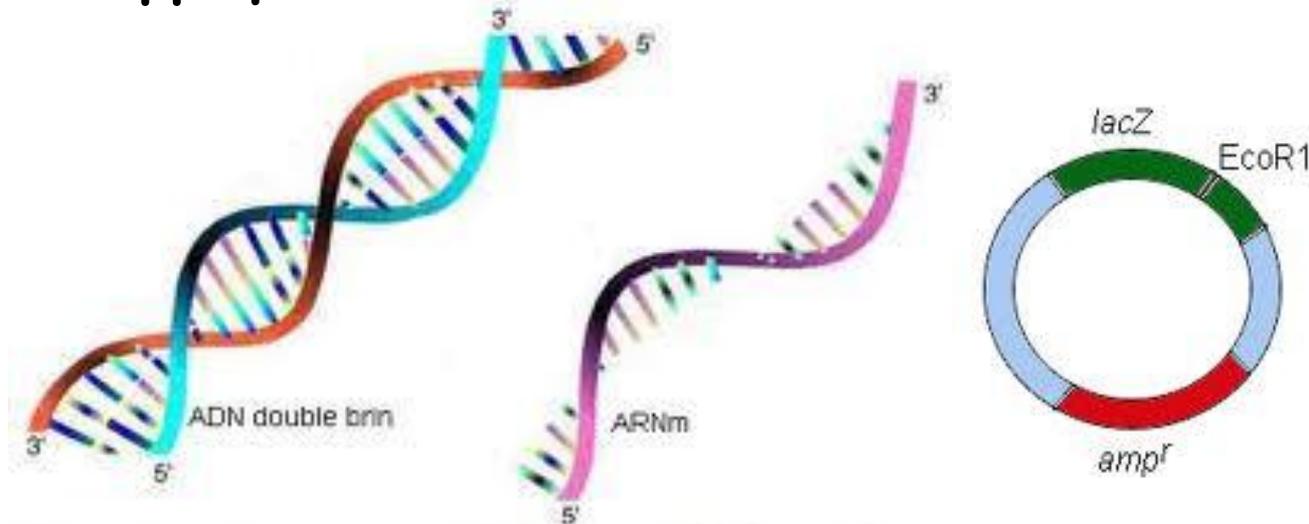


Introduction

- ❖ La purification des acides nucléiques constitue l'étape clé de toutes les études de génétique moléculaire.
- ❖ Selon le type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et selon le matériel de départ (cellules, organes,...) la première étape a pour objectif l'extraction.
- ❖ Par la suite une série de méthodes adaptées au type d'acides nucléiques (ADN génomiques ou plasmidiques, ou ARN) est appliquée à l'extrait.



Extraction et Purification des Acides Nucléiques

L'**extraction** et la **purification** des acides nucléiques se fait en 3 grandes étapes successives:

1- Lyse de la paroi bactérienne ou bien de la membrane cellulaire.

2- Séparation des acides nucléiques des autres composants cellulaires (tel que les protéines, les lipides...etc.).

3- Élimination des impuretés et re-suspension des acides nucléiques dans une solution (eau stérile 'nucléase free' ou autre tampon approprié).

Extraction et Purification des Acides Nucléiques

I. Extraction de l'ADN

= technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus.

L'ADN extrait → digestion, hybridation (Southern blot), séquençage, PCR, clonage...

Différents protocoles pour extraire l'ADN suivent le même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Elimination des autres acides nucléiques (Rnase)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

Préparation d'ADN génomique

1/4

lyse des cellules ou des tissus

=broyage ou pas
+ extraction/détergents



Solution très visqueuse

l'ADN = très longs filaments
s'opposant aux écoulements
hydrodynamiques.

- disperser les bicouches lipidiques des membranes
- dénaturer les protéines srtt celles associées à l'ADN dans la chromatine

Lyse chimique :

❑ Pour les cellules procaryotes et végétales on préférera une lyse chimique.

* Fragilisation enzymatique des parois de cellules bactériennes, végétales et fongiques.

Dans ce cas la **paroi est un obstacle majeur à la lyse cellulaire.**

Pour rendre efficace la désorganisation de la membrane plasmique, des hydrolases spécifiques peuvent être employées :

Organisme	Bactérie	Champignon	Végétaux
Type de paroi	Peptidoglycane	Chitine	Cellulose, Hémicellulose, Pectines
Enzyme	Lysozyme	Chitinase	Cellulase, Hémicellulase, Pectinase

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** (afflux d'eau vers l'intérieur de la cellule) jusqu'à **rupture de la membrane plasmique**.

Désorganisation des membranes par des détergents et solubilisation des lipides membranaires:

- ❑ Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) appelé aussi laurylsulfate de sodium, triton X100, sont des détergents qui vont solubiliser les lipides membranaires sous forme de micelles.**
 - Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment larges pour libérer le contenu du cytoplasme hors des cellules.
 - 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.

DÉTERGENTS IONIQUES

- Le dodécylsulfate de sodium (SDS) et le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB).
- Extrêmement **efficaces pour solubiliser les protéines membranaires**, souvent **dénaturants**.

DÉTERGENTS NON IONIQUES

- Triton™.
- **Perturbent les interactions lipides/lipides et lipides/protéines**, mais pas les interactions protéines/protéines, souvent considérés comme **non dénaturants**.
- Ces détergents doux sont largement utilisés pour **isoler les protéines membranaires dans leur forme bioactive**.

DÉTERGENTS ZWITTERIONIQUES

- CHAPS
- Cumulent les caractéristiques des détergents ioniques et non ioniques.
- Ne se fixent pas aux résines échangeuses d'ions donc souvent utilisés à la place des détergents non ioniques en chromatographie d'échange d'ions.
- Comme les détergents ioniques, ils sont efficaces pour perturber les interactions protéines/protéines.

Déprotéinisation par hydrolyse enzymatique :

Réalisée en faisant agir une **endoprotéase non spécifique** comme la **protéinase K**, (une enzyme très stable, active jusqu'à 65°C).

La digestion est **souvent conduite en présence d'un détergent dénaturant comme le SDS**.

Le SDS, en plus de solubiliser les lipides et contribuer à la lyse de la cellule, **facilite l'action de la protéinase K car il déploie la chaîne protéique**.

tampon sans pression osmotique,
faisant éclater les membranes
fermées

EDTA inhibe les nucléases en
chélatant les ions Mg^{++} & Ca^{++}

EDTA: Éthylène Diamine Tétra Acétique ou acide éthylène diamine tétraacétique: piège notamment le magnésium, cofacteur des DNases et RNases afin de mieux préserver les acides nucléiques par inhibition des nucléases.

Homogénéisation, déprotéinisation



Un traitement par la protéinase K (une protéase) permet également de libérer l'ADN nucléaire en digérant les histones qui lui sont associées dans les chromosomes eucaryotes.

