

Techniques d'Analyses de Biologie Moléculaire

Dr. ZIADA-BOUCHAAR H.
MI Génétique moléculaire

Université Frères Mentouri
Constantine

2019-2020



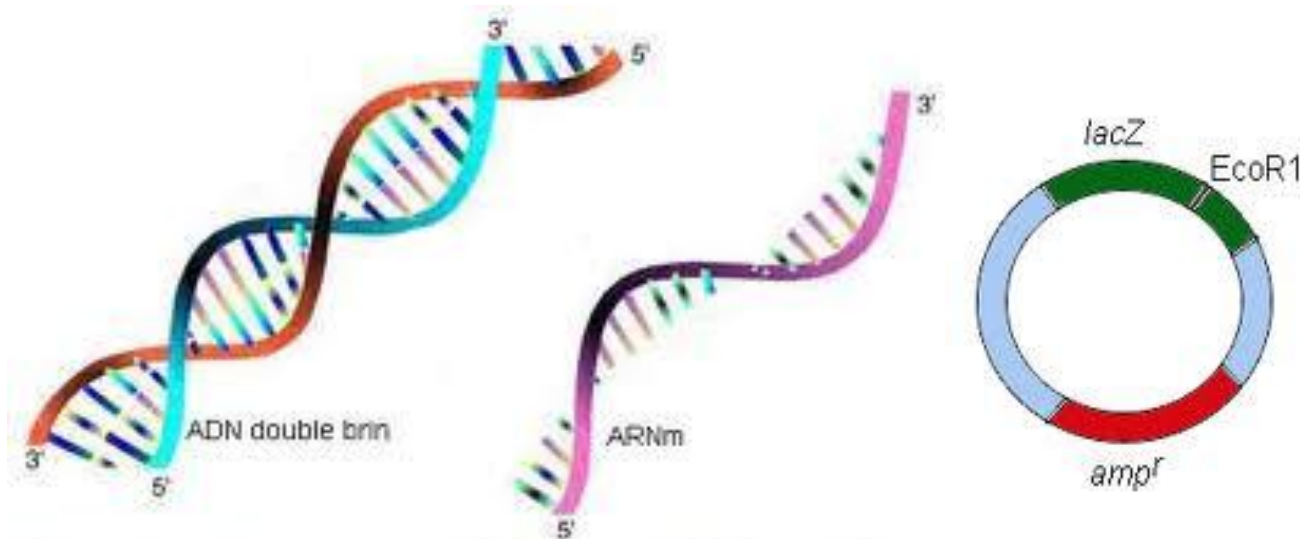
**Méthodes d'extraction et
de purification du matériel
génétiques.**

Introduction

- ❖ Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillons d'acides nucléiques.
- ❖ La purification des acides nucléiques constitue l'étape clé de toutes les études de génétique moléculaire.
- ❖ L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire dans:
 - Les techniques d'ADN recombinant
 - Les applications médicales (diagnostic moléculaire de m. héréditaires , infectieuses, identification génétique en cas de recherche de paternité...)

Introduction

- ❖ 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 pour obtenir un acide nucléique pur.



Introduction

Ces applications concernent l'étude du génome :
l'**ADN** des cellules animales (humaines) ou végétales ou encore des bactéries (chromosomes ou plasmides); toutefois, l'étude des ARN est nécessaire dans certains cas précis : quantification d'ARN viral, étude de l'expression de certains gènes (cytokines, récepteurs...) dans des tumeurs...

D'où l'ADN est -il extrait?

- **Dans les applications de l'ADN recombinant**
 - Des bactéries ou les virus ou encore les phages.
 - Cellules végétales (transformation et amélioration des plantes)
- **Dans la plupart des études en médecine:**
 - leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN.
 - Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies (biopsie de villosités choriales...) ou des cultures de cellules (amniocytes, fibroblastes, lignées lymphoblastiques...).
 - La détection de la présence d'un ou de plusieurs micro-organismes et virus peut se réaliser dans d'autres milieux biologiques tels que sérum, liquide céphalorachidien, urine, salive, crachat, exsudat, écouvillonnages (gorge, œil...), etc.

Extraction et purification des acides nucléiques

Extraction de l'ADN

technique permettant d'isoler l'ADN

Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à

- l'échantillon biologique
- la nature du génome (cellulaire, exogène)
- au nombre de copies dans l'échantillon
- aux méthodes de biologie moléculaire utilisées ultérieurement (*polymerase chain reaction* (PCR), Southern-blot, électrophorèse en champ pulsé...).

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

- Lyse des cellules
- Élimination des protéines
- Élimination des autres acides nucléiques (ARN...)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

Les principaux procédés d'extraction de l'ADN diffèrent et peuvent se classer en trois principales types:

- 1- Les méthodes utilisant des solvants organiques.**
- 2- Les méthodes utilisant des solvants non organiques.**
- 3- Les méthodes basées sur l'utilisation de microcolonnes de résines échangeuses d'ions.**

Différentes variantes employées:

l'**ADN génomique** (issu du ou des chromosomes des cellules analysées)

Ou

l'**ADN plasmidique** (provenant de plasmides portés le plus souvent par des cellules bactériennes).

Kits commerciaux → extractions rapides à l'aide de réactifs prêts à l'emploi proposés par un certain nombre d'industriels



Les principaux procédés d'extraction de l'ADN à partir du sang

Étapes majeures dans une extraction et purification d'ADN:

- le sang doit être initialement vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges.

Les solutions de lyse des globules rouges sont nombreuses et variées. Par exemple:

Tris 10 mM / EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) 10 mM.

La lyse est en général réalisée à 4 °C pendant 20 à 30 minutes.

- Le lysat est centrifugé (15 min, 1 500 g) et, le surnageant est éliminé.
- le culot cellulaire contenant les leucocytes est repris dans une solution saline (NaCl /EDTA) et est traité par une solution de lyse des globules blancs contenant du l' SDS (*sodium dodecyl sulfate*).
- L'ADN nucléaire libéré dans le milieu est traité par une protéinase très active, la protéinase K, qui a pour but de digérer les protéines qui lui étaient associées (18 h à 37 °C).

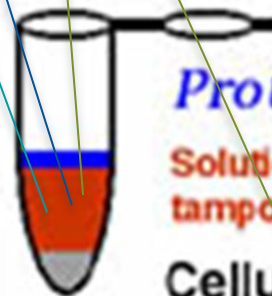
tampon sans pression osmotique,
faisant éclater les membranes
fermées

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

Homogénéisation, déprotéinisation



Homogénat
Protéines
ADN, ARN



Protéinase K
Solution de lyse :
tampon; EDTA; SDS
Cellules

Un traitement par la protéinase K
(une protéase) permet 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.

