

EXTRACTION, PURIFICATION ET QUANTIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

1. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN

1.1. PRÉCAUTIONS À PRENDRE LORS DE L'EXTRACTION ET DE LA PURIFICATION D'ADN

Lors d'une purification d'ADN, il faut :

-
.....
.....
.....
.....
-
.....

1.2. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN CHROMOSOMIQUE

1.2.1. DÉMARCHE GÉNÉRALE

1.2.2. ÉTAPES

1.2.2.1. ÉTAPE N°1 :

.....
.....

Exemples :

Lorsque les cellules possèdent des parois, un traitement préalable est nécessaire pour lyser les parois :

On utilise : -

Exemples :

-

Exemple :

1.2.2.2. ÉTAPE N°2 :

Les protéines, en particulier les histones, peuvent être dissociées de l'ADN suite à leur dénaturation ou leur hydrolyse.

On peut utiliser :

-
-
-

1.2.2.3. ÉTAPE N°3 :

✓ MÉTHODE DE RÉFÉRENCE : L'EXTRACTION AU PHÉNOL-CHLOROFORME (V/V)

Ces deux composés sont des solvants de densité supérieure à l'eau.

Le phénol est un déprotéinisant très puissant mais toxique.

Le chloroforme permet la solubilisation de certains débris cellulaires (les lipides en particulier).

Après ajout de phénol-chloroforme, le mélange est agité puis centrifugé.

On obtient alors le résultat suivant :

Toute trace de phénol doit être éliminée pour permettre l'action ultérieure d'enzymes. C'est par ailleurs une molécule toxique.

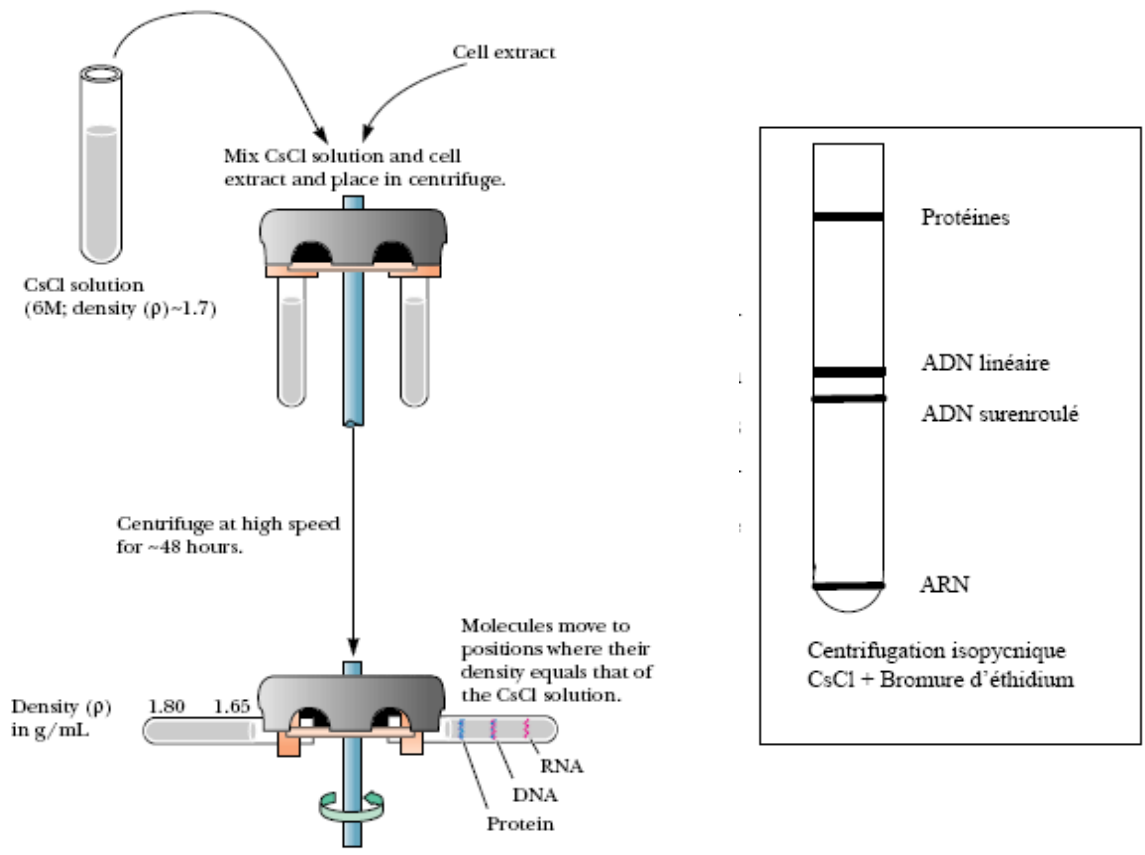
L'extraction au phénol-chloroforme est donc toujours **suivie d'une extraction au chloroforme**.

On ajoute souvent de l'**alcool isoamylique, agent anti-mousse** qui stabilise la séparation des phases.

✓ **MÉTHODES ALTERNATIVES :**

Ces méthodes présentent l'intérêt de ne pas utiliser de molécules aussi toxiques que le phénol.

