

# Tampons d'extraction

## Introduction

Un étape importante dans l'analyse de protéines ou d'ADN, est l'extraction de ces derniers des tissus et la purification des solution obtenus. Ces étapes ont lieu dans une solution tampon (solution qui maintient un pH à peu près stable, malgré certains changements des facteurs externes ou internes).

En sélectionnant les solutions appropriées et en suivant la méthode adéquate pour extraire l'ADN, on pourrait :

- Maintenir un pH optimal tout au long du processus d'extraction.
- Rompre efficacement les membranes cellulaires et nucléaires.
- Préserver l'intégrité de l'ADN et prévenir sa dégradation.
- Séparer l'ADN des débris cellulaires et des contaminants.

## I) Les étapes générales de l'utilisation des tampons d'extraction d'ADN

### 1. Préparation des échantillons

- Collecter les échantillons biologiques contenant l'ADN que vous souhaitez extraire. Cela peut être du sang, des tissus, des cellules, etc.
- Préparer les échantillons en les broyant ou en les homogénéisant pour libérer les cellules et l'ADN à extraire.

### 2. Préparation des tampons

- Préparer les tampons d'extraction d'ADN nécessaires en suivant les protocoles spécifiques pour chaque type de tampon. Assurez-vous de respecter les concentrations et les conditions de pH recommandées.

### 3. Lyse cellulaire

- Ajouter le tampon de lyse à vos échantillons pour rompre les membranes cellulaires et nucléaires et libérer l'ADN. Les tampons de lyse contiennent souvent des agents détergents tels que le Triton X100, le SDS ou le CTAB pour dissoudre les membranes.

### 4. Inactivation des enzymes

- Si nécessaire, ajouter des agents inhibiteurs d'enzymes tels que l'EDTA pour empêcher la dégradation de l'ADN par des enzymes telles que les DNases ou les RNases.

## 5. Précipitation de l'ADN

- Ajouter des agents de précipitation ou des solutions de précipitation, tels que l'alcool isopropanol ou l'éthanol, pour précipiter l'ADN des solutions.

## 6. Centrifugation et lavage

- Centrifuger les échantillons pour séparer l'ADN précipité des autres composants cellulaires et des contaminants.

- Laver l'ADN précipité avec de l'éthanol pour éliminer les résidus de tampon et d'autres contaminants.

## 7. Réhydratation de l'ADN

- Dissoudre l'ADN précipité dans un tampon d'hydratation approprié, tel que TE (Tris-EDTA), pour le stockage ou pour le préparer à des analyses ultérieures.

## 8. Analyse de l'ADN

- L'ADN extrait peut être utilisé pour diverses applications, telles que la PCR (réaction de polymérisation en chaîne), le séquençage, l'électrophorèse sur gel, etc.

Il est important de suivre attentivement les protocoles spécifiques à chaque kit d'extraction ou à chaque méthode d'extraction d'ADN pour obtenir les meilleurs résultats.

# II) Les tampons les plus courants en Biologie

### 1) Tampon de chlorure de sodium (NaCl) :

- Principe : Le tampon de NaCl est souvent utilisé pour ajuster la force ionique des solutions. Il est généralement préparé en dissolvant du chlorure de sodium dans de l'eau distillée.

- Exemples d'utilisation : Extraction d'ADN, de protéines ou d'autres biomolécules, hybridation d'acides nucléiques, réactions enzymatiques.

- Préparation :

1. Dissoudre le chlorure de sodium dans de l'eau distillée pour obtenir la concentration désirée.
2. Stériliser par autoclavage si nécessaire.

- Utilisation :

1. Ajuster la force ionique des tampons ou des solutions de lavage dans diverses applications biologiques.
2. Utiliser comme tampon pour l'extraction d'ADN ou de protéines.

### 2) Tampon d'acétate de sodium :

- Principe : Le tampon d'acétate de sodium est utilisé pour maintenir un pH stable dans une plage légèrement acide (pH autour de 5). Il est composé d'acide acétique et de sel de sodium.

- Exemples d'utilisation : Extraction d'ADN plasmidique, purification de protéines par précipitation, électrophorèse d'acides nucléiques.

