

T.P. BIOLOGIE CELLULAIRE  
EXTRACTION ET DOSAGE D'ADN

Vous allez au cours de cette séance, réaliser une extraction d'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir d'érythrocytes de poulet (cellules sanguines nucléées).

Vous réaliserez également un dosage direct et sensible de la solution d'ADN obtenue et des protéines contaminantes par spectrophotométrie.

A - EXTRACTION DE L'ADN D'ERYTHROCYTES DE POULET

I. MATERIELS ET REACTIFS NECESSAIRES

Matériel :

- tubes Eppendorf,
- tubes à centrifugation et portoir,
- 1 éprouvette de 100 mL,
- pipettes graduées diverses,
- pipettes automatiques,
- centrifugeuse.

Les pipettes automatiques sont des instruments de mesure très précis qu'il faut manipuler avec précaution. Attendre les explications d'un enseignant avant de les utiliser.

**Par ailleurs, il est impératif de bien équilibrer les tubes deux à deux par pesée avant leur introduction dans une centrifugeuse.**

Réactifs :

- **Solution mère de SSC** = NaCl à 0,15 M + Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (Citrate de sodium) à 0,015 M
  - o (Standard Saline Citrate) : Tampon utilisé à des concentrations variées qui stabilise l'ADN en solution et chélate (bloque) les ions Mg<sup>2+</sup>. Ces ions Mg<sup>2+</sup> étant les cofacteurs des DNAses.
- **Solution SSC 10%** = solution mère de SSC diluée au dixième.
- **Solution SDS 10%**
  - o SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) : Détergent très puissant qui permet de dénaturer les nucléases et de déprotéiniser les acides nucléiques.
- **Solution mère de NaClO<sub>4</sub> à 5M**
  - o NaClO<sub>4</sub> (perchlorate de sodium) : Utilisé à haute concentration, ce sel aide à la dissociation protéines-acides nucléiques et renforce l'action du SDS.
- **Solution de chloroforme contenant 4% v/v d'alcool iso-amylque**
  - o Chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) : Utilisé pour déprotéiniser les acides nucléiques, le chloroforme dénature les protéines qui perdent toute affinité pour les acides nucléiques et passent ainsi dans la phase organique, laissant l'ARN et l'ADN dans la phase aqueuse.
  - o iso-amylque (3-Méthylbutanol ; (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) : Utilisé à 4% v/v dans le chloroforme comme agent anti-moussant. De plus, l'alcool iso-amylque aide à la séparation et stabilise les différentes phases après centrifugation.
- **Ethanol absolu froid à -20°C**
  - o L'éthanol à une concentration finale de 66% précipite les acides nucléiques en solution.
  - o A la fin de la manipulation, le surnageant contient à la fois de l'ADN et de l'ARN. Après addition d'éthanol, ces molécules sont précipitées mais seul l'ADN s'enroule autour de la baguette de verre à cause de sa très grande taille. L'ARN, représenté par des molécules considérablement plus

*petites, ne s'enroule pas autour de la baguette et reste dans le tube, ce qui se visualise par un trouble blanchâtre.*

- **Tampon TE** = Tris.HCl [tris(hydroxyméthyl)aminométhane] 1 mol.l<sup>-1</sup> + EDTA (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique) 0,1 mol.l<sup>-1</sup>

II. PROTOCOLE DE LA METHODE D'EXTRACTION D'ADN

**Respecter strictement les volumes indiqués. Toute erreur de pipetage pourra avoir des conséquences sur la quantité d'ADN extraite.**