- **C'est à ce stade en général que les procédés de purification varient :**

- *Méthodes utilisant des solvants organiques*

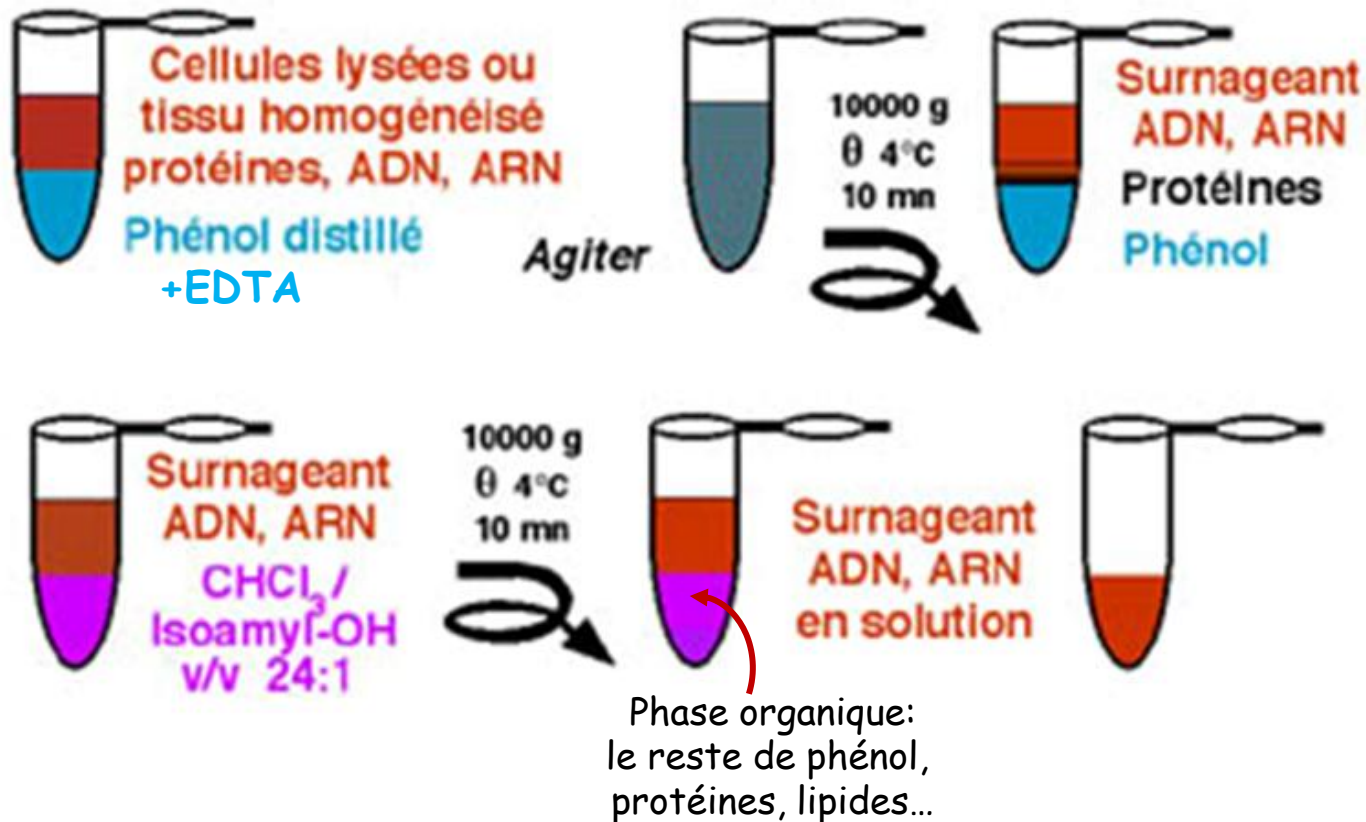
1- **Méthode au phénol-chloroforme :**

le principe consiste à traiter le lysat cellulaire dans un premier temps par du **phénol** volume à volume

mais après centrifugation (3 000 g, 10 min) il faut enlever la phase phénolique, par un mélange **chloroforme-alcool isoamylique (24:1)**. L'objectif est d'éliminer les traces éventuelles de phénol qui auraient pu être emportées avec la phase aqueuse et qui sont fortement inhibitrices des réactions enzymatiques.

Le phénol, équilibré à pH 8,0, est un puissant agent déprotéinisant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles.

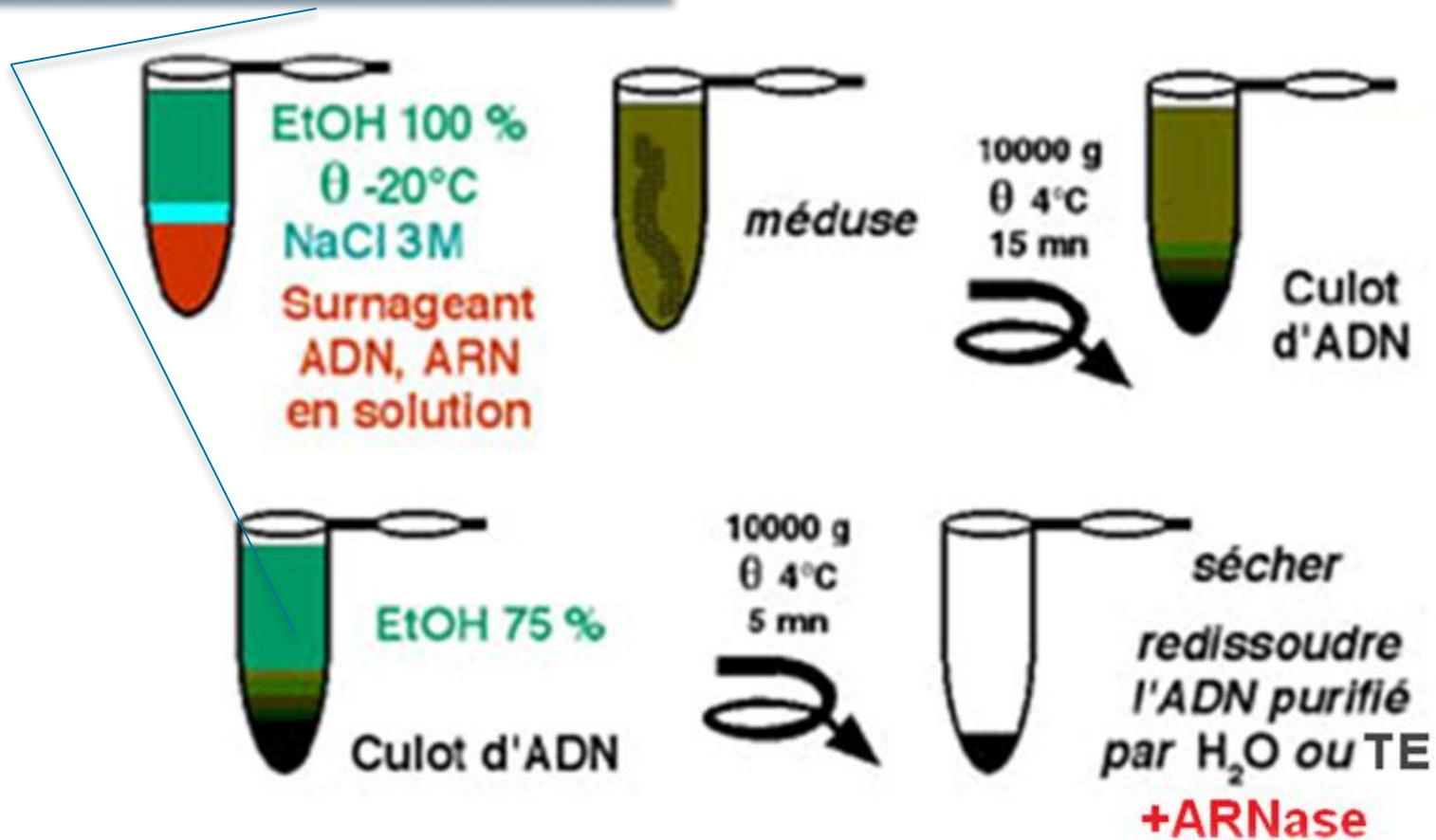
Extraction de l'ADN



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.

