République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire de Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'odre :
Série :

Spécialité : Biochimie

Mini-Projet

Thème :

Identification moléculaire bactérienne par séquençage du gène ADNr16S : Essai d'extraction, purification et identification de l'ADN bactérien.

Présenté par :

BENSALAH Nafissa

KAHMOUSSE Aziza

GHERASSI Asma

Promoteur : BOUBENDIR A.

Année Universitaire 2011/2012

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Remerciement

Nous remercions à tous cœur le bon Dieu de nous avoir

Donné force et courage pour accomplir ce travail;

Nous remercions notre promoteur Mr BOUBENDIR A. pour avoir

suivi et dirigé ce travail avec patience et pour précieuse aide

Sa compétence et sa présence;

Nous tenons à remercier également Mr KALAB R.

Pour sa précieuse aide;

Notre remerciement s'adresse pour l'ensemble des enseignants du

département de Biologie pour nous avoir transmis le savoir dans notre

centre universitaire.

Nafissa
Aziza
Asma

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

A : Adénine

T : Thymine

C : Cytosine

G : Guanine

°C : Degré Celsius

DNTP : Désoxyribonucléotide Triphosphate

DDNTP : Didésoxyribonucléotide triphosphate

PCR : Polymérase Chain Réaction

PCR-RADP : Randon Amplified Polymorphisme DNA

DGGE : Denaturant Gradient Gel Electrophoresis

RFLP : Restricted Fragment Lenght Polymorphism

µM : Micromolaire

mM : Milimolaire

nm : Nanomètre

rpm : Rotation par minute

µl : Microlitre

abs : absorbance

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Liste des figures

Figure01 : Réaction de polymérisation en chaine (PCR).

Figure 02 : la séparation des ADN sur gel d'électrophorèse

Figure03 : l'étape de l'électrophorèse

Figure 04 : Séquençage de l'ADN

Figure 05 : différentes étapes de l'extraction de l'ADN bactérien.

Figure 06 : Dépôt des produits de PCR dans les puits d'électrophorèse.

Figure 07 : La cuve d'électrophorèse après la migration.

Figure 08 : La visualisation des bandes d'ADN.

Figure 09 : Recherche et identification de l'ADN bactérienne

Figure 10 : Congélateur (Thermo Scientific)

Figure 11 : Centrifugeuse (Sigma)

Liste des tableaux

Tableau 01 : matériel et produits d'extraction d'ADN bactérien.

Tableau 02:solution mixte de la PCR ADNr16S.

Tableau 03: solution mixte de la PCR-RADP.

Tableau 04 : Matériel et produits de l'électrophorèse

Tableau 05 : Mélange réactionnel pour la PCR de séquençage.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Table des matières

Introduction……...01

Partie bibliographique

1. Extraction de l'ADN bactérien …… …….02

2. Purification d'ADN……02

2.1. Précipitation par l'éthanol……02

2.2. Estimation quantitative et qualitative de l'ADN…….03

2.3. Conservation de l'ADN pur ……...03

3. La réaction de polymérisation en Chain (PCR) …….....03

3. 1 .Le principe de la méthode PCR…….....04

3. 2. La réalisation pratique …….....04

3.2.1. Dénaturation de l'ADN……....04

3.2.2. Hybridation des amorces…….04

3.2.3. Extension…….05

4. Electrophorèse……...07

4. 1 .L'électrophorèse sur gel d'agarose……....07

5. Séquençage de l'ADN……..10

5.1. La méthode de Sanger……10

6. Analyse bio informatique……..13

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Partie expérimentale

I. Séquençage du gène ADN r 16S……..14

1. Extractionde l'ADN……..14

2 .PCR ……..17

2.1. Composition de la solution mixte pour la PCR ADNr16S…….....17

2.2. Composition de la solution mixte pour la PCR-R.A.D.P……..17

2.3. La purification des produits de PCR…….18

3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose……...19

4. Réaction de séquençage……....23

4.1. PCR de séquençage ……..24

4.2. Purification des produits de séquençage……...24

5. Analyse bioinformatique des séquences…….....25

II - Essai d'extraction et d'identification de l'ADN bactérien……....27

2 –Matériel et méthodes……..27

2-1-Matériel……..27

2-2-Méthode ……....27

3 - Résultats et discussion……....31

III.Conclusion et perspectives…….37

Annex……..32

Bibliographie……38

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Introduction :

Les bactéries s'installent partout ou la vie est possible, sont plus nombreux que n'importe quel autre type d'organisme;et constituent probablement le composant le plus important de la biomasse terrestre.

La plupart des bactéries ne présentent que peu ou pas de danger et beaucoup s'avèrent indéniablement utiles à l'homme . Il ressort clairement que mieux nous connaitrons les bactéries, plus efficacement nous pouvons limiter leur potentialités nocives et tirer avantage de leur activités utiles.

Traditionnellement les bactéries isolées sont identifiées par leurs caractères morphologiques, culturaux, biochimiques et parfois antigéniques.Il s'agit essentiellement de comparer ces caractères avec ceux des bactéries déjà connues jusqu'à trouver une similitude, tout cela peut prendre beaucoup de temps. Aussi des méthodes d'identification moléculaire rapides basées sur l'ADN tel que la mesure de contenue en GC,l'hybridation de l'ADN, RFLP, DGGE, le séquençage de l'ADN ,etc .

La comparaison des séquences de gène ADNr 16S reste la plus importante et la plus utilisée ; ce qui nous amène à réaliser cette recherche qui se divise en deux parties : la première est une étude bibliographique qui explique les différentes étapes de l'identification moléculaire bactérienne qui passe au début par l'extraction et la purification de l'ADN bactérien , l'amplification par PCR , l'électrophorèse pour la séparation des produits PCR, puis l'étape du séquençage pour la détermination de la succession des nucléotides ; et enfin la comparaison de la séquence obtenue à l'aide du logiciel NCBI- BLAST .

La partie expérimentale renferme le matériel, les produits, et les protocoles qui permettent la réalisation pratique de différentes étapes jusqu'à l'obtention des résultats finaux.De plus notre travail est complété par un essai d'extraction et d'identification de l'ADN bactérien dans les laboratoires du département SNV au centre universitaire de Mila .

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

1. Extraction de l'ADN bactérien :

Pour travailler in vitro, on prépare les acides nucléiques (ADN) en lysant les cellules et en séparant les différent formes d'ADN. Point de départ : des colonies, ou un culot de culture liquide centrifugée (Singleton, 2005). Il est normalement possible d'isoler une quantité suffisante d'ADN pour la manipulation à partir de quelques millilitres de culture bactérienne, la suspension est centrifugée pour donner un agrégat cellulaire (Turner et *al.*, 2006).

Plusieurs méthodes sont disponibles pour digérer la paroi cellulaire des bactéries; parmi lesquels le choc thermique qui augmente la perméabilité de la membrane cellulaire à l'ADN ou par des solutions tampons contient des lysozymes :

- Chez les bactéries Gram-positives, le peptidoglycane de la paroi cellulaire peut être rompu avec du lysozyme tamponné.
- Chez les bactéries Gram-négatives, la membrane externe est le plus souvent rompue en chélates les cations qui la stabilisent, au moyen d'EDTA tamponné avec du tris , le lysozyme peut alors atteindre le peptidoglycane .L'EDTA inhibe les nucléases du lysat cellulaire et protège ainsi les acides nucléiques (Singleton, 2005) .

Extraction par le phénol :

C'est la méthode la plus lente mais parfaitement efficace, implique l'extraction du lysat par le couple phénol- chloroforme (Turner et *al.*, 2006) ,le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines (Moulessehoul,2009) il est non miscible avec la couche aqueuse mais lorsqu'il est vigoureusement brassé avec celle-ci et qu'on les laisse en suite se séparer, les protéines restantes sont dénaturées, elles forme un précipité à l'interface des deux couches (Turneret *al.*,2006)

2. Purification d'ADN :

2.1. Précipitation par l'éthanol :

L'ADN et l'ARN qui restent au niveau de la couche aqueuse sont ensuite concentrés par précipitation par ajout d'éthanol et de sels (acétate de sodium). (Turneret *al.*, 2000 ; kamoun et *al.*,2003).

Une centrifugation sur un gradient de chlorure de césium permet de séparer les différentes formes d'ADN, l'échantillon est déposéen surfaces d'une solution dont la densité augmente du haut vers le bas du tube à centrifugé (Singleton, 2005).

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

La centrifugation permettra la formation d'un agrégat d'acide nucléique qui peut être lavé et récupéré sous forme solide dans un plus petit volume. (Turner et *al.*, 2006; Moulessehoul, 2009).

2.2. Estimation quantitative et qualitative de l'ADN :

Cette estimation est indispensable après extraction de l'ADN, elle s'effectue par spectrophotomètre dans l'ultra violet à 260 nm, une unité de densité optique correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50µg/ml (Moulessehoul, 2009).