- Préparation :

1. Dissoudre l'acide acétique et le sel de sodium dans de l'eau distillée.
2. Ajuster le pH avec de l'acide acétique ou de l'hydroxyde de sodium jusqu'à obtenir le pH désiré.

- Utilisation :

1. Utiliser comme tampon de précipitation pour la purification de protéines.
2. Ajuster le pH des solutions pour différentes applications en biochimie.

### 3) Tampon de phosphate d'ammonium :

- Principe : Ce tampon est utilisé pour maintenir un pH stable dans une plage légèrement acide (pH autour de 5 à 6). Il contient des sels de phosphate et d'ammonium.

- Exemples d'utilisation : Extraction d'ADN, électrophorèse d'acides nucléiques, réactions enzymatiques.

- Préparation :

1. Dissoudre les sels de phosphate et d'ammonium dans de l'eau distillée.
2. Ajuster le pH avec de l'acide phosphorique ou de l'ammonium hydroxyde jusqu'à obtenir le pH désiré.

- Utilisation :

1. Utiliser comme tampon pour l'extraction d'ADN ou d'ARN.
2. Ajuster le pH des solutions pour différentes applications en biologie moléculaire.

### 4) Tampon de glycérine :

- Principe : La glycérine est souvent utilisée comme additif dans les tampons pour améliorer la stabilité des échantillons biologiques, réduire l'évaporation et minimiser la dénaturation des protéines.

- Exemples d'utilisation : Conservation des échantillons biologiques, stabilisation des protéines, préparation de milieux de culture.

- Préparation :

1. Ajouter la glycérine à la concentration désirée dans le tampon choisi.
2. Mélanger soigneusement pour assurer une distribution homogène.

- Utilisation :

1. Ajouter comme additif aux tampons pour améliorer la stabilité des échantillons biologiques.
2. Utiliser comme milieu de conservation pour les échantillons biologiques.

#### 5) Tampon de carbonate de sodium :

- Principe : Le carbonate de sodium est utilisé pour maintenir un pH alcalin dans une plage donnée (généralement entre 9 et 11). Il est souvent utilisé pour la dissolution de protéines et la fixation des échantillons biologiques.

- Exemples d'utilisation : Extraction de protéines membranaires, dissolution de protéines dans des solutions tampons, préparation de milieux de culture.

- Préparation :

1. Dissoudre le carbonate de sodium dans de l'eau distillée.
2. Ajuster le pH avec de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium jusqu'à obtenir le pH désiré.

- Utilisation :

1. Utiliser comme tampon alcalin pour la lyse cellulaire ou l'extraction de protéines membranaires.
2. Ajuster le pH pour différentes applications en biochimie et biologie moléculaire.

#### 6) Tampon de Tris-EDTA (TE) :

- Principe : Le tampon de Tris-EDTA est utilisé pour l'extraction, la purification et la conservation de l'ADN. Il contient du Tris pour le maintien du pH et de l'EDTA pour inhiber les enzymes endogènes qui dégradent l'ADN.

- Exemples d'utilisation : Conservation d'échantillons d'ADN, dilution d'échantillons d'ADN pour la PCR, réhydratation de l'ADN lyophilisé.

- Préparation :

1. Dissoudre le Tris et l'EDTA dans de l'eau distillée.
2. Ajuster le pH avec de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium jusqu'à obtenir le pH désiré.

- Utilisation :

1. Utiliser comme tampon pour l'extraction, la purification et la conservation de l'ADN.
2. Diluer les échantillons d'ADN pour la PCR ou d'autres analyses moléculaires.

#### 7) Tampon de carbonate-bicarbonate de sodium :

- Principe : Ce tampon est utilisé pour maintenir un pH alcalin dans une plage donnée, généralement entre 9 et 10. Il est couramment utilisé dans les applications biochimiques et biologiques nécessitant un milieu alcalin.

- Exemples d'utilisation : Réactions d'immobilisation de protéines sur des supports solides, culture de cellules en milieu alcalin, réactions d'hybridation d'acides nucléiques.