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.

- *Méthodes utilisant des solvants organiques*

2- **Méthode au chlorure de guanidium:**

Le principe consiste à traiter le lysat cellulaire obtenu après action de la solution de lyse des globules rouges par une solution d'un agent chaotropique, **le chlorure de guanidium** (hydrochloride de guanidium 6 M 10 ml/acétate d'ammonium 7,5 M 0,5 ml),

puis par une solution détergente et déprotéinisante (protéinase K 10 mg/ml, 300 ml/sarcosyl 5 % 1,5 ml) 2 h à 56 °C.

- *Méthodes utilisant des solvants non organiques :*

Dans ces méthodes, le principe consiste à traiter uniquement le lysat cellulaire par une solution saline.

L'objectif est d'éliminer par précipitation sélective les protéines. En fonction des protocoles, des étapes de prétraitement par la RNase sont proposées.

Différentes solutions salines ont été préconisées : par exemple, NaCl 2,5 M.

Quelques kits commercialisés par des industriels utilisent ce procédé.

- *Méthodes basées sur l'utilisation de colonnes résines échangeuses d'ions :*

Ces méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques sont les dernières récemment apparues.

Elles sont basées sur la propriété qu'ont les particules de silice d'adsorber sélectivement les acides nucléiques.

Les solutions de lavage permettent de se débarrasser des contaminants tels que l'hémoglobine, les protéines plasmatiques ou les ions Fe^{2+} .

Extraction de l'ARN

La préparation d'ARN est plus délicate que celle d'ADN car les ribonucléases (RNAses) sont très répandues (par ex. sur les doigts) et sont fréquemment capables de se renaturer après de nombreux traitements.

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 RNases.
- × 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
- ✓ Tubes et cônes RNase free (autoclavage)
- ✓ Nettoyer la pailasse et ces instruments (pipettes...) avec une solution décontaminante (Rnase Away)

[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

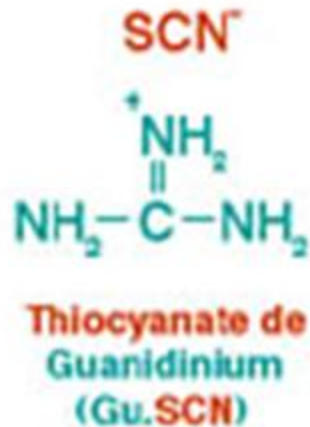
A new method of total RNA isolation by a single extraction with an acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform mixture is described. The method provides a pure preparation of undegraded RNA in high yield and can be completed within 4 h. It is particularly useful for processing large numbers of samples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

PMID: 2440339 [PubMed - indexed for MEDLINE]

GuSCN: agent puissant de dénaturation des protéines: Lyse

beta2-mercaptoéthanol: rupture des ponts disulfures protéiques

Isolation du RNA



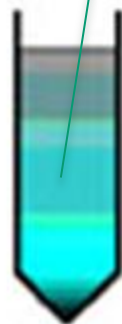
cellules

8000 rpm
10°C
10 mn



surnageant
Gu.SCN
CsCl 2,4M
CsCl 5.7M

30000 rpm
20°C
24 h



RNA

Extraction
NaCl 0,1 M
Phénol
CHCl₃
Isoamyl-OH

Précipité
Ethanol
- 20°C

L'ARN est extrait grâce à une forte densité de chlorure de césium (CsCl) solution → élimine l'ADN et polysaccharide.

+Phénol/Chlrf → accélérer la procédure d'extraction



Contient du:
Guanidine isothiocyanate
Phénol



+



aqueous phase: RNA

interphase: DNA

organic phase: proteins, lipids



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

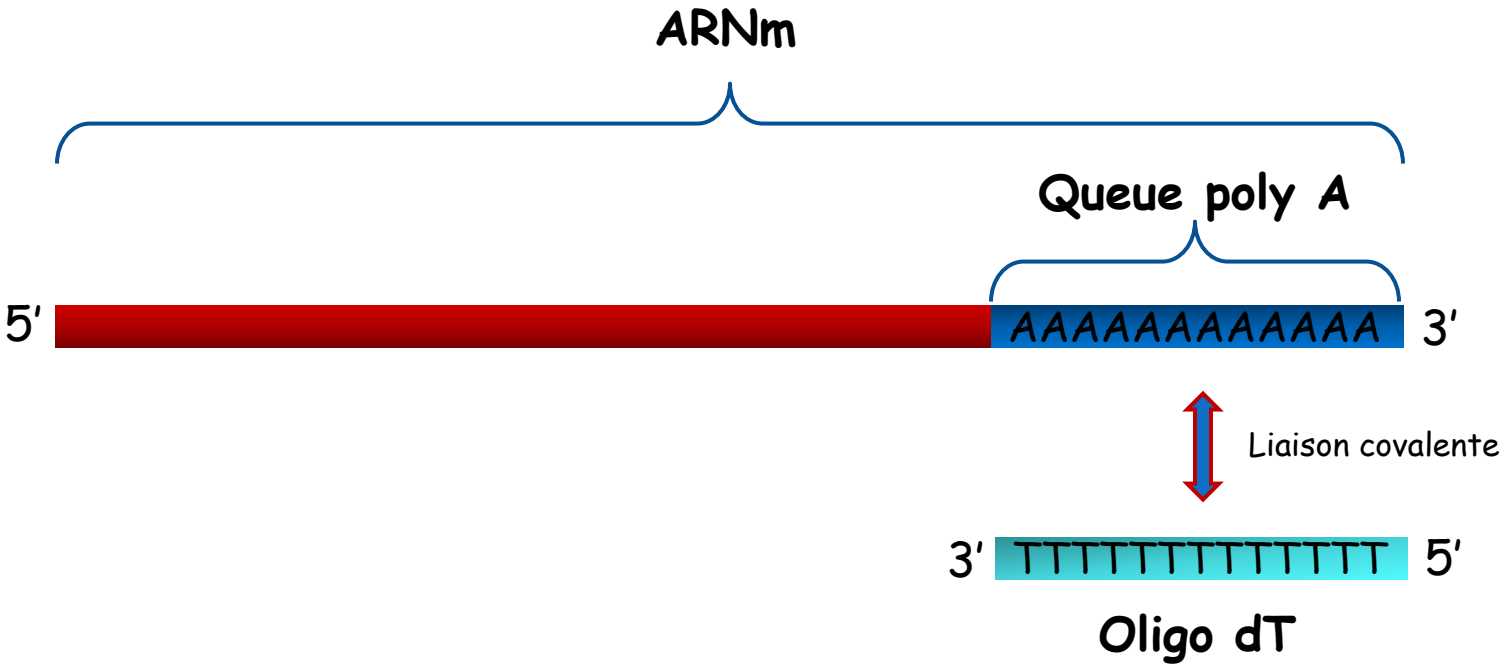
Parmi les acides ribonucléiques extraits des cellules →
les **ARN messagers = ARNm** = classe la plus étudiée