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) détergent anionique dénature les lipoprotéines membranaires et les enzymes lysosomiales et libère ainsi l'ADN tout en préservant sa structure.

Le SDS supprime les liaisons non-covalentes de la protéine, permettant la dénaturation de la protéine, la molécule perd donc à terme sa conformation initiale.

Préparation d'ADN génomique

2/4

déprotéinisation de la solution

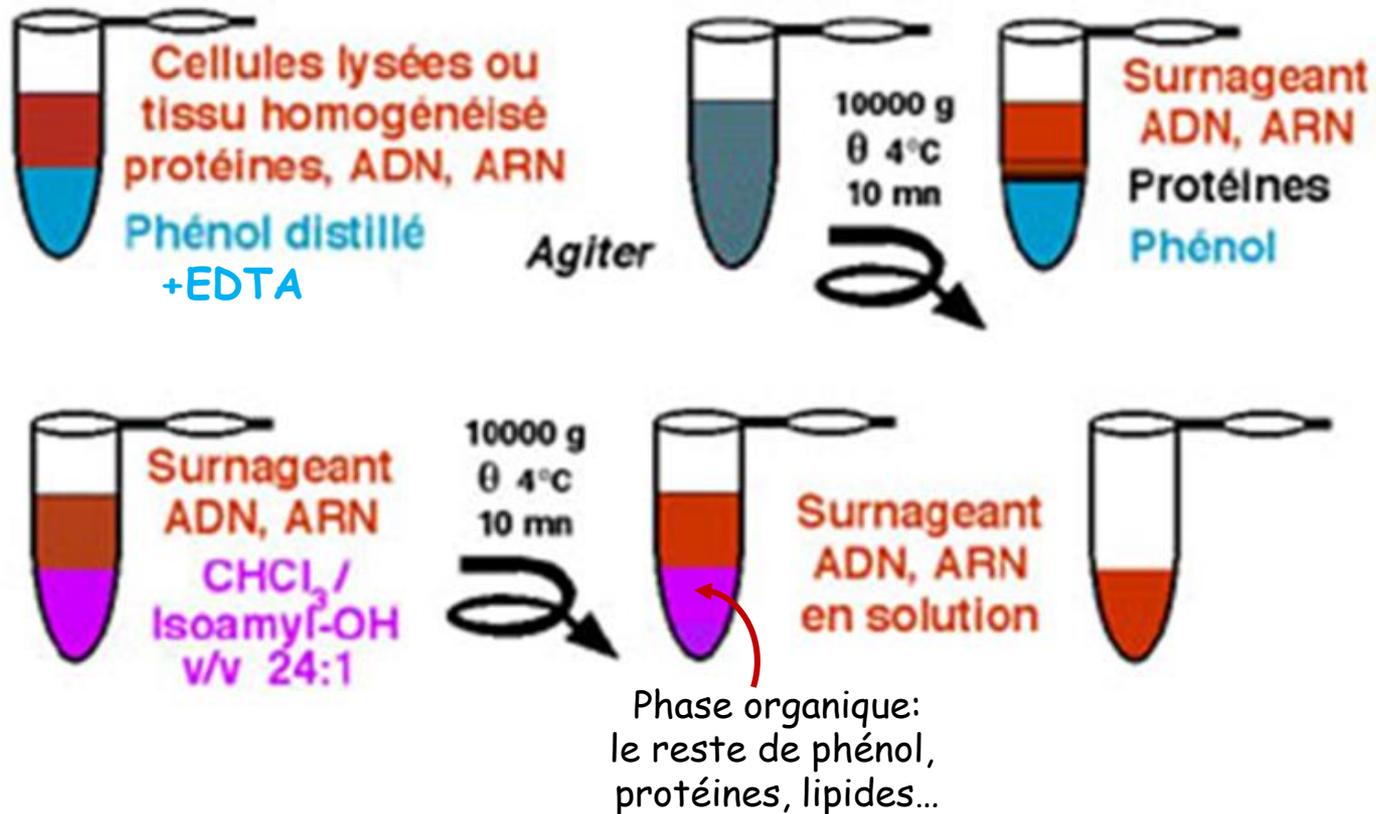
=extraction / solvants organiques,
en général du phénol +/-chloroforme



protéines dénaturées → précipité à l'interface phénol-eau =
« gâteau »

l'ADN → en solution dans la phase aqueuse

Extraction de l'ADN



Le traitement au phénol, chloroforme (CHCl₃ et Isoamyl-OH) permet de dénaturer les protéines car non miscible à l'eau et de densité supérieure à cette dernière. Les acides nucléiques n'y sont pas non plus solubles et restent dans le surnageant aqueux.

❑ ***l'extraction phénolique :***

- ✓ **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 membranaires lipidiques vont aller dans la phase phénol hydrophobe**
- ✓ **Le phénol** doit être très pur et saturé en tampon (**pH 8 pour extraire l'ADN**)
- ✓ Le phénol est hautement **corrosif**, c'est donc un produit à **manipuler avec précaution**.

❑ ***l'extraction au chloroforme :*** e

- ✓ Complète toujours l'extraction précédente pour éliminer toutes traces de phénol aqueux (Etape indispensable pour permettre l'action ultérieure d'enzyme tels que les enzymes de restriction sur l'acide nucléique extrait).
- ✓ Le chloroforme est additionné d'**alcool isoamylique** (AIA = 3-méthyl-1-butanol = $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) qui est un **agent antimousse stabilisant la séparation des phases** (agent déstabilisant de l'émulsion).

