

Extraction de l'ADN à partir des prélèvements de poissons

Objectif :

- Identifier les points critiques d'un pipetage de micro-volume
- Etiqueter une solution pour une utilisation ultérieure
- Choisir un lieu de stockage de la solution
- Réfléchir à l'impact de nos pratiques sur la société

Avant d'identifier les poissons de l'aquarium tropical, il faut au préalable récupérer leur ADN, et pour cela il faut l'extraire des tissus de poisson prélevés.

Maintenant que nous avons identifié les principales méthodes d'extraction et de purification d'ADN, nous allons utiliser une méthode et une technique « clé en main », plus sûre et plus sensible que celle réalisée dans l'AT1 afin que l'ADN récupéré soit plus pur.

Pour cela, nous allons utiliser un kit DNeasy Blood & tissue du fournisseur Qiagen.

Q1. Faire un chronogramme de la procédure opératoire exposé dans la FT 1.

→ Faire valider par votre professeur

Q2. Faire le tableau d'analyse des risques identifiant les dangers, leur nature, les situations exposantes et la prévention que vous allez mettre en place.

Q3. A l'aide du document 3 de l'AT1, identifier quelle est la ou les combinaison(s) de méthodes utilisées pour extraire et purifier l'ADN.

Q4. D'après le document 1, identifier le rôle de la protéinase K utilisée dans le kit.

Lire le communiqué de presse « Conserver l'ADN à température ambiante n'est plus une utopie » et répondre aux questions suivantes :

Q5. Identifier la température de stockage de votre échantillon d'ADN.

Q6. Résumer en quelques phrases les impacts du stockage à froid de l'ADN.

T1. Pipeter 40, 200 et 500 μL de la solution colorée fournie. Réaliser un contrôle visuel des micro-volumes pipetés.

T2. Identifier le plus précisément possible le poisson fourni (photo, nom de genre et d'espèce si possible et code).

BIOCHIMIE BIOLOGIE BIOTECHNOLOGIE

TSTL

T3. Réaliser la procédure opératoire d'extraction et de purification de l'ADN de poisson.

T4. Annoter correctement votre microtube pour permettre une traçabilité de votre travail dans le groupe.

→ Appeler l'enseignant pour validation

Fiche technique 1 : Extrait du protocole d'extraction d'ADN animal du fournisseur (Kit DNeasy from Qiagen)

Etape 1 :

- Couper en petits morceaux jusqu'à 25 mg de tissu et les placer dans un microtube à centrifuger (Eppendorf) de 1,5 mL.
- Bien annoter le tube, de préférence sur le capuchon.
- Ajouter 180 μ L de tampon ATL.

Etape 2 :

- Ajouter 20 μ L de protéinase K. Fermer le tube.
- Mélanger avec le vortex, et incuber à 56°C jusqu'à ce que le tissu soit complètement lysé.
- Vortexer occasionnellement pendant l'incubation pour disperser l'échantillon ou le placer dans un bain-marie à agitation.

NB : Le temps de lyse varie en fonction du type de tissu traité, mais il est généralement de 1 à 3 h.

Etape 3 :

- Vortexer pendant 15 s puis ajouter 200 μ L de tampon AL à l'échantillon. Vortexer pour bien mélanger.
- Ajouter ensuite, rapidement, 200 μ L d'éthanol (à 96-100 %), et mélanger à nouveau soigneusement au vortex.

Etape 4 :

- Prélever le mélange de l'étape 3 (y compris tout le précipité) et le mettre dans la colonne DNeasy Mini placée dans un tube collecteur de 2 mL (tube sans capuchon). Centrifuger à 6000 g (= 8000 rpm ou tours/min) pendant 1 min.
- Jeter le tube collecteur avec les éluants dans la poubelle biologique (pour solides)

Etape 5 :

- Placer la colonne à centrifuger DNeasy Mini dans un nouveau tube collecteur de 2 mL tube sans capuchon) et ajouter 500 μ L de tampon AW1 -> centrifuger pendant 1 min à 6000 g (8000 rpm).

