

Biologie Moléculaire et Génie Génétique

Chapitre II : Techniques de préparation de l'ADN

Dr. SELKA SARRA

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté SNV-STU

Département de Biologie

Email: s.selka.sek@gmail.com

1.0

Table des matières

I - Chapitre II: Techniques de préparation de l'ADN	3
1. Extraction d'ADN génomique et plasmidique	3
2. La digestion	6
3. Electrophorèse sur gel d'agarose	7
4. Isolement des fragments.....	9

Chapitre II: Techniques de préparation de l'ADN



1. Extraction d'ADN génomique et plasmidique

ADN végétal, ADN humain, ADN animal, ADN microorganisme

? Exemple

ADN génomique :

- Phase de lyse
 - Phase de purification
 - Phase de lavage

ADN plasmidique :

- La lyse alcaline
 - Gradient de chlorure de césium CsCl

1.1. Protocole d'extraction d'ADN génomique

• **Extraction d'ADN végétal par la méthode classique CTAB :**

✓ **Phase de lyse :**

- Broyage des feuilles,
- Ajouter CTAB (élimination des protéines et les polysaccharides),
- Ajouter « 2-mercapto- éthanol » (lyse des protéines),
- Incubation à 60°C,

✓ **Phase de purification :**

- Additionné (chloroforme /alcool isoamylique) : précipitation des protéines,
- Ajouter l'isopropanol, éthanol : précipitation,

✓ **Phase de lavage :**

- Ajouter tampon de lavage, éthanol 70% : afin d'enlever les Sels,
- Séchage de l'ADN à l'air libre,
- Ajouter TE X1 et incuber au bain marie,
- Traiter la solution avec RNase,
- Stockage à 4°C /-20°C.

- **DNA extraction from whole blood using the NaCl "Salting out" method**

- **1er jour :**

- Lavage du sang avec TE10/10,
- Répéter jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre (culot de globules blancs),
- Ajouter tampon de lyse des globules blancs et protéinase K (pK),
- Incubation à 37°C pendant une nuit,

- **2eme jour :**

- Ajouter NaCl,
- Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu froid (précipitation de l'ADN),
- Prélever la méduse (l'ADN) à l'aide d'une pipette Pasteur scellée, le rincer une fois avec de l'éthanol à 70%,
- Séchage à l'air libre,
- Dissoudre la méduse (l'ADN) dans TE10/1,

1.2. Protocole d'extraction d'ADN plasmidique

- **La lyse alcaline**

1. Culture bactérienne :

- Faire pousser une culture de bactéries (comme E. coli) contenant le plasmide d'intérêt dans un milieu de culture approprié
- Incuber la culture à 37°C avec agitation pendant 12 à 16 heures (généralement une culture de nuit).

2. Récolte des cellules :

- Centrifuger la culture à 4000-6000 g pendant 5 à 10 minutes pour récupérer le culot bactérien.
- Décanter le surnageant et garder uniquement le culot.

3. Resuspension des cellules (Solution I) :

- Resuspendre le culot de cellules bactériennes dans un tampon contenant du glucose, du Tris-HCl et de l'EDTA (environ 50 µL pour 1 mL de culture initiale).
- L'EDTA agit en chélatant les ions magnésium, ce qui affaiblit la membrane cellulaire et aide à protéger l'ADN contre les dégradations.

4. Lyse alcaline (Solution II) :

- Ajouter une solution de lyse contenant de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et du dodécyl sulfate de sodium (SDS).

- Cette solution rompt les membranes cellulaires et dénature les protéines.
- Incuber 3 à 5 minutes (pas plus, car une lyse excessive peut dégrader l'ADN plasmidique).

5. Neutralisation (Solution III) :

- Ajouter un tampon d'acétate de potassium (pH acide) qui neutralise la solution, permettant la précipitation des protéines et de l'ADN chromosomique.
- La centrifugation permet de séparer le surnageant contenant l'ADN plasmidique des débris cellulaires qui précipitent.