Préparation d'ADN génomique

3/4

précipitation de l'ADN

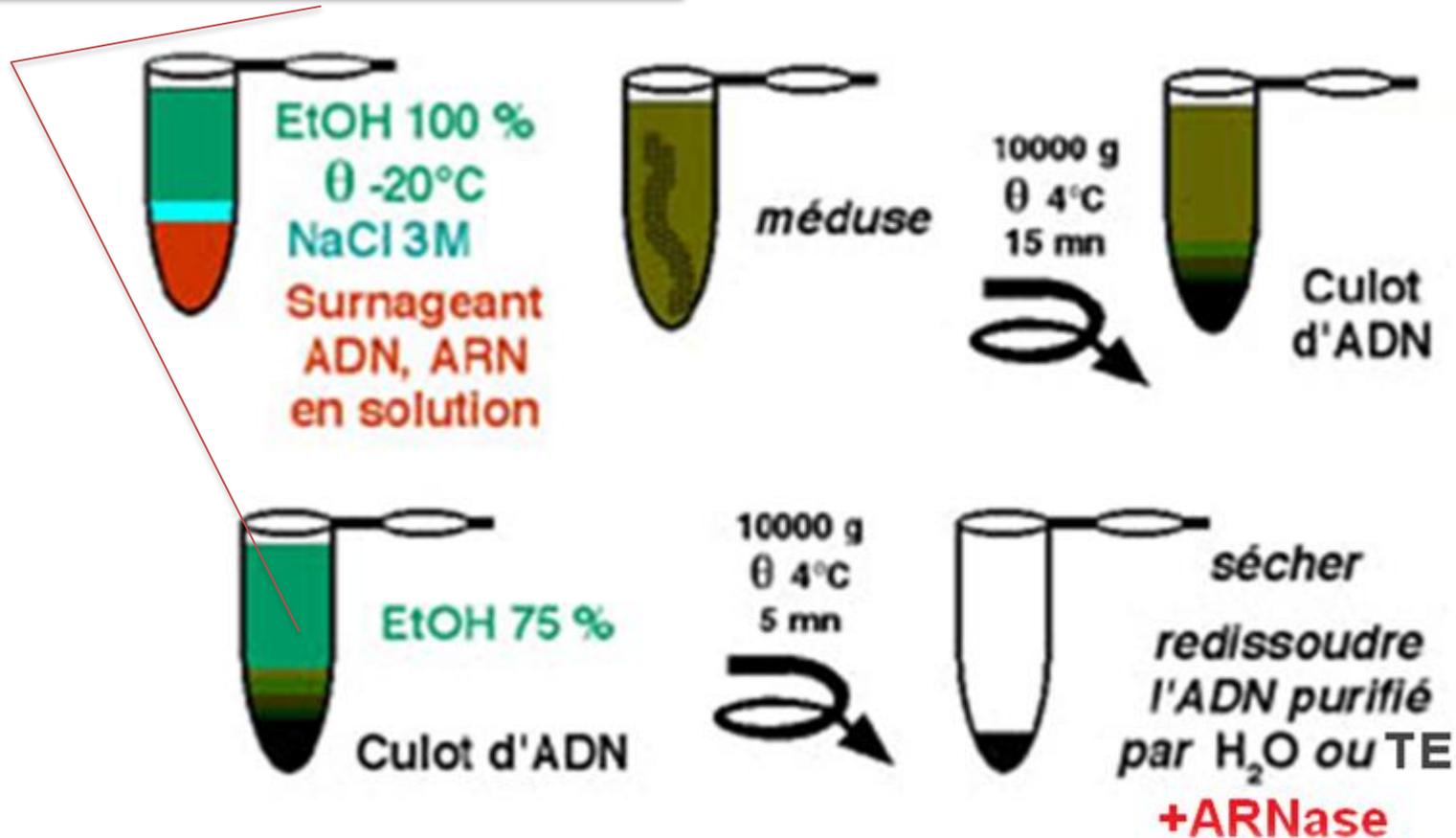
=addition d'éthanol ou d'isopropanol
dans la phase aqueuse

L'ADN collecté/centrifugation
→ dissous dans Tampon ou Eau
pure.

4/4 Pour éliminer les ARNs → Traitement par l'ARNase.

Ethanol mobilise l'eau du milieu & diminue la solubilité de l'ADN

Purification de l'ADN



Si la quantité d'acides nucléiques cibles est faible, un véhicule inerte (tel que le glycogène) peut être ajouté au mélange afin d'accroître l'efficacité de la précipitation.

l'ADN précipite car il n'est pas soluble dans l'alcool car celui-ci le déshydrate, tandis que les sels que l'on ajoute pendant l'extraction neutralisent les charges négatives de l'ADN (l'apport de charges positives permet la création de solides)

ADN Plasmidique

- Ⓢ Petites molécules d'ADN habituellement circulaire
- Ⓢ Existant indépendamment des chromosomes de l'hôte
- Ⓢ Présents chez nombreuses bactéries (qqes levures et mycètes)
- Ⓢ A répllication autonome indépendamment des chromosomes
- Ⓢ Portent un nombre de gènes très réduit (≤ 30)
- Ⓢ A information génétique non-essentielle pour l'hôte
- Ⓢ

En nbr. variable:

←
Plasmide à copie unique
(1 seul/cellule hôte)

→
Plasmides à copies multiples
(40 ou + /cellule hôte)

1.3.2. Purification par Lyse alcaline

⊙ Parmi les techniques les plus courantes de la biologie moléculaire = noms abrégés: **miniprep**, **midiprep** et **maxiprep** (volume de la culture bactérienne).

BUT : Extraire de façon rapide l'ADN plasmidique afin de l'analyser avec des enzymes de restriction et électrophorèse en gel d'agarose. Obtenir plusieurs mg d'ADN partiellement purifié et Réaliser plusieurs digestions enzymatiques pour vérifier un clone, ou établir une carte de restriction.

⊙ Préparation sélective de l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.

⊙ kits commerciaux (grd nbr) avec petites colonnes de résine chromatographique échangeuse d'ion → améliorer la pureté de l'ADN.

lyse alcaline

- Cette méthode permet de préparer sélectivement l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.
- Le principe de cette méthode consiste à effectuer la lyse des cellules au moyen d'un détergent (dodécyl sulfate de sodium) en présence de soude, à pH 13.
- À ce pH très alcalin, l'ADN est **dénaturé**, c'est-à-dire que les deux brins de la double-hélice sont séparés.
- On neutralise ensuite rapidement la solution, ce qui provoque la renaturation brutale (réappariement des brins du duplex d'ADN).
- L'ADN chromosomique, très long ($\sim 10^6$ paires de base), ne parvient pas à se réapparier complètement et forme des enchevêtrements insolubles.
- L'ADN plasmidique, court ($\sim 10^3$ paires de base), parvient à se reformer et reste en solution.
- On sépare alors les espèces par centrifugation. Les protéines précipitées, sont également éliminées avec le détergent et l'ADN chromosomique.
- La solution ne contenant que très peu d'ADN chromosomique et de protéines est appelée **lysat clair**.
- L'ADN plasmidique est ensuite concentré par précipitation à l'alcool.

Extraction de l'ARN

L'ARN extrait → hybridation (Northern blot), banques ADNc, RT-PCR...