BIOCHIMIE BIOLOGIE BIOTECHNOLOGIE

TSTL

- Jeter le tube collecteur avec les éluants.*

Etape 6 :

- Placer la colonne à centrifuger DNeasy Mini dans un nouveau tube collecteur de 2 mL (tube sans capuchon) et ajouter 500 μ L de tampon AW2, et centrifuger pendant 3 min à 20 000 g (14 000 rpm) pour sécher la membrane DNeasy.
- Jeter le tube collecteur avec les éluants

Etape 7 :

- Placer la colonne à centrifuger DNeasy Mini dans un microtube Eppendorf de 1,5 mL, et ajouter 200 μ L de tampon AE directement sur la membrane DNeasy.
- Incuber à température ambiante pendant 1 min, puis centrifuger pendant 1 min à 6000 g (8000 rpm) pour éluer.

Recommandé :

Pour un rendement maximal de l'ADN, répéter l'élution une fois comme décrit à l'étape 7. Cette étape permet d'augmenter le rendement global d'ADN.

Note : Il ne faut pas éluer plus de 200 μ L dans un microtube de 1,5 mL car la colonne DNeasy Mini spin entrera en contact avec l'éluat.

Un nouveau microtube peut donc être utilisé pour la deuxième élution afin d'éviter la dilution du premier éluat.

Informations sur la sécurité

Les tampons AL et tampon AW1 contiennent du chlorhydrate de guanidine : nocif, irritant.

La Protéinase K est un sensibilisant, irritant.

BIOCHIMIE BIOLOGIE BIOTECHNOLOGIE

TSTL

Document 1 : étapes de l'extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN suit généralement trois étapes de base :

1. Lyse des cellules

La membrane cellulaire est perturbée par la chaleur et par l'utilisation d'un détergent.

Les protéines, y compris les nucléases, sont inactivées par des enzymes digestives, telle que la protéinase K.

Le lysat cellulaire est combiné avec de l'alcool et placé dans la colonne de spin, qui est insérée dans un tube.

2. Séparation de l'ADN des autres composants cellulaires.

En présence d'un tampon très chaotropiques (qui permet de dénaturer les protéines et de les solubiliser), les billes de silice de la colonne de spin Qiagen lient l'ADN.

Un agent chaotropique est une molécule qui détruit la structure spatiale (tridimensionnelle) dans les macromolécules biologiques, comme les protéines, l'ADN ou l'ARN et les dénature. Les agents chaotropiques interfèrent avec les interactions intramoléculaires faibles (non-covalentes), comme les liaisons hydrogène, les forces de van der Waals et l'interaction hydrophobe.

Ex d'agent chaotropique : l'urée, le chlorhydrate de guanidine.

Lors de cette étape ; les protéines et les cations divalents, les ions chargés positivement, y compris le magnésium, sont éliminés à l'aide de multiples lavages de tampons et d'étapes de centrifugation.

3. Récupération de l'ADN.

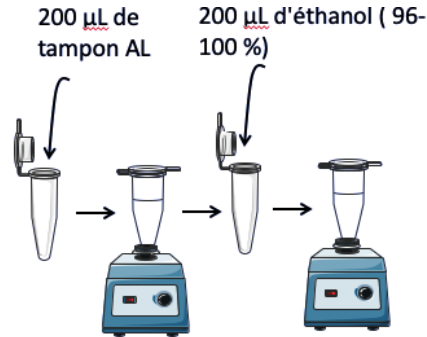
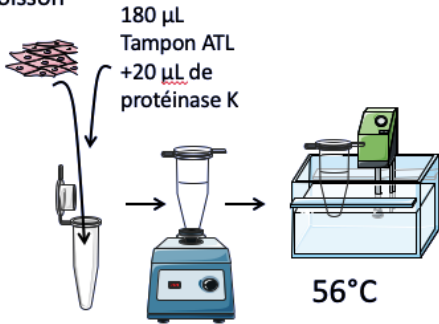
L'ADN encore lié à la silice est décroché en utilisant un tampon dit d'élution, très pauvre en sels tel que le tampon Tris-EDTA.

On dit que l'ADN est élué (il est décroché de la colonne).