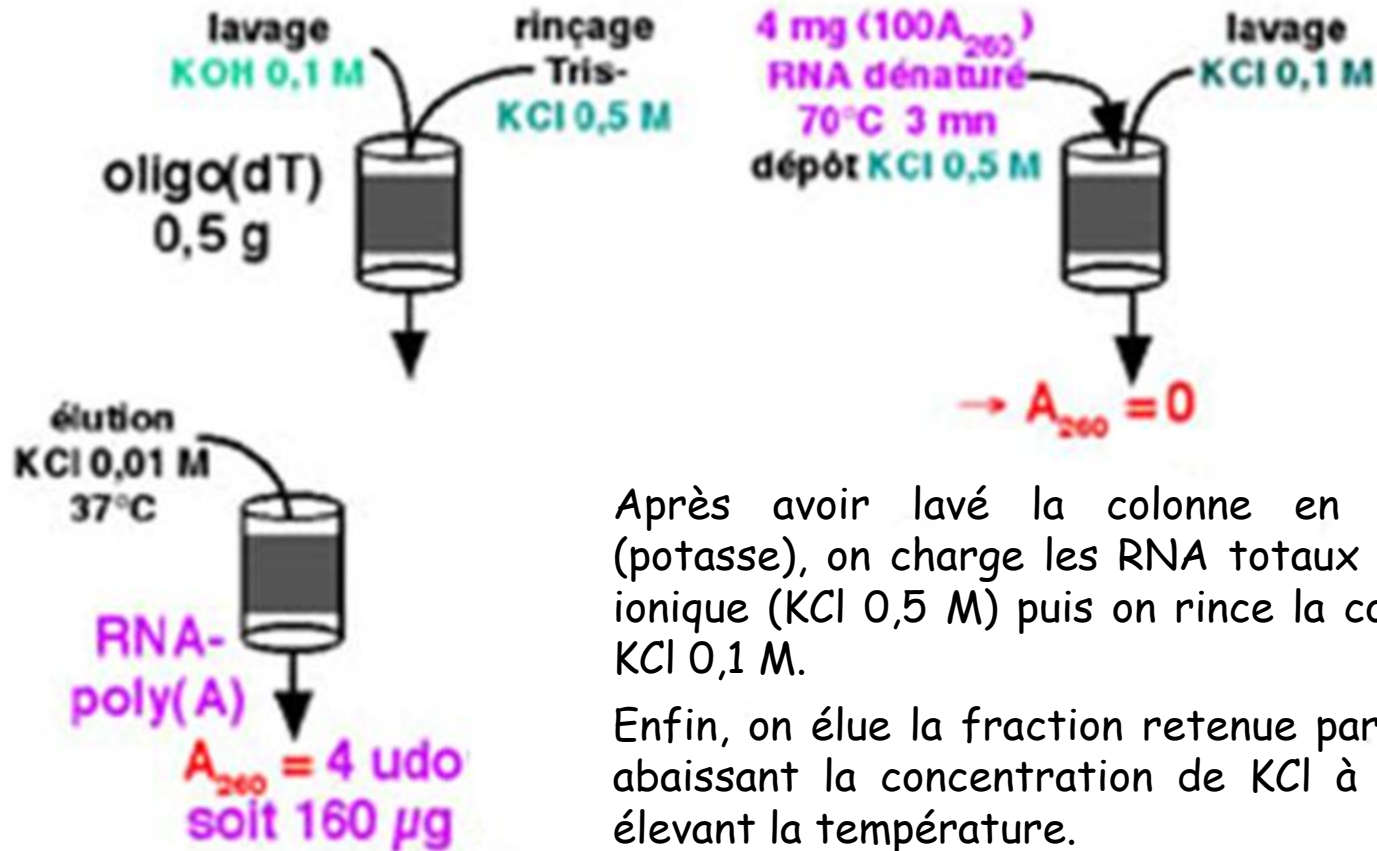
se caractérisent par la présence du côté 3'-terminal
d'une **longue queue poly(A)** synthétisée à la phase
post-transcriptionnelle.



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).



Purification du RNA-poly(A)



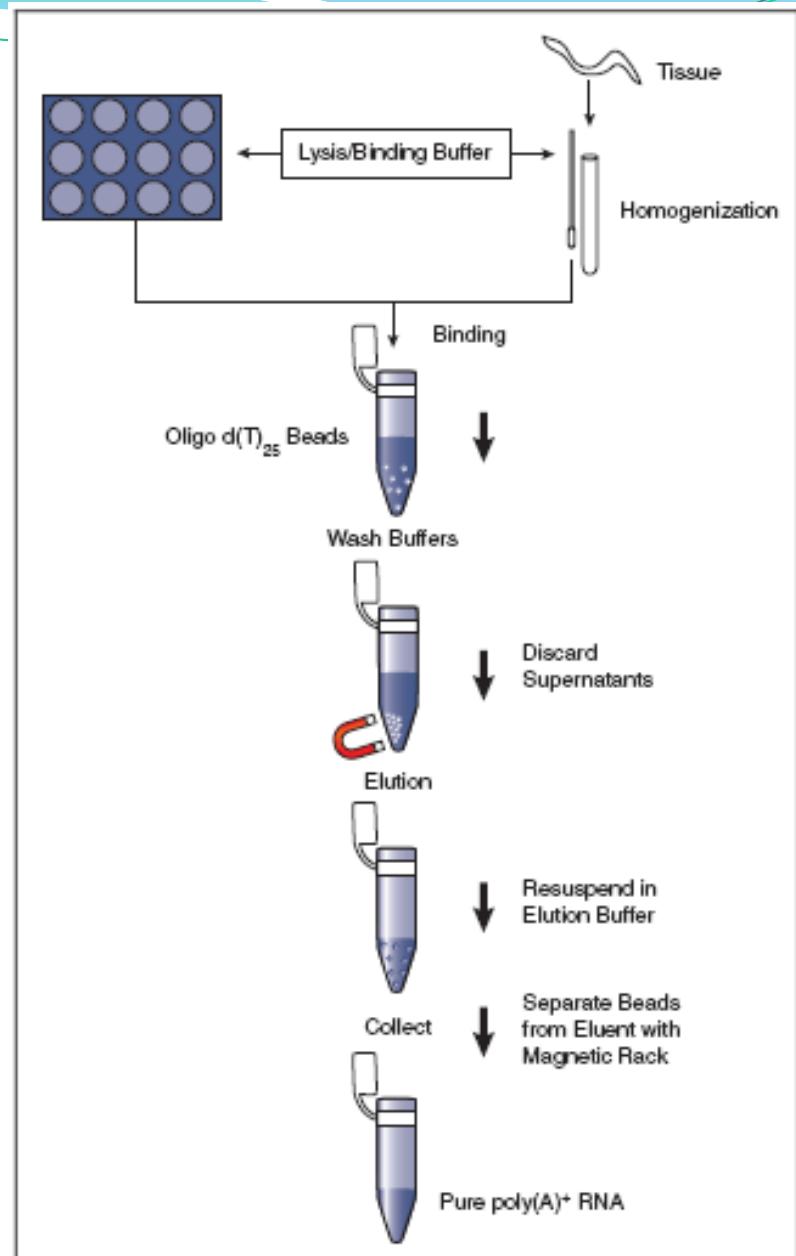
Après avoir lavé la colonne en milieu alcalin (potasse), on charge les RNA totaux à haute force ionique (KCl 0,5 M) puis on rince la colonne avec du KCl 0,1 M.

