

Collecte et extraction d'ADN



Type de documentation

Cette page est une documentation tutorielle.

Vous pouvez partager vos connaissances en l'améliorant ([comment ?](#)).

Cette page est axée sur l'apprentissage, permet au nouvel arrivant de commencer, telle une leçon. Elle est similaire à l'acte d'apprendre à planter des légumes ou d'apprendre à faire la cuisine à un individu.

Exemple : [Wikifab](#)

Répertoire : [Les tutoriels dans ce wiki](#)

Support : Le [portail dédié](#) à la documentation et aux codes sources

2020/11/27 15:04 · xavcc

Extraction simple en TP de cuisine en 4 minutes

Matériels

Vos besoins matériels sont simples. Munissez vous de quelques articles ménagers courants :

- un sachet de pois cassés verts
- Sel de table
- Détergent liquide vaisselle
- Éthanol 98% ou alcool pur
- Attendrisseur de viande en poudre ou jus d'ananas ou solution de nettoyage pour lentilles de contact .
- Un filtre à café
- Un entonnoir de cuisine
- Un verre mesureur (en verre !) 100 cl avec un mixeur ou un blender en verre.
- Un verre mesureur 10 cl ou des tubes à essais

1ère étape : séparer

Mettre dans un blinder ou verre mesureur 100 cl + mixeur :

- 1/2 verre de pois cassés (100 ml)
- 1/8 cuillère à café de sel table (moins de 1 ml)
- 1 verre d'eau froide (200 ml)

Mélangez le tout à haute vitesse pendant 15 secondes .

Le mixeur sépare les cellules de pois les unes des autres, de sorte que vous avez maintenant une soupe de pois "cellulaire".

Étape 2 : Filtrage et mélange

1. Versez la soupe de pois à travers un filtre à café + entonnoir dans un autre récipient en verre propre.
2. Ajoutez 2 cuillères à soupe de liquide vaisselle (30 ml) et mélanger .
3. Laissez reposer le mélange pendant 5-10 minutes .
4. Versez le mélange dans des tubes à essai ou d'autres petits contenants en verre , chacun rempli au 1/3.

Pourquoi du liquide vaisselle?

Chaque cellule est entourée d'un sac (la membrane de la cellule). L'ADN se trouve à l'intérieur d'un deuxième sac (le noyau) au sein de chaque cellule. Pour visualiser l'ADN, nous devons briser ces deux sacs. Les membranes de la cellule ont deux couches lipidiques (matière grasse) avec des protéines en au milieu. Lorsque le détergent (liquide vaisselle) se rapproche de la cellule, il "capture" les lipides et

les protéines de façon similaire où il capture graisses et saleté dans vos plats quand vous faites la vaisselle.

Étape 3 : séparation

Ajoutez une pincée “d’enzymes” dans chaque tube à essai ou verre et mélangez délicatement.

Faites attention!

Si vous mélangez trop fort, vous brisez l’ADN , ce qui rend plus difficile l’observation.

Utilisez un attendrisseur de viande en guise de pincée “d’enzymes”. Si vous ne pouvez pas trouver de l’attendrisseur de viande, essayez d’utiliser le jus d’ananas ou de solution de nettoyage pour lentilles de contact (2 ou 3 gouttes).

Pourquoi une pincée d’enzymes?

Pour couper des protéines tout comme une paire de ciseaux. L’ADN dans le noyau de la cellule est moulé, plié et protégé par des protéines. L’attendrisseur de viande ou autres produits cités libèrent l’ADN des protéines.

Étape 4 : isoler

Inclinez votre tube à essai ou verre mesureur et versez lentement l’alcool (70–95 % alcool isopropylique ou éthanol) dans le tube sur le côté de sorte qu’il forme une légère couche sur le dessus du mélange de pois verts filtré.

Versez une quantité d’alcool quasi identique à la quantité de mélange, 15ml d’alcool pour 20ml de mélange de pois verts.

L’alcool est moins dense que l’eau, il flotte au-dessus du mélange. Recherchez des brins antiparallèles blancs filandreux sur la couche supérieur d’alcool dans le mélange.