La lecture au spectrophotomètre permet aussi de vérifier la pureté de l'ADN, le rapporte des DO (260nm/280nm) est normalement voisin à 1.8, un rapport supérieur indique une contamination par des ARN ; s'il y'a contamination par des protéines (280 nm) ou du phénol (270nm), le rapport sera très inferieur à 1.8, lorsque l'ADN pur la quantité d'ADN peut être appréciée par lecture à 260nm (Etienne et *al.*, 2006).

2.3. Conservation de l'ADN pur :

L'ADN purifié est placé dans un solution tris-EDTA pour assurer sa conservation. Cette solution contient du tri HCl jouant le rôle de tampon (pH = 8) et une faible concentration en EDTA, qui chélate les ions Mg^{++} dans la solution.

On peut également ajouter la ribonucléase A (ARN ase A) à la solution pour dégréer tout ARN contaminant (Turner et *al.*, 2006).

3. La réaction de polymérisation en Chain (PCR) :

Cette technique (Polymerase Chain Réaction) est développée en 1985 par KarryMullis (Prix de noble de chimie en 1993) (Beaumont, 2007). Elle permet d'augmenter de manière considérable jusqu'à million de fois une séquence choisie d'ADN. Il s'agit d'une amplification in vitro par opposition à la méthode in vivo qui implique le clonage du fragment et l'amplification dans une bactérie (Kamoun et *al.*, 2003).

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

3. 1 .Le principe de la méthode PCR :

Il repose sur la capacité de l'enzyme ADN polymérase à synthétiser le brin d'un ADN de séquence comme servant de matrice , l'ADN à amplifier est déposé dans un milieu comportant des nucléotides (ATP, CTP, TTP, GTP), une ADN polymérase et du magnésium (Mg^{++}) indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs (Mohamed, 2006).

- **L'intérêt de la technique PCR :**

- Sa sensibilité elle peut amplifier des séquences d'ADN spécifiques à partir d'ADN présent à l'état de trace .comme l'ADN d'une unique cellule (Klug et *al*., 2006)
- Sa rapidité : elle permet de produire des milliards de copies d'un segment donné en quelques heurs (Campbell ; Reece 2007)
- Sa spécificité : les amorces doivent correspondre à des séquences unique dans l'ADN matrice (Coutouly et *al.*, 2009).

La PCR est la méthode de choix pour de nombreuses applications dans la biologie moléculaire (le clonage dans des vecteurs plasmidiques et le séquençage de l'ADN, la génétique humain, l'évolution, le développement,la conservation et les bases de données ADN de la police scientifique (Klug et *al.*, 2006).

3. 2. La réalisation pratique :

La PCR comporte des cycles successifs, chaque cycle comprend une succession de trois phases **(Fig 01):**

3.2.1. Dénaturation de l'ADN :

Au début du cycle l'ADN cible est séparé en deux brins en élevant la température jusqu'à 95°C pendant 30 secondes -1 minutes (Moulessehoul, 2009).Cette température est supérieure à la température de fusion Tm (Mouhamed, 2006).

3.2.2. Hybridation des amorces :

Après dénaturations , une diminution de la température entre 55° et 60°C pendent 30 seconde-1 minute (Moulessehoul, 2009) en présence d'un large excès des deux amorces , les amorces sont des oligonucléotides synthétique (15-30 nucléotides de long) complémentaire des séquences encadrant d'ADN cible à copier (Klug et *al* ., 2006) .

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Les amorces s'hybrident aux séquence complémentaire des deux brins d'ADN aux deux extrémités du fragments à amplifier (Etienne et *al* ., 2006) .

3.2.3. Extension :

L'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire dans le sens 5'→3' à partir de l'extrémité 3' OH libre de l'amorce (Etienne et *al* ., 2006). Cette phase est effectué à des températures comprises entre 70 – 72°C, cette phase prend 1-2 min (Moulesshoul, 2009).

L'ADN polymérase utilisée est la polymérase taq extraite de la souche bactérienne *Therm*us *aquaticus*. Et utilisée pour catalyser la réaction de la polymérisation (Mafteh et *al.*, 2007).

La taq polymérase est thermostable (n'est pas affecte par l'étape de dénaturation (95°c) au cours de différent cycle de la PCR (Madigan et martinko, 2007).

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

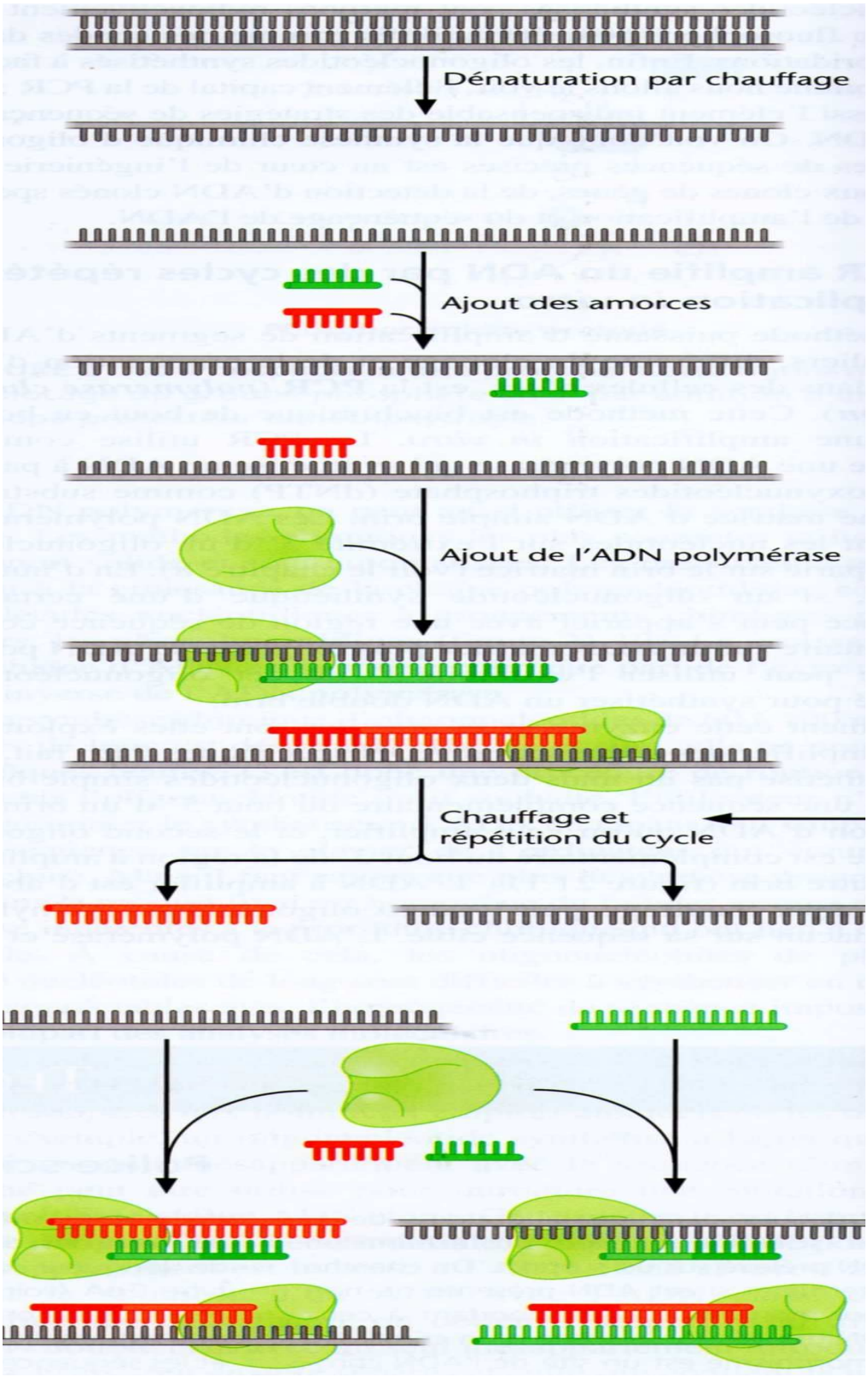


Figure01 : Réaction de polymérisation en chaine (PCR). (Watson et *al.*, 2009)

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

4. Electrophorèse :

Electrophorèse est une technique incontournable pour l'analyse des acides nucléiques. Cette technique couramment utilisée en génétique moléculaire permet de séparer des molécules d'un mélange par migration dans un champ électrique (Klug et al.,2006)

Dans l'électrophorèse sur gel , on dépose l'échantillon dans un puits à une extrémité du gel et on applique un voltage entre les deux extrémité (Singleton, 2005) (**Fig.02**) deux sortes de matrice de gel sont utilisées : le gel d'agarose et le gel de polyacrylamide (Watson et *al.*, 2009).Les indication de l'électrophorèse sont nombreuses : sothern bloth , PCR , séquençage … (Mouhamed, 2006).

4. 1. Electrophorèse sur gel d'agarose :

Le gel d'agarose est le support le plus souvent utilisé pour la séparation des fragments de 100pb à 30kpb en position horizontale (Kamoun et *al* ., 2003)

L'agarose est un polysaccharide dérivée d'un algue, il forme un gel solide lorsqu'il est dissout dans un solution aqueuse à des concentration entre 0.5 et 2% (Turner et *al* ., 2006)

L'ADN étant une molécule chargée négativement (au niveau des groupements phosphates). Il est possible de la faire migrer sous l'effet d'un champ électrique vers le pole positif (Biaumount, 2007).

