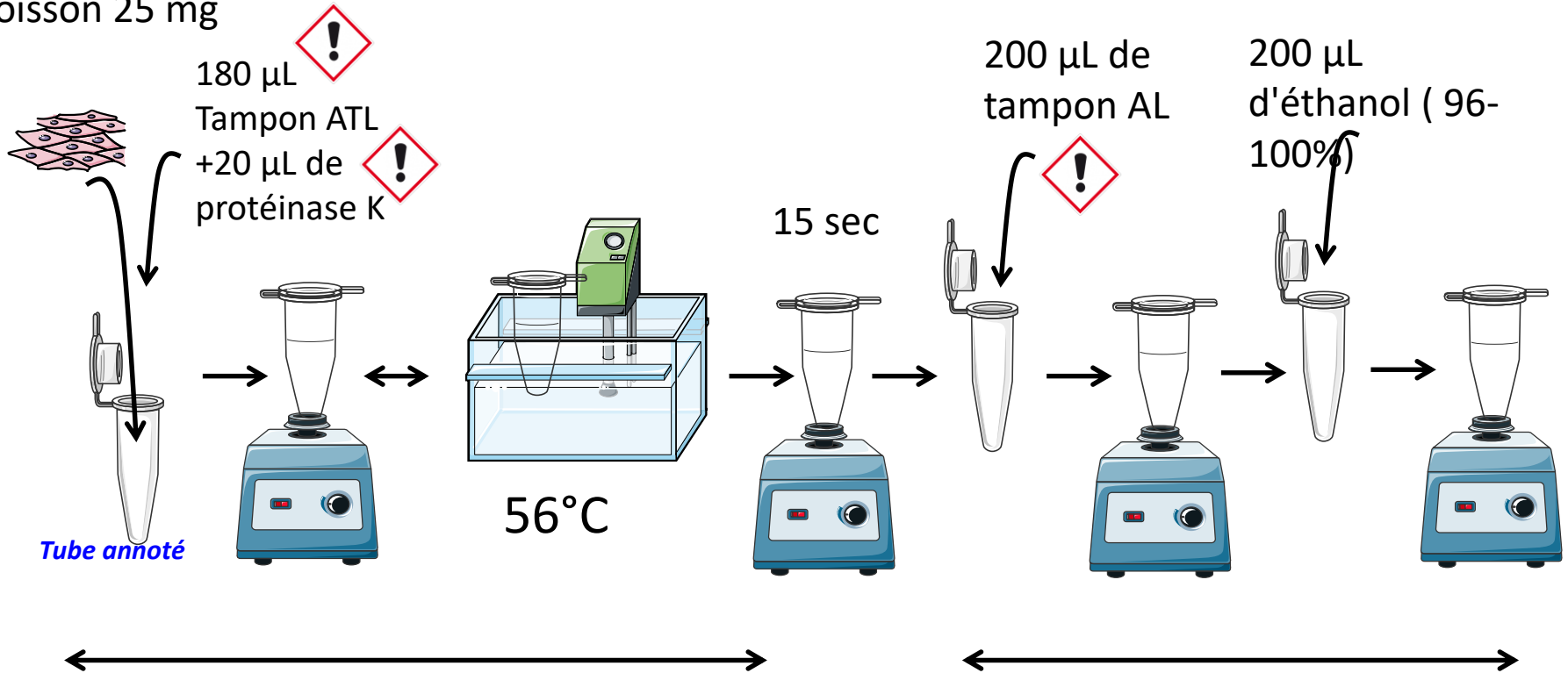


# PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN DE POISSON

Morceau de poisson 25 mg



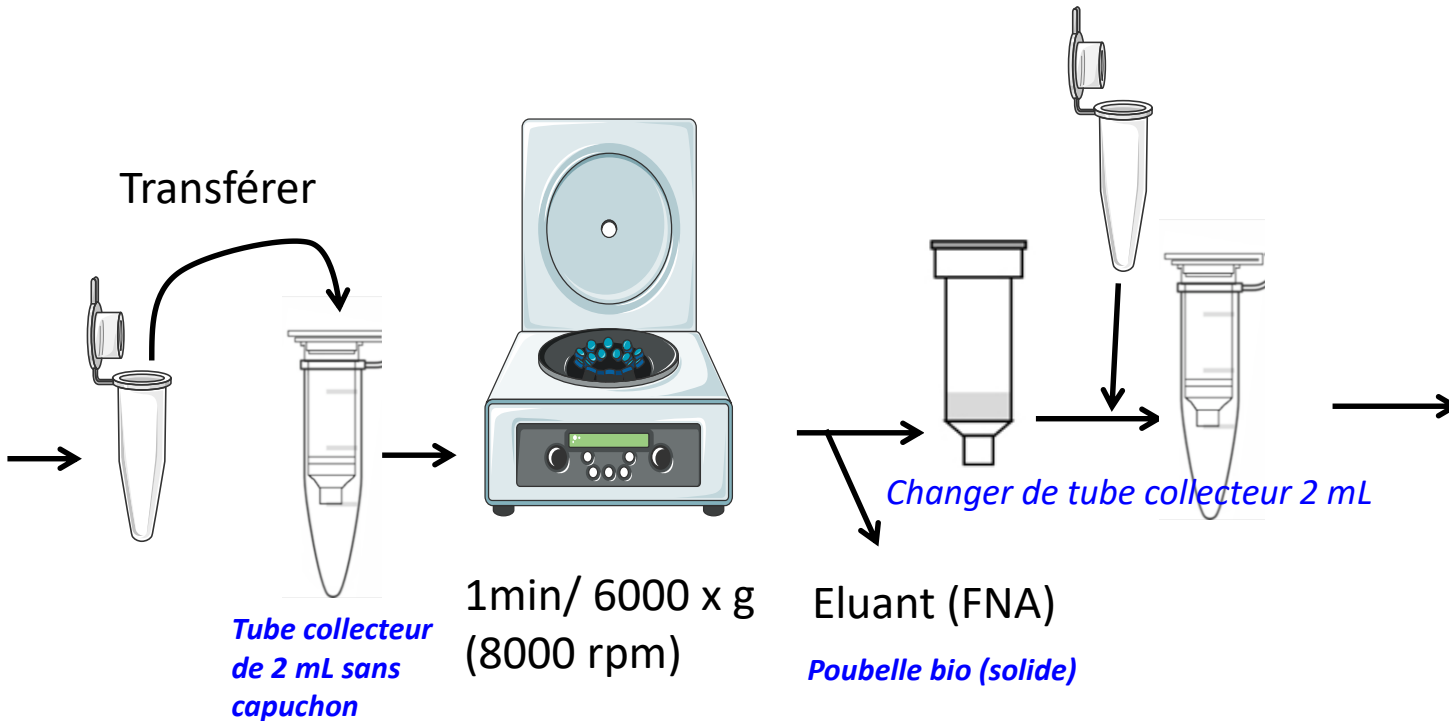
Étape 1+ 2 : LYSE Cellulaire

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

# PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN DE POISSON

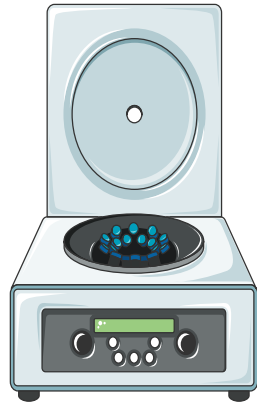


Étape 4 : Fixation de l'ADN à la résine (charge de la colonne) . La fraction cellulaire non adsorbée (liée) à la résine est éliminée par la centrifugation dans l'éluant (FNA)

# PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN DE POISSON



500  $\mu$ L de  
tampon AW1



1min/ 6000 g  
(8000 rpm)

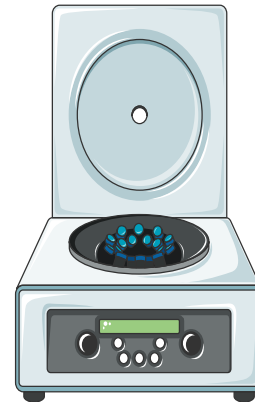


Eluant  
(lavage)

*Poubelle bio (solide)*

*Changer de tube collecteur 2 mL*

500  $\mu$ L de  
tampon AW2



3 min /20 000g  
(14000 rpm)



Eluant  
(lavage)

*Poubelle bio (solide)*

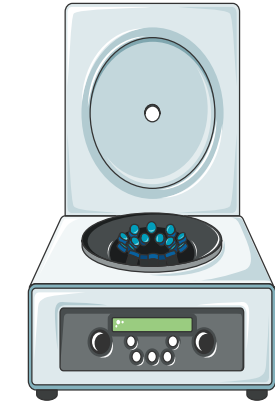
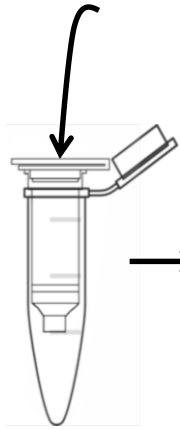
*Changer de tube collecteur 1,5 mL*