Vous observez des macro molécules biologiques: de L’ADN !

Tips:

L’alcool dénaturé de couleur pourpre peut être un bon substitut à l’éthanol. Il est ainsi plus facile de voir la couche de précipité dans certains fruits de couleurs différentes. Et pour ceux qui demanderaient, non, tu ne peux pas le remplacer par du white spirit car ce n’est pas à base d’alcool.

L’ADN est une longue molécule filandreuse . Le sel que vous avez ajouté dans la première étape lui permet de coller ces molécules entre elles. Donc, ce que vous voyez sont des amas de molécules d’ADN enchevêtrées !

l’ADN reste normalement dissous dans l’eau , mais lorsque “l’ADN salé” entre en contact avec l’alcool , il devient non dissous. Ceci est appelé le précipité.

Vous pouvez utiliser un bâton de bois ou de paille pour recueillir les macro molécule d’ADN . Si vous souhaitez conserver votre ADN de pois cassés verts, vous pouvez le transférer dans un petit récipient

rempli d'alcool puis le refermé hermétiquement.

Étape 5 : Do It Yourself

Maintenant que vous avez réussi à extraire l'ADN d'une seule source, vous êtes prêt à expérimenter plus loin dans la curiosité. Essayez de faire par vous-même avec d'autres sources d'ADN. Quelle source vous donne le plus d'ADN? Comment pouvez-vous les comparer?

Expérimentez avec différents savons et détergents. Avez-vous du savon en poudre ainsi qu'autres des détergents liquides? Shampoing?

Expérimentez en laissant de côté des étapes ou en inter-changeant des étapes. Vous avez suivi un protocole mais est-ce vraiment nécessaire? Découvrez-le par vous-même. Sortez des règles! Essayez de modifier la quantité de chaque ingrédient que vous utilisez par exemple.

Voir aussi

- 2018
 - [Atelier d'initiation Biononymous & bioprivacy](#), octobre 2018, Rennes
 - [Atelier ADN IndieCamp](#), Août 2018, Kerbors
 - [Forum des usages coopératifs](#), Juillet 2018, Brest
 - [Parcours numérique](#), mars 2018, Nantes
- 2017
 - [BioPanique, Cuisine et Féminisme](#), 7 octobre 2017, Rennes
- 2016
 - [Atelier Biopanique, cuisine et féminisme](#)

Méthodes de purification d'échantillon

1. Extraction au Chloroforme de phénol

L'extraction du chloroforme de phénol¹⁾ (voir Kirby, 1957), normalement suivie d'une précipitation à l'éthanol, est la méthode traditionnelle pour éliminer les protéines d'un échantillon d'ADN. Dans cette procédure, la solution d'ADN est mélangée avec du phénol et du chloroforme. L'ADN soluble dans l'eau se divise en phase aqueuse, tandis que les protéines se dénaturent en présence de solvants organiques, restant ainsi dans la phase organique. La phase aqueuse contenant l'ADN sans protéine est alors prête pour le prélèvement.

- Avantages : Un moyen économique et efficace d'éliminer les protéines des solutions d'ADN.
- Inconvénients : Lent comparativement à la plupart des méthodes modernes. Il existe un risque de transfert de phénol/chloroforme dans l'échantillon final (ce qui pourrait inhiber les réactions enzymatiques en aval). Le chloroforme et le phénol sont tous deux des produits chimiques dangereux.

2. Précipitation de l'éthanol et déssalement

La précipitation de l'éthanol est une méthode populaire pour dessaler et concentrer l'ADN. Des cations monovalents (0,1 à 0,5 M, normalement sous forme de sel acétate de sodium) sont ajoutés à l'ADN, avec de l'éthanol à une concentration finale de 70 %. L'éthanol modifie la structure de l'ADN de sorte que les molécules d'ADN se regroupent et précipitent hors de la solution (voir Eickbush et Moudrianakis, 1978). La plupart des sels et des petites molécules organiques sont solubles dans l'éthanol à 70 %, laissant l'ADN précipité prêt pour la séparation par centrifugation.

