

Extraction d'ADN de cellules végétales

En biologie moléculaire, de nombreuses techniques se basent sur l'analyse et le traitement de l'ADN (Acide DesoxyriboNucléique), à ne pas confondre avec l'ARN (Acide RiboNucléique).

C'est le cas de la Polymérase Chain Reaction (PCR), Southern Blot, utilisation d'enzymes de restriction, hybridation moléculaire...

Pour ce faire, il est nécessaire d'isoler l'ADN de son environnement (cellule, tissus) pour obtenir d'un échantillon pur et de quantité suffisante pour servir de base pour les techniques suivantes.

Protocole d'extraction : [1]

- Couper une pièce de feuille (1-2cm²) dans un tube eppendorf
- Broyer les feuilles fortement pendant 15 secondes.
- Ajouter 500 µL de tampons d'extraction
- Vortex 5 secondes.
- Centrifuger l'extrait pendant 5min à 13'000 rpm (4°C)
- Prélever 350 µl du surnageant dans un nouveau tube eppendorf
- Ajouter 350 µl d'isopropanol
- Inverser le tube une dizaine de fois et laisser précipiter l'ADN pendant 2 min
- Centrifuger pendant 15 min à 13'000 rpm (4°C)
- Jeter le surnageant, ajouter 400 µl d'éthanol 80%.
- Centrifuger pendant 5 min à 13'000 rpm
- Enlever le surnageant et laisser sécher le culot (10min environ)
- Ajouter 50 µl d' H₂O distillé
- Vortex

L'isopropanol provoque l'agrégation et la précipitation de l'ADN dans la solution.

Le Vortex est un matériel en biologie moléculaire pour mélanger des solutions notamment dans des microtubes. Il est composé d'un socle lourd où se situe le moteur de l'appareil. Au-dessus, se trouve un réceptacle en caoutchouc où l'on pose le tube à vortexer. [2]

Précisions :

Le tampon d'extraction est habituellement préfabriqué, il sert à rompre les membranes cellulaires et nucléaires, maintenir un pH optimal tout au long de l'extraction, sauvegarder l'intégrité de l'ADN et prévenir sa dégradation, Séparer l'ADN des débris cellulaires et des contaminants. [2]

Protocole de fabrication du tampon d'extraction de cellules végétales : [3]

- Tampon d'extraction CTAB (pH 8)
 - Tris-Cl 100 mM, pH 8,0
 - EDTA 20 mM, pH 8,0
 - NaCl 1,4 M
 - 2 % (p/v) CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium)
 - 1 % PVP 40 000 (polyvinylpyrrolidone)
 - 0,3 % de 2-β-mercaptoéthanol (ajouté directement avant utilisation dans une hotte)
- Chloroforme : alcool isoamylique (24:1 v/v)
- NaCl 6 M
- Acétate de potassium 3 M
- Glace froide
- Alcool isopropylique à 100 %
- Éthanol à 70 %
- Réhydratation dans un tampon TE 1 × (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 ; EDTA 1 mM, pH 8,0, autoclavé)

Bibliographie :

[1] Extraction d'ADN génomique et amplification des gènes d'actine 2 et Cycline D des plantes Arabidopsis Thaliana et Tomates, Laboratoire de Physiologie Végétale, Université de Neuchâtel :

<https://www.unine.ch/files/live/sites/physiologievegetale/files/shared/documents/TP-PCR.pdf>

[2] Vortex, Wikipédia : [https://fr.wikipedia.org/wiki/Vortex_\(biologie_mol%C3%A9culaire\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Vortex_(biologie_mol%C3%A9culaire))

[3] Fabriquer et utiliser des tampons d'extraction ADN courants, Fourni-Labo : <https://www.fourni-labo.fr/tutoriel/comment-fabriquer-et-utiliser-des-tampons-d-39-extraction-d-39-adn-courants-2023-08-19>

Revision #3

Created 30 April 2024 12:02:04 by Turcios Maya

Updated 30 April 2024 13:26:19 by Turcios Maya