

TP N°3 : Extraction de l'ADN d'oignon

Introduction

La procédure d'extraction de l'ADN d'une cellule est la première étape de nombreuses études possibles. Pour cela, l'ADN doit être récupéré de la cellule et séparé des autres composés indésirables.

L'extraction se fait en plusieurs étapes

- 1- broyer mécaniquement les tissus cellulaires,
- 2- (ii) rompre les membranes (plasmiques et nucléaires)
- 3- (iii) une étape de filtration qui permet de se débarrasser des différents débris cellulaires.

L'ADN est enfin précipité en utilisant de l'éthanol à froid.

Protocole

- Chauffer dans une fiole 200 ml d'eau du robinet à 60°C dans un bain-marie.
- Prélever 5 ml d'éthanol et les mettre dans un bécher de 10 ml.
- Placer ce bécher dans de la glace
- Mettre environ un quart d'oignon dans un mortier. Y rajouter l'équivalent d'une cuillerée à café de NaCl.
- Broyer vigoureusement pendant environ 5 min jusqu'à obtention d'une purée.
- Rajouter environ 10 ml d'eau tiède (à 60°C) mesurés dans une éprouvette et continuer à mélanger pendant encore 2 min.
- Mesurer environ 4 ml de liquide vaisselle dans une éprouvette et rajouter au broyat.
- Mélanger 5 min jusqu'à apparition d'une consistance visqueuse.
- Positionner un entonnoir sur un bécher en forme haute et placer une épaisseur de papier filtre
- Déposer progressivement et délicatement une petite quantité de votre broyat sur le filtre.
- Attendre d'obtenir dans le bécher une quantité suffisante du filtrat (~2 ml ; arrêter la filtration dès que la quantité de filtrat dans le bécher dépasse ~0.5 cm de hauteur). Si l'écoulement est trop lent et le mélange trop pâteux, rajouter une petite quantité d'eau tiède (~5 ml) sur le broyat.
- Récupérer dans un grand tube à essai 2 ml du filtrat obtenu et rajouter 5 ml d'éthanol froid en laissant s'écouler délicatement l'éthanol sur la paroi du tube. Incliner plusieurs fois le tube pour augmenter l'interface entre les deux phases et continuer jusqu'à faire remonter et précipiter l'ADN dans l'éthanol (phase supérieure).

NB :

Chaque binôme doit être muni d'un quart d'oignon et d'un verre à thé de liquide vaisselle (isis).