Introduction à extraction d'ADN − méthodes et procédures

Cette page documente les connaissances de bases communément acquises, ainsi que les procédures, techniques, méthodes basiques ; et indique les liens vers le documentation de techniques et méthodes en *biologie de garage ou biologie DIY*

> Pour une découverte plus simplifiée, à réaliser dans votre cuisine en 4 minutes, voir Extraction simple en TP de cuisine en 4 minutes

Type de documentation

> Cette page est une documentation en forme d'explication.

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

Cette page est axée sur la compréhension, explique, fournit des renseignements généraux et le contexte. Elle est comparable à un article sur l'histoire sociale de la tomate ou l'histoire sociale culinaire.

Exemple : Le wiki de communs

Répertoire : Les explications dans ce wiki

Support : Le portail dédié à la documentation et aux codes sources

2020/11/27 15:59 · xavcc

Intro

Le premier isolement de l'acide désoxyribonucléique (ADN) a été effectué en 1869 par Friedrich Miescher.

> le mot et concept biologie lui arrive en 1766 par Michael Christoph Hanow ; puis en 1797 par les médecins Roose, Burdach et Treviranus (1800 -1802) puis par Lamarck (1800 - 1802) naturaliste, botaniste, zoologiste.

Après plus de 150 ans de travaux et de recherche, extraire, isoler, qualifier de l'ADN est devenu une procédure de routine en biologie moléculaire ou dans les analyses médico-légales.

De plus en plus de matériels libres, y compris matériels bio-chimiques libres, permettent de faire de l'extraction d'ADN.

Procédure standard

Un fois l'échantillon de cellules, que nous souhaitons étudier, ont été prélevées

1. Il nous faut ouvrir les membranes cellulaires pour exposer l'ADN et le cytoplasme qu'elles contiennent (lyse cellulaire).
    - Les lipides de la membrane cellulaire et du noyau sont décomposés à l'aide de détergents et de surfactants.
    - Dégradation des protéines par l'ajout d'une protéase (facultatif).
    - Décomposition de l'ARN par l'ajout d'une RNase (facultatif).
2. La solution est traitée avec une solution saline concentrée afin d'agglomérer les débris tels que les protéines, les lipides et l'ARN.
3. Centrifugation de la solution, qui sépare les débris cellulaires agglutinés de l'ADN.
4. Purification de l'ADN à partir des détergents, des protéines, des sels et des réactifs utilisés pendant l'étape de lyse cellulaire. Les procédures les plus couramment utilisées sont les suivantes :
    - Précipitation à l'éthanol, généralement à l'aide d'éthanol ou d'isopropanol glacé. L'ADN étant insoluble dans ces alcools, il s'agrège et donne un culot lors de la centrifugation. La précipitation de l'ADN est améliorée en augmentant la force ionique, généralement en ajoutant de l'acétate de sodium.
    - Extraction phénol-chloroforme dans laquelle le phénol dénature les protéines de l'échantillon. Après centrifugation de l'échantillon, les protéines dénaturées restent dans la phase organique tandis que la phase aqueuse contenant l'acide nucléique est mélangée avec du chloroforme pour éliminer les résidus de phénol de la solution.
    - Purification sur minicolonne qui repose sur le fait que les acides nucléiques peuvent se lier (adsorption) à la phase solide (silice ou autre) en fonction du pH et de la concentration en sel du tampon.

Voir aussi : Billes de silicates et purification d'ADN

Les protéines cellulaires et histones liées à l'ADN peuvent être éliminées soit par l'ajout d'une protéase, soit en ayant précipité les protéines avec de l'acétate de sodium ou d'ammonium, soit en les extrayant avec un mélange phénol-chloroforme avant la précipitation de l'ADN.

Après l'isolement, l'ADN est dissous dans une solution tampon légèrement alcaline, généralement dans un tampon TE, ou dans de l'eau ultra-pure.