6. Précipitation de l'ADN plasmidique :

- Récupérer le surnageant contenant l'ADN plasmidique et ajouter de l'isopropanol pour précipiter l'ADN.
- Centrifuger à grande vitesse pour récupérer l'ADN sous forme de culot.

7. -Lavage de l'ADN plasmidique :

- Laver le culot d'ADN avec de l'éthanol à 70 % pour éliminer les impuretés et les sels.
- Sécher le culot (généralement par évaporation de l'éthanol) puis re suspendre dans un tampon d'éluion (comme de l'eau ou du tampon Tris-EDTA).

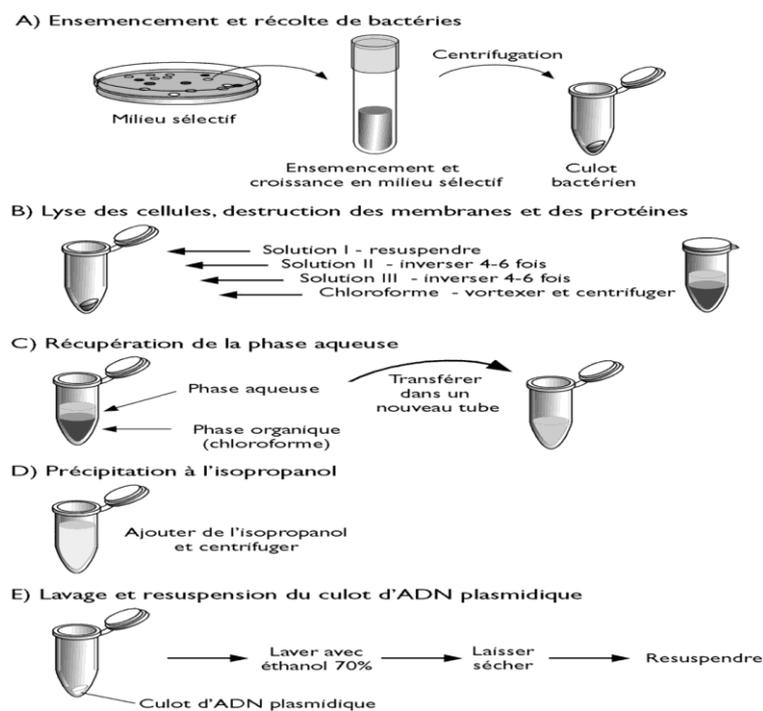


Fig.1 : Les étapes d'extraction d'ADN plasmidique

- **Gradient de chlorure de césium CsCl**

Même étapes que la lyse alcaline :

- Le lysat est fractionné avec un gradient de CsCl en présence de **bromure d'éthidium (BET)**
- Les différents constituants sont séparés par centrifugation.
- La solution contenant le plasmide est prélevée puis une précipitation à l'éthanol.

Cette méthode permet d'obtenir de l'ADN plasmidique très pur

? *Remarque*

! *Attention*

BET : agent intercalant (mutagène) cancérigène très dangereux on l'utilise pour que L'ADN s'intercale avec lui sous UV on peut voir la couche qui contient l'ADN (bande orange)



2. La digestion

La digestion de l'ADN plasmide ou génomique se fait avec les enzymes de restriction pour deux but (fins) :

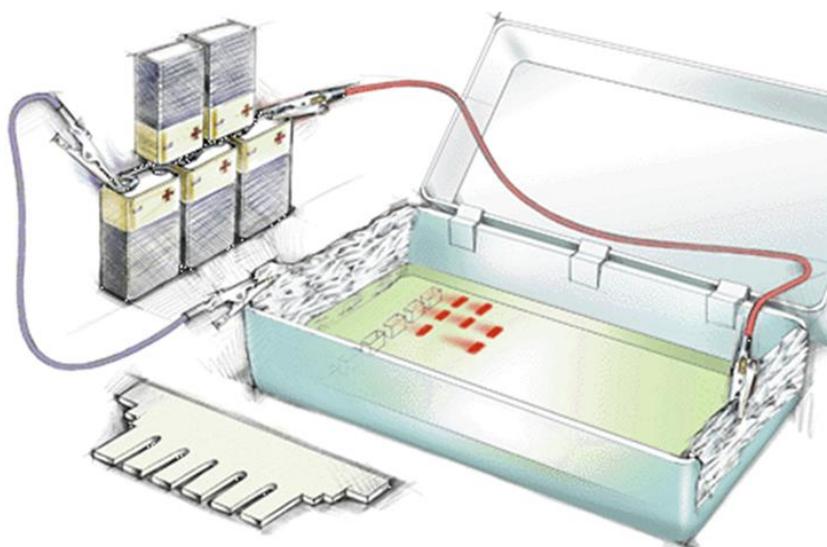
La fin analytique	Une électrophorèse pour voir la taille
La fin préparatif	Couper pour pouvoir insérer