- On a :
-
 - :
Un agent chaotrope est une molécule qui détruit la structure tridimensionnelle des macromolécules biologiques, comme les protéines, l'ADN ou l'ARN, et les dénature. Les agents chaotropiques interfèrent avec les interactions intramoléculaires faibles (non-covalentes), comme les liaisons hydrogène, les forces de Van Der Waals et les interactions hydrophobes.
 Dans ces conditions, l'ADN se fixe aux particules de silice disposées en colonne, sur filtre ou sur des billes magnétiques tandis que les protéines restent solubles.
 -
 -



Technique longue et lourde à mettre en œuvre donc peu utilisée (mais ADN de bonne qualité).

La bande est récupérée par ponction directe à l'aide d'une seringue.

L'élimination du BET se fait par extraction à l'isopropanol et celle du CsCl par dialyse.

1.2.2.4. ÉTAPE N°4 :

Cette étape n'est pas toujours nécessaire selon la technique d'extraction employée.

.....

.....

.....

.....

On peut également utiliser de l'isopropanol ; dans ce cas l'ajout de sels est inutile et on peut travailler à +4°C.

1.2.2.5. ÉTAPE N°5 :

Elle peut se faire :

-
-

1.2.2.6. ÉTAPE N°6 :

.....

1.3. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE

1.3.1. CARACTÉRISTIQUES DES PLASMIDES

Taille :

.....

-
-
-
-

Leur nombre de copies par cellule est variable :

- **1 à 5** pour les plasmides à répllication coordonnée à celle du chromosome.
- **15 ou plus** pour les plasmides à répllication indépendante de celle du chromosome : la répllication est possible même lorsque synthèse des protéines et la répllication du chromosome sont stoppés par action du chloramphénicol. L'ajout de chloramphénicol permet donc d'**amplifier** le plasmide (jusqu'à plusieurs centaines de copies).

1.3.2. MÉTHODES D'EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE

✓ _____ :

1.
.....
.....
2. :
—
.....
—
.....
.....
3.
.....
.....

✓ _____ :

Elles sont nombreuses et permettent une purification plus poussée des plasmides.

-
.....
-
.....
.....
-
L'ADN chromosomique intercale beaucoup de BET entre les bases d'où leur espacement tandis que l'ADN plasmidique incorpore peu de BET : L'ADN plasmidique est donc plus dense que l'ADN chromosomique.

1.4. CONTRÔLE DE PURETÉ D'UNE SOLUTION D'ADN

.....
.....
.....
.....

.....
D'autres longueurs d'ondes permettent d'affiner cette détermination de la pureté :

-
La mesure à $\lambda = 320$ nm est une bonne indication concernant les particules ou le matériel indésirable dans la préparation.

-

-

- les acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane) ont un **maximum d'absorption pour $\lambda = 280$ nm**. Le **ratio** $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ de la solution d'ADN est souvent utilisé comme **indicateur d'une contamination protéique ou ribonucléique (ARN)** :
.....
.....

- le **ratio** $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ est un second indicateur de pureté d'une solution d'ADN :
.....
.....

2. EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARN

2.1. DIFFICULTÉS DE L'EXTRACTION DES ARN

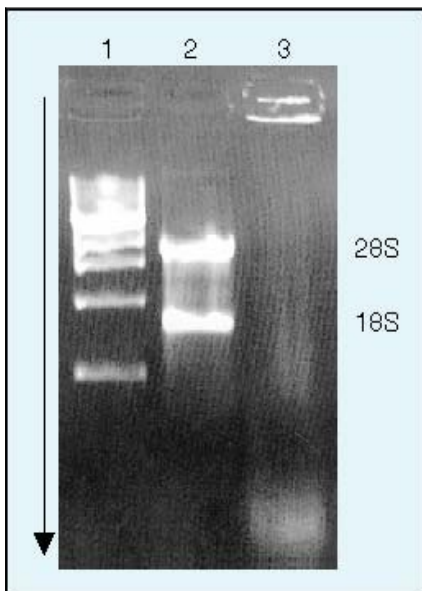
La préparation d'ARN est **plus délicate** que celle d'ADN car les **ribonucléases (RNAses) sont très répandues** (par exemple sur les doigts) et sont **fréquemment capables de se renaturer** après de nombreux traitements (même la dénaturation par la chaleur).

Les contaminations sont minimisées par :

-
-

La lyse cellulaire s'effectue dans milieu qui inactive les RNAses :

-
-



Électrophorèse sur un gel non dénaturant d'agarose à 1,2 % des ARN totaux extraits de lignées lymphoblastoïdes humaines.

- piste 1 : marqueur de taille 1 kb.
- piste 2 : ARN totaux non dégradés lors de l'extraction.
- piste 3 : ARN totaux dégradés par des RNAses lors de l'extraction (observation d'un *smear*)

2.2. MÉTHODES D'EXTRACTION-PURIFICATION DES ARN

Il existe plusieurs possibilités.

