

TP BMANGG : EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN CHROMOSOMIQUE ÉTUDE DE LA DÉNATURATION THERMIQUE DE L'ADN MÉTHODES DE QUANTIFICATION DE L'ADN

Les activités à réaliser au cours de la séance ont pour objectifs :

- ✓ Extraire et purifier l'ADN chromosomique de *Saccharomyces cerevisiae* par méthode chromatographique.
- ✓ Évaluer la qualité de la purification de l'ADN chromosomique par spectrophotométrie UV.
- ✓ Doser la solution d'ADN chromosomique purifié par fluorimétrie.
- ✓ Étudier la dénaturation thermique de l'ADN chromosomique purifié.

1. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN CHROMOSOMIQUE AVEC LE KIT ZR FUNGAL/BACTERIAL MINIPREP™

1.1. PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION D'ADN CHROMOSOMIQUE

Sécurité : Certaines solutions du kit contiennent des composés irritants.

Ceci impose le port de gants et de lunettes de sécurité.

- 1) Après avoir bien agité, prélever 200 μL de suspension de levures et les transférer dans le microtube ZR *BashingBead™ Lysis Tube* contenant les billes.
- 2) Ajouter 750 μL de solution de lyse LS.
- 3) Fermer soigneusement le tube puis vortexer vigoureusement pendant 5 minutes.
- 4) Centrifuger à 10 000 g pendant 1 minute.
- 5) Transférer 400 μL de surnageant sur le filtre *Zymo-Spin™ IV Spin Filter* (bouchon orange) placé dans un tube collecteur et centrifuger à 7 000 rpm pendant 1 minute.
Casser la base du *Zymo-Spin™ IV Spin Filter* avant de l'utiliser.
- 6) Ajouter au filtrat obtenu 1 200 μL de tampon de liaison *DNA Binding buffer* BB.
Homogénéiser.
- 7) Transférer 800 μL de ce mélange sur une mini-colonne de chromatographie *Zymo-Spin™ IIC Column* placée dans un tube collecteur et centrifuger à 10 000 g pendant 1 minute.
- 8) Éliminer la fraction de lavage puis déposer les 800 μL restant de mélange sur la colonne placée dans le même tube collecteur. Centrifuger à 10 000 g pendant 1 minute et éliminer la fraction de lavage.
- 9) Ajouter 200 μL de tampon *DNA Pre-Wash Buffer* PWB sur la colonne placée dans un tube collecteur propre. Centrifuger à 10 000 g pendant 1 minute.
- 10) Ajouter 500 μL de tampon *DNA Wash Buffer* WB sur la colonne. Centrifuger à 10 000 g pendant 1 minute.
- 11) Transférer la colonne sur un microtube propre de 1,5 mL et ajouter 110 μL de tampon d'élution *DNA Elution Buffer* EB.
- 12) Centrifuger à 10 000 g pendant 30 secondes et récupérer la fraction d'élution.

1.2. COMPTE RENDU

Q1. Expliquer les principales étapes du principe de la purification d'ADN chromosomique par ce kit.

2. ANALYSE DE LA PURETÉ DE LA FRACTION PURIFIÉE D'ADN CHROMOSOMIQUE

2.1. PROTOCOLE

- Dans une microcuve UV, réaliser une dilution au $\frac{1}{4}$ de la solution d'ADN purifié en eau distillée pour un volume final de 400 μL .
- Réaliser un spectre d'absorption de la solution diluée d'ADN purifié contre un témoin de compensation adéquat sur une gamme de longueurs d'onde judicieusement choisie.
- Relever les valeurs d'absorbance de la solution diluée d'ADN purifié à $\lambda = 230 \text{ nm}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$ et $\lambda = 280 \text{ nm}$ contre un témoin de compensation adéquat.

2.2. COMPTE RENDU

Q2. Expliquer la réalisation de la dilution de la solution d'ADN purifié.

Q3. Donner la composition du témoin de compensation à utiliser.

Q4. Justifier la gamme de longueurs d'onde choisie pour la réalisation du spectre d'absorption.