Enfin, on élue la fraction retenue par la colonne en abaissant la concentration de KCl à 0,01 M et en élevant la température.

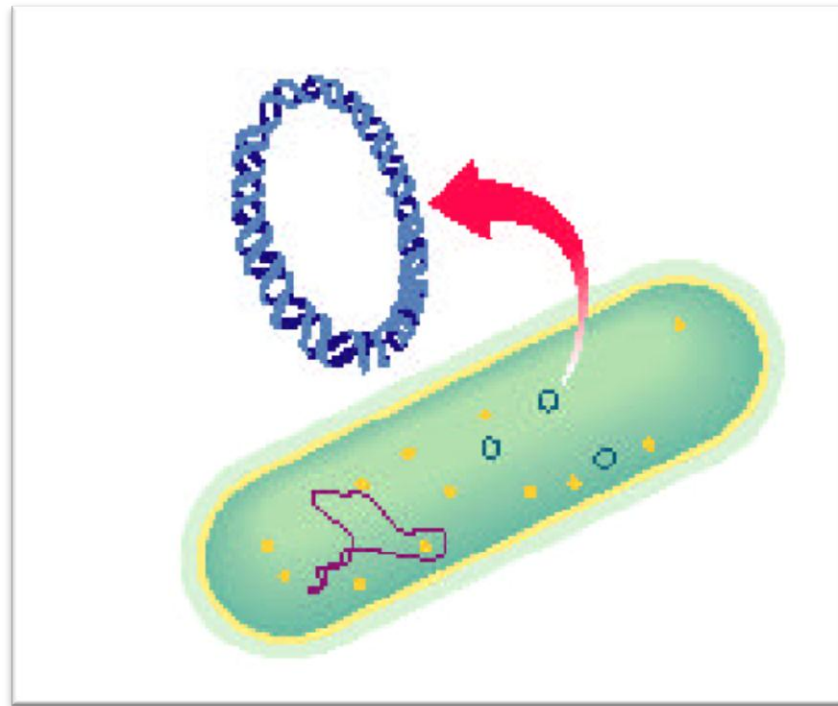
L'ARN poly A (ARNm) est élué dans de l'eau ou conservé dans de l'ETOH (-20C)

NB: Oligo-dT: une courte séquence de deoxy-thymine nucléotides

Kits d'extraction d'ARN poly A



Extraction de plasmide



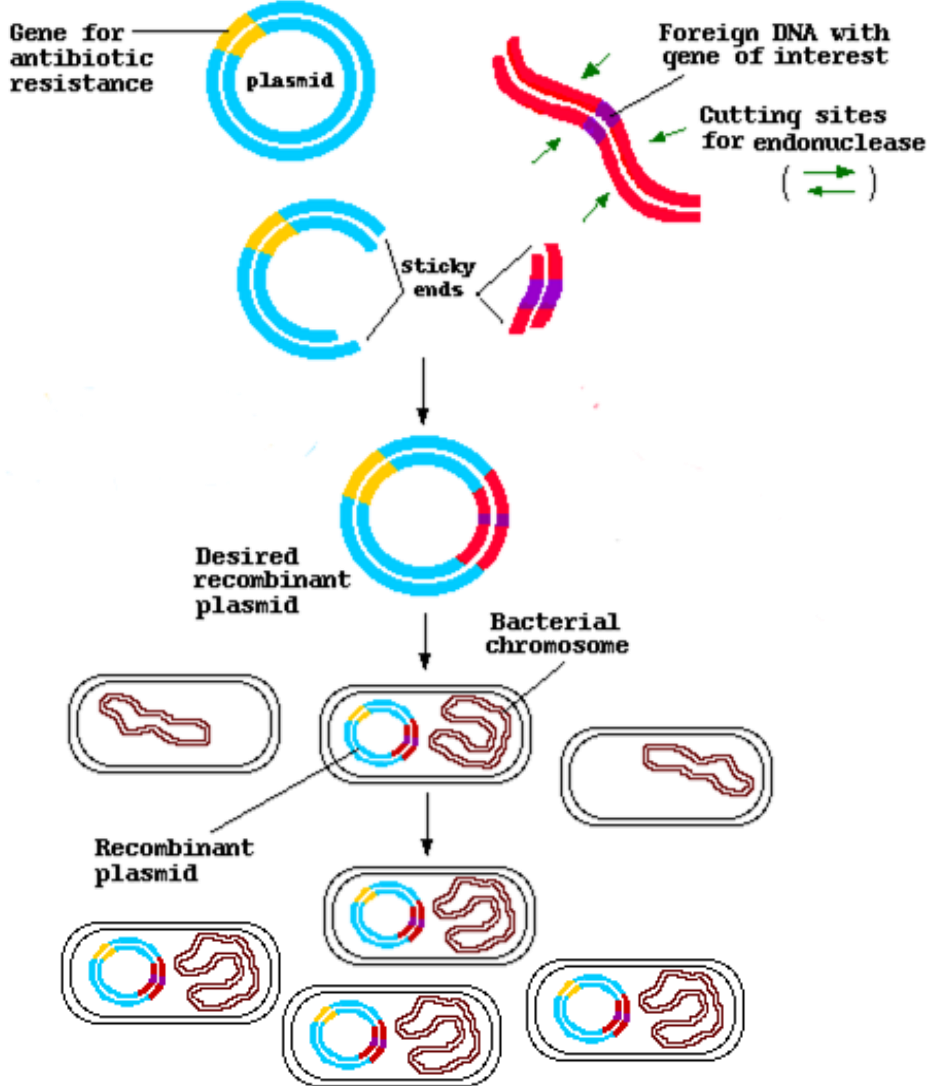
- Petites molécules d'ADN habituellement circulaire
- Existant indépendamment des chromosomes de l'hôte
- Présents chez nombreuses bactéries (qqes levures et mycètes)
- A répllication autonome indépendamment des chromosomes
- Portent un nombre de gènes très réduit (≤ 30)
- A information génétique non-essentielle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

En nbr. variable:

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

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

Plasmid Insertion



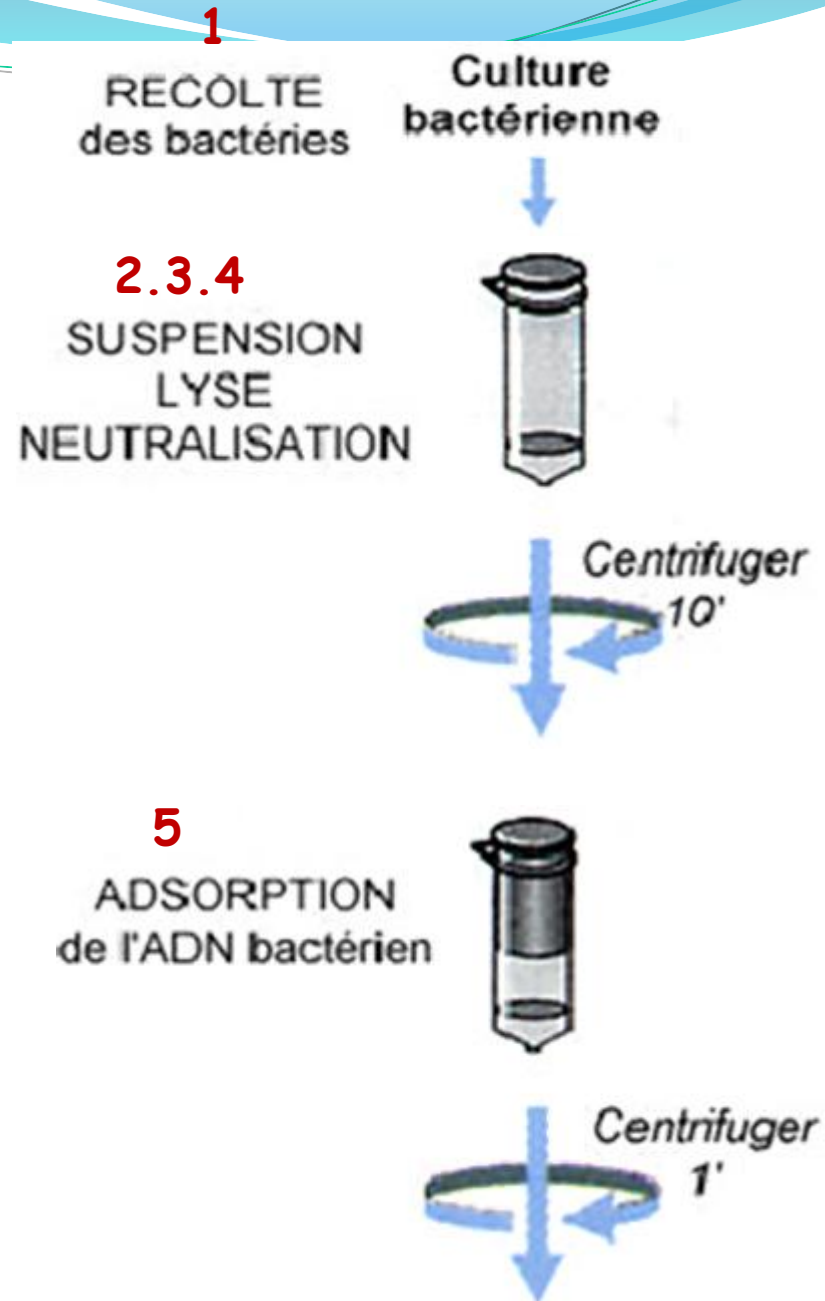
- ⊙ Parmi les techniques les plus courantes de la biologie moléculaire = noms abrégés: **miniprep**, **midiprep** et **maxiprep** (volume de la culture bactérienne).
- ⊙ Préparation sélective de l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.
- ⊙ kits commerciaux (grd nbr) avec petites colonnes de résine chromatographique échangeuse d'ion → améliorer la pureté de l'ADN.

Etape 1: Récolter les bactéries transformées

Etapes 2.3.4: Lysér les structures cellulaires et éliminer les grosses molécules en utilisant de l'EDTA fragilise la membrane bactérienne, la RNase lyse les ARN, du SDS pour dissoudre et dégradé la membrane bactérienne, libérant ADN et protéines dans la solution.

L'acétate de sodium précipite protéines et ADN chromosomique. Ce précipité et les débris cellulaires sont séparés par centrifugation du surnageant qui contient, entre autres, l'ADN plasmidique.

Etape 5: Filtrer l'ADN plasmidique sur une colonne de silice. La silice qui se fixe dans la colonne présente une grande affinité pour l'ADN et va pouvoir l'adsorber au cours de la filtration.



Etape 6: Purifier par lavage l'ADN adsorbé. L'éthanol contenu dans la solution de lavage va dissoudre et libérer la majorité des molécules adsorbées dans la colonne à l'exception de l'ADN plasmidique insoluble dans l'éthanol.

Etape 7: Recueillir l'ADN plasmidique par élution (= séparation) dans de l'eau ou un tampon d'élution

6
LAVAGE



7
ELUTION
séparation de
l'ADN adsorbé



Plasmide
pur

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.

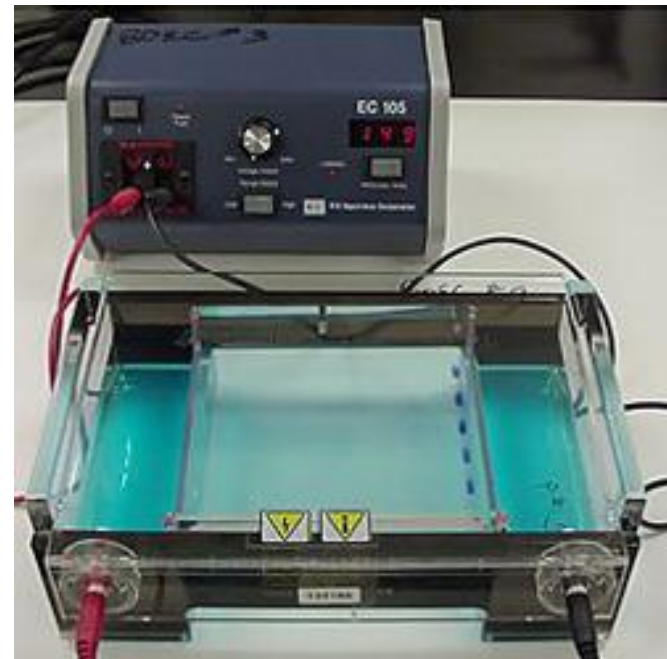
▶ Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur.

▶ 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.