Différents critères pour extraire l'ARN:

- ⊗ Lyse cellulaire mécanique (congélation, billes de céramique ou détergents) ou enzymatique (lysozyme)
- ⊗ Protection des ARN de l'action des ARNases.
- ⊗ les différences de propriétés physico-chimiques ARN/protéines



Pour une extraction ARN optimale



**Inhiber
toute trace
d'ARNase**



- ✓ Utilisation des gants pendant toute la manipulation
- ✓ Utiliser de l'eau et des réactifs RNase free (ajouter du DEPC à l'eau et autoclaver)
- ✓ Tubes et cônes RNase free (autoclavage)
- ✓ Nettoyer la pailasse et ces instruments (pipettes...) avec une solution décontaminante (Rnase Away)

DEPC (DiEthylPyroCarbonate)= composé organique qui inactive les ribonucleases

[Display Settings:](#) Abstract

[Send to:](#)

[Anal Biochem.](#) 1987 Apr;162(1):156-9.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

[Chomczynski P.](#) [Sacchi N.](#)

Abstract

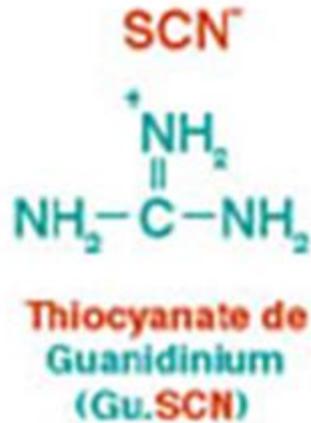
A new method of total RNA isolation by a single extraction with an acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform mixture is described. The method provides a pure preparation of undegraded RNA in high yield and can be completed within 4 h. It is particularly useful for processing large numbers of samples and for isolation of RNA from minute quantities of cells or tissue samples.

PMID: 2440339 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Trizol: GuSCN+Phenol acide+ b2-Mercaptoethanol

beta2-mercaptoéthanol:
agent reducteur,
inhibiteur des Rnases
rupture des ponts
disulfures protéiques

Isolation du RNA



cellules

8000 rpm
10°C
10 mn



GuSCN + phénol acide.
GuSCN agent
chaotropique puissant
de dénaturation des
protéines: Lyse et
inhibition des RNases



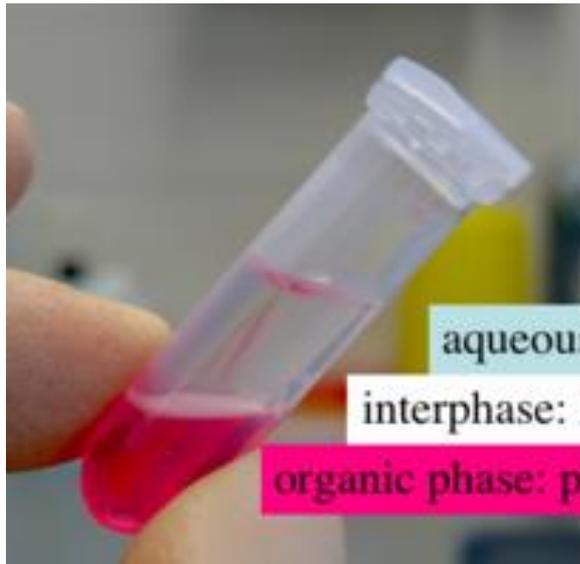
RNA

Extraction
NaCl 0,1 M
Phénol
CHCl₃
Isoamyl-OH

Précipité
Ethanol
- 20°C

Chloroforme → accélérer
la procédure d'extraction

- La lyse est ensuite suivie par une extraction en phénol acide.
- Le phénol utilisé est un phénol acide c'est-à-dire qu'il a été mis en solution et équilibré avec un tampon de pH acide (pH 5).
- Dans ces conditions les protéines histones, riches en acides aminés basiques (portant dans leur radical un groupement NH_2), vont avoir à pH acide une forte charge positive (cf. NH_3^+), elles vont alors s'associer plus fortement à l'ADN génomique chargé négativement et vont l'entraîner avec elles lors de leur précipitation.
- Ainsi l'ADN et les protéines qui ont précipité restent à la surface de la phase phénolique et sont ainsi rassemblés à l'interface.
- La phase aqueuse (supérieure) contiendra en solution les ARN débarrassés de l'ADN. La phase phénolique (inférieure) contiendra les lipides.



aqueous phase: RNA

interphase: DNA

organic phase: proteins, lipids



Précipitation à l'Isopropanol
Lavage à l'ETOH 70%

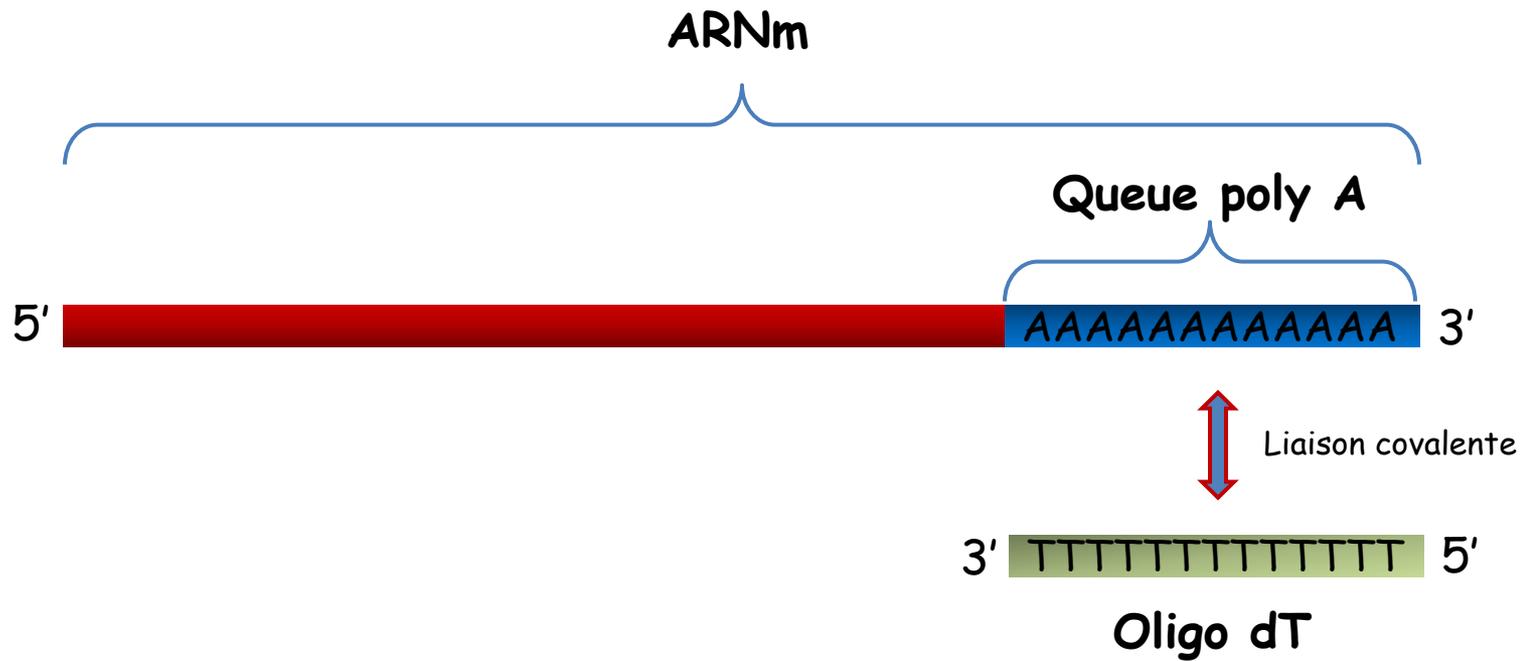
Parmi les acides ribonucléiques extraits des cellules →
les **ARN messagers = ARNm** = classe la plus étudiée