- Préparation :
  1. Dissoudre le carbonate de sodium et le bicarbonate de sodium dans de l'eau distillée.
  2. Ajuster le pH avec de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium jusqu'à obtenir le pH désiré.
- Utilisation :
  1. Utiliser comme tampon alcalin dans les réactions biochimiques nécessitant un pH élevé.
  2. Préparer des milieux de culture cellulaires avec un pH alcalin pour certaines lignées cellulaires spécifiques.

#### 8) Tampon Tris-glycine :

- Principe : Ce tampon est constitué de Tris et de glycine et est utilisé pour des applications de séparation et d'électrophorèse de protéines. Il offre une bonne résolution et une séparation efficace des protéines dans les gels de polyacrylamide.

- Exemples d'utilisation : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), transfert de protéines sur membrane (Western blot), électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE).

- Préparation :
  1. Dissoudre le Tris et la glycine dans de l'eau distillée.
  2. Ajuster le pH avec de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium jusqu'à obtenir le pH désiré.

- Utilisation :
  1. Préparer des gels de polyacrylamide pour l'électrophorèse en utilisant ce tampon comme tampon de migration.
  2. Utiliser dans les tampons de transfert pour le transfert de protéines sur membrane dans les techniques de Western Blot.

#### 9) SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium) :

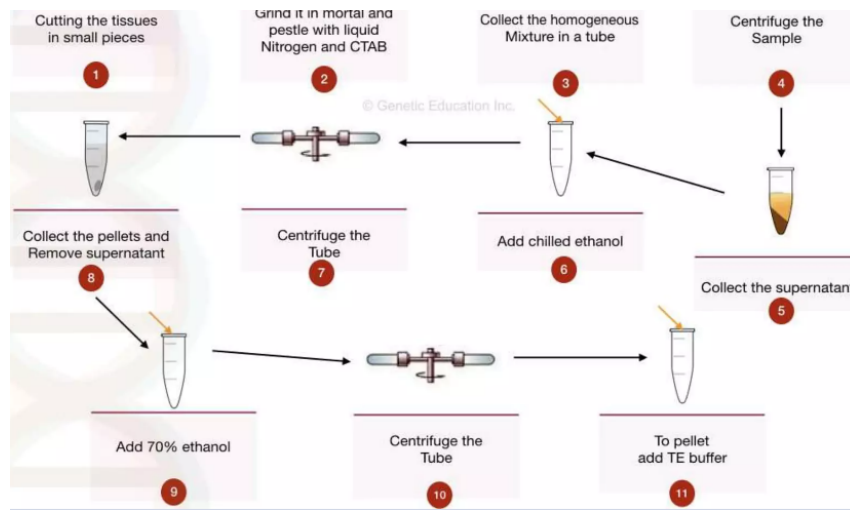
- Principe : Le SDS est un détergent ionique utilisé dans les applications de biochimie et de biologie moléculaire pour dénaturer les protéines et les rendre linéaires avant l'électrophorèse.

- Exemples d'utilisation : SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium), extraction de protéines membranaires.

- Préparation : N/A, le SDS est généralement acheté sous forme de poudre et ajouté directement aux solutions.

- Utilisation :
  1. Ajouter à des échantillons protéiques pour les dénaturer avant l'électrophorèse sur gel.
  2. Utiliser dans les tampons d'extraction pour solubiliser les protéines membranaires.

#### 10) CTAB (Chlorure de Cetyltriméthylammonium) :



(source:

<https://www.slideshare.net/slideshow/different-methods-of-dna-isolation/249634941>)

- Principe : Le CTAB est un tensioactif cationique utilisé dans l'extraction d'ADN pour lyser les membranes cellulaires et séparer l'ADN des protéines et des polysaccharides.

- Exemples d'utilisation : Extraction d'ADN végétal ou fongique, isolation d'ADN extrachromosomique.

- Préparation : Dissoudre le CTAB dans de l'eau stérile pour obtenir la concentration désirée.

- Utilisation :

1. Utiliser comme composant principal dans les tampons d'extraction pour rompre les membranes cellulaires et libérer l'ADN.

2. Ajouter à des solutions de précipitation pour séparer l'ADN des contaminants protéiques et polysaccharidiques.

### 11) Triton X100 :

- Principe : Le Triton X100 est un détergent non ionique utilisé pour solubiliser les membranes cellulaires, les lipides et les protéines membranaires.

