007,50	Local Median	51428,00	47511,52	52037,00	8051
8	Copy (7) of 1	-70572733,00	7691354,0	839708160,0	52905,00	Local Median	51506,00	48458,63	52400,00	6399
9	Copy (8) of 1	-85198142,00	754430658,0	839628800,0	52900,00	Local Median	50984,00	47532,17	52584,00	7545
10	Copy (9) of 1	-69948921,00	773481223,0	843430144,0	53139,50	Local Median	51799,00	48732,44	52239,00	6754

- Tracer la droite d'étalonnage à l'aide des valeurs connues de la gamme et en déduire la concentration dans les échantillons. La valeur rapportée en ng d'ADN extrait par gramme de sol correspond à la biomasse moléculaire microbienne de l'échantillon. Pour faire ce calcul, il faut tenir compte des dilutions préalables et de la réduction de l'échantillon au cours de l'extraction d'ADN. Attention, pour être valable, le dosage doit respecter certains critères :
 - Le R² de la droite doit être supérieur à 0,9
 - Les échantillons doivent être entre les points max et min de la droite si ce n'est pas le cas, recommencer le gel avec une dilution plus ou moins forte de votre échantillon (90% des échantillons entrent dans la gamme avec une dilution au 1/5)

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