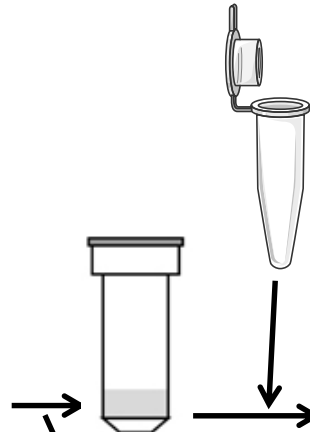
Étape 5 +6 : LAVAGE DE LA COLONNE et de l'ADN qui est accroché à la résine  
(Les protéines et les cations divalents, les ions chargés positivement, y compris le magnésium, sont éliminés à l'aide de multiples lavages de tampons et d'étapes de centrifugation )

# PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN DE POISSON

200  $\mu$ L  
tampon AE



1min/ 6000 g  
(8000 rpm)

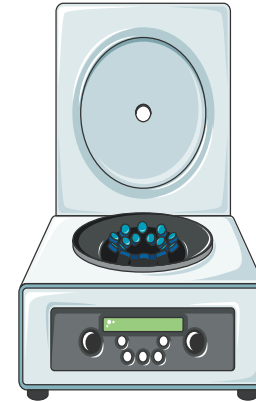
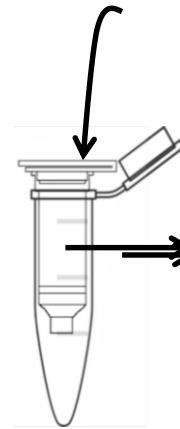


Changer de tube  
collecteur 1,5 mL

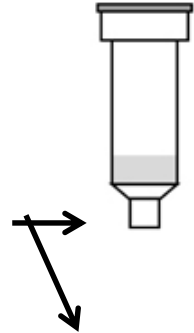
**Eluat 1**



200  $\mu$ L  
tampon AE



1min/ 6000 g  
(8000 rpm)