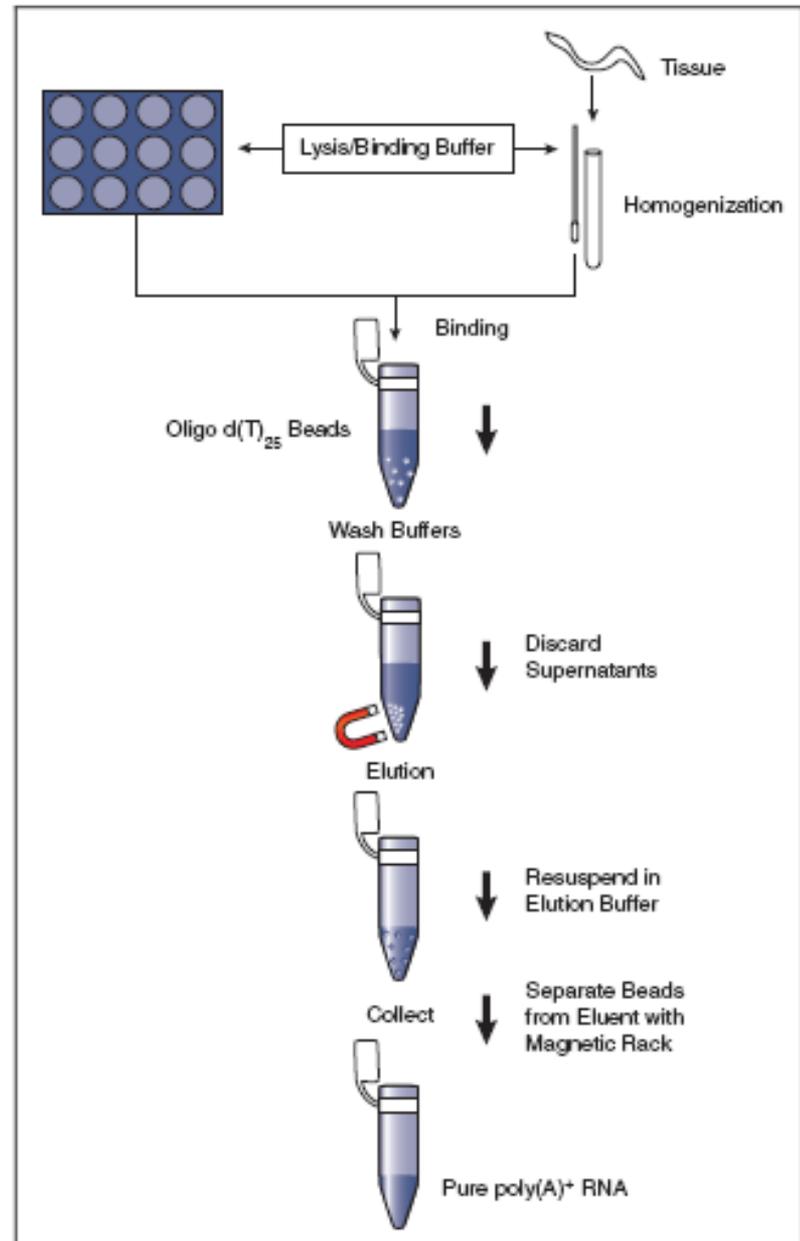
se caractérisent par la présence du côté 3'-terminal
d'une **longue queue poly(A)** synthétisée à la phase
post-transcriptionnelle.



chromatographie d'affinité entre cette queue poly(A)
et une colonne dont la phase fixe est pourvue de
fragments d'oligo(dT) de quelques dizaines de
nucléotides qui peuvent s'hybrider avec les RNA poly(A).



Kits d'extraction d'ARN poly A



SPECTROPHOTOMETRIE à UV

Le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à **260 nm**.

Les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'ultraviolet à 260 nm.

Cette méthode est peu sensible, et ne peut pas être utilisée pour des concentrations inférieures à 250 ng/mL ($A_{260 \text{ nm}} = 0,005 \text{ UA}$).

QUANTITE DE L'ADN:

$DO_{260 \text{ nm}} = 1$ correspond à 50 ng/ μL d'ADN Total

QUANTITE DE L'ARN:

$DO_{260 \text{ nm}} = 1$ correspond à 40 ng/ μL d'ARN Total

QUALITE DE L'ADN:

Abs260/Abs280 nm

QUALITE DE L'ARN:

Abs260/Abs280 nm

❖ Les protéines ont un maximum d'absorption qui se situe vers 280 nm à cause des acides aminés aromatiques.

❖ Le rapport $R = A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ constitue alors un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN ou ARN par les protéines.

