

Extraction d'ADN génomique bactérien

L'objectif de la séance est de purifier de l'ADN génomique d'E. coli.

Les cellules sont d'abord concentrées après centrifugation puis lysées. On réalise ensuite une extraction au phénol ce qui permet de se débarrasser des protéines cellulaires. Les molécules d'ARN sont éliminées par des RNase.

Pour concentrer l'ADN, la méthode utilisée ici est la précipitation à l'éthanol.

Le dosage des acides nucléiques et la vérification de la pureté se font par mesure du spectre d'absorption U.V.

Protocole

1. Lyse cellulaire et dénaturation des protéines

- Dans un tube à centrifuger en polypropylène, introduire 3mL de culture d'E.coli. Centrifuger 5 minutes à 150 g.
- Retirer le surnageant et redissoudre le culot dans 2,5mL de tampon S.E.
- Ajouter 0,15mL de solution de lysozyme
- Incuber 30 minutes à 37°C puis ajouter 0,2mL de SDS
- Mélanger doucement par retournements et incuber 10 minutes à 60°C.
- Refroidir dans la glace jusqu'à température ambiante.
- Ajouter lentement 0,60mL de NaClO₄.
- Bien mélanger par agitation douce.

2. Extraction au phénol

- Ajouter dans le même tube un volume (soit 3,5mL) de phénol saturé.
- Fermer hermétiquement le tube.
- Mélanger par retournements successifs pendant 5 minutes de manière à maintenir une émulsion
- Centrifuger 5 minutes à 1600g à température ambiante de manière à obtenir 2 phases bien séparées et à l'interface, les protéines précipitées.
- Transférer avec précaution la phase aqueuse (phase supérieure contenant les acides nucléiques) dans un tube propre en veillant à ne prélever ni la phase organique (phénolique), ni les protéines précipitées.

Procéder à une nouvelle extraction par le mélange phénol/chloroforme :

- Ajouter 3,5mL de phénol/chloroforme, (a)
- Fermer hermétiquement le tube, (b)
- Mélanger par retournements successifs pendant 5 minutes de manière à maintenir une émulsion (c)
- Centrifuger 5 minutes à 1600 g à température ambiante, (d)
- Transférer avec précaution la phase aqueuse dans un tube propre en veillant à ne prélever ni la phase organique, ni les protéines précipitées (e)
- Ajouter 100µg de RNase par mL de solution aqueuse.
- Incuber le mélange 15 minutes à 37°C

Procéder à une nouvelle extraction par le mélange phénol/chloroforme : étapes a, b, c et d précédentes

- Transférer la phase aqueuse dans un tube propre.
- Ajouter à la phase aqueuse le même volume de chloroforme afin d'éliminer toute trace de phénol puis répéter les étapes b, c et d.

3. Concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol

- Transférer la phase aqueuse dans un tube propre : déterminer approximativement le volume prélevé.
- Ajouter: 2,5volumes d'éthanol à 95% et un volume V d'acétate de sodium pour obtenir une

- concentration finale de 0,3 M
- Mélanger et laisser séjourner 30 minutes à -20°C.
- Centrifuger 15 minutes à 12000 g et éliminer avec précaution le surnageant.
- Laver le culot par une solution d'éthanol à 70%.
- Centrifuger à nouveau 5 minutes à 12000 g et éliminer le surnageant.
- Sécher le culot afin d'éliminer les traces d'éthanol (évaporateur relie à un dessiccateur).
- Dissoudre le précipité dans 0,5mL de SSC.

4. Contrôle de pureté et dosage d'ADN

- Réaliser une dilution au 1/10^{ème} de la solution d'ADN directement dans une cuve en quartz (diluante: SSC).
- Tracer le spectre UV de la solution entre 210 et 330 nm.
- Déterminer les absorbances à 260 nm, 270 et 280 nm.
- Déterminer le rapport A_{260} / A_{280} .
- Conclure quant à la pureté de l'ADN obtenu.
- Calculer la quantité totale et la concentration d'ADN obtenues sachant que 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration d'ADN de 50µg/mL.
- Reprendre les différentes étapes sous la forme d'un organigramme et indiquer les rôles essentiels de chacune d'elles et des produits utilisés.

Matière d'œuvre et explications

Culture d'E.coli de 18 à 37°C en milieu riche.

Tampon SE: saline-EDTA, pH=8, l'EDTA est un complexant des ions Mg^{2+} , cofacteurs des DNases.

Lysozyme (10mg/mL): cf cours microbio

SDS 25%: sodium dodécyl sulfate = détergent

$NaClO_4$: perchlorate de sodium: le perchlorate dénature les protéines

Phénol: on utilise du phénol saturé qui est un dénaturant des protéines et un agent de précipitation

Phénol/Chloroforme: idem, le chloroforme piège le phénol

Éthanol froid à 95%: précipitation de l'ADN par déshydratation ce qui entraîne l'agrégation des molécules en de multiples brins précipités.

Na^+ : les ions Na^+ neutralisent les phosphates de l'ADN ce qui facilite l'agrégation des molécules d'ADN

SSC: sodium saline citrate

Acétate de sodium: concentration de 3M

Rnase : 10mg/mL

Les protéines absorbent à 280 nm, le phénol à 270 nm et les acides nucléiques à 260 nm.

Le rapport A_{260} / A_{280} doit être supérieur à 1,8 pour une bonne purification.

Un pic d'absorbance à 270 nm indique une contamination par le phénol.