Les molécules d'ADN sont flexibles et elles occupent un certaines volume, le gel agit à la manière d'un tamis moléculaire au travers duquel les molécules d'ADN en mouvement doivent passer ; les molécules de grandes tailles ont plus de difficultés pour passer à travers les mailles créées par le réseau des microfibres du gel et vont donc migrer plus lentement que les petits ADN. Après un certaine temps d'électrophorèse, les molécules de tailles différents sont séparées car elles ont migré à travers le gel à des distances différentes en fonction de leur taille, de leur charge et de leur forme (Madigan et Martinko, 2007, Watson et *al* ., 2009) parallèlement aux fragments d'acide nucléique étudiés on fait migré un marquer de poids moléculaire connu servant d'étalant ,ceci permet de vérifier la taille du fragment étudiés (Mouhamed, 2006) .Une foi l'électrophorèse termine, les bandes d'ADN séparées sur le gel sont incubé dans une solution du bromure d'éthéduim (un colorants fluorescent) cette molécule plan se fixe à l'ADN en s'intercalant entre les paires de base. **(Figure 03)**. la concentration d'éthéduim dans l'ADN augmente, alors la fluorescence intrinsèque de celui-ci ;

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

de ce fait lorsque le gel est illumine par des rayons ultraviolet, les régions du gel contenant de l'ADN émettant une fluorescence plus marqué que les régions du gel dépourvus l'ADN (Ladish et *al.*, 2005).

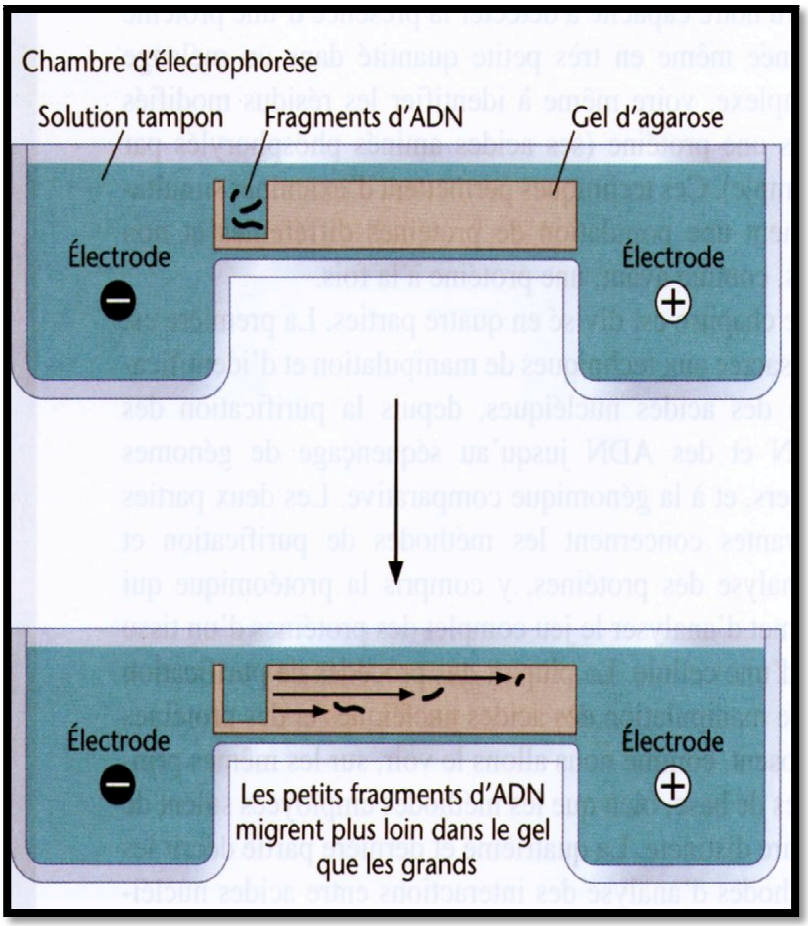
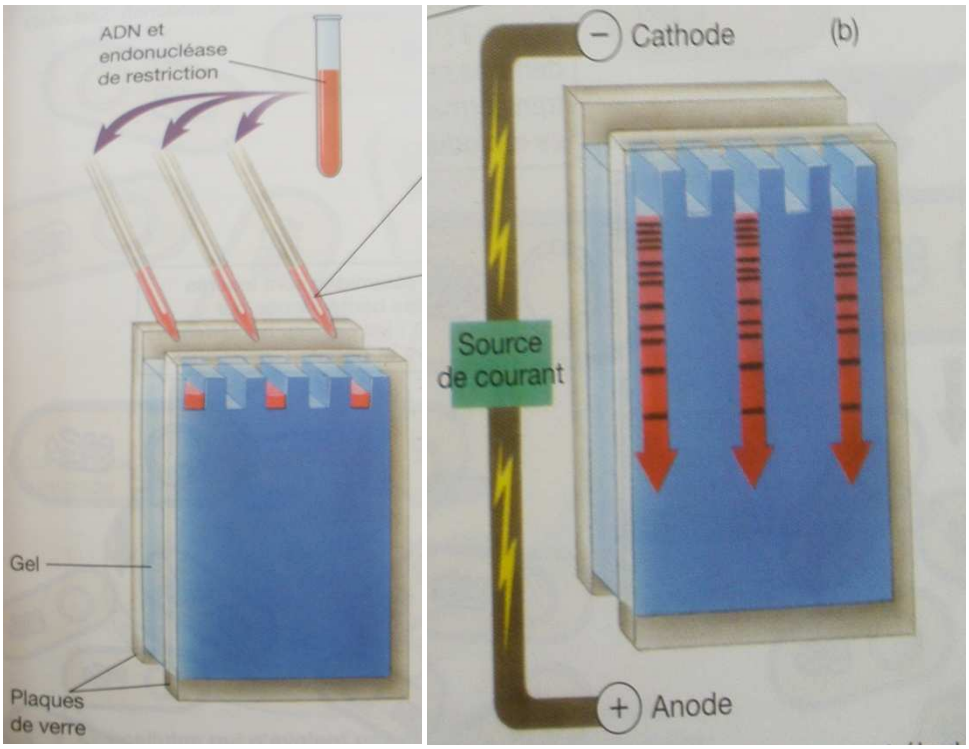
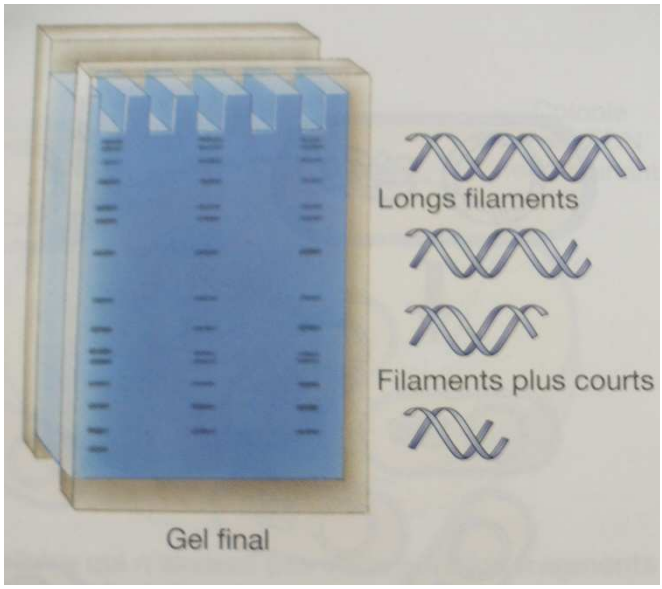


Figure 02 : la séparation des ADN sur gel d'électrophorèse (Watson et *al.*, 2009)

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com



a- Mélange de fragments d'ADNb- Après l'application d'un courantélectriquede tailles différentes



c – Gel final

Figure03 : Les étapes de l'électrophorèse (Raven et *al* ., 2007)

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

5. Séquençage de l'ADN :

Le séquençage d'un ADN est la détermination de la succession des nucléotides (Delarue, 2002) au milieu des années 1970 ont vu le jour presque simultanément deux méthodologie de séquençage de l'ADN. Une méthode chimique par A.Maxam et W.Gilbert, et une méthode enzymatique par SANGER-COULSON1977 (Karp, 2010) elle a été la méthode la plus utilisée (Perry et *al.*, 2004).