2.2.1. EXTRACTION AU PHÉNOL SATURÉ EN EAU EN CONDITIONS ACIDES

Elle est basée sur la **précipitation différentielle des ARN et de l'ADN en fonction du pH**.

-
-
-

2.2.2. MÉTHODES PAR ADSORPTION SUR SILICE (ÉVENTUELLEMENT MODIFIÉE)

.....

.....

2.2.3. ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITÉ DE CsCl

.....

2.2.4. CAS PARTICULIER DE LA PURIFICATION DES ARNm EUCARYOTES

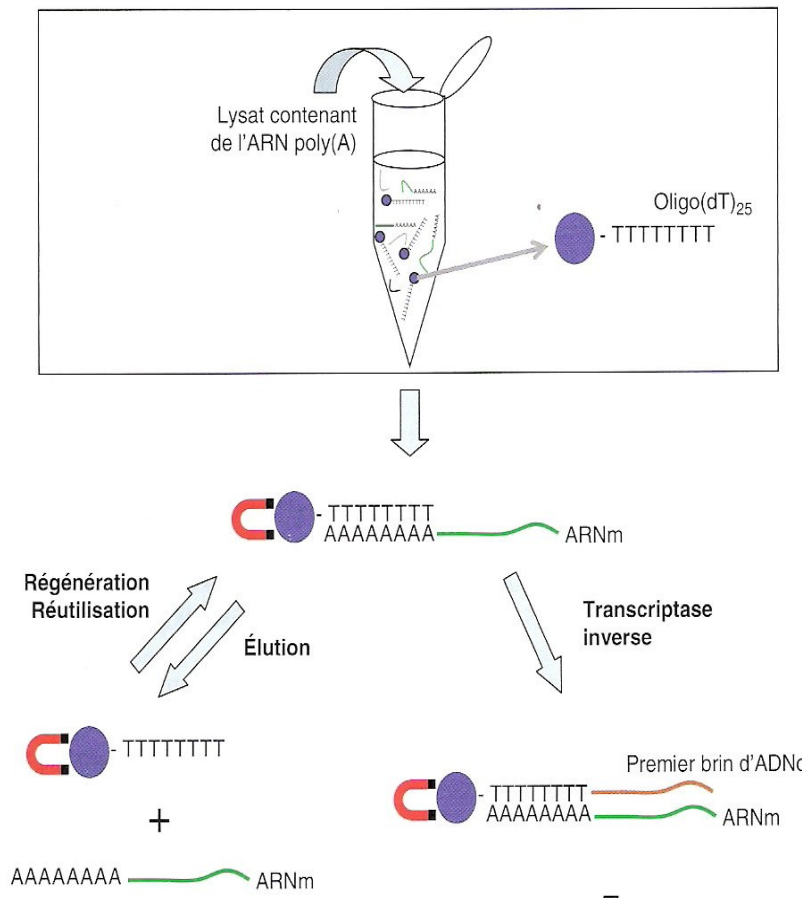
.....

.....

.....

.....

.....



Pour les ARNm procaryotes :

- élimination des ARNr 16S et 23S avec des billes portant les séquences complémentaires.
- ou - ARN bouilli : ARNr instables et pas les ARNm.

3. QUANTIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

3.1. DOSAGE COLORIMÉTRIQUE

.....
.....
.....

3.2. DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE UV À $\lambda = 260 \text{ nm}$

.....
.....

.....
.....

3.3. DOSAGE FLUORIMÉTRIQUE

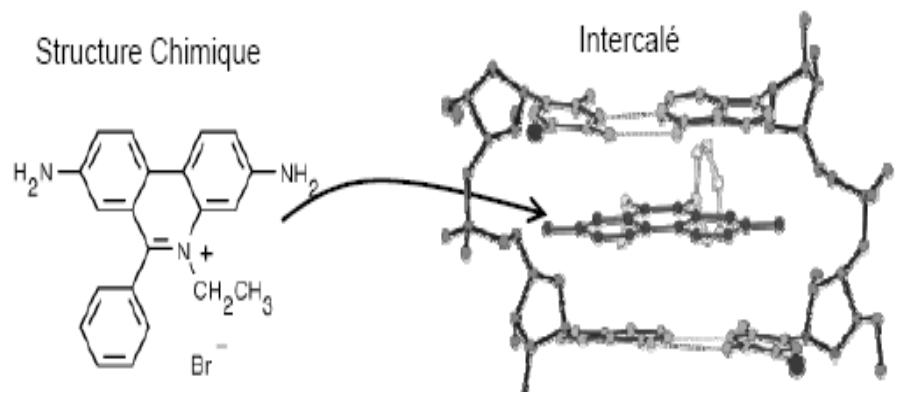
Certains composés faiblement fluorescents sous forme libre subissent un renforcement marqué de leur fluorescence lorsqu'ils se fixent aux acides nucléiques (fluorophores).

.....
.....

La concentration en ADN de la solution étudiée est obtenue par comparaison avec un étalon.

On peut utiliser :

-
-
-



- **DAPI** et **Hoescht 33258** interagissent sélectivement avec l'**ADN**.
-