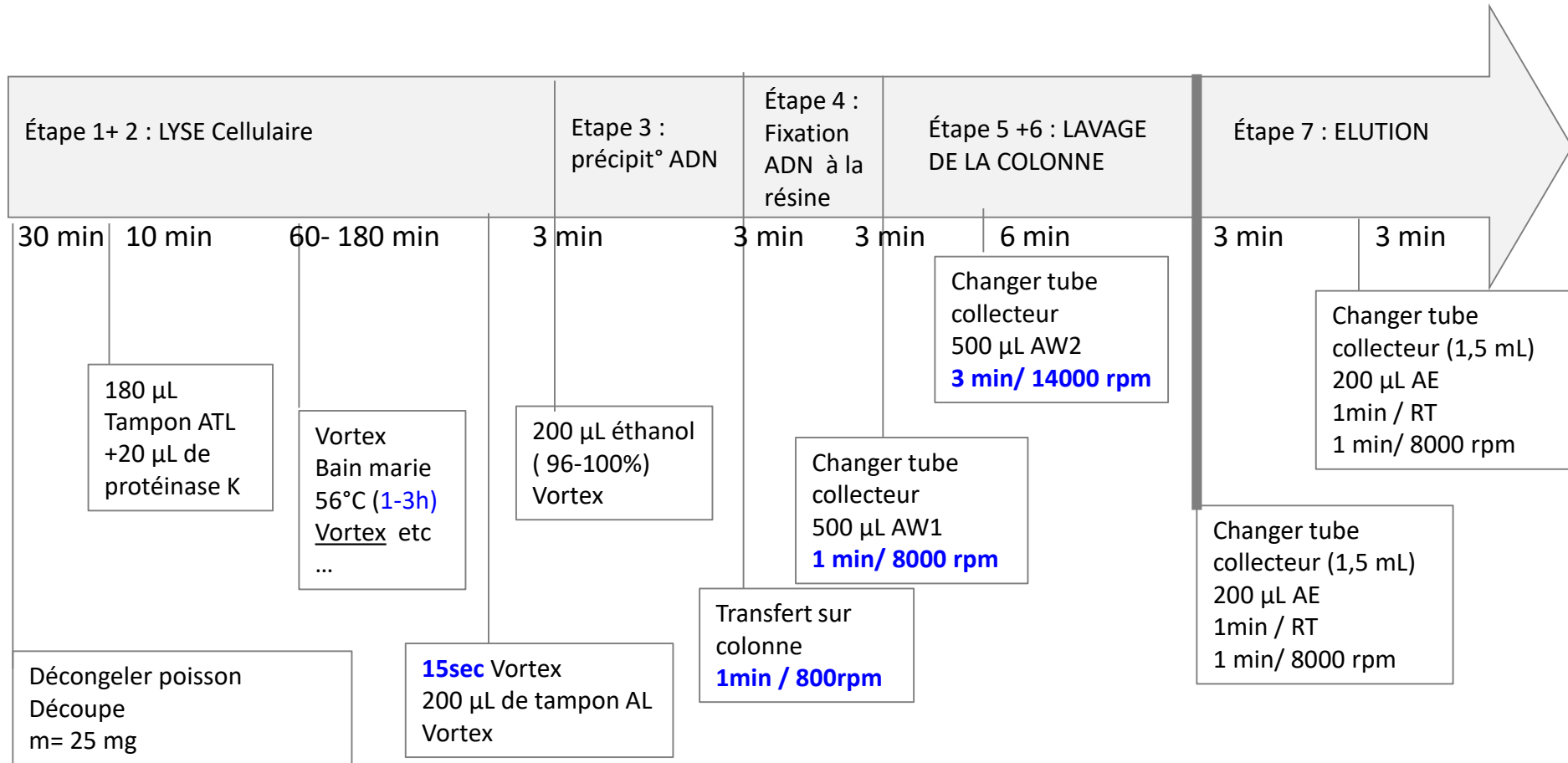


**Eluat 2**



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

# CHRONOGRAMME



Étape 1+ 2 : LYSE Cellulaire

Etape 3 :  
précipit° ADN

Étape 4 :  
Fixation  
ADN à la  
résine

Étape 5 +6 : LAVAGE  
DE LA COLONNE

Étape 7 : ELUTION

30 min

10 min

60- 180 min

3 min

3 min

3 min

6 min

3 min

3 min

180 µL  
Tampon ATL  
+20 µL de  
protéinase K

Vortex  
Bain marie  
56°C (1-3h)  
Vortex etc  
...

200 µL éthanol  
( 96-100%)  
Vortex

Changer tube  
collecteur  
500 µL AW1  
1 min/ 8000 rpm

Changer tube  
collecteur  
500 µL AW2  
3 min/ 14000 rpm

Changer tube  
collecteur (1,5 mL)  
200 µL AE  
1min / RT  
1 min/ 8000 rpm

Décongeler poisson  
Découpe  
m= 25 mg

15sec Vortex  
200 µL de tampon AL  
Vortex

Transfert sur  
colonne  
1min / 800rpm

Changer tube  
collecteur (1,5 mL)  
200 µL AE  
1min / RT  
1 min/ 8000 rpm

<b>Danger</b>	<b>Nature du danger</b>	<b>Voie d'expo</b>	<b>Situations exposantes Décrire moment ou on manipule le danger</b>	<b>Exemple d'évènements dangereux = conséquences possible à éviter</b>	<b>EPI EPC</b>
Echantillon de poisson	Risque bio	cutanée	Découpe du poisson Transfert dans le tube (étape 1) Lyse mécanique au vortex	Toucher le poisson à main nue Rverser son tube Ouverture du bouchon étape de vortex (projection)	Blouse Gants Poubelle déchets bio solide
Eluants (FNA, wash (étape 4/ 5/ 6))			Transfert du lysat sur la colonne Transfert de la colonne sur nouveau tube collecteur Jeter l'éluant dans la poubelle solide bio		
ATL	Risque chimique Nocif irritant	cutanée	Pipetage et Transfert des 180 µL Vortexer le lysat Transfert du lysat sur la colonne		Blouse Gants  Poubelle déchets bio solide
Protéinase K	Risque chimique Irritation	cutanée	Pipetage et Transfert des 20 µL Vortexer le lysat Transfert du lysat sur la colonne		Blouse Gants Poubelle déchets bio solide
AL	Risque chimique Nocif irritant	cutanée	Pipetage et Transfert des 200 µL Vortexer le lysat Transfert du lysat sur la colonne		Blouse Gants
AW1		cutanée	Pipetage et Transfert des 500 µL Retirer la colonne du tube collecteur Evacuer le tube collecteur poubelle déchets bio		Poubelle déchets bio solide

## Doc 3 de AT1 :Les différentes méthodes d'extraction et de purification d'ADN

### **Méthodes d'extraction**

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique des débris cellulaires.

La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible.