- Exemples d'utilisation : Lyse cellulaire, extraction de protéines membranaires, préparation de lysats cellulaires pour diverses analyses.

- Préparation : N/A, le Triton X100 est généralement acheté sous forme liquide et utilisé tel quel.

- Utilisation :

1. Ajouter au tampon de lyse pour solubiliser les membranes cellulaires et les composants membranaires.

2. Utiliser comme additif dans les tampons de lavage pour éliminer les contaminants membranaires des échantillons.

#### 12) MgCl<sub>2</sub> (Chlorure de Magnésium) :

- Principe : Le MgCl<sub>2</sub> est un sel de magnésium couramment utilisé dans de nombreuses réactions enzymatiques comme cofacteur, notamment dans les réactions de polymérisation d'ADN.

- Exemples d'utilisation : Réactions d'amplification d'ADN telles que la PCR, séquençage d'ADN, réactions d'enzyme de restriction.

- Préparation : Dissoudre le MgCl<sub>2</sub> dans de l'eau stérile pour obtenir la concentration désirée.

- Utilisation :

1. Ajouter aux mélanges de réaction d'amplification d'ADN pour activer les enzymes telles que les ADN polymérases.

2. Utiliser comme composant dans les tampons de réaction enzymatique nécessitant du magnésium.

#### 13) KCl (Chlorure de Potassium) :

- Principe : Le KCl est un sel de potassium utilisé dans de nombreux tampons et solutions pour ajuster la force ionique, notamment dans les réactions enzymatiques et les réactions d'hybridation d'acides nucléiques.

- Exemples d'utilisation : Extraction d'ADN, réactions d'hybridation d'ARN, électrophorèse sur gel.

- Préparation : Dissoudre le KCl dans de l'eau stérile pour obtenir la concentration désirée.

- Utilisation :

1. Ajuster la force ionique des tampons d'extraction pour favoriser les interactions protéine-ADN.

2. Utiliser comme composant dans les tampons de lavage pour éliminer les contaminants des échantillons.

#### 14) CsCl (Chlorure de Césium) :

(Cette méthode est fastidieuse et difficile à mettre en œuvre car elle nécessite une centrifugation à grande vitesse (100 000 tr/min) pendant plus de 10 heures)

- Utilisation :

1. L'ADN est séparé en fonction de sa densité par centrifugation

2. Lors de la centrifugation à grande vitesse, au point isopycnique où la densité de l'ADN et le gradient (CsCl) deviennent identiques, la bande d'ADN apparaîtra

### III) Les techniques biologiques pour lesquelles on utilise les tampons d'extraction

## 1) Extraction d'acide nucléique de plantes

- 1) Transformer les plantes lyophilisés ou déshydratés (congelés), en fine poudre.
- 2) Ajouter la poudre dans une solution tampon d'extraction CTAB (env. 1mL pour 30-50 mg de tissus, le ratio exact dépendant du type de la plante).
- 3) Incuber la solution obtenu pendant 60 min, à une température entre 55 et 60 °C, en mélangeant occasionnellement.
- 4) Ajouter une quantité égale de solution de chloroforme et d'alcool isoamyl (24 : 1), et mélanger.
- 5) Centrifuger, à température ambiante, la solution obtenue, à 1 000-5 000 g, pendant 30 à 50 min.
- 6) Transférer la phase aqueuse (supérieure), à l'aide d'une pipette large, dans un tube en verre.
- 7) Ajouter 2.5 volumes de EtOH (-20°C), ou 0.6-1 volume d'isopropanol (-20°C), et mélanger délicatement jusqu'à la précipitation de l'ADN.
  - Si les brins d'ADN ne sont pas immédiatement visible, il est possible de laisser la solution reposer quelques jours ou même une nuit entière.
- 8) Repêcher les brins d'ADN, en utilisant une pipette de Pasteur scellée et incurvée et les transférer dans 10-20 mL, d'une solution de 75% d'EtOH et de 10mM de solution d'acétate d'ammonium. Incuber pendant 20 min, à température ambiante en mélangeant de temps en temps. Répéter une à deux fois.
  - Il est possible de faire une pause à cette étape, les brins d'ADN peuvent séjourner même un ou deux jours dans la solution de lavage.
- 9) Placer l'ADN dans un tube pour microfuge et laisser sécher à l'air libre pendant une quinzaine de minutes.
- 10) Dissoudre l'ADN dans 200-800 µL de solution stérile de tampon TE (10mM tris-Ha, 1mM EDTA, pH 7.4) et centrifuger dans une microfuge avec une force de 13 000 µg pendant 10 min.
- 11) Mesurer la concentration en ADN et la réajuster pour avoir une concentration d'environ 0.5-0.7 µg/µL