- 1) Après avoir agité le tube de sang, prélever 1 ml de sang dans un tube à centrifugation.
- 2) Ajouter 1 ml de solution SSC et agiter par retournement.
- 3) Centrifuger à 1500 rpm pendant 5 min pour sédimenter les cellules.
- 4) Eliminer délicatement le surnageant avec une pipette pasteur pour ne pas perdre le culot.
- 5) Resuspendre le culot dans 10 ml de SSC 10% jusqu'à obtenir une solution homogène.
- 6) Ajouter le SDS (**calculer le volume nécessaire pour obtenir une concentration finale de 1%**).
- 7) Agiter « par inversion » pour éviter la formation de mousse.
- 8) Ajouter du NaClO<sub>4</sub> (**calculer le volume nécessaire pour obtenir une concentration finale de 1M**).
- 9) Agiter par inversion.
- 10) Ajouter 1 équivalent volume de chloroforme contenant 4% v/v d'alcool iso-amylque. **Indiquer quel volume de chloroforme vous avez ajouté.**
- 11) Agiter par inversion jusqu'à obtenir un mélange homogène (pendant environ 15 min).
- 12) Centrifuger à 5000 rpm pendant 10 min pour séparer la phase aqueuse de la phase organique.
- 13) Récupérer la phase aqueuse (supérieure) contenant les acides nucléiques (ADN et l'ARN) dans une éprouvette, mesurer le volume, puis le transvaser dans un bécher et ajouter 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C pour précipiter les acides nucléiques. **Indiquer quel volume d'éthanol vous avez ajouté.**
- 14) Enrouler les filaments d'ADN autour d'une baguette de verre.
- 15) Sécher l'ADN à l'air et le re-dissoudre dans 5 mL de tampon TE.

B - DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ADN RECUPERE

I. MATERIELS ET REACTIFS NECESSAIRES

Matériel :

- Spectrophotomètre,
- Cuves en quartz

**Attention, les cuves en quartz sont fragiles et coûteuses.**

II. SPECTRE D'ABSORPTION U.V. et DOSAGE DE L'ADN

Les mesures de densité optique sont réalisées dans un spectrophotomètre à deux faisceaux. Les échantillons doivent être analysés par rapport à une solution témoin de composition chimique identique (qu'il vous faut déterminer).

- 1) Verser 2 mL de solution contenant l'ADN dans une cuve à quartz.
- 2) Dans une autre, verser la solution témoin.
- 3) A partir du spectre d'absorption U.V. (balayage de 290 à 240 nm) **déterminer la longueur d'onde où l'absorption de l'ADN est maximale ( $\lambda$  max).**
- 4) **Mesurer sur le graphique la densité optique** à cette longueur d'onde pour déterminer la quantité d'ADN récupérée. Eventuellement, diluer la solution d'ADN si l'absorbance est trop forte ( $A > 1.5$ , cf explication du professeur sur l'utilisation du spectromètre). **Expliquer dans le CR pourquoi vous avez ou non dilué l'ADN.**
- 5) **Mesurer également l'absorbance à  $\lambda = 280$  nm**, correspondant à la longueur d'absorption des protéines.
- 6) A partir des mesures précédentes :
  - o **Calculer la concentration massique** en ADN dans les 5 ml de TE. Sachant qu'il a été déterminé à partir de la loi de Beer-Lambert que :

$$1 \text{ DO}_{\lambda_{\text{max}}} = 50 \mu\text{g d'ADN} / \text{mL de solution}^*$$

*\*Ne pas oublier de tenir compte des dilutions qui ont pu être réalisées.*

- o En considérant que vous avez purifié tout l'ADN initialement contenu dans les 1 ml de sang de poulet, **calculer la masse d'ADN** contenue dans votre échantillon de sang de départ.
- o Sachant que la masse d'une mole de nucléotides (ou masse molaire) est de 309 g qu'elle était la **quantité (en moles) d'ADN** contenue dans votre échantillon de sang.
- o Sachant que les protéines absorbent aussi la lumière dans l'U.V., on peut **calculer un indice de pureté de l'ADN** extrait :

$$\text{Indice de Pureté} = \text{DO}_{260\text{nm}} / \text{DO}_{280\text{nm}}^{**}$$

**\*\***On estime que l'ADN est de bonne qualité lorsque ce rapport est compris entre 1,7 et 2.

Remarques :

- L'absorbance est la même chose que la densité optique.
- L'absorbance n'a pas d'unité.
- M = mol/l ou mol.l<sup>-1</sup>.