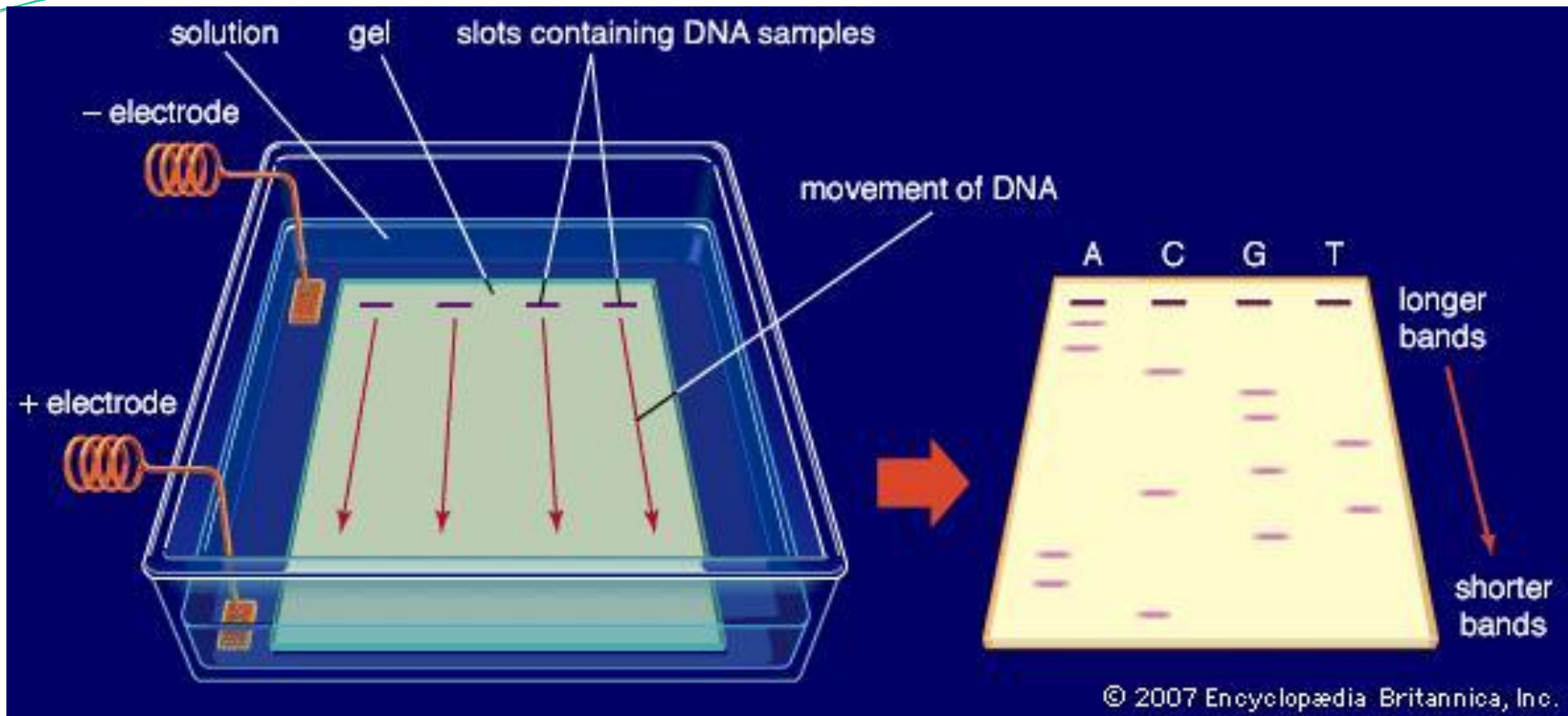
La taille des mailles varie selon la concentration d'agarose

❖ 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.

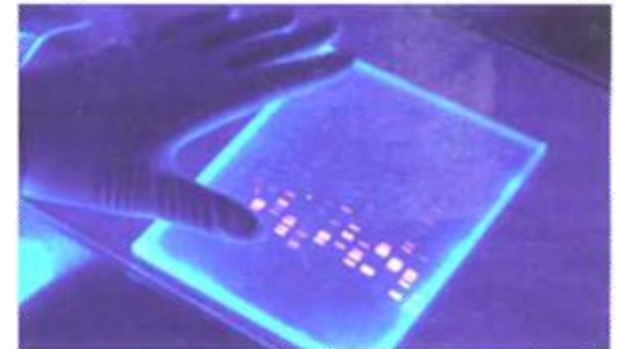
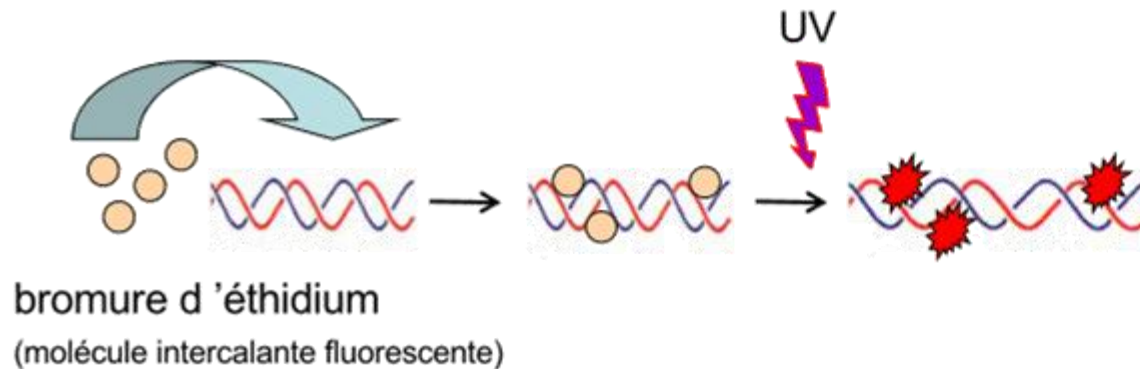
→ Une méthode sensible de coloration de l'ADN consiste à plonger le gel après électrophorèse dans du bromure d'éthidium (BET ou EtBr) un intercalent de l'ADN qui devient cent fois plus fluorescent sous illumination ultra-violette lorsqu'il est lié à l'ADN.

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

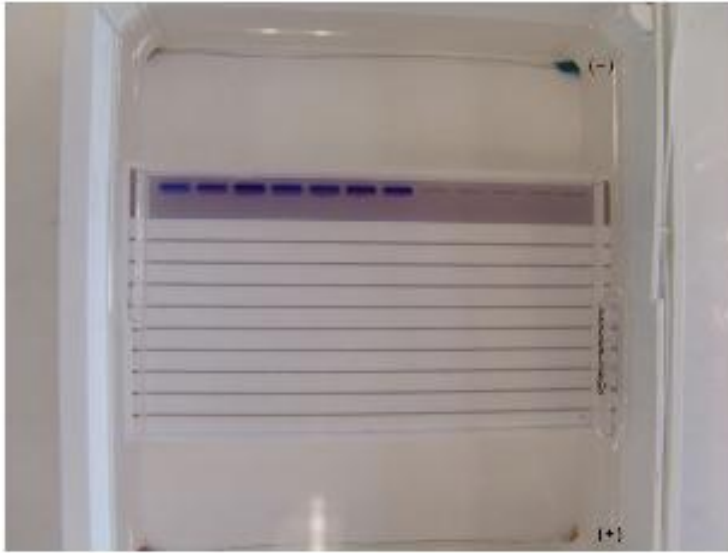
Le bromure d'éthidium (EtBr) = à la fois un agent intercalant et un fluorochrome.

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.