### **Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :**

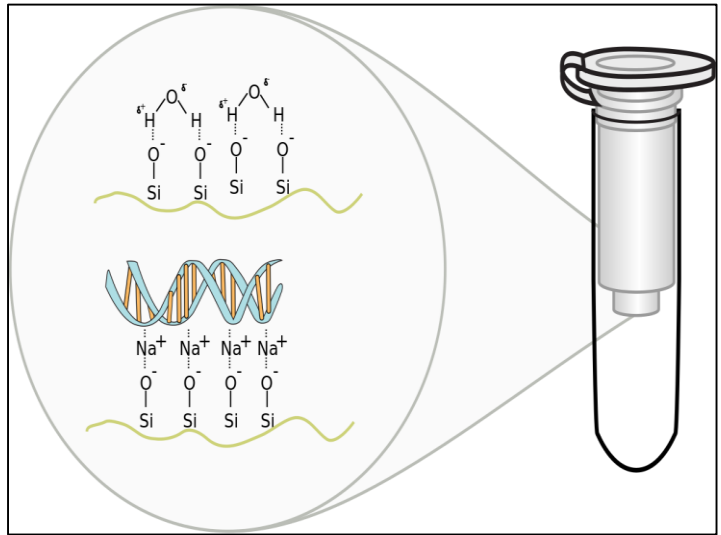
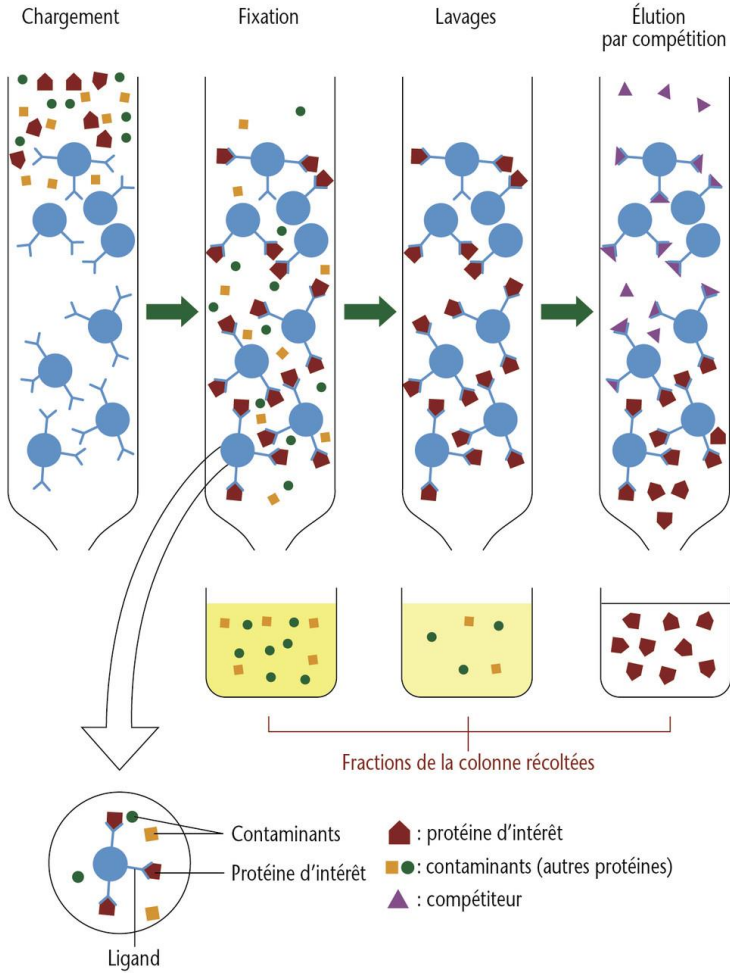
- la rupture mécanique (ex. : broyage ou lyse hypotonique),
- le traitement chimique (ex.: lyse détergente, agents chaotropiques (sels),
- la digestion enzymatique (ex.: protéinase K).

La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. À titre d'exemple, une solution simple peut contenir des détergents pour solubiliser les membranes cellulaires et des sels chaotropiques puissants pour inactiver les enzymes intracellulaires. Après la lyse cellulaire et l'inactivation des nucléases, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation.

### **Méthodes de purification**

Les méthodes de purification des acides nucléiques issus d'extraits cellulaires sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques suivantes : extraction/précipitation, chromatographie, centrifugation et séparation par affinité.

# Chromatographie d'affinité



La chromatographie d'affinité est une technique de chromatographie qui permet de séparer un composé en utilisant des interactions biologiques entre un ligand spécifique (greffé sur une matrice macromoléculaire) et son substrat