- Avantages : Un moyen économique et efficace de dessaler et de concentrer l'ADN.
- Inconvénients : Cela prend du temps. Vous risquez de transporter de l'éthanol dans l'échantillon final.

3. Kits à base de colonne de silice

Les trousseaux sur colonne offrent une approche pratique pour le nettoyage de l'ADN. Le principe est que des sels chaotropes sont ajoutés à l'échantillon pour dénaturer l'ADN en rompant ses liaisons hydrogène. Dans ces conditions, l'ADN se lie sélectivement à la résine de silice de la colonne, ce qui facilite sa séparation du reste de l'échantillon. Après le lavage, l'ADN est élué de la colonne avec une solution à faible teneur en sel qui permet sa renaturation, entraînant une perte d'affinité de l'ADN pour la silice. La plupart des fournisseurs commerciaux proposent des kits basés sur cette technologie, avec une gamme de kits disponibles pour le nettoyage de l'ADN après extraction du gel d'agarose, réactions enzymatiques et PCR, pour n'en citer que quelques-uns.

- Avantages : Pratique, relativement rapide et l'utilisateur peut traiter un grand nombre d'échantillons en utilisant l'option collecteur sous vide.

Inconvénients : Peut être coûteux. Certains kits donnent de faibles rendements (jusqu'à 25%). L'entraînement chaotrope du sel peut être un problème.

Note : Certains fournisseurs offrent maintenant des trousseaux de colonne de silice améliorées, où l'élution de l'échantillon se fait en très petit volume pour obtenir de fortes concentrations d'ADN.

4. Échange d'anions

Les méthodes de purification de l'ADN par échange d'anions utilisent généralement des résines fonctionnalisées DEAE chargées positivement pour lier le squelette du phosphate d'ADN chargé négativement. Dans des conditions spécifiques de sel et de pH, l'ADN de l'échantillon lie la résine et des étapes de lavage rigoureuses éliminent les contaminants (p. ex. protéines, débris cellulaires). L'ADN restant peut ensuite être élué sélectivement de la résine.

- Avantages : ADN de haute pureté pour des applications en aval, par exemple transfection et séquençage de l'ADN.
- Inconvénients : les résines peuvent être coûteuses.

5. Perles magnétiques

Cette approche utilise des billes magnétiques qui se lient conditionnellement à l'ADN en fonction du pH, ce qui vous permet de séparer l'ADN du reste de l'échantillon par simple contrôle du pH. Il existe quelques kits de perles magnétiques sur le marché. Les billes magnétiques sont chargées positivement et se lient à l'ADN à faible pH, mais à pH élevé, elles deviennent chargées négativement, libérant ainsi l'ADN.

- Avantages : Rapide, sans sels chaotrophiques ou solutions de lavage organiques nécessaires. Idéal pour l'automatisation du traitement à haut débit, puisqu'il n'y a pas besoin de centrifugation ou d'autres étapes de traitement qui prennent du temps. Notez qu'il existe également des kits de billes magnétiques qui se lient sélectivement à l'ADN en fonction de la concentration en sel.
- Inconvénients : Le coût initial d'achat des aimants est raisonnablement élevé. Cette procédure peut s'avérer délicate lorsque vous manipulez plusieurs échantillons, mais ce n'est pas un problème si vous avez accès à un flux de travail automatisé.

voir également

- Protocoles pour prélèvements et analyses ADN quantitatives dans les sols, par le groupe genosol INRA Dijon https://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/protocoles

ADN, Educ Pop

¹⁾

https://fr.wikipedia.org/wiki/Extraction_au_ph%C3%A9nol-chloroforme

From:
<https://wiki.kaouenn-nouz.fr/> - **Kaouenn-nouz**

Permanent link:
https://wiki.kaouenn-nouz.fr/ateliers:collecte_et_extraction_d_adn_en_4_minutes?rev=1611241614

Last update: **2021/05/28 13:33**