## 2) Protéines



### 3) L'isolation d'ADN plasmidique

#### Protocole d'Isolation d'ADN Plasmidique par Lyse Alcaline

##### Matériel requis :

- Eppendorfs stériles
- Centrifugeuse
- Tubes à centrifuger
- Pipettes
- Incubateur à température appropriée
- Réfrigérateur
- Colonne de purification d'ADN ou kit d'extraction d'ADN plasmidique (en option)

##### Réactifs :

- Solution de Remise en Suspension :
  - 50 mM Tris HCl, pH 8
  - 10 mM EDTA
  - 100 µg/ml RNase A
- Solution de Lyse :
  - 0,2 N NaOH
  - 1 % de SDS (sodium dodécyl sulfate)
- Acétate de potassium à 3/5 M, pH 6 (solution de neutralisation)
- Isopropanol
- Éthanol à 70 %
- Eau stérile ou solution tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)

##### Procédure :

##### 1. Préparation des Échantillons

- Prélevez 1 à 5 ml de culture bactérienne en croissance logarithmique contenant le plasmide.
- Transférez la culture dans un tube à centrifuger et centrifugez à 3000 x g pendant 5 minutes pour récolter les cellules bactériennes.

##### 2. Lyse des Cellules Bactériennes

- Retirez le surnageant et resuspendez les cellules dans 200 µl de Solution de Remise en Suspension contenant RNase A.
- Incubez les échantillons à 37°C pendant 30 minutes pour digérer l'ARN.
- Ajoutez 200 µl de Solution de Lyse (0,2 N NaOH + 1 % SDS) et mélangez délicatement en inversant plusieurs fois le tube.
- Incubez les échantillons à température ambiante pendant 5 à 10 minutes pour permettre la lyse des cellules.

##### 3. Neutralisation de la Solution de Lyse

- Ajoutez 300 µl d'acétate de potassium (3/5 M, pH 6) à chaque échantillon et mélangez doucement en inversant le tube plusieurs fois.
- Incubez les échantillons sur glace pendant 10 minutes pour permettre la coagulation des

protéines et des débris cellulaires.

#### 4. Précipitation de l'ADN Plasmidique

- Centrifugez les échantillons à 12 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante pour précipiter l'ADN plasmidique.
- Retirez délicatement le surnageant sans perturber le précipité d'ADN.

#### 5. Lavage de l'ADN Précipité

- Lavez le précipité d'ADN avec 1 ml d'éthanol à 70 % en centrifugeant à 12 000 x g pendant 5 minutes.
- Retirez l'éthanol avec une pipette et laissez sécher le précipité d'ADN à température ambiante pendant quelques minutes.

#### 6. Réhydratation de l'ADN Plasmidique

- Dissolvez l'ADN précipité dans 50 µl d'eau stérile ou de solution tampon TE en incubant à 65°C pendant quelques minutes ou en agitant doucement.

#### 7. Analyse de l'ADN Plasmidique

- Analysez la pureté et la concentration de l'ADN plasmidique isolé en utilisant la spectrophotométrie UV ou d'autres méthodes d'analyse.

## 4) L'extraction d'ADN à partir de cellules de mammifères

### **Protocole d'Extraction d'ADN à partir de Cellules de Mammifères**

#### **Matériel requis :**

- Eppendorfs stériles
- Centrifugeuse
- Tubes à centrifuger
- Pipettes
- Réfrigérateur

#### **Réactifs :**

- Solution de Lyse d'ADN :
  - 0,1 M EDTA, pH 8,0
  - 0,5 % (p/v) de FDS (sodium dodécyl sulfate)
  - 10 mM Tris-Cl, pH 8,0
  - RNase pancréatique sans DNase à une concentration de 20 µg/ml (à ajouter juste avant utilisation)

#### **Procédure :**

##### 1. Préparation des Échantillons

- Récoltez les cellules de mammifères par centrifugation et éliminez le milieu de culture.
- Lavez les cellules avec du PBS (tampon phosphate salin) ou un tampon de votre choix pour

éliminer les résidus de milieu de culture.