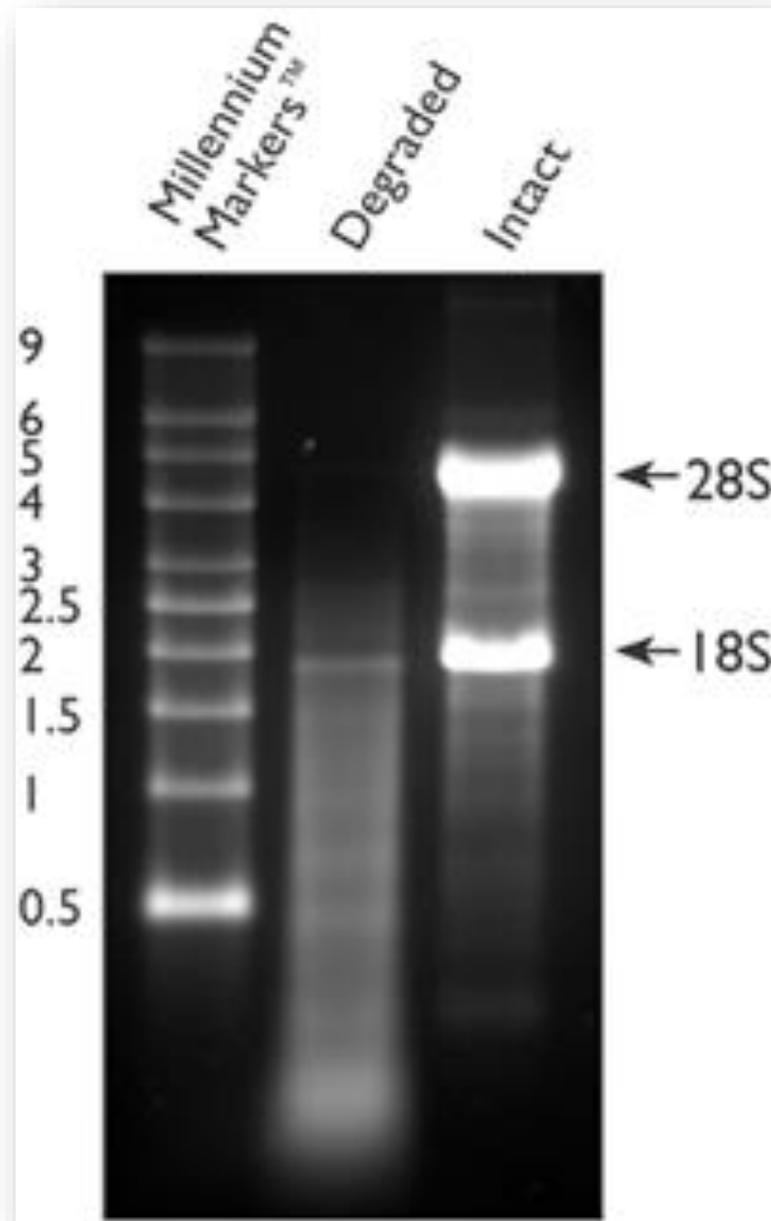
un rapport compris entre 1,8 et 2 correspond à une solution pure d'ADN ou d'ARN;

- 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 (ds le cas de l'ADN).

NB: L'ARN et ADNsb absorbent plus à 260 nm que ADNdb (effet hyperchrome) les acides aromatiques des protéines absorbent à 280 nm.

Qualité de l'ARN:
Electrophorèse sur
gel d'agarose
dénaturant



L'ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

ELECTROPHORESE DE L'ADN

= technique de biologie moléculaire → séparer des fragments d'ADN de différentes tailles en les faisant migrer dans un **gel** en les soumettant à un courant électrique.

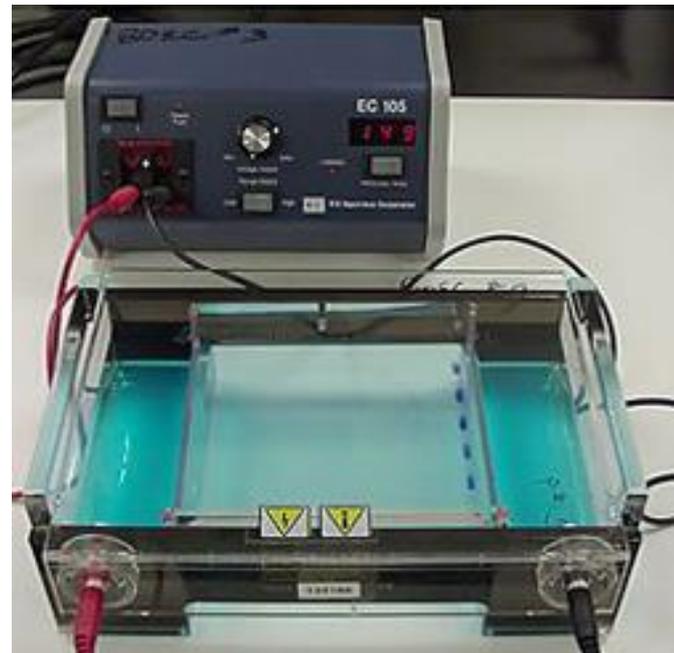
▶ Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur.

▶ Deux principaux polymères sont utilisés : l'**agarose** et le **polyacrylamide**.

❖ Le réseau de mailles constituant le gel forme un tamis moléculaire à l'intérieur duquel les molécules d'ADN migrent.

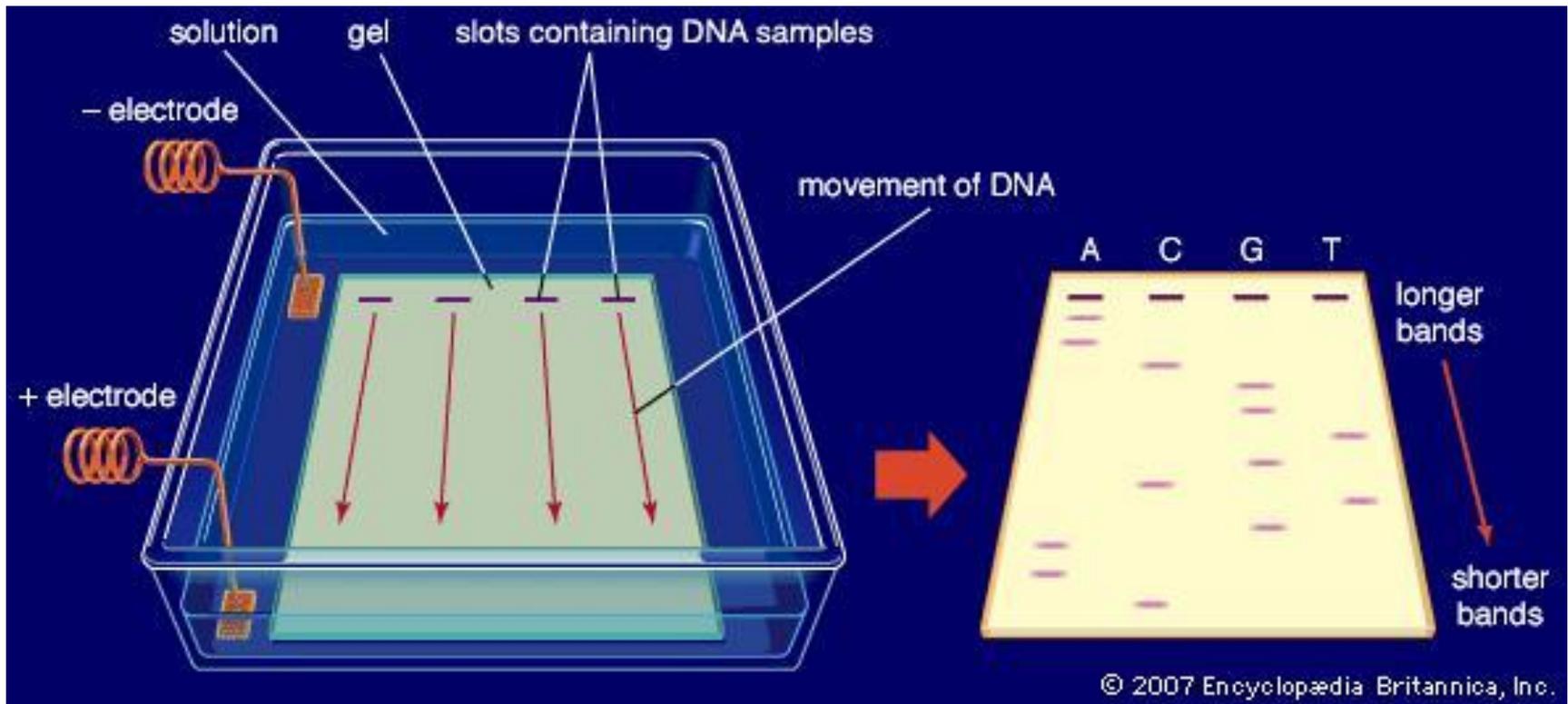
!!!! La taille des mailles varie selon la concentration d'agarose

❖ L'électrophorèse permet donc de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille.



