

Etudes des différentes variétés d'haricots par PCR

- [Protocole d'extraction de l'ADN](#)
- [Extraction de l'ADN des feuilles d'haricots \(noirs de créances\)](#)

Protocole d'extraction de l'ADN

1) Préparation du tampon d'extraction: Préchauffer le tampon CTAB dans le bain-marie à 60°C .

2) Préparation de l'échantillon : Broyer les feuilles d'haricots jusqu'à obtenir une poudre fine.

3) Ajout du tampon CTAB :

- Ajouter 7,5 mL de CTAB par gramme de feuille broyée.

4) Ajout des réactifs :

- Sous hotte il faut ajouter 10 à 15 Mg de charbon actif par gramme de feuille
- 375µL de B- mercaptoéthanol par gramme de feuille
- Bien vortexer

5) Incubation :

- Incuber à 65°C pendant 1h avec agitation

6) Extraction avec solvant :

- Ajouter 7,5 mL d'un mélange chloroforme : Alcool isoamylique par gramme de feuille
- Mélanger doucement en inversant les tubes pendant 5 minutes.

7) Centrifugation à 16300 g pendant 10 minutes à 4°C et le répéter si nécessaire pour clarifier la phase aqueuse.

8) Précipitation de l'ADN :

- Récupérer le surnageant : Ajouter 2/3 de volume d'isopropanol froid à 4°C
- Inverser doucement et laisser précipiter au moins 30 minutes à - 20°C

9) Centrifugation de l'ADN : Centrifuger à 13000 g pendant 5 minutes à 4°C.

10) Éliminer le surnageant : Jeter le surnageant délicatement sans toucher le culot.

11) Lavage de l'ADN:

- Ajouter 10 mL de tampon de lavage par gramme de feuilles

- Agiter verticalement pendant 30 minutes

12) Nouvelle centrifugation : Centrifuger à 13000 g pendant 5 minutes à 4°C.

13) Séchage de l'ADN : Jeter le surnageant et laisser sécher à l'air libre pendant 20 minutes.

14) Solubiliser l'ADN : Ajouter 100µL-300µL de TE 1X pour suspendre le culot.

15) Incubation : Chauffer à 60°C pendant 10 minutes.

16) Dégradation de l'ARN :

- Ajouter 8µL de RNase pour 100µL d'ADN
- Incuber à 37°C pendant 30 minutes

17) (optionnel) : Clarification finale: Centrifuger à 650 g pendant 2 minutes.

Extraction de l'ADN des feuilles d'haricots (noirs de créances)

Manip du 20/05/2026

1) Des Feuilles d'haricots ont été broyées à l'azote liquide (6 feuilles de noirs de créances) . On a pesé environ 1g pour chaque feuilles et on a mis ces feuilles dans des tubes falcon de 50mL et dans le congélateur à -20°C (le 13/05/2026). Les tubes sont notés NC#1, NC#2, NC#3,NC#4,NC#5,NC#6.

2) On a mis le tampon CTAB à 60°C pendant 5 minutes dans le bain marie.

3) On a déposé 7,5mL du tampon CTAB pour chaque échantillon.

4) On a pesé 16mg de charbon actif qu'on a déposé dans chaque échantillon et 375µL de beta-mercaptoéthanol. (le Beta mercaptoéthanol est un CMR qui se manipule sous la hotte).

5) On a incubé au four à 65°C avec l'agitateur à tube (légère agitation à 30 rpm).

6) Ajouter à 7,5mL du mélange chloroforme-alcool isoamylique puis mélanger les tubes en inversant pendant 5 minutes.

On observe deux phases: Une phase claire (aqueuse) au niveau du surnageant et une phase verdâtre au vers le fond du tube.

Préparation du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24:1) : 196mL de chloroforme et 4mL d'alcool isoamylique (24:1).

7) On a centrifugé 2 fois à 4°C pendant 10 minutes pour clarifier la phase aqueuse . **Problème technique :** La centrifugeuse ne peut pas dépasser 6415g.