5.1. La méthode de Sanger:

La réaction de séquence consiste en une synthèse de l'ADN in vitro (Etienne et *al.*,2006) cette réaction est initiée par la dénaturation de l'ADN à séquencé par chauffage. Des échantillons de l'ADN simple brin lie aux amorces sont répartis en quatre tubes, chaque tube contient l'ADN polymérase qui début la synthèse d'un brin d'ADN à partir des amorces (Dularue , 2002 ; Peycra et *al* ., 2009). Les quatre types de dNTP radio marqués (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en excès et une faible quantité d'un didésoxynucléotide (ddNTP : nucléotides de synthèse analogues structuraux de nucléotides et dépourvu de fonction alcool en 3') (Perry et *al* ., 2004 ; Etienne et *al* ., 2006 ; Madigan et Martinko, 2007). Les ddNTPs se fixent aux brins répliquent sur les nucléotides porteurs d'une base spécifique (Adénine , guanine , cytosine ou thymine) et bloquent l'élongation de la chaine (**Figure 04(a))** (Peycra et *al* .,2009) ces réaction donnent des produits radioactifs de différents tailles ; les produits sont séparés par une électrophorèses sur gel d'acrylamide et identifie par autoradiographie (Perry, 2004).

L'électrophorèse se fait sur quatre pistes une par mélange de réaction, la gel est autoradiographié, (Prescott et *al.*, 2003) la taille relative des fragments et la source de ddNTP permettent alors la détermination de la séquence correspondante dans la direction 5' a partir de l'amorce (Perry, 2004).

La séquence d'ADN se lit directement sur le gel, en partant des fragments les plus petites, c'est à dire des bandes qui ont migrés les plus vite, pour aller vers les fragments les plus grandes, c'est-à-dire les bondes les plus lentes. On peut lire jusqu'à 800 résidus sur un seul gel (Prescott et *al.*, 2003).

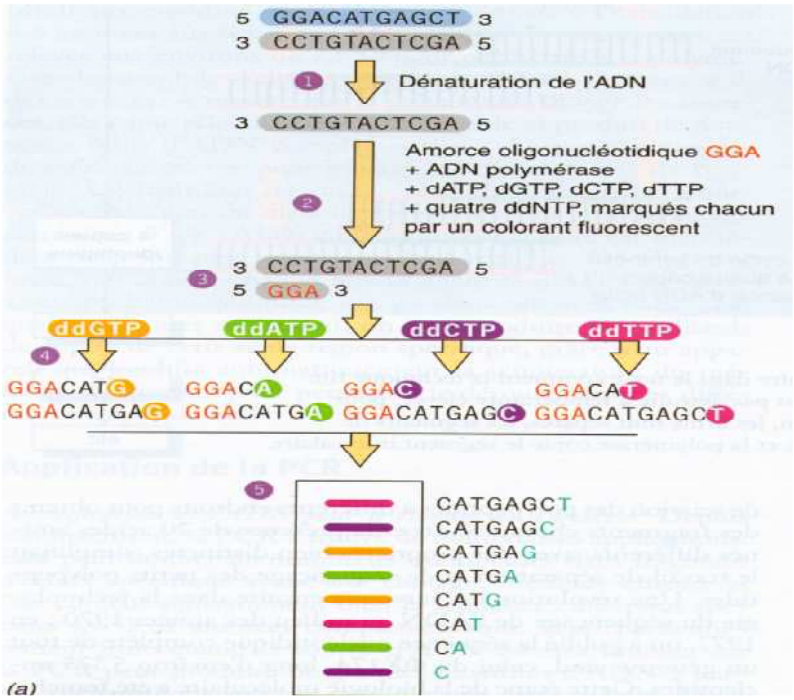
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

- **Automatisation du séquençage :**

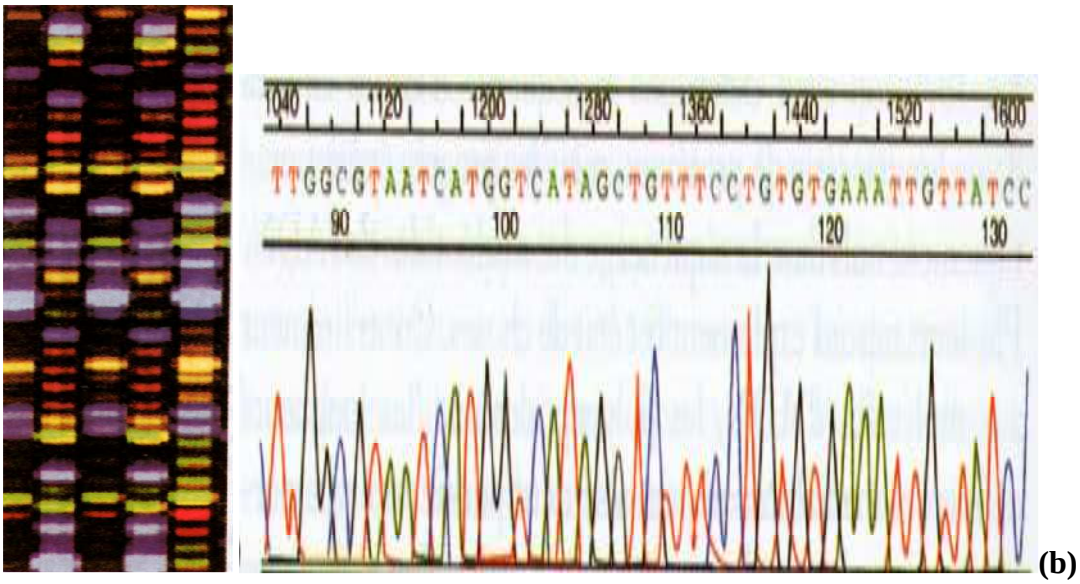
La très grande majorité des séquences réalisés et publiés aujourd'hui sont réalisées sur des séquenceurs automatiques, ceux-ci sont capables de réaliser les réactions de séquence puis de les lire (Delarue, 2002) ces systèmes sont toujours basés sur la méthode désoxy, mais emploient des amorces fluorescentes au lieu de la radioactivité, les produits sont séparés par spectroscopie à fluorescence. Chacune des quatre réactions utilise un fluorochrome différent scanné par un laser, de cette manière les quatre réactions peuvent avoir lieu simultanément, les résultats sont analysés par ordinateur et une séquence est générée avec chacune des quatre bases d'une couleur différentes (**Figure 04 (b.c))** (Madigan et Martinko, 2007).

Les différentes séquences provenant de différentes espèces bactériennes sont alignées (en établissant un catalogue des oligonucléotides et comparés par ordinateur) (Boulehbal, 2010).

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com



(a) étapes de base du séquençage d'un petite fragment d'ADN par la technique de Sanger.



(b)

(c)

(b) Pistes du gel dans lesquelles les molécules filles fluorescentes ont été séparées.

(c) La séquence des nucléotides du brin modèle est interprétée par un ordinateur qui lit le gel.

Figure 04 : Séquençage de l'ADN (Karp, 2010)

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

6. Analyse bioinformatique :

Quand on a séquencé un gène, l'étape suivante consiste à déterminer si cette séquence est déjà connu ou si encore inconnue. De nombreuses informations de séquences sont ainsi accumulées et cataloguées dans des banques de données informatiques (Maftah et *al* . ,2007).

La banque de données est un assemble de bases données contenants des informations biologiques et des données du séquence largement diffusés par le réseau internet (Coutouly et *al* ., 2009).

Il excite trois banques nucléiques internationales : Gen bancla banque américaines gérée par National center for biotechnology information(NCBI). European molucular biology laboratory databank(EMBL) et enfin la DNA Data baseof japon (DDBJ), ces trois banques gérent l'ensemble des séquences nucléiques et leurs annotation (Tugee et Rislex, 2010).

- **Recherche par BLAST :**

BLAST (basic local alignement search tool) (Altschul, 1990) à été spécialement développé pour confronter une séquence inconnue à une banque et trouver les alignements locaux statistiquement significatifs (Coutoyly et *al* .,2009) la comparaison d'une séquence identifie par un chercheur avec les autres séquences des gènes rencontrées se fait en introduisant la nouvelle séquence sous la forme de "séquences requêtes" dans des bases publiques de données contenant la liste de toutes les séquences de gènes connues . Ce procédé s'appelle une recherche par blast. La séquence peut être introduite sous la forme d'une séquences nucléique (une recherche blast n) permet de comparer une séquence nucléotidique à un banque de séquence nucléotidique sur la page d'accueil de BLAST ou NCBI ce la correspondant à l'option "nucléotide Blast" (Rislex, 2010).

Le programme informatique parcourt la base de donnée et produit en réponse une liste de correspondances partielles ou totales en commençant par les ressemblances les plus fortes si la séquence candidate ressemble beaucoup à celle d'un gène préalablement identifie chez un autre organisme, alors cette ressemblance laisse fortement penser que le gène candidat est un véritable gène (Griffiths et *al* ., 2010).

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Partie Expérimentale

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

I .Séquençage du gène ADNr16S

1. Extraction de l'ADN :

1.1. Matériel et méthodes :

1.1.1. Matériel :

Tableau 01 : Matériel et produits de l'extraction de l'ADN bactérien.

Matériel	produits
✓ Tubes Eppendorfstériles ✓ Portoir pour les tubes Eppendorf ✓ Cônes bleus stériles ✓ Cônes jaune stériles ✓ Pipettes automatique (100-1000 µl) (Thermo-scientific). ✓ Bain marie 56°c (DUBNOFF BATH (ISCO)) ✓ Plaque chauffante (100°) (VELP SIENTIFICA) ✓ Centrifugeuse 5000-11000 rpm ✓ Bec benzène ✓ Vortex (VELP SCIENTIFICA)	✓ Eau distilléestérile. ✓ Instagéne matrix (*)

(*) : BIO-RAD InstaGenne^{TM}MATRIX20ml.