BIOCHIMIE BIOLOGIE BIOTECHNOLOGIE

TSTL

Morceau de poisson

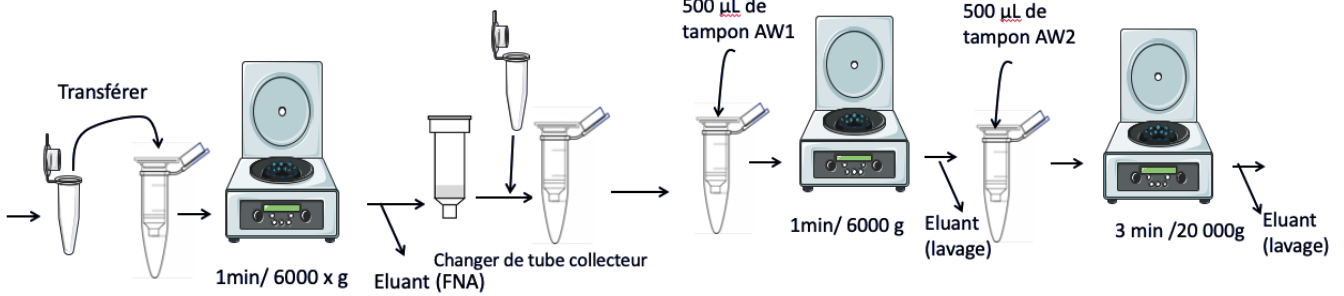


Étape 1+ 2 : LYSE Cellulaire

La chaleur et les détergents détruisent la membrane et dénaturent les protéines (couplé au cassage mécanique du vortex) . Les protéines, y compris les nucléases, sont lysées par des enzymes digestives, telle que la protéinase K.

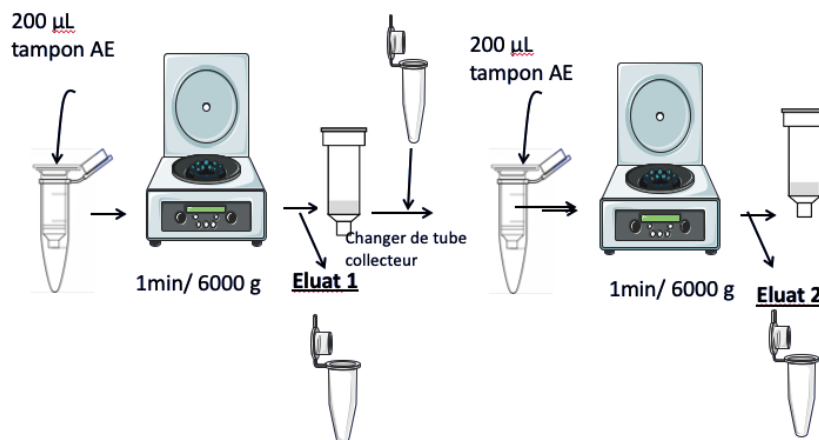
Étape 3

L'alcool précipite l'ADN et le sépare des protéines



Étape 4 : Fixation de l'ADN à la résine (charge de la colonne) . La fraction cellulaire non adsorbée (liée) à la résine est éliminée par la centrifugation dans l'éluant (FNA)

Étape 5 +6 : LAVAGE DE LA COLONNE et de l'ADN qui est accroché à la résine
(Les protéines et les cations divalents, les ions chargés positivement, y compris le magnésium, sont éliminés à l'aide de multiples lavages de tampons et d'étapes de centrifugation)



Étape 7 : ELUTION DE L'ADN associé à la colonne (l'ADN lié à la silice est décroché en utilisant un tampon dit d'éluant par compétition)

Matière d'œuvre

Préparation préalable	MO pour 22 élèves (matériel fourni par binôme)	Equipements à dispo dans la salle
<p>Dans kit qiagen DNeasy Blood and Tissue :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 19 mL d'éthanol à 96-100% dans la bouteille AW2 - Ajouter 30 mL d'éthanol à 96-100% dans la bouteille AW2 	11 tubes Eppendorf de 1,5 mL contenant 400 µL de tampon ATL étiquetés « ATL »	<ul style="list-style-type: none"> - Un bain marie ou étuve à 56°C - Centrifugeuse branchée et allumée
	11 tubes Eppendorf de 0,5 mL contenant 50 µL de protéinase K étiquetés « protéinase K »	
	11 tubes Eppendorf de 1,5 mL contenant 450 µL de tampon AL étiquetés « AL »	
	11 tubes Eppendorf de 1,5 mL contenant 450 µL d'éthanol à 99,9 % étiquetés « EtOH »	
	11 tubes Eppendorf de 1,5 mL contenant 1200 µL de tampon AW1 étiquetés « AW1 »	
	11 tubes Eppendorf de 1,5 mL contenant 1200 µL de tampon AW2 étiquetés « AW2 »	
	11 tubes Eppendorf de 1,5 mL contenant 900 µL de tampon AE étiquetés « AE »	