8) On a récupéré environ 6mL de surnageant pour chaque échantillon et on a jouté 12mL d'isopropanol à froid (qui a été mis au frigo) ce qui correspond au 2/3 du volume. La phase verdâtre est jetée. Une fois terminée on a mis les tubes NC#1, NC#2, et NC#3 au congélateur à -20°C. On fera la suite de leur extraction le 26/05/2026. On poursuit les extractions des tubes NC#4, NC#5 et NC#6.

9) On a centrifugé une fois à 4°C pendant 5 minutes à 6415g. Le culot n'est pas visible pour le tube NC#5. On a centrifugé une seconde fois pour cet échantillon et le culot est apparu plus clair (blanc) alors que les autres étaient plus sombre (pour NC#4 et NC#6).

10) Eliminer le surnageant délicatement (sans entrainer le culot vers le surnageant).

11) Lavage de l'ADN : On a ajouté 10mL de tampon de lavage et on a agité verticalement (en couchant les tubes) pendant 30 minutes à l'aide de l'agitateur à tube à 30 rpm.

Préparation du tampon de lavage: 150mL d'éthanol absolu, 50 mL d'eau distillée et 0,154g d'acetate d'ammonium (j'en ai pesé 0,16g car difficile à prélever) à 77g/mol. On obtient un tampon de lavage à 75% d'éthanol et à 10mM d'acétate d'ammonium.

12) On a fait une nouvelle centrifugation 6415 g à 4°C pendant 5 minutes. On a pu observer que le culot s'est éclairci surtout pour le tube NC#5 mais pour cet échantillon le culot s'est fragmentée donc au moment d'enlever le surnageant il y a eu des pertes.

13) On a séché les échantillons à l'air libre pendant 20 minutes. C'est une étape un peu critique car difficile d'évacuer tout le surnageant sans perdre le culot donc le culot reste un peu hydraté.

14) On a solubilisé l'ADN avec 300µL de tampon TE 1X. Le protocole nous conseille entre 100-300µL mais on a pris 300µL car il y avait de la matière (le culot était assez gros).

15) Chauffer au bain marie à 60°C pendant 10 minutes.

16) Dégradation de l'ARN : On a préparé une solution mère de 10mg de RNase A et 1mL d'eau ultra pure. A partir de la solution mère on dépose 3µL dans chaque échantillon (c'est 1µL de solution mère pour 100µL de solution contenant l'ADN). On a incubé 30 minutes à 37°C.

Résultats de l'extraction

Une fois cette étape terminée, on peut doser la quantité et la qualité de l'ADN au nanodrop. On dépose 2µL de l'échantillon au centre de la platine. On appuie sur DNA au niveau du menu puis sur blank. On fait le blanc avec le tampon TE 1X (2µL) on essuie au papier kimtech puis on dépose 2µL de l'échantillon et on appuie sur mesure. On obtient ces résultats.

Echantillon	A260/A280	Concentration en ADN (ng/µL)
NC#4	<u>2,02</u>	<u>1354</u>
NC#5	<u>1,99</u>	<u>564</u>
NC#6	<u>1,91</u>	<u>1746</u>

Interprétation

Les concentrations assez élevées dans l'ensemble nous conforte dans l'idée que ce protocole est adapté pour l'extraction de l'ADN des feuilles d'Haricots. Cependant, On a eu des pertes au niveau de l'échantillon NC#5 qui vient du fait que le culot a été fragmenté et qu'il a été difficile de le récupérer entièrement. Il ne faut pas hésiter de centrifuger une nouvelle fois pour éviter ce problème. La pureté des échantillons est assez variable. Les échantillons ne sont pas contaminés par des protéines mais l'échantillon NC#4 par exemple est contaminé par de l'ARN, (on dépasse très légèrement la valeur limite de 2), l'échantillon NC#5 est à la limite de la contamination (1,99) et l'échantillon NC#6 est de bonne qualité. Pour pallier à ce problème, il faudrait mettre un volume légèrement plus important (le protocole préconisait 8 μ L pour 100 μ L d'ADN mais je ne sais pas pour quelle concentration) ou laisser agir la RNase plus longtemps.