Pouvoir de séparation d'ADN linéaire, double brin, selon la concentration d'agarose du gel

Concentration d'agarose (% en M/V)	Gamme de tailles idéales (en kb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2



Le matériel génétique (ADN, ARN, plasmide...) est chargé négativement, il migre vers le pôle positif

Les différents types d'électrophorèse permettent de séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille:

- ❖ L'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN de 50 à 10 000 paires de bases en fonction de la concentration du gel en agarose.
- ❖ L'électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*) permet de séparer les fragments d'ADN dont les longueurs vont de 1 à 1 000 nucléotides. Ex. séquençage
- ❖ L'électrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé (PFGE) permet de séparer des fragments d'ADN double brin dont la taille peut varier de 220 000 à 2 500 000 paires de bases. (PFGE pour Pulsed Field Gel Electrophoresis).

Suivi de la migration.

Les échantillons d'ADN, avant d'être déposés dans les puits, sont mélangés avec une solution de charge qui contient:

- ❖ Un alourdisseur (glycérol ou saccharose) pour entraîner l'ADN au fond du Puits.
- ❖ Des marqueurs de mobilité (colorants visibles : bleu de bromophénol et xylène cyanol).
- ❖ Des marqueurs de taille pour l'identification (dans le puits de référence).

Les deux marqueurs (colorants) migrent à des vitesses différentes.

- ➔ Le bleu de bromophénol (violet) migre avec les fragments de petites tailles (donc plus vite)
- ➔ alors que le xylène cyanol (bleu turquoise) migre avec les fragments de grande taille.

On peut ainsi suivre indirectement la migration de l'ADN sur le gel.

Révélation:

Les bandes d'ADN sur un gel de polyacrylamide ou d'agarose ne sont pas visibles si l'ADN n'est pas marqué ou coloré.

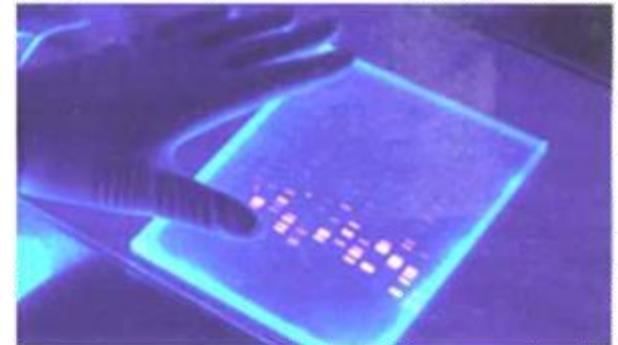
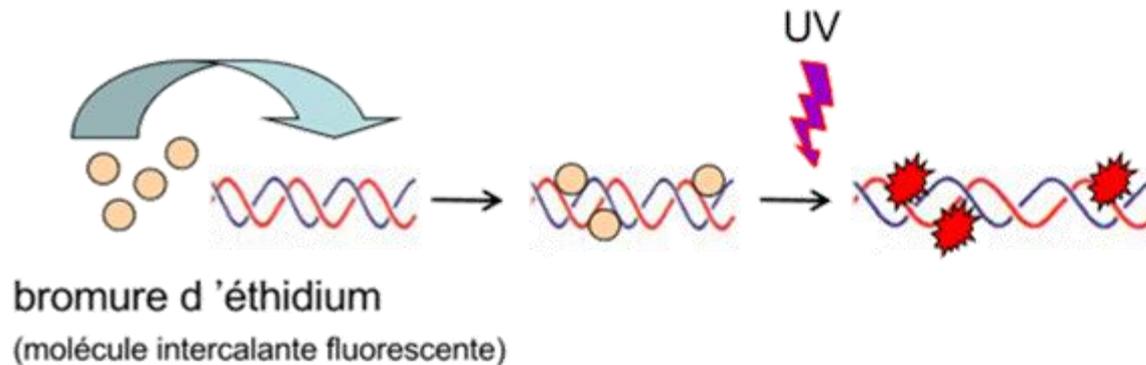
→ Une méthode sensible de coloration de l'ADN consiste à plonger le gel après électrophorèse dans du bromure d'éthidium (BET ou EtBr) un intercalent de l'ADN qui devient cent fois plus fluorescent sous illumination ultra-violette lorsqu'il est lié à l'ADN.

Le BET est un produit hautement mutagène/
carcinogène, donc il doit être manipulé avec
beaucoup de soins.

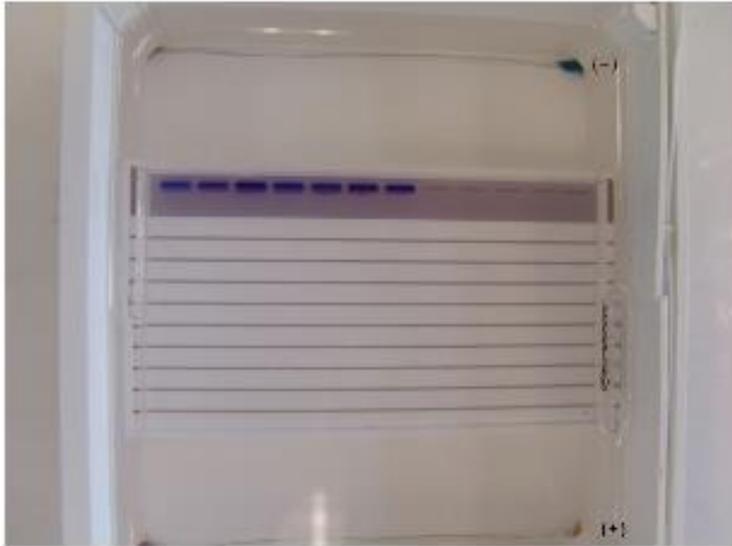
Le bromure d'éthidium (EtBr) = à la fois un agent intercalant et un fluorochrome.