Catalog≠ 732-6030

Bio Rad Laboratories 2000 Ahrednobe

Dr Hercule CA 94547 (510) 741-1000.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

1.1.2.Méthode :

Le Protocol décris ci dessus est pour la préparation de l'ADN bactérienne **(Figure 05).**

1- Prélever une colonie bactérienne isolée. La suspendre dans un tube Eppendorf contenant 1 ml d'eau distillée stérile.

2- Vortexer et centrifuger à 5000 rpm pendant 3 min, récupérer le surnageant.

3- Ajouter 200 µl de Instagénematrix , puis incuber à 56°c pendant 25 min .

4- Vortexer à grande vitesse pendant 10 second et chauffer dans une eau bouillante (100°c) pendant 8 min

5- Vortexer pendant 10 s et centrifuger à 1000-12000 rpm pendant 2-3 min.

6- Prélever 20µldu surnageant pour la réaction de la PCR, consérver le reste du Surnageant à -20°c .

Remarque : Instagene matrix est homogenisé moderiment sur une plaque d'agitation magnétique.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

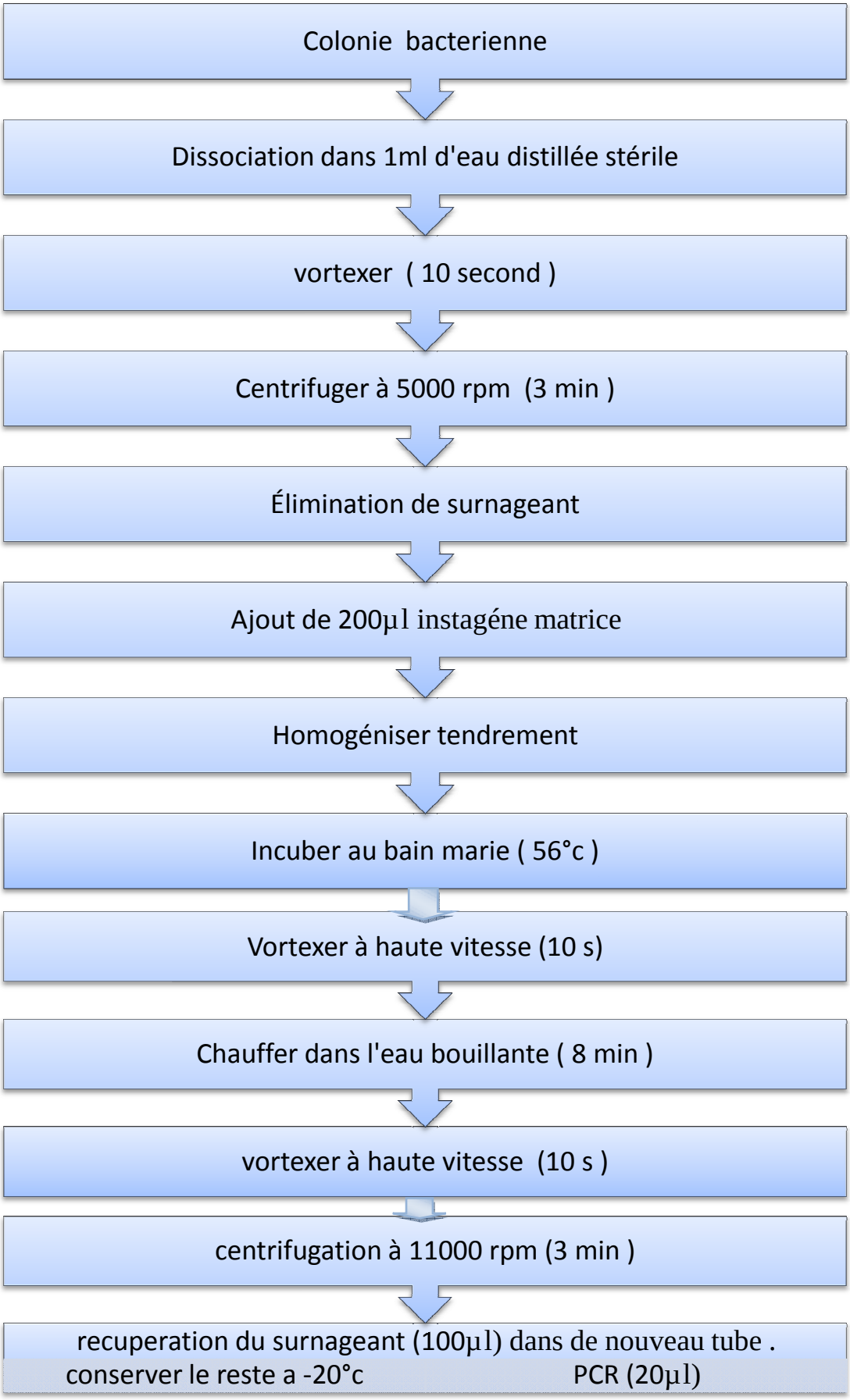


Figure 05 : différentes étapes de l'extraction de l'ADN bactérien.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

2 .PCR :

2.1. Composition de la solution mixte pour la PCR ADNr16S

Tableau 02 : Solution mixte de la PCR ADNr16S

Les composants	×1	×16	×11
H_2O	38.75	620	426.25
Tampon 10×	5	80	55
$MgCl_2$	4	64	44
16SF	0.25	4	2.75
16SR	0.25	4	2.75
ADN polymérase	0.25	4	2.75
$DNTP_S$	1	16	11
	49.5 µl	792 µl	544.5 µl

Répartir 49.5 µl de la solution mixte dans tous les tubes Eppendorf et compléter par d'ADN.

2.2. Composition de la solution mixte pour la PCR-R.A.D.P :

Tableau 02: Solution mixte de la PCR-R.A.D.P

Les composants	×1	×2	×3	×4
Tampon $MgCl_2$	1.875	3.75	5.625	7.5
$dNTP_S$	02	04	06	08
M13 (20µl)	1.25	2.5	3.75	05
ADN polymérase	0.2	0.4	0.6	0.8
L'eau bi distillée stérile	17.67	35.35	53.025	70.7
	23 µl	46 µl	69 µl	92 µl

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Répartir 23µl de la solution mixte dans tous les tubes Eppendorf et compléter avec un volume d'ADN préparé.

2.3. La purification des produits de PCR :

- **Notes importantes avant le début :**

- Ajouter l'éthanol (96-100%) au tampon PE avant d'utiliser (voir l'étiquette du flacon pour le volume).

- toutes les étapes de centrifugation sont portes à13000 rpma température ambiante.

- Ajouter un volume de 250 de l'indicateur de pH au tampon PB (c'est-à-dire ajouter 120µl de l'indicateur de pH au 30ml du tampon PB ou ajouter 600µl de l'indicateur de pH au 150ml du tampon)

- La couleur jaune du tampon PB avec l'indicateur de pH indique un pH ≤7,5.

- **Procédure :** La procédure est conduite par les étapes suivantes :

1 - Ajouter 5 volume du tampon PB à 1volume de l'échantillon PCR et mélanger, il n'est pas nécessaire d'éliminer l'huile minérale ou le kérosène, par exemple : ajouter 500µl du tampon PB à100µl de l'échantillon PCR (sans inclure l'huile)

2 - Si l'indicateur du pH est ajouté au tampon PB ; la couleur de la solution mixte sera jaune, si la couleur est oronge ou violet ajouter 10µl de l'acétate de sodium 3M (pH=5) et mélanger, la couleur retourne au jaune.

3 - Placer les tubes qia quick dans un tube de collecte de 2ml.

4 - Pour fixer l'ADN, appliquer l'échantillon sur le tube qia quick et centrifuger pendant 30 -60S.

5 - Jeter l'éluât, placer le tube qia quick retourne dans le même tube, les tube de collecte sont réutilisés pour réduire les déchets de plastique.

6 - Pour laver ; ajouter 0.75ml du tampon PE aux tubes qia quick et centrifuger encore pendant 30-60S.

7 - Placer les tubes dans de nouveaux tubes propre 1.5m pour la centrifugation.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

8 - Pour éluer l'ADN, on ajoute 50µl du tampon EB (10 tris CL, pH=8), ou de l'eau dans le centre des tubes qia quick est centrifuger pendant 1min ; sinon pour augmenter la concentration de l'ADN ajouter 30 µl d'élution du tampon au centre de la membrane qia quick, laisser les tubes centrifuger pendant 1 min.

Remarque : l'éthanol résiduel du tampon PE ne sera pas éliminé et supprimé avant cette dernière centrifugation.

