

TP n°1 : Extraction de l'ADN

1. But du TP

Le but du TP consiste à extraire de l'ADN génomique total à partir de quelques végétaux (bananes, fraises, oignons, chou-fleur, ...).

2. Principe

Lyse cellulaire ensuite extraction par une combinaison de phénol et de chloroforme.

3. Matériel et réactifs

✓ Matériel :

Matériel végétale (banane, fraise, oignon, ...), lame a bistouri, mortier et pilon, entonnoir, éprouvettes, papier filtre (ou gaze à pansement), centrifugeuse et tubes à centrifuger, micropipettes et embouts, tubes à eppendorf, bain Marie, bac à glace et glace, hotte chimique, gants, azote liquide.

✓ Réactifs

Tris-HCL, EDTA, NaCl, SDS (sodium dodécyl sulfate), protéinase K, ARNase A, eau distillée stérile, phénol/chloroforme/alcool isoamylque, éthanol pure, éthanol 70%.

✓ Préparation de la solution de lyse (pH=8)

Solutés	Concentrations
Tris-Hcl	100 mM
EDTA	50 mM
NaCl	1 M
SDS	1 %
Proteinase K	
ARNase A	

* Prépare la solution de lyse sans protéinase K et ARNase A.

* Ajouter la protéinase K et l'ARNase A dans le tampon de lyse au dernier moment.

✓ Préparation du tampon TE

Tris-HCl 10mM (pH 7,5)

EDTA mM

4. Mode opératoire

- Découper le matériel végétal dans un mortier, ajouter de l'azote liquide et écraser le matériel jusqu'à obtention d'une poudre. Transformer la poudre dans un tube maintenu dans un bac à glace.
- Ajouter la solution de lyse avec inversement des tubes doucement.
- Mettre les tubes dans un bain Marie à 65°C pendant 20 min.

- Récupérer les tubes et ajouter le phénol saturé en Tris pH 8 et le chloroforme/alcool isoamilique (24 :1, v/v).
- Centrifuger à 10000 tr/min pendant 10min.
- Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube stérile.
- Ajouter un volume égal d'éthanol pur refroidi à -20°C pendant 15 min.
- Récupérer l'ADN par centrifugation à 10000 tr/min pendant 10 min.
- Eliminer le surnageant et laver le culot deux fois avec l'éthanol 70%.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot ADN à l'air libre.
- Ajouter le tampon TE et bien resuspendre l'ADN.

TP n°2 : Spectre d'absorption dans l'UV et estimation de la pureté de l'extrait d'ADN

1. But du TP

Le but du TP consiste à étudier les propriétés physicochimiques des acides nucléiques en évaluant le spectre d'absorption dans l'UV et en estimant la pureté de l'extrait d'ADN préalablement préparé dans le TP précédent.

2. Principe

Les acides nucléiques (ADN et ARN) possèdent la capacité d'absorber à une longueur d'onde (λ) de 260 nm. Cette propriété peut être utilisée pour doser la quantité d'acides nucléiques en solution et pour en estimer la pureté (contamination avec des protéines). La loi de Beer-Lambert donne une relation entre l'absorbance (A) d'une solution et sa concentration dans la solution. Cependant, les spectrophotomètres que nous utilisons ont des limites de fabrication ; ils ne peuvent suivre cette loi que pour des A comprises entre 0 et 1. Au-delà de cette valeur, la droite n'est plus linéaire et les valeurs d'A obtenues sont sous-estimées. Il est donc indispensable de diluer les échantillons pour être toujours dans la bonne zone de lecture.

3. Matériel et réactifs

✓ Matériel :

Extrait d'ADN en solution, micropipette, embouts, tubes à essai, spectrophotomètre UV et cuve en quartz de 1cm.

✓ Réactifs

Tampon TE.

4. Mode opératoire

• Spectre d'absorption.

Prélever 0.5 ml de la solution d'ADN obtenue en fin du TP1, faire une dilution au 1/10 et tracer le spectre d'absorption $DO = f(\lambda)$ entre 220 et 300 nm.

λ	220	230	240	250	260	270	280	290	300
2DO									

En déduire λ max.

• Estimation de la pureté de l'extrait d'ADN

Utiliser les valeurs des DO pour les longueurs d'ondes 260 et 280. Calculer le rapport DO_{260}/DO_{280} .

En général pour des solutions d'ADN pure, ce rapport doit être compris entre 1.8 et 2 :

- Si ce rapport est inférieur à 1.8, l'extrait d'ADN est contaminé avec des protéines.
- Si en revanche le rapport est supérieur à 2, l'extrait d'ADN est contaminé avec de l'ARN.

- **Travail à faire**

- Déterminer le rapport A260/A280.
- Donner vos conclusions sur le degré de pureté de votre extrait d'ADN.
- Déterminer la concentration de la préparation d'ADN sachant que 1 unité d'absorbance à 260nm correspond à une concentration d'ADN de 50 µg/ml.

On déduit la concentration grâce au calcul suivant :

$$[C] (\mu\text{g/ml}) = \text{facteur de dilution} \times \text{DO}_{260\text{nm}} \times 50\mu\text{g/ml}$$

TP n°3 : Amplification par PCR du gène d'actine

1. But du TP

Apprendre manipuler la technique PCR classique et amplifier *in vitro* une séquence choisie de l'ADN (gène d'actine) en tirant partie du mode normal de synthèse de l'ADN *in vivo*.

2. Matériel et réactifs

✓ Matériel :

Micropipette : 1-10 μ l et 10-100 μ l, embouts, tubes à eppendorfs : 2ml et 0.5ml, hotte chimique, gants, thermocycleur.

✓ Réactifs

H₂O stérile, tampon de réaction, dNTP, amorces : (ActinFW : TGG AAT CCA CGA GAC AAC CTA et actinREV : TTC TGT GAA CGA TTC CTG GACA), Taq polymérase, ADN matrice.

3. Mode opératoire

• Préparation de la réaction

Volume final de réaction par échantillon 25 μ l (2 μ l ADN + 23 μ l Mix).

Les produits doivent être ajoutés dans l'ordre indiqué. La réaction se fait dans un total de 25 μ l, le prémix (23 μ l X) ne contient pas d'ADN.

Mix	Concentration initiale	Quantité ou concentration finale	Volume à prélever	Prémix X
H ₂ O stérile		Ajuster à 25 μ l		
Tampon de réaction	10 X	1 X		
dNTP	20 μ M	0.8 μ M		
Amorce ActinFW	10 μ M	0.4 μ M		
Amorce ActinREV	10 μ M	0.4 μ M		
ADN polymérase		0.1 μ M		
ADN matrice		2 μ L	2 μ L	Ajouter à la fin

Programmez la machine PCR :

94 °C 2min

94 °C 40s

57 °C 40s

72 °C 1min 30

x 35

72 °C 5min

Débutez la PCR