

Extraction de large quantité d'ADN de phage

Introduction

Le phage est produit en grande quantité (high titer stock, voir protocole) par infection de son hôte bactérien conduisant en général à un lysat contenant 10^8 CFU/mL à 10^{11} CFU/mL dans du marine broth. On précipite le phage au Polyéthylène Glycol (PEG) pour d'une part pouvoir encore plus le concentrer si besoin, d'autre part reprendre les phages par un tampon compatible avec des nucléases. En effet avant d'extraire l'ADN viral (protégé par la capsid) il faut dégrader les ADN et ARN de l'hôte bactérien, en particulier si on veut réaliser des banques de séquençage. On inhibe ensuite ces nucléases par addition du chélateur EDTA et on peut procéder à la digestion des protéines par la protéinase K. L'ADN des phages est ensuite purifié par extraction au phénol chloroforme et précipitation à l'éthanol. Des kits commerciaux peuvent être une alternative mais ne fonctionnent pas avec tous nos isolats, donc mieux vaut utiliser les (vieilles) méthodes qui ont fait leur preuve.

Matériel

- 5x PEG solution (500 mL)
 - 5 M NaCl stock solution – 250 mL
 - PEG8000 – 100 g
 - H₂O qsp 500 mL
 - Stir until dissolved.
- SM buffer
 - NaCl 100 mM
 - MgSO₄.7H₂O 8 mM
 - Tris-Cl 50 mM pH7.5
- DNase RQ1 (Promega) et son tampon
- RNase
- EDTA 0.5N pH 8
- Protéinase K à 20 mg/ml
- SDS 20%
- Mélange 1VPhénol 1V (chloroforme.alcool isoamylique 24.1)=> acheter ce mélange
- Chloroforme/alcool isoamylique 24.1 : soit acheter soit préparer au labo
- Acetate Na 3N pH 5.4
- Ethanol pur, 70%
- TE: Tris 10mM pH7.5 et EDTA 1mM pH8

Méthode

Concentration PEG

1. A 40 mL phage (high titer, schizo 10^8 PFU/mL) ajouter 10 mL PEG 5X, mélange en inversant tube et incubé la nuit à 4 °C (tube conique)
2. Centrifuger à 19,000 × g 60 min à 4 °C.
3. Resuspendre le culot par 500 µL de tampon SM à 4°C, possibilité de stockage à 4°C
4. Comparer le titre des phages concentrés au non concentrés : titre final des phages ?

Digestion nuclease

1. Ajouter tampon DNase qsp 1X final (50 µl tampon 10X + 450 µl de phages concentré)
2. Mélanger en pipettant doucement
3. Ajouter 1µl de DNase RQ1 (Promega) a 1 Unité/µl
4. Ajouter 2,5 µl de RNase à 3.5 mg/ml
5. Mélanger en pipetant doucement
6. Incuber à 37°C pendant 30 minutes
7. Bloquer la réaction en ajoutant 20 µl d'EDTA 0,5M pH8 au 500 µl de préparation (20 mM final)=> procéder de suite à l'extraction

Extraction

1. Au 500 µl de phage traité aux nucléases ajouter 12,5 µl d'une solution de protéinase K à 20 mg/ml et 12,5 µl de SDS à 20%.
2. Mélanger en inversant tube deux ou trois fois doucement
3. Incuber 30 minutes à 55°C
4. Ajouter 2V du mélange Phénol/Chloroforme/Alcool Isoamylique (Prelever un aliquot de la bouteille vers un falcon et PIPETER SOUS LA COUCHE AQUEUSE)
5. Mélanger en inversant le tube deux ou trois fois doucement
6. Centrifuger 5 min à 14 000 rpm
7. Récupérer la phase supérieure dans un tube Eppendorf de 1,5 ml en évitant la galette blanchâtre à l'interface avec la phase phénolique
8. Ajouter 500 µl de chloroforme/Alcool Isoamylique (24 :1).
9. Mélanger en inversant le tube deux ou trois fois doucement
10. Centrifuger 5 min à 14 000 rpm
11. Récupérer la phase supérieure dans un tube Eppendorf de 1,5 ml en évitant interface
12. Ajouter 1/10 volume d'acétate de Na 3N pH5,4, mélanger en inversant le tube
13. Ajouter 2,5 volumes d'éthanol 100% mélanger en inversant le tube : vois tu une méduse ? si oui passer directement à l'étape centrifugation. Si non, incuber -20°C au moins une heure (possibilité de s'arrêter là)
14. Centrifuger 10 minutes à 14 000 rpm, RT
15. Laver le culot par 500 µl d'éthanol à 70% à température ambiante
16. Centrifuger 5 minutes à 14 000 rpm, RT
17. Re-suspendre par 50 µl de tampon TE (augmenter le volume si visqueux)
18. Incuber 1H à 65°C ou ON à 4°C
19. Quantifier au nanodrop (faire attention au rapport 260/280 qui doit être compris entre 1.7 et 2)
20. Contrôler la qualité de l'ADN sur un gel à 0,7% migration 50V ON à 4°C

Tip importants !

Des kits commerciaux peuvent être une alternative mais ne fonctionnent pas avec tous nos isolats, donc mieux vaut utiliser les (vieilles) méthodes qui ont fait leur preuve.

Reference

- 1- Cahier K, Piel D, Barcia-Cruz R, Goudenège D, Wegner KM, Monot M, Romalde JL and Le Roux F*. Environmental vibrio phage-bacteria interaction networks reflect the genetic structure of host populations. **Environmental microbiology** 2023 Mar 6. doi: 10.1111/1462-2920.16366.
- 2- Piel D, Bruto M, Labreuche Y, Blanquart F, Chenivresse S, Lépense S, James A, Dubert J, Petton B, Lieberman E, Wegner KM, Hussain FA, Kauffman KM, Polz MF, Bikard D, Gandon S, Rocha EPC and Le Roux F*. Phage-host coevolution in natural populations. **Nature Microbiology**. 2022 Jul;7(7):1075-1086.