

## Immunologie

## Extraction d'un ADN génomique

*En première S (chromosome, ADN support de l'information génétique), mais aussi en première L et ES (supports de l'information génétique), il est possible de proposer une séance de travaux pratiques au cours de laquelle on peut extraire l'ADN.*

### PRINCIPE

L'extraction de l'ADN s'effectue à partir de matériels biologiques variés : cellules sanguines, cellules en culture, tissus.

Cette extraction comporte plusieurs étapes :

- libération de l'ADN et des différents constituants cellulaires par un broyage mécanique du matériel biologique suivi d'une lyse cellulaire chimique ;
- purification sélective de l'ADN : précipitation sélective par un alcool (éthanol ou isopropanol) qui aboutit à la formation d'une pelote d'ADN.

La purification commence classiquement par une digestion enzymatique des protéines par une protéinase (protéinase K). Cette étape peut-être éliminée, la qualité de la purification n'étant pas le propos de cette manipulation et la durée nécessaire étant incompatible avec celle d'une séance de travaux pratiques.

L'utilisation du phénol étant prohibée, et dangereuse, elle est avantageusement remplacée par la précipitation à l'alcool.

### MATÉRIEL

- larves de chironome ou matériel végétal (feuilles) ;
- lames, lamelles, pincettes fines pour la dissection des glandes salivaires ;
- tubes type Ependorf pour les étapes de la purification ou à défaut verres de montre ;
- pipette Pasteur et propipette ;
- colorant spécifique de l'ADN (vert de méthyle acétique, bleu de toluïdine tamponné, orcéine acétique, Feulgen) ;
- isopropanol ou éthanol absolu, éthanol à 70°, acétate de sodium.

## PROTOCOLE

On pourra utiliser des glandes salivaires de chironome ou du tissu végétal. L'utilisation des glandes salivaires permet d'associer pour ce matériel la mise en évidence visuelle des chromosomes et la présence d'ADN.

L'exigence est d'avoir du matériel frais. Il est donc recommandé d'avoir du matériel vivant ou congelé très frais.

On peut aussi travailler dans un cristallisateur avec de la glace pour éviter toute lyse de l'ADN par les enzymes cellulaires.

- 1- dissection des glandes salivaires ;
- 2- découpe fine des échantillons avec des ciseaux (broyage mécanique) ;
- 3- incubation pendant 15 minutes des échantillons dans le liquide de lyse ;
- 4- récupération de la phase liquide ;
- 5- ajout à cette phase liquide :
  - soit du même volume d'isopropanol ;
  - soit de deux volumes d'éthanol absolu ;
  - puis (dans les deux cas) d'une quantité d'acétate de sodium permettant d'obtenir une solution finale avec une concentration en acétate de sodium à  $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$  ;
- 6- transfert de la pelote dans un nouveau tube et lavage à l'éthanol  $70^\circ$ .

On peut alors colorer cette pelote avec des colorants spécifiques de l'ADN (coloration de Feulgen, vert de méthyle acétique, bleu de toluïdine tamponné ou orcéine acétique).

Pour plus de détails sur les méthodes d'extraction de l'ADN, se reporter, dans ce bulletin, à l'article «Le gène en 1995, concepts et méthodes actuels en génétique moléculaire».

