

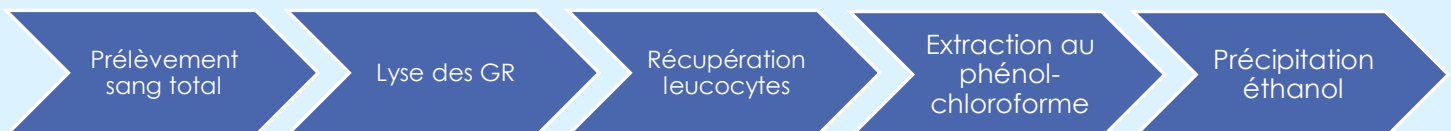
Génétique 2023/2024



Fiche 1 : Extraction ADN/ARN

I) Extraction d'ADN génomique

La première étape va être d'extraire l'acide nucléique à partir duquel on va travailler. Dans la situation la plus fréquente, on travaille sur l'**ADN**. Il va donc falloir l'extraire de tissus, de cellules amniotiques en cas de diagnostic prénatal, de follicules pileux, de coupes en paraffine.... Le plus courant dans les pratiques médicales, c'est d'extraire cet ADN à partir de sang total :



1. Prélèvement du sang total :

Quelques mL (de 1 à 10mL) de sang total suffisent. Ils sont prélevés sur anticoagulant (**EDTA ou acide éthylène diamine tétracétique ++**). On ne peut pas faire d'analyse sur du sang prélevé sur héparine, car elle inhibe certaines étapes de biologie moléculaire.

/!\ Piège QCM : On utilise de l'EDTA et pas de l'héparine +++++



2. Lyse des globules rouges (GR)

On lyse les GR car ce sont des cellules **anucléées**. Ils ne possèdent pas de noyau et donc pas d'ADN. Cette lyse se fait grâce à une solution **hypotonique**.

3. Récupération des leucocytes

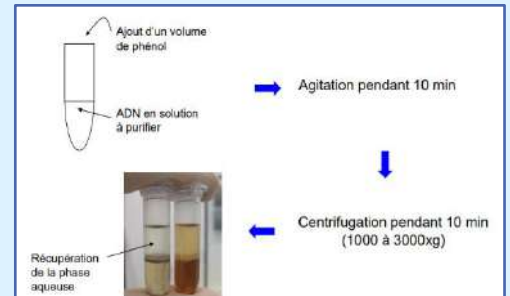
On récupère du culot qui nous intéresse : les leucocytes que l'on va laver et re-suspendre dans un mélange de **détergent** et de **Protéinases K**. C'est une étape très importante car des protéines (ex : chromatine) sont fixées sur l'ADN et doivent être éliminées tout comme les DNases pouvant dégrader l'ADN une fois les cellules lysées.

4. Extraction au phénol-chloroforme

Cette étape consiste à extraire l'ADN grâce à une solution de Phénol-Chloroforme.

Cette solution permet l'élimination définitive des protéines en utilisant la solubilité différentielle ADN/Protéines entre 2 phases non miscibles.

- 🧪 L'ADN à purifier est en solution dans un micro tube,
- 🧪 On ajoute un volume de phénol à la solution d'ADN,
- 🧪 On agite pendant 10 minutes,
- 🧪 On centrifuge pour séparer les 2 phases :



- ⇒ Phase aqueuse supérieure contenant de l'ADN (c'est la phase à récupérer),
- ⇒ Galette de protéines dégradées séparant les 2 phases,
- ⇒ Phase inférieure phénolique.

5. Précipitation éthanol

On ajoute à la phase aqueuse **2,5 volume d'éthanol à 95° froid (-20°)** en présence de **sel**. Une **méduse d'ADN** apparaît alors. Ce floccula (= *précipité sous forme de flocon*) blanc correspond à l'ADN purifié.

Il est ensuite **lavé, récupéré et resuspendu** dans une solution T10E1 (=Tris10 mM E1 mM) qui protège l'ADN des nucléases qui auraient persisté. (mM = millimolaire)

On quantifie ensuite l'ADN : **1 unité de densité optique 260 nm = 50 µg / ml d'ADN**

L'ADN étant très stable, une fois préparé il peut être conservé dans une **DNAthèque** à 4°C pendant extrêmement longtemps. Il pourra être utilisé des années après.






II) Extraction de l'ARN

On peut aussi être amené à travailler de l'ARN. Cependant il sera plus difficile à étudier que l'ADN car l'ARN est très sensible aux **ribonucléases (RNAse A)**. Elles dégradent l'ARN.

Il est peu utilisé en diagnostic de « routine », mais reste très utile lorsque l'on veut tester la pathogénicité de mutations susceptibles de jouer un rôle sur l'épissage.

Pour extraire de l'ARN, il faut faire une **homogénéisation** des cellules ou des tissus dans un **tampon**.

Cette homogénéisation permet :

-  D'inhiber les **RNAse** endogènes,
-  De dénaturer les **acides nucléiques**,
-  Et de dégrader les **protéines**.

L'extraction se fait avec une solution permettant **l'extraction différentielle** ARN/ADN a pH acide.

On peut aussi réaliser une extraction des **ARN polyA+ représentant 1%** des ARN totaux. On réalise une purification par affinité en passant les ARN totaux extraits sur une **colonne d'oligo-dT cellulose** qui va fixer les ARN poly A+.

Après **lavage**, les ARN poly A+ sont élués par abaissement de la force ionique. La précipitation est ensuite réalisée avec de **l'alcool éthylique absolu froid** de manière classique. L'étude de l'ARN permet également d'analyser **l'expression des gènes**.



Voilà c'est tout pour cette affiche. Apprenez bien les différentes étapes. Au début c'est un peu indigeste mais ne vous inquiétez pas, à la fin du semestre vous serez les boss de l'extraction !

Je vous laisse avec une merveilleuse photo de Philibert qui m'a accompagné et soutenu tout au long de ma P1 ! Et qui partage ma vie depuis 2 ans déjà ! <3<3<3