

# EXTRACTION, PURIFICATION ET QUANTIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

## EXERCICES

### EXERCICE N°1 : Extraction de l'ADN génomique à partir de sang total

Réactifs :

– Tampon A :	Saccharose	0,32 mol.L <sup>-1</sup>
	Tris-HCl	10 mmol.L <sup>-1</sup>
	MgCl <sub>2</sub>	5 mmol.L <sup>-1</sup>
	Triton X-100	75 %
	Ajuster le pH à 7,6	
– Tampon B :	Tris-HCl	20 mmol.L <sup>-1</sup>
	EDTA-Na <sub>2</sub>	4 mmol.L <sup>-1</sup>
	NaCl	100 mmol.L <sup>-1</sup>
	Ajuster le pH à 7,4	

Mode opératoire :

- Introduire dans un tube à centrifuger :
  - 1 volume de tampon A.
  - 1 volume de sang.
  - 2 volume d'eau distillée froide et stérile.
- Homogénéiser doucement et placer dans la glace pendant 2 à 3 minutes.
- Centrifuger à 3 500 rpm à 4°C.
- Éliminer le surnageant dans une solution d'eau de Javel à 2,5 %.
- Reprendre le culot par 2 mL de tampon A et 6 mL d'eau distillée.
- Centrifuger 15 minutes à 3 500 rpm à 4°C.  
Le culot doit être de couleur blanche à crème. Si le culot est nettement rouge, répéter l'étape de lavage.
- Reprendre le culot par 5 mL de tampon B et 500 µL de SDS à 10 %.
- Ajouter ensuite 50 µL de protéinase K à 20 mg.mL<sup>-1</sup>.
- Incuber 2 heures dans un bain thermostaté à 55°C.
- Refroidir, puis ajouter 4 mL de solution de NaCl à 5,3 mol.L<sup>-1</sup>.
- Centrifuger 20 minutes à 4 500 rpm à 4°C.
- Transvaser le surnageant dans un nouveau tube. Prendre soin de ne pas remettre le culot en suspension.
- Ajouter un volume égal d'isopropanol froid (stocké à -20°C).
- Retourner 5-6 fois pour précipiter l'ADN.
- Récupérer l'ADN précipité avec une pointe et transférer dans un microtube.
- Ajouter 1 mL d'éthanol à 70 %.
- Laisser reposer 20 minutes à 37°C.
- Reprendre dans 300-400 µL de tampon Tris-HCl pH 8,5.
- Laisser à température ambiante pendant une nuit.  
L'ADN peut être stocké au réfrigérateur à +4°C pendant une année au maximum.  
Stockage à plus long terme en éthanol à -70°C.

**Q1.** Préciser le rôle du tampon A.

**Q2.** Indiquer la composition du culot à la première centrifugation.

**Q3.** Donner le rôle du SDS et de la protéinase K.

**Q4.** Expliquer le rôle de l'isopropanol. Indiquer un autre mélange permettant également cette étape.

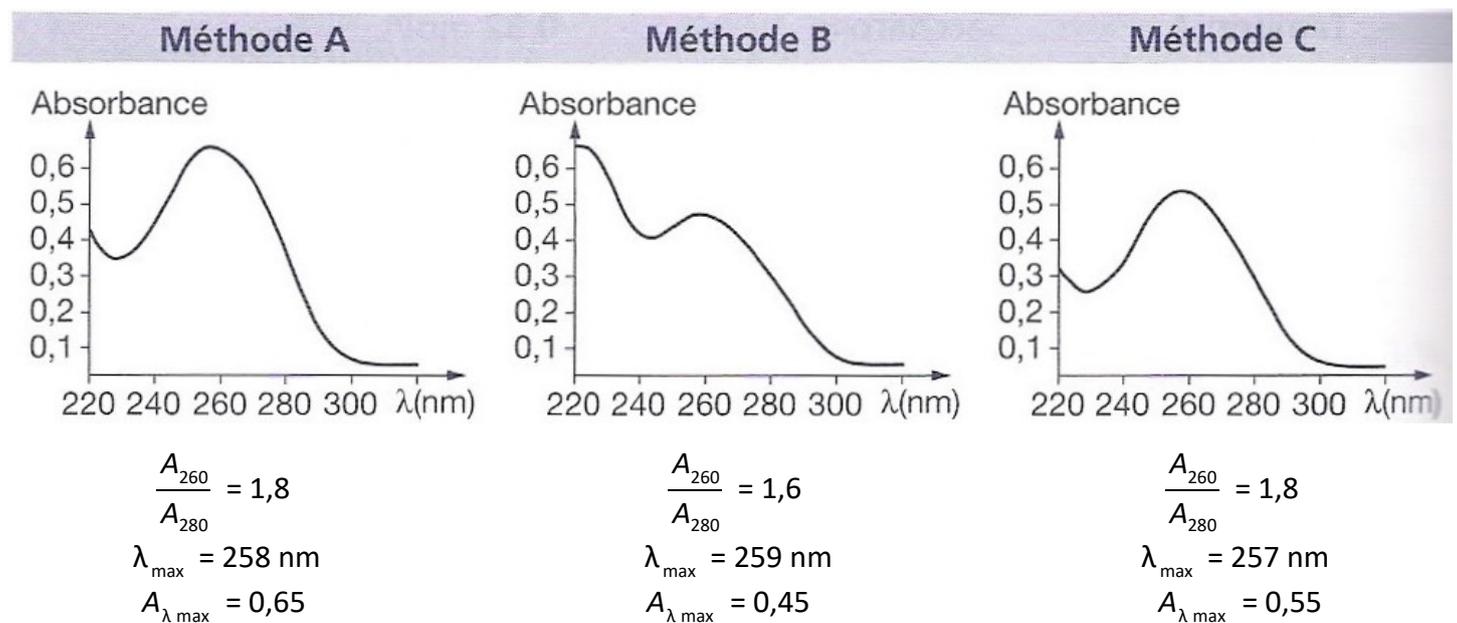
**Q5.** Donner le rôle de l'éthanol à 70 % et du tampon Tris-HCl *pH* 8,5 en fin de protocole.

## **EXERCICE N°2 : Comparaison de méthodes d'extraction d'ADN**

Trois méthodes d'extraction d'ADN sont réalisées en parallèle sur la même quantité du même échantillon biologique :

- Méthode A : extraction au phénol.
- Méthode B : précipitation par l'iodure de sodium.
- Méthode C : extraction par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (Nucleobon Clontech).

Les résultats obtenus sont les suivants :



**Q1.** Calculer les concentrations d'ADN dans les trois extraits.

**Q2.** Analyser l'ensemble des résultats et comparer les méthodes employées.