

## BIOLOGIE MOLECULAIRE EXTRACTION D'ADN

### Comparaison de deux méthodes d'extraction de l'ADN d'E.coli

#### INTRODUCTION

Très fier(e) de la filière STL Biotechnologie que vous avez choisi, vous parlez fréquemment de vos travaux de laboratoire à votre famille.

Votre sœur/frère, en classe de troisième décide de vous narguer en prétendant qu'il n'est pas utile d'être en filière STL pour extraire de l'ADN.

Désireux de remettre les choses à leur place, vous décidez de montrer à votre sœur/frère que l'ADN extrait au collège est de moins bonne qualité que l'ADN que vous extrayez au lycée.

#### OBJECTIFS DU TP

		NA	EA	A
<b>Objectifs</b>	- Préciser les particularités des bonnes pratiques de laboratoire en biologie moléculaire.			
	- Préparation d'un culot bactérien.			
	- Comparer des procédures différentes d'extraction d'ADN.			
	- Réaliser le spectre d'absorption de l'ADN.			
	- Quantifier et contrôler la pureté d'une solution d'ADN préparée par mesure d'absorption dans l'UV.			

#### QUESTIONS PRELIMINAIRES

1. Utiliser le document 1 pour indiquer les numéros des étapes participant à la lyse cellulaire, puis préciser le rôle de chacune des étapes ainsi que celui des solutions écrites en gras.
2. Procéder de même avec les étapes permettant la purification du lysat cellulaire.
3. A l'aide de la fiche technique, préciser les particularités des bonnes pratiques de laboratoire en biologie moléculaire.
4. Effectuer une analyse des risques encourus par cette activité expérimentale et préciser les mesures de prévention à appliquer.

**Doc 1 :** Procédure opératoire du kit « Gene jet GENOMIC DNA purification ». Delagrave, Terminale STL, Biotechnologie, 2017, p.227.

Étape	Procédure opératoire
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Introduire stérilement 2 mL de culture bactérienne dans un microtube.</li> <li>→ Centrifuger pendant 10 minutes à 5000 g.</li> <li>→ Éliminer le surnageant à l'aide d'une pipette à piston.</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Reprendre le culot dans 180 µL de <b>solution de digestion</b> (<i>Digestion Solution</i>).</li> <li>→ Ajouter 20 µL de solution de <b>protéinase K</b> (<i>Proteinase K Solution</i>).</li> <li>→ Homogénéiser doucement par aspiration/refoulement ou en utilisant un agitateur orbital.</li> </ul>
3	Incuber le mélange dans un bain thermostaté réglé à 56 °C pendant 30 minutes et agiter de temps en temps en vortexant.
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Ajouter 20 µL de solution de <b>RNase</b> (<i>RNase A Solution</i>), mélanger en utilisant un agitateur orbital et incuber 10 minutes à température ambiante.</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Ajouter 200 µL de <b>solution de lyse</b> (<i>Lysis Solution</i>).</li> <li>Homogénéiser doucement en utilisant un agitateur orbital pendant 15 secondes.</li> </ul>
6	Ajouter 400 µL d'éthanol à 50 % et mélanger en utilisant un agitateur orbital.
7	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Disposer une <b>colonne de chromatographie</b> (<i>Genomic DNA Purification Column</i>) sur un tube collecteur de 2 mL.</li> <li>→ Transférer l'ensemble du lysat obtenu à l'étape 6 sur la colonne.</li> <li>→ Centrifuger l'ensemble colonne-tube collecteur pendant 1 minute à 6000 g.</li> <li>→ Éliminer le tube collecteur.</li> <li>→ Replacer la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2 mL.</li> </ul>
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Ajouter sur la colonne, 500 µL de <b>tampon de lavage 1</b> (<i>Wash Buffer I</i>).</li> <li>→ Centrifuger l'ensemble colonne-tube collecteur pendant 1 minute à 8000 g.</li> <li>→ Éliminer la solution récupérée dans le tube collecteur et replacer la colonne sur le tube collecteur vidé.</li> </ul>
9	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Ajouter sur la colonne 500 µL de <b>tampon de lavage 2</b> (<i>Wash Buffer II</i>).</li> <li>→ Centrifuger l'ensemble colonne-tube collecteur pendant 3 minutes à vitesse maximale (<math>\geq 12\ 000</math> g).</li> <li>→ Éliminer le tube collecteur et replacer la colonne dans un microtube stérile de 1,5 mL.</li> </ul>
10	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Ajouter au centre de la colonne 200 µL de <b>tampon d'éluion</b> (<i>Elution Buffer</i>).</li> <li>→ Incuber pendant 2 minutes à température ambiante.</li> <li>→ Centrifuger l'ensemble colonne-tube collecteur pendant 1 minute à 8 000 g.</li> </ul>
11	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Éliminer la colonne.</li> <li>→ Maintenir l'extrait d'ADN à 4 °C puis le conserver à -20 °C après avoir étiqueté correctement le microtube (date, nom de l'échantillon et du manipulateur).</li> </ul>

La « solution de digestion » contient des molécules détergentes.

La « solution de lyse » contient une molécule dénaturante (sel de guanidium).

**Doc 2 :** Extraction d'ADN selon une méthode domestique.

1. Ajouter sur le culot de bactéries quelques gouttes de liquide vaisselle afin de casser les membranes.
2. Ajouter une petite quantité de sel fin (1 gr).
3. Ajouter alors l'éthanol en le faisant couler lentement le long de la paroi du récipient (remplir celui-ci aux 3 quarts). L'éthanol élimine les molécules d'eau entre les molécules d'ADN qui se regroupent alors en formant une sorte de "méduse" qui remonte dans l'alcool.
4. La "méduse" peut ensuite être récupérée à l'aide d'un cure dent, d'un bâtonnet ou d'une pince.
5. Reprendre de culot d'ADN dans de l'eau stérile (200µL).

**MODE OPERATOIRE**

1. Centrifuger les cultures bactériennes 15 minutes à 2500 rpm. Récupérer le culot.
2. Réaliser les procédures opératoires décrites dans les documents 1 & 2.  
Conserver l'extrait d'ADN obtenu dans la glace.
3. Analyse de l'extrait d'ADN par spectrophotométrie.  
Diluer l'extrait obtenu au 1/5 dans un volume total de 500 µL en microtube.  
Transférer le contenu du microtube dans une cuve de type « UVette ».  
Réaliser le spectre d'absorption de l'ADN.  
Mesurer les absorbances de la solution d'ADN diluée contre un blanc adapté à 260 et à 280 nm.

**RESULTATS**

1. Utiliser les mesures d'absorbance à 260 nm pour estimer la concentration massique en ADN dans les extraits bactérien d'E. coli.
2. Utiliser les mesures d'absorbance à 260 et 280 nm pour analyser la pureté de l'extrait d'ADN bactérien d'E.coli vis-à-vis des protéines. Le ratio d'absorbance 260/280 est un bon indicateur d'une contamination par les protéines : lorsqu'il est égal à 1,8, il indique un échantillon d'ADN pur.  
Lorsque le ratio d'absorbance 260/230 est inférieur à 1,8, il indique la présence d'une contamination probablement causée par des composés organiques.
3. Comparer la qualité d'extraction des deux méthodes utilisées.