3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose :

3.1. Préparation du gel d'agarose :

- Peser 3 g d'agarose dans un erlenmeyer de capacité suffisante.
- Ajouter l'agarose à 200 ml de TAE(x1).
- Chauffer avec agitation jusqu'à ébullition et disparition du trouble.
- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (environ 45-50°c).
- Ajouter 4 - 5 % de B.E.T (2µl BET dans 50ml TAE) .
- Agiter (sans chauffer) doucement pour éviter la formation de bulles.
- Préparation du moule pour couler le gel.
- Placer le moule sur une surface bien horizontale.
- Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur et laisser gélifier dans la cuve.
- Le peigne mis au préalable crée des espaces pour les puits.
- Laisser refroidir 30 min environ avant d'enlever délicatement le peigne .
- Enleverdélicatement le peigne.
- Les puits sont placés du côté de la cathode.
- Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Tableau 04 : Matériel et produits de l'électrophorèse

Matériel	produit
✓ -Appareil électrophorèse (BIO.RAD+BIO métra) ✓ -Balance ✓ -Plaque chauffante agiter (VELP Scientifica) ✓ -Générateur ✓ -Cuve d'eau ✓ -Peigne ✓ -Barreau ✓ -Erlen (100ml) ✓ -Pipette automatique (Thermo Scientific)	Agarose BET TAE Solutionde charge

3.2. Dépôt des produits d'amplification dans les puits : (Figure 06)

- Mélanger la solution de charge et l'ADN sur un morceau de parafilm de plastique non absorbant en mélangeant (2µl d'ADN) et (2µl de la solution de charge) et prélever le mélange avec une micropipette. Bien mélanger en rinçant et en changeant de cône à chaque prélèvement.

- Pipeter 2µl du mélange en fixant fermement la pipette avec l'autre main.

- Remplir les puits en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette

Remarque : Il faut faire attention lors du transport car le gel glisse très facilement de son support.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

3.3. La migration :

- La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltagede 70 volts.

- Fermer la cuve, brancher les fils et exercez un voltage de 70 volts jusqu' à 80 volts pendant 5 min pour permettre la sortie de l'ADN du puits.

- Ensuite descendre à 50 volts le reste de l'électrophorèse.

-Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 30min).

- Quand le témoin de migration (colorant bleu) atteint l'extrémité du gel, on coupe le courant. **(Figure 07)**

3.4. La visualisation:

La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée grâce à un colorant fluorescent, ***bromure d'ethidium*** (BET). Ce composé possède la propriété de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques. On peut procéder de la manière suivante :

- Les gels sont observables à ce stade mais on peut vouloir décolorer le fond pour améliorer la qualité des photographies.

- Les bandes d'ADN conservent la coloration bleue et sont de plus en plus visibles dans les heures qui suivent.

- Le gel est visualisé à l'aide d'un transilluminateur à UV **(Figure 08)** puis photographié avec un appareil numérique ou scanner.

Remarque: Pour observer les fragments d'acide nucléiques, utiliser les UV landa =254nm. Attention, le gel doit être manipulé avec soin car il est très fragile.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

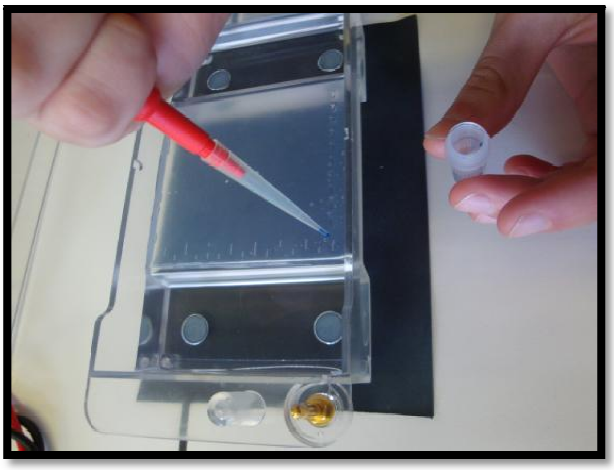


Figure 06 : Dépôt des produits de PCR dans les puits d'électrophorèse.

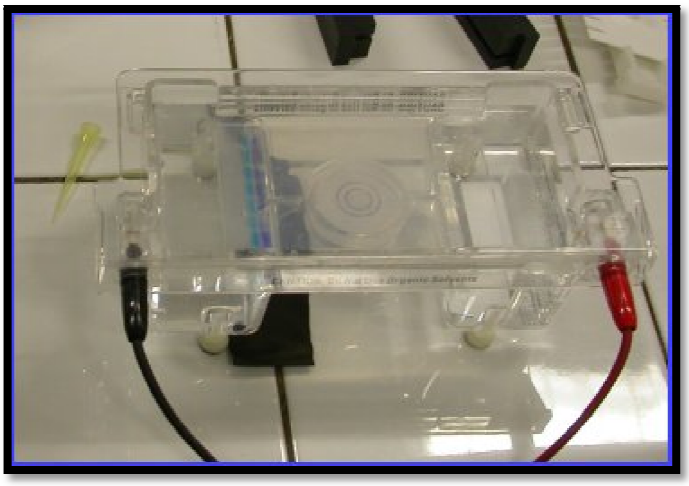


Figure 07 : La cuve d'électrophorèse après la migration

Figure 08 : La visualisation des bandes d'ADN.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

4. Réaction de séquençage

Le séquençage est accompli sur les produits de PCR préalablement purifiés. Il est réalisé selon la technique automatisée de Sanger. Cette méthode consiste à faire une amplification spécifique (PCR, tableau 05) dans laquelle ont été utilisés des didésoxynucléosides triphosphates (ddNTP) généralement marqués par des fluorochromes. L'incorporation du ddNTP par l'ADN polymérase bloque l'allongement de la molécule d'ADN en cours de copie. Nous obtenons donc une famille de fragments d'ADN synthétisés avec des longueurs différentes.

Ces fragments nucléiques sont séparés par électrophorèse selon leur longueur. Les plus petits migrent plus rapidement. Le pouvoir discriminant du gel de polyacrylamide est tel qu'il permet de différencier des brins de l'ADN ne différant en longueur que par un seul nucléotide.

La séquence de l'ADN amplifié est alors lue par un balayage automatique qui permet de distinguer grâce à des fluorochromes différentes les quatre bases A, T, C ou G.

L'utilisation de logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

4.1. PCR de séquençage : A ce stade sont ajoutées les bases sous formes de ddNTPs qui Servent à inhiber l'ADN polymérase.

Tableau 05 : Mélange réactionnel pour la PCR de séquençage.

Réactifs	Volume (µl)
✓ BigDye (Tampon Taq, $MgCl_2$, Taq polymérase, dNTPs, ddNTPs)	2
✓ fD1 (10 µM) ou Rs 16 (10 µM)	2
✓ H_2O pure	6
✓ Produit PCR	10
✓ Volume final	20

Amplification

Après une prédénaturation à 96°C pendant 5 minutes, 25 cycles successifs ont été entrepris ; chacun comprenant :

- Dénaturation à 96°C pendant 10 secondes.
- Hybridation à 55°C pendant 10 secondes.
- Elongation à 60°C pendant 4 minutes.

4.2. Purification des produits de séquençage

Afin d'éliminer tout le matériel nucléique (amorces, ddNTP, dNTP) qui peut gêner la lecture de la séquence, une purification est réalisée selon le protocole suivant :

- Dans un tube Eppendorf de 0, 5 ml, déposer 10 µl de produit de séquence.
- Ajouter 90 µl de la solution Magnesil Green (de la société Génome biotechnologie) contenant des billes fixant l'ADN.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 5 minutes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- Récupérer les tubes du portoir magnétique et ajouter 100 µl d'éthanol à 90%.
- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 5 minutes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- Récupérer les tubes du portoir magnétique puis répéter l'étape de lavage avec l'éthanol à 90% une deuxième fois. Ensuite, les tubes sont séchés 5 à 10 minutes à température ambiante.
- Re-suspendre les particules dans 20 µl de formamide. Laisser agir 1 à 2 minutes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis récupérer le surnageant contenant le formamide et les produits de séquence dans de nouveaux tubes. Le séquençage peut ainsi être effectué.

La plaque contenant les échantillons est placée dans le séquenceur. Les 16 capillaires auxquels est associée une électrode, vont être plongés dans les échantillons.

5. Analyse bioinformatique des séquences :

L'analyse bioinformatique des séquences ADN 16S a été réalisée sur le site miroir du NCBI qui offre la possibilité d'aligner nos séquences ADN 16S avec celles de la banque nucléique (GenBank en l'occurrence). Ce sont les séquences des souches ayant poussé sur gélose additionnée de Céfazoline.

BLAST, un outil d'alignement local du NCBI, est un programme en ligne libre de droits permettant de rechercher des séquences similaires dans une banque de séquences à partir d'une séquence requête (query) d'ADN. Le programme BLAST contient six programmes différents d'alignement des séquences (appelés parfums de BLAST). BLASTN (N pour nucléotide) est l'un des différents parfums de Blastetest utilisé pour comparer une séquence requête nucléique à une banque de séquences nucléiques.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

L'utilisation des différents types de parfums de Blast dépond de la nature de la séquence requête ; en effet :

- Blastn : compare une séquence requête nucléique contre une base de séquences nucléiques,
- Blastp : compare une séquence requête protéique contre une base de séquences protéiques (Swiss Prot par exemple),
- Blastx : compare une séquence requête nucléique traduite selon six phases de lectures (ORF : Open Reading Frame : cadres de lecture ouverts) contre une banque de séquences protéiques,
- Tblastn : Compare une séquence requête protéique contre une banque de séquences nucléiques traduites selon les six phases de lecture,
- Tbalstx : compare une séquence requête nucléique traduite en six phases de lecture contre une banques de séquences nucléiques traduites en six phases de lecture.

