

Extractions et purifications des acides nucléiques

Introduction

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant.

Il existe différents protocoles expérimentaux pour extraire les acides nucléiques, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines et des lipides
- Elimination d'un acide nucléique donné : en effet, un « extrait acides nucléiques » brut contient en mélange ARN, ADN génomique et ADN plasmidique pour les bactéries par exemple.

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement l'extraction et la purification à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

1. Techniques d'extraction et de purification

1.1. Préparation d'extraits bruts

A. Lyse des cellules

Pour lyser les cellules on peut utiliser soit un système mécanique soit un système chimique suivant le type de cellules concerné.

➡ Lyse mécanique :

Pour la lyse mécanique, on utilise de préférence des méthodes ou systèmes qui ne dénaturent pas l'ADN. On utilise par exemple le choc thermique (cycles de congélation/ décongélation) ou le choc osmotique.

La lyse mécanique est préférentiellement réservée aux cellules eucaryotes.

➡ Lyse chimique :

Ce traitement crée des brèches dans la paroi. Avec la perte de protection assurée par la paroi contre la forte pression osmotique intracellulaire, la cellule gonfle jusqu'à rupture de la membrane plasmique.

la désorganisation de la membrane plasmique, des hydrolases spécifiques peuvent être employées tel que les lysozymes chez les bactéries (Peptidoglycane), Cellulase, Hémicellulase, Pectinase chez les végétaux (Cellulose, Hémicellulose, Pectines)... ainsi des détergents sont utilisés pour désorganiser les membranes et de solubiliser les lipides membranaires. Exemple: le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), triton X100, sarcosyl. Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment larges pour libérer le contenu du cytoplasme. Suivant leur force (chargés ou pas), les détergents vont aussi plus ou moins dénaturer les protéines membranaires. La dénaturation des protéines de la membrane plasmique contribue également à la lyse de la cellule.

B. Elimination des protéines

Cette **étape** sera très importante pour l'élimination des histones eucaryotes. On peut procéder de deux façons différentes.

➡ Déprotéinisation par hydrolyse enzymatique :

Elle est réalisée en faisant agir une endoprotéase non spécifique comme la protéinase K.

➡ Précipitation des protéines en utilisant un agent chaotrope :

Un agent chaotropique est un sel (donc des ions) qui modifie la solubilité des molécules (protéines ou acides nucléiques) et qui peut provoquer leur précipitation. Exemple: le chlorure de sodium (NaCl) à forte concentration et le sulfate d'ammonium.

C. Réactifs divers ajoutés au tampon d'extraction

- Lorsqu'on utilise les agents chaotropiques pour éliminer les protéines par précipitation, on ajoute quelque fois dans le tampon d'extraction des thiols pour empêcher la reformation de ponts disulfures des protéines qui restent ainsi à l'état dénaturé.
- Une forte concentration saline (NaCl 0,15 M) du milieu d'extraction empêche la séparation des deux brins de l'ADN, le citrate de sodium et l'acétate de sodium sont aussi utilisés dans les tampons d'extraction jouent le même rôle = stabilise l'ADN sous sa forme bicaténaire.
- Le tampon contient souvent de l'EDTA

D. Elimination des ARN lors de l'extraction de l'ADN

- Hydrolyse chimique avec NaOH. A pH alcalin l'ARN est hydrolysé et pas l'ADN
- Digestion enzymatique, on utilise une RNase

1.2. Purification par extraction phénol-chloroforme

- Principe de la méthode d'extraction : les méthodes utilisent la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques / contaminant comme les protéines et les lipides) entre deux phases non miscibles.

En pratique : on mélange vigoureusement la solution d'acides nucléiques en phase aqueuse à une phase non miscible hydrophobe. Après centrifugation, on récupère la phase aqueuse contenant les acides nucléiques à la pipette (phase aqueuse = phase supérieure).