Le but de la digestion

2.1. Les objectifs de la digestion de l'ADN

- Elle se fait avec les **enzymes de restriction**.
- Analyse et vérification de constructions génétiques
- Création de cartes de restriction
- Préparation de fragments pour le clonage et les études de recombinaison
- Identification et caractérisation de polymorphismes génétiques
- Préparation d'échantillons pour des techniques d'hybridation (comme le Southern blot)

3. L'électrophorèse sur gel d'agarose



3.1. Préparation du gel d'agarose

L'agarose (poudre blanche) :

- Polysaccharide dérivant d'une algue
- Forme purifiée de l'agar

Il forme un gel solide dans une solution aqueuse : Gel (1%) = agarose + tampon :

1g de poudre d'agarose dans 100 ml dans une solution tampon « TAE » → microonde.

3.2. Séparation de fragments d'ADN par électrophorèse

- On dissout le gel préparé dans un microonde puis on verse dans une plaque et on ajoute quelques gouttes de BET.
- On dépose notre peigne pour former des puits et on verse aussi un peu de solution tampon pour les recouvrir.
- Après on dispose de l'ADN dans chaque puits.

- Un champ électrique est appliqué au gel en présence d'une solution tampon.
- Migration des fragments d'ADN vers l'électrode + à une vitesse qui dépend de leurs tailles et de leurs formes.
- L'ADN étant coloré par le BET → il apparaît en bande orange à l'UV.