> Un Tampo TE se compose :
>
> - d'un fr:Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol)
> - d'une Eau purifiée / déminéralisée / dé-ionisée

Extraction organique

Extraction par chélation

La méthode d'extraction par chélation consiste à ajouter une résine (parfois de marque Chelex des Bio-Rad Laboratories) à l'échantillon dans un tube, à faire chauffer la solution (optionnel selon le protocole[1]), puis à la soumettre à un vortex et à la centrifuger.

Les matières cellulaires se lient aux billes de la solution de chélation, tandis que l'ADN devient disponible dans la couche liquide qui surnage.

La méthode par chélation est beaucoup plus rapide et plus simple que l'extraction organique, et elle ne nécessite qu'un seul tube, ce qui diminue le risque de contamination de l'échantillon d'ADN.

Désavantage, l'extraction par chélation ne permet pas d'obtenir une quantité très importante et l'ADN obtenu est fr:monocaténaire, ce qui signifie qu'il ne peut être utilisé que pour des analyses basées sur la PCR et non pour la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (ou RFLP, de l'anglais restriction fragment length polymorphism)

> Le produit de marque Chelex 100[2] est une résine chélatrice de cations, destinée à appauvrir la solution en cations divalents (principalement) de sorte que les enzymes qui en dépendent soient inactives.
>
> Une résine chélatrice inerte présente l'avantage de ne pas devoir être purifiée de la solution par la suite.
>
> Le Chelex 100 est onéreux !
>
> Théoriquement, tout chélateur à haute affinité peut être utilisé, à condition qu'il ait une affinité très élevée pour le magnésium, le manganèse, le calcium (qui peut être catalytique ou inhibiteur) et les ions similaires.

Extraction par phase solide

voir également

Autres Chélateurs[3] potentiels

- fr:EDTA, acide éthylènediaminetétraacétique
- EGTA egtazic acid
- 2,2 Bypidryl
- Acide Salicylique

Méthodes pour cas spécifiques

Des techniques spécifiques doivent être choisies pour isoler l'ADN de certains échantillons pour lesquels l'isolement de l'ADN est compliqué sont

- les échantillons contenant des inhibiteurs des procédures d'analyse ultérieures, plus particulièrement des inhibiteurs de la PCR, tels que l'acide humique du sol, l'indigo et d'autres colorants textiles ou l'hémoglobine dans le sang
- les échantillons provenant de micro-organismes à paroi cellulaire épaisse, par exemple les levures
- les échantillons contenant de l'ADN mélangé provenant de sources multiples
- * les échantillons archéologiques contenant de l'ADN partiellement dégradé, voir de l'ADN très ancien

L'ADN extrachromosomique est généralement facile à isoler, en particulier pour les plasmides peuvent être facilement isolés par lyse cellulaire suivie d'une précipitation des protéines, ce qui piège l'ADN chromosomique dans la part insoluble et après centrifugation, l'ADN plasmidique peut être séparé puis purifié à partir de la part soluble.

L'extraction d'ADN par procédure Hirt consiste à isoler tout l'ADN extrachromosomique d'une cellule de mammifère. Le processus d'extraction de Hirt élimine l'ADN nucléaire (plus grand haut poids moléculaire), ne laissant que l'ADN mitochondrial (plus faible poids moléculaire) et les épisomes viraux éventuellement présents dans la cellule.

ADN, Protocole

1)
Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. Juliane Casquet, C. Thébaud, R. Gillespie. DOI:10.1111/j.1755-0998.2011.03073.x

2)
“Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual” (PDF)

3)
https://openwetware.org/wiki/User:Alexander_Cvitan/Notebook/Experimental_Biological_Chemistry_Lab2014/01/29|Alexander Cvitan/Notebook/Experimental Biological Chemistry Lab/2014/01/29

From:
https://wiki.kaouenn-noz.fr/ - **Kaouenn-noz**

Permanent link:
https://wiki.kaouenn-noz.fr/protocole:techniques:introduction_aux_techniques_extraction_adn

Last update: **2021/11/09 16:18**