

TP de TAM: Extraction et dosage des acides Nucléiques (ADN génomique)

I- Principe:

La purification des acides nucléiques constitue l'étape clé des analyses en biologie moléculaire. selon le type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et selon le matériel de départ (cellules, organes....) la première étape a pour but l'extraction. Cette dernière a pour but l'homogénéisation du contenu mécaniquement par broyage dans un mortier ou chimiquement en présence de détergents anionique tel que le SDS permettant de dénaturer la bicouche lipidique.

A ce stade, il est possible de séparer l'ADN des protéines par extraction au phénol/chloroforme. le phénol permet de dénaturer les protéines tandis que le chloroforme élimine les traces de phénol susceptibles de contaminer l'ADN dans la phase aqueuse. Lors de cette étape, la purification de l'ADN repose essentiellement sur l'élimination enzymatique des protéines par action de la protéinase K (dénaturation des histones), tout en veillant a ne pas activer les nucléases cellulaires (inhibition par l'EDTA). Enfin, une précipitation à l'alcool (éthanol ou isopropanol) permet de séparer l'ADN des autres molécules car il y est insolubles.

Tout comme les protéines, les acides nucléiques sont caractérisés par un spectre d'absorbance de la lumière. les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement à 260 nm. les protéines absorbant de même à 280 et 260 nm, il est impératif de calculer le rapport Abs_{260}/Abs_{280} afin de s'assurer de la pureté de l'extraction et l'absence de toutes traces de contaminant. Sur une solution pure d'ADN une unité de DO correspond à 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin et à 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN.

II- But de la manipulation

Il s'agit dans cette séance de

- S'initier à l'extraction et purification de l'ADN génomique
- S'assurer de la pureté de l'extrait en calculant le rapport Abs_{260}/Abs_{280}
- Déterminer la concentration d'une solution d'ADN par spectrophotométrie.

III- Mode opératoire

III.1 Extraction de l'ADN

- Chauffer dans une fiole 200 ml d'eau du robinet à 60°C dans un bain-marie.
- Prélever 5 ml d'éthanol et les mettre dans un bécher de 10 ml. Placer ce bécher au réfrigérateur.
- Mettre environ un quart d'oignon dans un mortier. Y rajouter l'équivalent d'une cuillerée à café de NaCl.
- Broyer vigoureusement pendant environ 5 min jusqu'à obtention d'une purée.
- Rajouter environ 10 ml d'eau tiède (à 60°C) et continuer à mélanger pendant encore 2 min.
- Mesurer environ 4 ml de SDS 20% dans une éprouvette et rajouter au broyat.
- Mélanger 5 min jusqu'à apparition d'une consistance visqueuse.
- Positionner un entonnoir sur un bécher en forme haute et placer une épaisseur de papier filtre
- Déposer progressivement et délicatement une petite quantité de votre broyat sur le filtre.

- Attendre d'obtenir dans le bécher une quantité suffisante du filtrat (~2 ml). Si l'écoulement est trop lent et le mélange trop pâteux, rajouter une petite quantité d'eau tiède (~5 ml) sur le broyat.
- Récupérer dans un grand tube à essai 2 ml du filtrat obtenu et rajouter 5 ml d'éthanol froid en laissant s'écouler délicatement l'éthanol sur la paroi du tube. Incliner plusieurs fois le tube pour augmenter l'interface entre les deux phases et continuer jusqu'à faire remonter et précipiter l'ADN dans l'éthanol (phase supérieure).

III.2 Dosage de l'ADN

- Dans un tube Eppendorf 1,5 ml mélanger 5 μ l de solution d'ADN avec 195 μ l d'eau. mélanger en faisant plusieurs va et vient à la pipette.
- Au spectrophotomètre régler l'appareil à 260 nm puis déterminer le blanc en déposant 200 μ l d'eau dans une cuve de spectrophotométrie. Rincer la cuve avec de l'eau, la sécher en tapotant sur du papier et y ajouter la solution d'ADN, calculer la DO de votre échantillon.
- Refaite la même procédure à 280 nm