Structure aromatique plane → s'intercaler entre les paires de bases → détorsion de la double hélice et émission de lumière (fluorescence) dans le rouge-orange lorsque le complexe ADN-EtBr est excité en lumière ultraviolette.

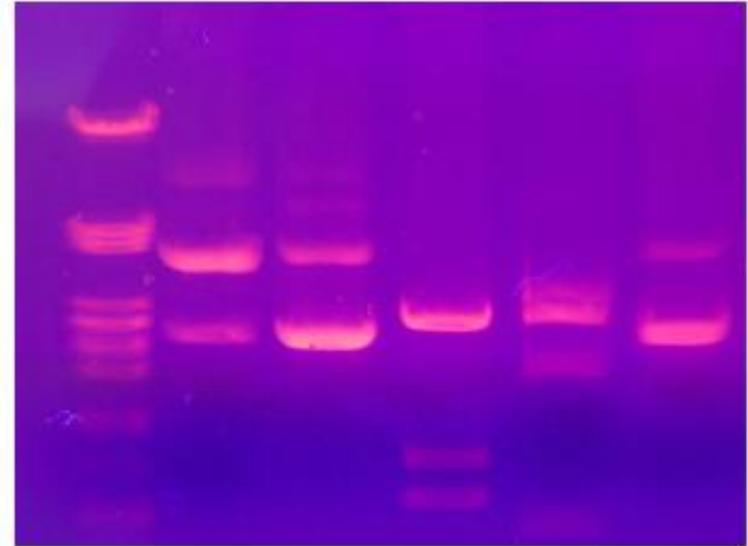
C'est l'une des principales méthodes de détection de l'ADN dans les gels d'électrophorèse.



Gel agarose

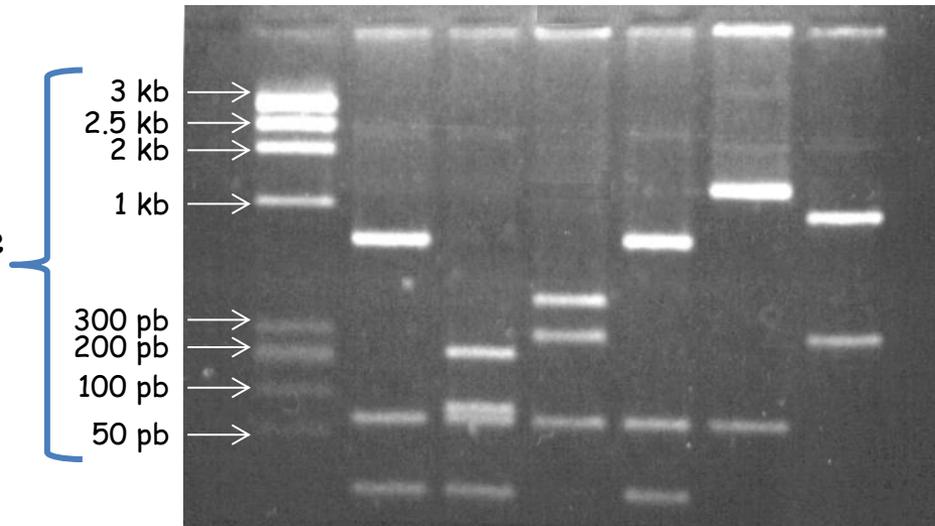


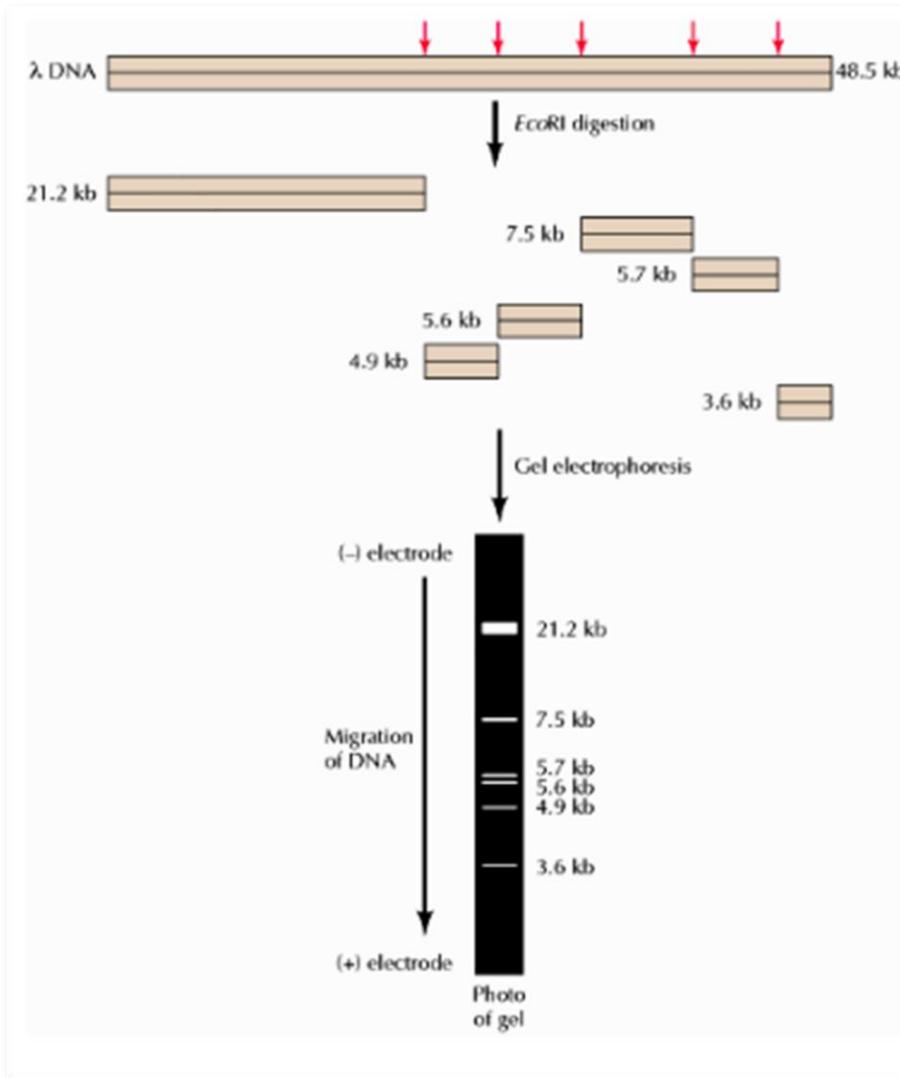
Bromure d'ethidium/lampe UV



Photographie de gel après migration

**Marqueur de taille
(DNA ladder)**





Digestion d'ADN par EcoRI
puis séparation des fragments
de restriction par
électrophorèse