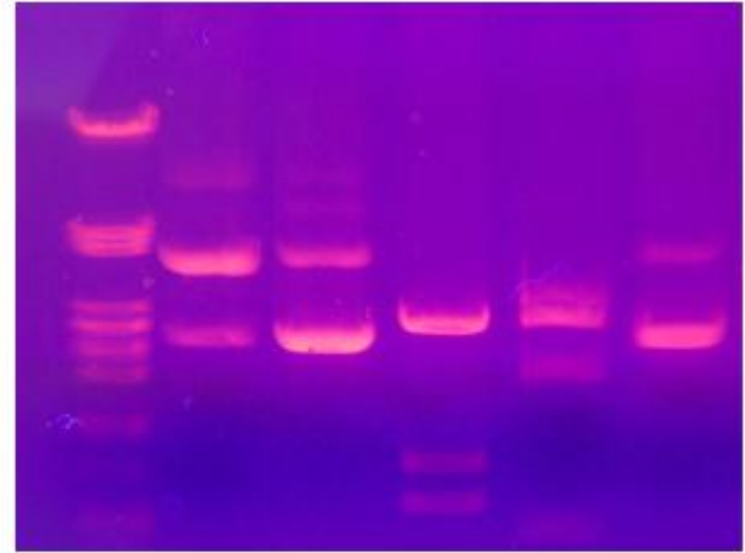
C'est l'une des principales méthodes de détection de l'ADN dans les gels d'électrophorèse.



Gel agarose

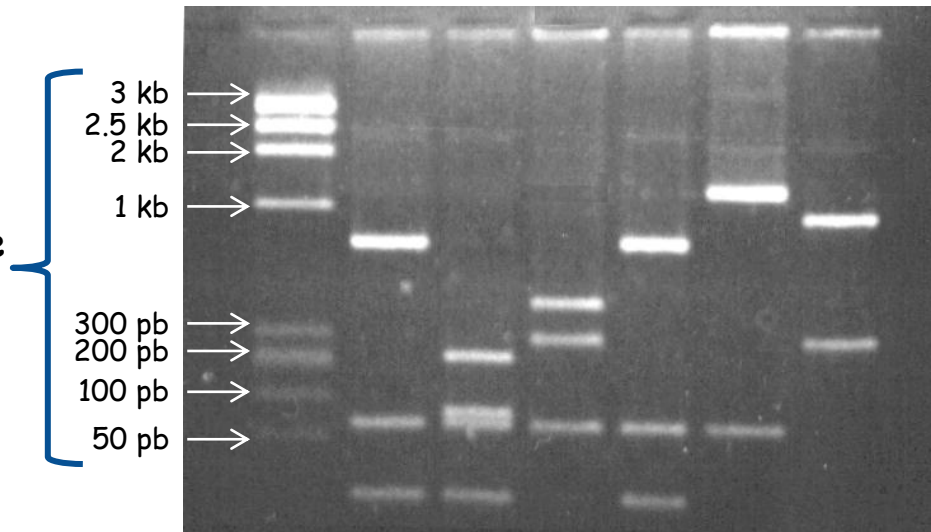


Bromure d'ethidium/lampe UV

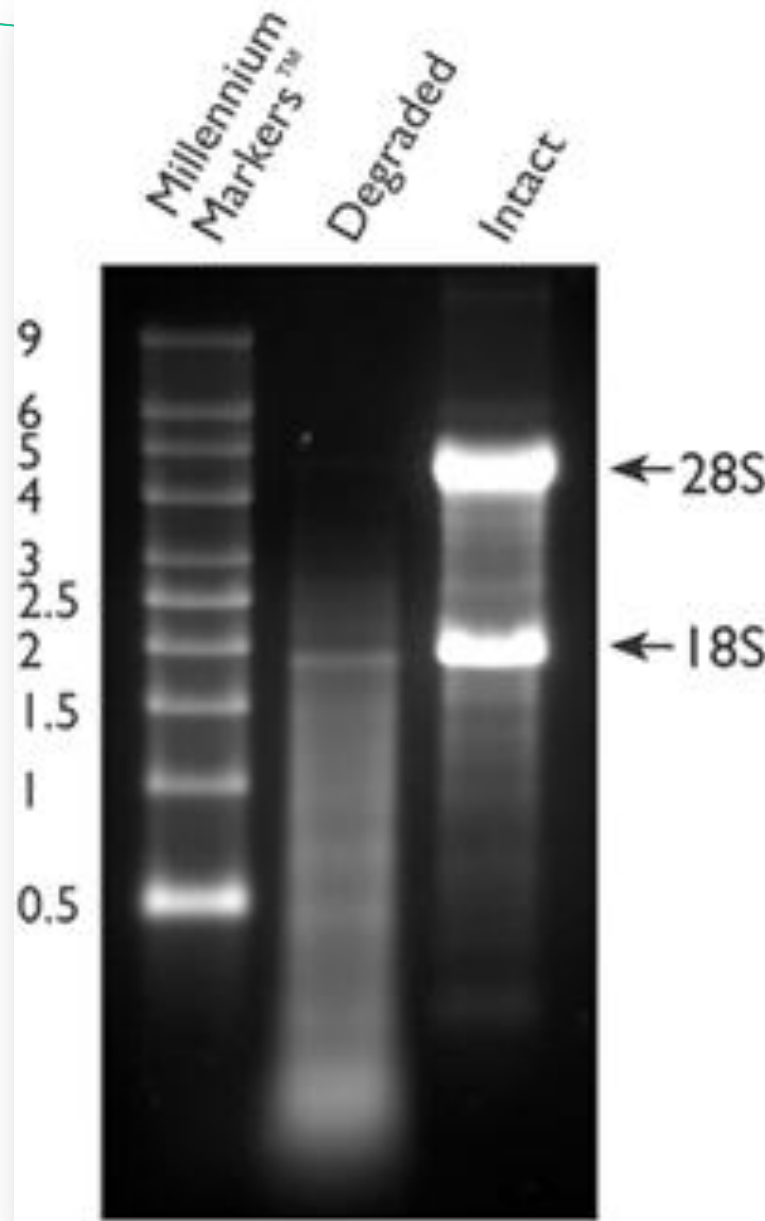


Photographie de gel après migration

**Marqueur de taille
(DNA ladder)**



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



Critères d'évaluation de la qualité de l'ADN

La taille des fragments d'acides nucléiques.

La taille des fragments a été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8 %. Deux à 5 µl de la solution d'ADN ont été déposés dans chaque puits d'un gel d'agarose à 0,8 % soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 2 h. Cette analyse permet, par ailleurs, d'observer une éventuelle dégradation de l'ADN survenue au cours de l'extraction.

Le rendement de l'extraction.

La concentration de l'ADN extrait a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm des solutions diluées au 1/100 ou 1/50 (selon le procédé), sachant que 1 U DO correspond à 50 mg/ml d'ADN. Le rendement a été calculé en réalisant le rapport entre la quantité d'ADN obtenue et le volume initial de sang total utilisé.

SPECTROPHOTOMETRIE à UV

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



QUANTITE DE L'ADN:

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

QUANTITE DE L'ARN:

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

La pureté.

La contamination de l'ADN extrait par des protéines a été appréciée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm et en effectuant le rapport DO 260 nm/DO 280 nm.

La pureté a été aussi appréciée en vérifiant l'amplification d'un fragment d'ADN par la Taq polymérase.

La rapidité. Le temps nécessaire pour réaliser une extraction a été déterminé : temps réel et temps de travail.

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.

L'ADN pur: $1.8 < R < 2$

L'ARN pur: $R \approx 2.0$