Après alignement de chacune de nos séquences ADNr 16S avec l'outil BLASTN, seules les séquences de GenBank ayant une similarité (avec notre séquence) supérieure ou égale 99% et une E-value nulle ont été retenues car la définition moléculaire du genre stipule que les homologies des séquences des ADNr 16S doivent être supérieures ou égale à 97%. Une homologie supérieure ou égale à 99% traduit l'appartenance à une même espèce. Alors qu'un score d'homologie inférieur à 97% ne permet pas l'identification**.**

Dans le cas où plusieurs séquences sont proposées par la banque, et qui ont la même Evalue et le même pourcentage d'identité, nous avons tranché pour la séquence ayant présenté le meilleur score d'alignement avec notre séquence requête.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

II. Essai d'extraction de l'ADN bactérien :

- **Objectif :** Extraction de l'ADN bactérien par la méthode du "choc thermique" qui consiste en des changements rapides de température (congélation / décongélation).

1. Matériel et méthodes :

1.1. Matériel :

Tableau06 : Matériel et produits d'extraction d'ADN bactérien

Matériel	Produits
✓ Tubes Eppendorf stériles ✓ Portoir pour les tubes Eppendorf ✓ Pipettes automatique (100-1000 µl) ✓ Bec benzène ✓ Anc de platine ✓ Congélateur (Thermo Scientific) **(Figure10)** ✓ Centrifugeuse (Sigma) **(Figure11)** ✓ Cuve en quartz (Hellma) ✓ Spectrophotomètre u.v.1800 Shimadzu. **(Figure 12)** ✓ Vortex (Fishier scientifique top mix FB15024)	Eau distillée stérile.

1.2. Méthode :

Le protocole suivant à été réalisé **(figure09**) :

1. Mettre 500 µl d'eau distillée stérile dans les tubes Eppendorf .
2. Prélever trois à quatre colonies identiques par Anc de platine.
3. Dissocier les bactéries dans les tubes Eppendorf
4. Vortexer
5. Placer les tubes dans le congélateur (-50°c) durant 15 minutes.
6. Chauffer les tubes à 94°c.
7. Recongeler a (-50° c) puis décongeler a 94°c durant 5 min.
8. Vortexer.
9. Centrifuger à 7000 rpm pendant 10 min.
10. Prélever le surnageant contenant l'ADN en évitant de récupérer les cellules en culot.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

11.Lecture au spectrophotomètre en UV :

- ✓ Mettre l'eau distillée dans une autre cuve (régler le blanc avec l'eau distillée).
- ✓ Prendre le surnageant (450 µl) de tubes Eppendorf.
- ✓ Recherche de la longueur maximale d'absorbance du surnageant.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

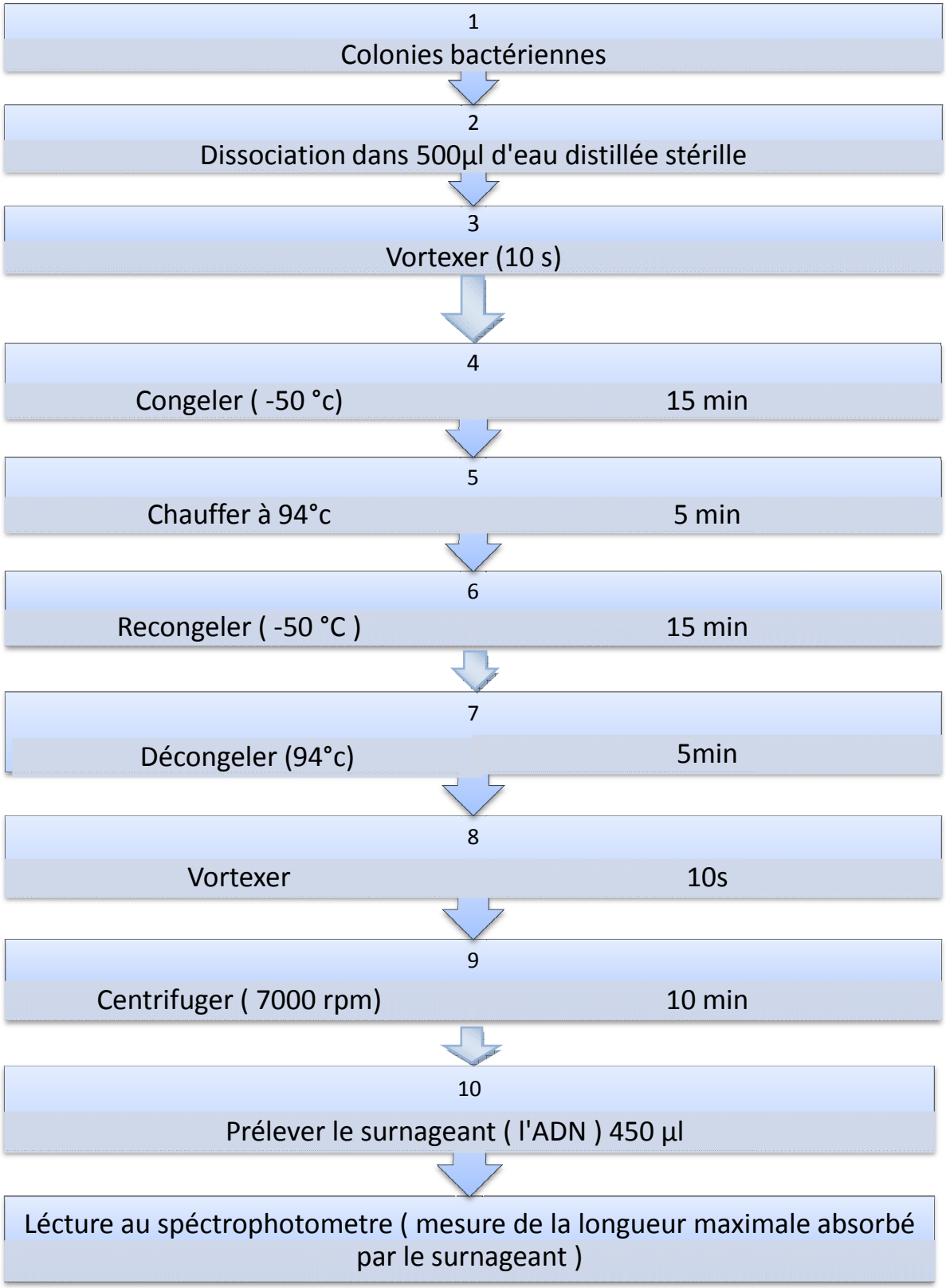


Figure 09 : Recherche et identification de l'ADN bactérien

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Figure 10 : Congélateur (Thermo Scientific)

Figure 11 : Centrifugeuse (Sigma)

Figure 12 : Spectrophotomètre u.v.1800 Shimadzu

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Résultats et discutions :

La lecture au spectrophotomètre en UV du surnageant donne les résultats suivantes :

- La langueur d'onde absorbée est de 280 nm. **(figure13);** Ce qui montre l'existence de l'ADN dans l'échantillon.
- La valeur d'absorbance est de 0.591 abs.

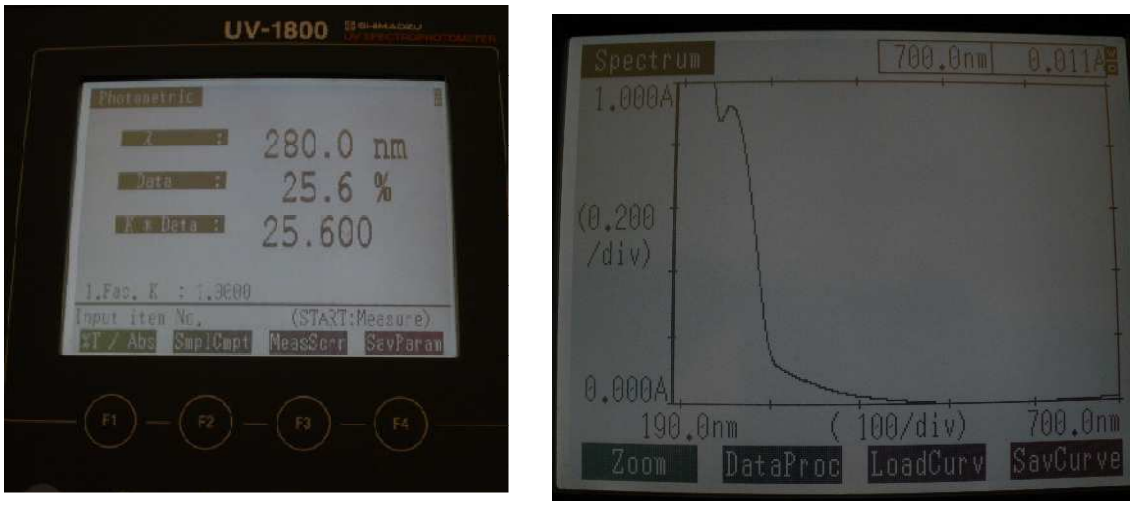


Figure 13: La lecture au spectrophotomètre en UV de l'ADN.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

III. Conclusion et perspectives :

La comparaison des séquences d'ADNr16S de différentes espèces bactériennes est la méthode la plus utilisée parmi les autre techniques de biologie moléculaire pour la comparaison des structures génomiques.