## 2. Lyse des Cellules de Mammifères

- Ajoutez 200 µl de Solution de Lyse d'ADN à chaque échantillon de cellules de mammifères.
- Mélangez délicatement en pipetant ou en agitant doucement le tube.
- Incubez les échantillons à température ambiante pendant 5 à 10 minutes pour permettre la lyse des cellules.

## 3. Traitement avec RNase

- Ajoutez la RNase pancréatique sans DNase à une concentration finale de 20 µg/ml juste avant utilisation.
- Incubez les échantillons à 37°C pendant 30 minutes pour digérer l'ARN.

## 4. Centrifugation et Collecte de l'ADN

- Centrifugez les échantillons à 12 000 x g pendant 10 minutes pour séparer les débris cellulaires et les protéines de l'ADN.
- Transférez soigneusement le surnageant (contenant l'ADN) dans un nouveau tube propre.

## 5. Analyse de l'ADN

- Analysez la pureté et la concentration de l'ADN extrait en utilisant la spectrophotométrie UV ou d'autres méthodes d'analyse.

# 5) L'extraction d'ADN à partir d'échantillons de sang

## Protocole d'Extraction d'ADN à partir d'Échantillons de Sang

### Matériel requis :

- Eppendorfs stériles
- Centrifugeuse
- Tubes à centrifuger
- Pipettes
- Réfrigérateur

### Réactifs :

- Tampon de Lyse pour les Globules Rouges (pH 7,6) :
  - 0,155 mol/L NH<sub>4</sub>Cl
  - 10 mmol/L KHCO<sub>3</sub>
  - 0,1 mol/L EDTA (Na<sub>2</sub>)
  - 20 µg/ml de RNase pancréatique sans DNase (ajouter juste avant l'utilisation)
- Tampon d'Extraction à base de CTAB (pH 8,0) :
  - 1,5 mol/L Tris, pH 7,6
  - 0,4 mol/L Na<sub>2</sub> EDTA
  - 2,5 mol/L NaCl
  - 2 % CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium)
  - 10 % SDS (dodécylsulfate de sodium)
  - β-mercaptoéthanol

- Mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24:1)
- Isopropanol
- Éthanol à 70 % et 90 %

### **Procédure :**

#### 1. Lyse des Globules Rouges

- Mélangez 1 volume de sang avec 5 volumes de Tampon de Lyse pour les Globules Rouges.
- Incubez à température ambiante pendant 10 minutes pour lyser les globules rouges.

#### 2. Traitement avec RNase

- Ajoutez 20 µg/ml de RNase pancréatique sans DNase au mélange juste avant utilisation.
- Incubez à 37°C pendant 30 minutes pour digérer l'ARN.

#### 3. Lyse Cellulaire avec le Tampon d'Extraction à base de CTAB

- Ajoutez une quantité égale de Tampon d'Extraction à base de CTAB au mélange de sang lyse.
- Incubez à 65°C pendant 10 minutes pour lyser les cellules et dénaturer les protéines.

#### 4. Extraction de l'ADN avec le Mélange de Chloroforme et d'Alcool Isoamylique

- Ajoutez une quantité égale de Mélange de Chloroforme et d'Alcool Isoamylique au mélange et mélangez vigoureusement.
- Centrifugez à 12 000 x g pendant 10 minutes pour séparer les phases.

#### 5. Précipitation de l'ADN avec de l'Isopropanol

- Transférez la phase aqueuse (contenant l'ADN) dans un nouveau tube et ajoutez une quantité égale d'isopropanol.
- Incubez à température ambiante pendant 10 minutes pour précipiter l'ADN.

#### 6. Lavage et Éluion de l'ADN

- Lavez l'ADN précipité avec de l'éthanol à 70 % et éliminez l'éthanol résiduel.
- Éluez l'ADN précipité dans de l'eau stérile ou une solution tampon TE.