Deux extractions successives qui se distinguent selon la phase non miscible :

- ➡ **l'extraction phénolique** : elle est utilisée pour débarrasser les acides nucléiques des protéines car le phénol est un déprotéinisant puissant. Les protéines précipitent, elles sédimentent au fond de la phase aqueuse mais et elles restent à l'interface c'est-à-dire qu'elles restent à la surface de la phase phénolique qui est une phase hydrophobe. Les débris membranaire lipidiques vont aller dans la phase phénol hydrophobe. Le phénol doit être très pur et saturé en tampon (pH 8 pour extraire l'ADN). L'inconvénient du phénol réside dans son caractère très corrosif, c'est donc un produit à manipuler avec précaution.
- ➡ **l'extraction au chloroforme** : elle complète toujours l'extraction précédente pour éliminer toutes traces de phénol aqueux. Toute trace de phénol doit être éliminée pour permettre l'action ultérieure d'enzyme (de restriction par exemple) sur l'acide nucléique extrait. Le chloroforme est additionné d'alcool isoamylique (AIA = 3-méthyl-1-butanol = $(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) qui est un agent antimousse stabilisant la séparation des phases (agent déstabilisant de l'émulsion).

1.3. Concentration par précipitation à l'éthanol froid

- **Précipitation à l'alcool éthylique** : La précipitation est réalisée par addition de l'éthanol moins polaire que l'eau. Il faut ajouter à un volume de solution, au moins deux volumes d'éthanol.
- On récupère les acides nucléiques sous forme solides.
- Le précipité est lavé avec de l'éthanol à 70 % pour se débarrasser des sels.
- Puis le précipité est séché. Le séchage est obligatoire pour éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution ultérieure du précipité.
- Après le séchage, les acides nucléiques pourront être resolubilisés dans un tampon adéquat (souvent tampon TE = Tris-EDTA pH 8).

- **Précipitation à l'isopropanol** : Le principe est le même que précédemment sauf que le sel n'est pas nécessaire et que les petits fragments d'ADN sont éliminés car non précipités. Dans ce cas, on procède à un mélange volume à volume. Le précipité sera également lavé pour éliminer les traces d'isopropanol puis séché.

2. Conservation des acides nucléiques

- ➡ Conservation de l'ADN : L'ADN peut être conservé dans un tampon (10mM Tris pH=8) additionné d'EDTA (1mM) à 4°C.

- A pH 8, la dégradation de l'ADN est notablement plus faible qu'à pH 7.

- L'EDTA permet de chélater les ions divalents (nécessaires de les piéger pour inactiver les nucléases) et ils évitent aussi la croissance de microorganismes.

L'ADN peut être également conservé à -20°C dans le même tampon mais des cycles successifs de congélation/décongélation entraînent des cassures des acides nucléiques de grande taille (>10kb). D'où la nécessité de réaliser des fractions aliquotes pour la conservation si nécessaire.

3. Quantification des acides nucléiques

- ➡ **Absorptiométrie UV** : La quantification est effectuée par spectrophotométrie, les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'ultraviolet à 260 nm.

* Correspondance A260 nm et concentration en acides nucléiques La mesure de l'absorbance à 260 nm est une méthode précise si l'ADN est pur et natif. Cette méthode est peu sensible, et ne peut pas être utilisée pour des concentrations inférieures à 250 ng/mL (A260 nm = 0,005 UA).

Une unité d'absorbance à 260 nm (DO lue sur le spectrophotomètre) correspond à :

- une solution d'ADN double brin à 50 µg/mL
- une solution d'ADN simple brin à 37 µg/mL
- une solution d'ARN à 40 µg/mL

- ✓ **Rapport A260 nm / A280 nm et contrôle de la pureté d'une solution d'ADN :**

Les protéines absorbent également à 260 nm mais leur maximum d'absorption se situe, lui, à 280 nm. Ainsi, le rapport A260 nm/A280 nm constitue un moyen d'apprécier une éventuelle contamination de la solution d'ADN :

- un rapport compris entre 1,8 et 2 correspond à une solution pure d'ADN ;
- un rapport inférieur à 1,7 est le signe d'une contamination par des protéines ;
- un rapport supérieur à 2 est le signe d'une contamination par l'ARN.

- Une éventuelle contamination par du phénol peut être recherchée en mesurant l'absorption à 270 nm (rarement pratiqué).

- ➡ **Fluorimétrie** : L'ADN peut aussi être dosé avec plus de sensibilité et de spécificité par fluorimétrie après coloration par un fluorochrome spécifique.

Cette technique est plus sensible que la spectrophotométrie. De plus il est possible de travailler sur de plus faibles volumes (10 µL). Cette méthode présente cependant un inconvénient : elle est sensible à la composition en bases (le fluorochrome peut se fixer préférentiellement sur les ADN riches en A-T ou G-C). Cette technique ne quantifie pas l'ARN.