Le séquençage de l'ADN r16S présente plusieurs avantages ; cette technique utilise le gène ADNr16S qui est présent chez toutes les bactéries ; elle repose sur la PCR pour amplifier une région spécifique du génome, la PCR améliore le diagnostique bactériologique grâce à sa sensibilité, sa rapidité et sa spécificité.

Les produits PCR subissent une électrophorèse sur le gel d'agarose ; avant la réaction de séquençage par la méthode de SANGER, cette dernière aussi est améliorée par des séquenceurs automatiques pouvant analyser plus d'une centaine de séquences simultanément.

Si les séquences sont déterminées, il reste leur comparaison avec de multiples séquences présentes dans des bases de données telles que GenBank .

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Bibliographie

1. Abdelali Mohamed(2006), Génétique Humaine, Office des Publications Universitaires, Alger,P201.
2. Abderrahmane Maftah , Jean Michel Betit, Raymond Julien(2007),Manuel de biologie moléculaire , Dunod, Paris, P222.
3. Asma BALLA et Maha RAHALI (2009). Etude préparative pour la création d'un l'aboratoire d'analyse moléculaire bactérienne, par le séquençage du géne ADNr16S amplifié par PCR , Mémoire d'ingénieur d'état en Control et Analyse de la Qualité.Université Mohamed Kheider – Biskra ,92pp .
4. Denis Tagu et Jean loup Rislex (2010) , Bioinformatique principe d'utilisation des outiles , Quae , p176.
5. Denis Tagu, Christian Moussard (2003), Principes des techniques de biologie moléculaire,2eme édition, Inra, Paris,P270.
6. F.Boulahbal, N . Ramdani Bouguessa,R.Belouni,M . seghier , A.Benslimani (2010),Mannuel de Microbiologie ,OPU , p23-
7. Gérard.Coutouly , Emile.Klein,Eric.Barbieri(2009),Travaux dirigés de Biochimie,biologe moléculaire et bioiformatique,doin, 3e édition, p346.
8. Griffiths,Wessler , Lewontin,Carroll , Introduction àl'analyse génetique (2010), bock université ,5e édition , p831.
9. Guillaume.lecointre, Hervé.Guyader (2001) , Classification phylogénétique du vivant , BELIN 3e édition . p559.
10. J.Etienne , E .clauser , C.Honsset ,P.Roingeard (2006) , Biochimie génétique biologie moléculaire , Masson , p294.
11. James Watson, Tania Boker, Stephen Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick(2009), Biologie moléculaire du gene, Pearson, France, P688.
12. Jerome j.Perry , JamesT.Staley,Stephen.Cory,(2004),Microbiologie,Dunod , p891.
13. Karp(2010), Biologie Cellulaire et moléculaire, 3ème édition, De Boeck, Paris, P818.
14. Ladish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnel(2005),Biologie moléculaire de la cellule , De boeck, Paris, P973.
15. Michael Madigan, John Martinko(2007), Biologie des micro-organismes, pearson, France,P1047.
16. Neil Compbell, Jane Reece(2007), Biologie, Pearson,P426.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

17. P.C.Turner,A.G.M.C.Lennan, A.D.Bates et M.R.A.White(2006), L'essentiel en biologie moléculaire, Berti edition, Paris, P386.
18. P.kamoun , A.Lavoinne , H.Devernouil (2003), Biochimie et biologie moléculaire , Flammarion, p473.
19. Paul.Singleton(2005) , Bactériologie pour la medcine , la biologie at la biotéchnologie ,Dunod, p542.
20. Peter Raven, Jonathan Loser, George Gohnson,Susan Singer(2007), Biologie, Deboek, Paris,P1250.
21. Pierre Peycra, Jean-françois fogelgesang, Didier Grand perin, Bernard Augére, Jean Cland Baecht, Christian Perrier, Jean Michel Dupin, Cecil Van Derpest, Biologie Tout EN.MN.BCPST 1ér année, Dunod, Paris,P753.
22. Prescott,Harley, Klein(2003), Microbiologie, De boeck,P1137.
23. Simon biaumount(2009), biologie moléculaire, Ediscience,P299.
24. Soraya moulessehoul(2009), Biologie moléculaire, Office des publications universitaires, Alger, P97.
25. Werner,Muller.Esterl , (2007), biochimie et biologie moléculaire Dunod ,p654.
26. William klug, Michael cumming, Charlotte Spencer(2006), Génétique, Pearson, France,P490.

Les Sites internet :

www.genetic.ch/(lexique).
www.bacterio.cict.fr/bacdico/systematique/nomenclature.html.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Résumé :

L'identification moléculaire bactérienne par le séquençage du gène ADNr16S se fait par une extraction de l'ADN à partir de la bactérie isolée suivie par une amplification à l'aide des amorces spécifique (PCR) pour ce gène , les produits de la PCR sont sépares par l'electrophorèse sur gel d'agarose . Les fragments d'ADNr16S sont séquencés par la méthode de Sanger qui devient plus rapide grâce au séquenceur automatique. Enfin la séquence d'ADN est analysée par bioinformatique et comparé à la base de donnée Blast n .

Mots clés : ADNr16S, PCR, Séquençage, bio-informatique.

Abstract:

The molecular identification of bacterial gene 16Sr DNA by sequencing is done by an extraction of the DNA part of the bacterium studied followed by amplification using primers specific for this gene (PCR), the PCR products are separated by electrophores is on agarose gel, the fragments of 16SrDNA are sequenced by Sanger's Method becomes faster with the automated sequencer. Finally DNA sequences are analyzed by bioinformatics to database Blast n.

Key words: 16Sr DNA, PCR, Sequencing, Bioinformatics.

الملخص :

التحديد الجزيئي البكتيري لمورثة الADNr16S بطريقة سنجر يتم باستخلاص الADN انطلاقا من البكتيريا المعزولة ثم تضخيمه باستخدام بادئات محددة لهذه المورثة (PCR) , تفصل نواتج PCR على هلام ال Agarose.يتم تحديد تتابع نيكليوتيدات ال ADNr16S بطريقة سنجر التي أصبحت سريعة بفضل جهاز محدد السلاسل الألي . في الأخير تحلل هذه السلاسل معلوماتيا على قاعدة البيانات الخاصة بالنيكليوتيدات Blast n.

الكلمات المفتاحية: ADNr16S, تحديد تسلسل النيكليوتيدات, تفاعل تكثيف السلسلة, إعلام آلي حيوي.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Résumé :

L'identification moléculaire bactérienne par le séquençage du gène ADNr16S se fait par une extraction de l'ADN à partir de la bactérie isolée suivie par une amplification à l'aide des amorces spécifique (PCR) pour ce gène , les produits de la PCR sont sépares par l'electrophorèse sur gel d'agarose . Les fragments d'ADNr16S sont séquencés par la méthode de Sanger qui devient plus rapide grâce au séquenceur automatique. Enfin la séquence d'ADN est analysée par bioinformatique et comparé à la base de donnée Blast n .

Mots clés : ADNr16S, PCR, Séquençage, bio-informatique.

Abstract:

The molecular identification of bacterial gene 16Sr DNA by sequencing is done by an extraction of the DNA part of the bacterium studied followed by amplification using primers specific for this gene (PCR), the PCR products are separated by electrophoresis on agarose gel, the fragments of 16SrDNA are sequenced by Sanger's Method becomes faster with the automated sequencer. Finally DNA sequences are analyzed by bioinformatics to database Blast n.

Key words: 16Sr DNA, PCR, Sequencing, Bioinformatics.

الملخص :

التحديد الجزيئي البكتيري لمورثة الADNr16S بطريقة سنجر يتم باستخلاص الADN انطلاقا من البكتيريا المعزولة ثم تضخيمه باستخدام بادئات محددة لهذه المورثة (PCR) , تفصل نواتج PCR على هلام ال Agarose.يتم تحديد تتابع نيكليوتيدات ال ADNr16S بطريقة سنجر التي أصبحت سريعة بفضل جهاز محدد السلاسل الألي . في الأخير تحلل هذه السلاسل معلوماتيا على قاعدة البيانات الخاصة بالنيكليوتيدات Blast n.

الكلمات المفتاحية: ADNr16S, تحديد تسلسل النيكليوتيدات, تفاعل تكثيف السلسلة, إعلام آلي حيوي.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com