Fig.2. Dépôt de l'ADN DANS LES PUITES

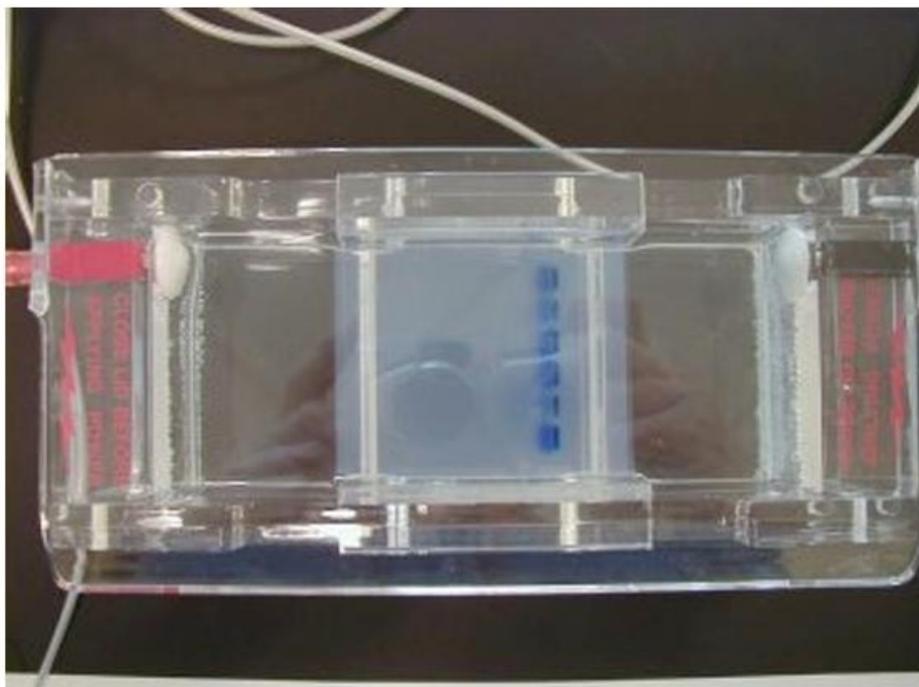
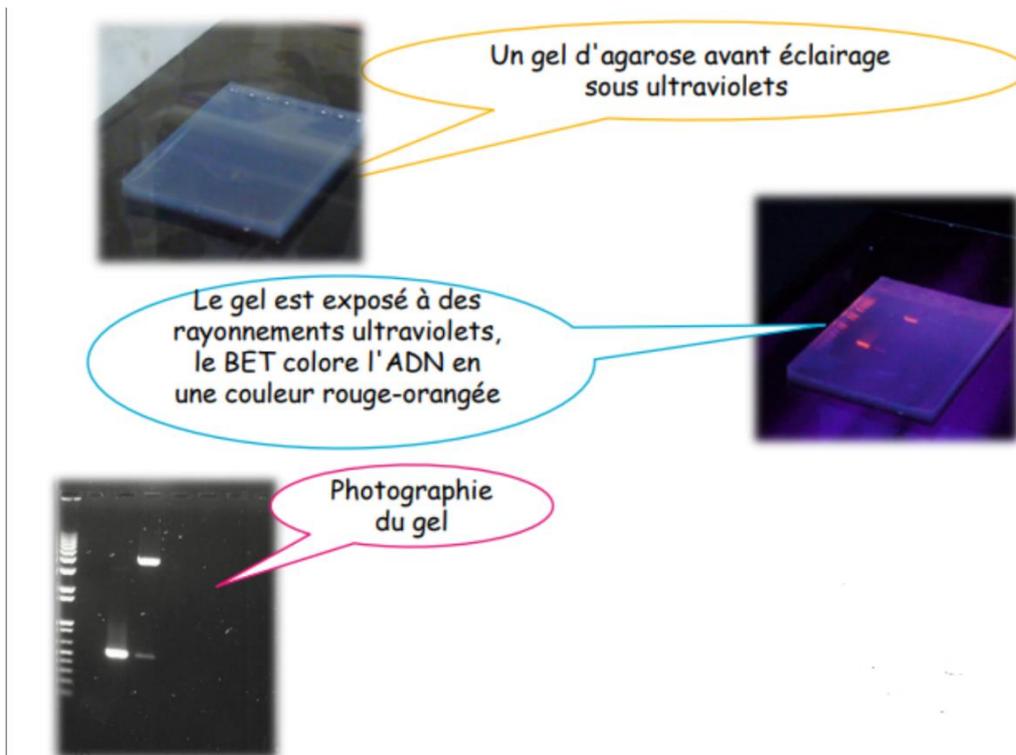


Fig.3. Migration de l'ADN



4. Isolement des fragments

Le gel d'agarose peut être utilisé également de manière préparatoire :

- Isolement des fragments spécifiques.
 - Ligation ou clonage.
 - Excision des fragments du gel.
 - Purification de l'ADN (agarose et *BET*).

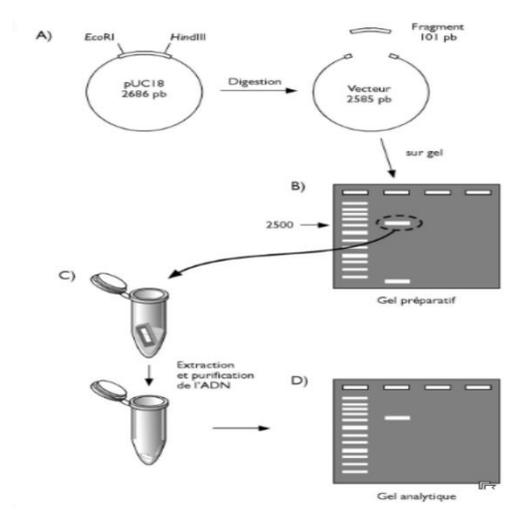


Fig.4. Isolement des fragments