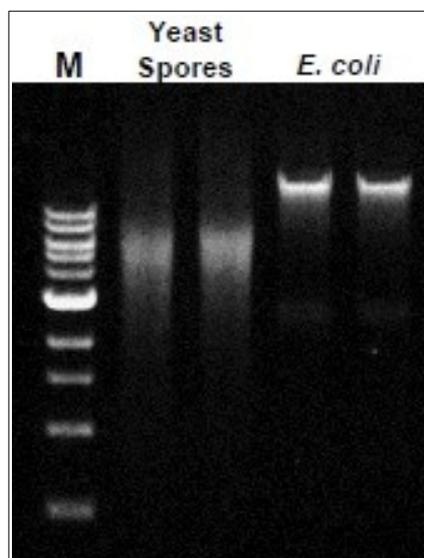
Q5. Expliquer le(s) moyen(s) d'évaluer la pureté de la solution diluée d'ADN chromosomique.

Q6. Évaluer la pureté de la solution diluée d'ADN chromosomique.

Q7. Déterminer la concentration d'ADN chromosomique dans la fraction purifiée non diluée.

Q8. La qualité de l'ADN purifié peut également être contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose révélé par le bromure d'éthidium.

La purification avec le kit utilisé donne les résultats suivants pour divers échantillons :



(yeast = levure)

Analyser les résultats obtenus. Conclure.

3. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA DÉNATURATION THERMIQUE DE L'ADN CHROMOSOMIQUE (une manipulation par groupe)

3.1. PROTOCOLE

- Placer un papier aluminium sur une cuve en quartz contenant la solution d'ADN purifiée diluée au ¼.
- Placer la cuve dans le spectrophotomètre thermostaté.
- Lire l'absorbance à $\lambda = 260$ nm, contre le témoin de compensation adéquat, pour des températures croissantes par intervalle de 5°C après 4 minutes d'équilibration.
On explorera un domaine de températures de +30 à +90°C environ.

3.2. COMPTE RENDU

Q9. Présenter les résultats expérimentaux obtenus dans un tableau.

Q10. Tracer la représentation graphique $A_{260} = f(\text{température})$.

Q11. Commenter et déterminer la température de fusion, notée T_m (melting temperature).

Q12. La valeur de T_m dépend du pourcentage en GC dans l'ADN. Expliquer.

4. DOSAGE DE LA SOLUTION D'ADN CHROMOSOMIQUE PURIFIÉ PAR FLUORIMÉTRIE

4.1. PROTOCOLE

On dispose d'une solution d'ADN de phage λ de concentration connue (standard) $\rho_{(\text{ADN } \lambda ; \text{standard})} = 0,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

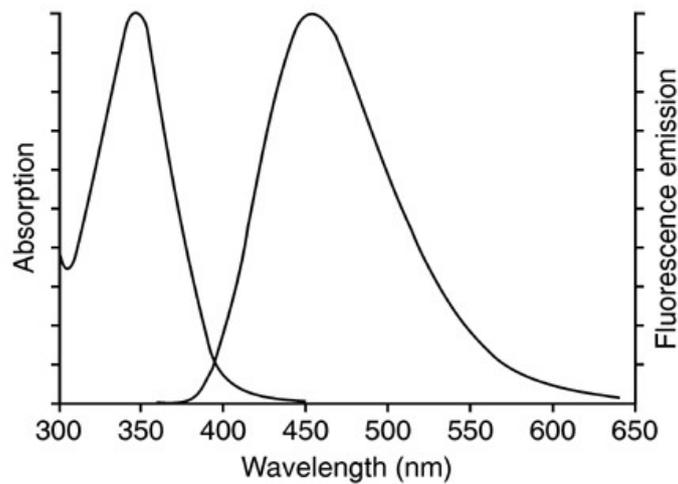
- Préparer, en macrocuvettes, des dilutions de ce standard dans du tampon TNE : 1/50^{ème}, 1/100^{ème} et 1/500^{ème}.
Le volume final dans chaque macrocuvette doit être de 1 mL.
- Préparer une macrocuvette contenant uniquement 1 mL de tampon TNE.
- À partir de la solution d'ADN purifié présente dans la microcuvette UV, réaliser une dilution au 1/50^{ème} en tampon TNE dans deux macrocuvettes.
Le volume final dans les macrocuvettes doit être de 1 mL.
- Ajouter, dans les différentes macrocuvettes réalisées, 1 mL de solution de Hoechst 2X.
- Homogénéiser doucement par aspiration-refoulement.
- Placer à l'obscurité 5 minutes.
- Mesurer l'intensité de fluorescence pour chacune des macrocuvettes contre le témoin de compensation.