#### 7. Analyse de l'ADN

- Analysez la pureté et la concentration de l'ADN extrait en utilisant la spectrophotométrie UV ou d'autres méthodes d'analyse.

## **6) La dissolution des spermatozoïdes et l'extraction d'ADN**

### **Protocole de Dissolution des Spermatozoïdes et d'Extraction d'ADN**

Les méthodes d'extraction d'ADN généralement employées pour les cellules somatiques humaines se révèlent inefficaces pour les spermatozoïdes en raison de la compaction nucléaire et de la stabilité de l'ADN propres à ces cellules. Ainsi, un protocole spécifique est nécessaire pour dissoudre les spermatozoïdes et extraire leur ADN de manière appropriée.

**Matériel requis :**

- Eppendorfs stériles
- Centrifugeuse
- Tubes à centrifuger
- Pipettes
- Réfrigérateur

**Réactifs :**

- Tampon de Lyse (10x) : (ajouter de l'eau pour obtenir le volume final)
  - 5 ml de Tris-HCl à une concentration de 1 M
  - 1 ml de NaCl à une concentration de 5 M
  - 2,5 ml de MgCl<sub>2</sub> à une concentration de 1 M
  - 41,5 ml d'eau
- Solution ARN-Plus : 500 µL
- Protéinase K : 50 µL
- Chloroforme : 500 µL
- Éthanol froid pur : 800 µL
- Citrate de sodium 3 M : 40 µL (maintenu à basse température)
- Éthanol à 70 %

**Pour la Réhydratation :**

- Tris-HCl ou eau distillée et déionisée (ddH<sub>2</sub>O)

**Procédure :****1. Lyse des Spermatozoïdes**

- Mélangez 1 volume de Tampon de Lyse (10x) à 9 volumes d'échantillon contenant les spermatozoïdes.
- Incubez à température ambiante pendant 10 minutes pour lyser les spermatozoïdes.

**2. Traitement avec Protéinase K**

- Ajoutez 500 µL de Solution ARN-Plus et 50 µL de Protéinase K à chaque échantillon.
- Incubez à 37°C pendant 1 heure pour digérer les protéines.

**3. Extraction de l'ADN avec du Chloroforme**

- Ajoutez 500 µL de chloroforme à chaque échantillon et mélangez vigoureusement.
- Centrifugez à 12 000 x g pendant 10 minutes pour séparer les phases.
- Transférez la phase aqueuse (contenant l'ADN) dans un nouveau tube.

**4. Précipitation de l'ADN**

- Ajoutez 800 µL d'éthanol froid pur à la phase aqueuse.
- Ajoutez 40 µL de citrate de sodium 3 M à basse température.
- Incubez à -20°C pendant 1 heure ou à température ambiante pendant 10 minutes pour précipiter l'ADN.

**5. Lavage et Éluion de l'ADN**

- Lavez l'ADN précipité avec de l'éthanol à 70 % et éliminez l'éthanol résiduel.

- Éluiez l'ADN précipité dans du Tris-HCl ou de l'eau distillée et déionisée.

#### 6. Analyse de l'ADN

- Analysez la pureté et la concentration de l'ADN extrait en utilisant la spectrophotométrie UV ou d'autres méthodes d'analyse.

## Conclusion

En conclusion, les tampons d'extraction jouent un rôle crucial dans la purification et la préservation de l'ADN et des protéines lors des procédures d'analyse biologique. Le choix approprié du tampon et le respect des protocoles spécifiques garantissent le maintien du pH optimal, la lyse efficace des cellules, la séparation des composants cellulaires et des contaminants, ainsi que la préservation de l'intégrité des molécules ciblées. Ces tampons offrent une variété de compositions et de pH adaptés à différentes applications, ce qui en fait des outils indispensables pour les techniques d'extraction et d'analyse en biologie moléculaire et cellulaire.

---

## *Les liens qui peuvent être intéressants ... :*

**[DNA extraction methods using magnetic beads](#)**

**[DNA extraction using anion exchange resins](#)**

---

Revision #11

Created 29 March 2024 13:04:19 by Szopka Pola

Updated 25 July 2024 16:01:07 by Sametoglu Alper