4.2. COMPTE RENDU

Q13. Donner le principe de la fluorescence.

Q14. Donner le principe du dosage fluorimétrique.

Q15. Analyser les spectres du Hoechst présentés ci-après.



Q16. Présenter les résultats expérimentaux obtenus dans un tableau.

Q17. Tracer la droite d'étalonnage.

Q18. Déterminer la concentration d'ADN chromosomique dans la solution non diluée d'ADN purifié.

Q19. Comparer le résultat obtenu à celui de la question Q7.

Q20. Donner un intérêt du dosage fluorimétrique par rapport au dosage spectrophotométrique dans les UV.

TP BMANGG : EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN CHROMOSOMIQUE

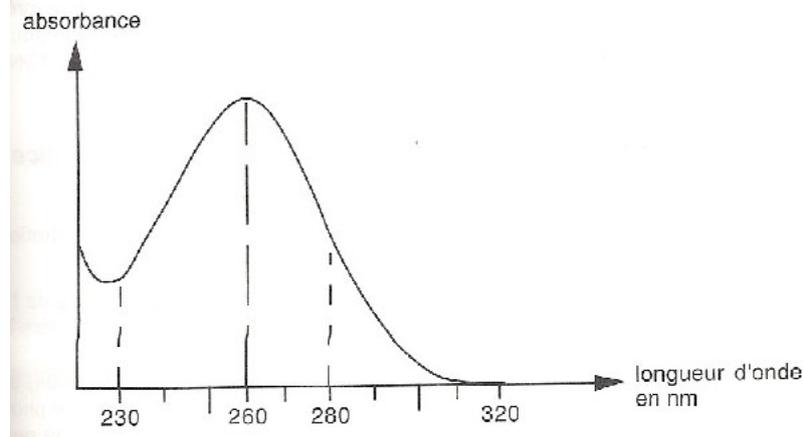
ÉTUDE DE LA DÉNATURATION THERMIQUE DE L'ADN

MÉTHODES DE QUANTIFICATION DE L'ADN

ANNEXE : Contrôle de la pureté d'une solution d'ADN

L'absorption dans l'UV est utilisée pour caractériser la pureté et la concentration d'une solution d'ADN.

- 1) Le maximum d'absorption d'une solution d'ADN se situe à $\lambda = 260 \text{ nm}$. À cette longueur d'onde, ce sont essentiellement les bases azotées pyrimidiques et puriques qui sont responsables de l'absorption. L'allure du spectre est identique pour une solution d'ARN ou d'ADN purifié.



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

- **L'absorbance à $\lambda = 320 \text{ nm}$ doit être inférieure à $0,1 \cdot A_{260}$.**
La mesure de l'absorbance à $\lambda = 320 \text{ nm}$ est une bonne indication concernant les particules ou le matériel indésirable dans la solution.
- **Un épaulement à $\lambda = 270 \text{ nm}$ indique une éventuelle contamination par le phénol.**
- **Un épaulement à $\lambda = 230 \text{ nm}$ indique une éventuelle contamination par les glucides.**

- 2) Les acides aminés aromatiques tyrosine et tryptophane ont un **maximum d'absorption pour $\lambda = 280 \text{ nm}$** .

Le **ratio $\frac{A_{260}}{A_{280}}$** d'une solution d'ADN est souvent utilisé comme indicateur d'une contamination protéique ou ribonucléique (présence d'ARN) :

- Si $\frac{A_{260}}{A_{280}} < 1,8$: on suspecte une contamination protéique significative et/ou par le phénol.
- Si $\frac{A_{260}}{A_{280}} > 2$: on conclut à une contamination significative par les ARN.

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

- Si $\frac{A_{260}}{A_{230}} < 2$: on suspecte une contamination par des glucides, et/ou par du phénol.
- Si $\frac{A_{260}}{A_{230}} > 2,2$: on suspecte une erreur avec la réalisation du blanc (composition inadéquate).