

# Extraction de L'AND génomique

## Définition

Il s'agit de l'ensemble des étapes permettant de séparer l'ADN génomique (l'ADN présent dans les chromosomes d'un organisme) des autres composants cellulaires (protéines, lipides, ARN, etc.). Ce processus implique généralement la lyse des cellules pour libérer le contenu cellulaire, puis la purification de l'ADN en éliminant les contaminations, notamment les protéines et les résidus lipidiques, à l'aide de réactifs chimiques spécifiques. Une fois l'ADN purifié, il peut être utilisé pour des analyses ultérieures, telles que le séquençage, la PCR (réaction en chaîne par polymérase), ou des études de génétique moléculaire.

## Étapes clés de l'extraction de l'ADN génomique

1. Lyse cellulaire : Utilisation de détergents ou de solvants pour casser la membrane cellulaire et libérer l'ADN dans le milieu.
2. Détournement des contaminants : Enlèvement des protéines (par exemple, avec des enzymes comme la protéinase K) et des lipides, souvent par une extraction avec des solvants comme le phénol ou le chloroforme.
3. Précipitation de l'ADN : L'ADN est précipité en utilisant de l'éthanol ou de l'isopropanol, ce qui permet de le séparer du reste des composants solubles.
4. Purification de l'ADN : L'ADN précipité est lavé pour enlever les impuretés et resuspendu dans un tampon, tel que de l'eau ou un tampon contenant des sels, pour le conserver dans des conditions optimales.

## Extraction d'AND à l'aide d'un kit Qiagen

### Principe

L'extraction de l'ADN par kit Qiagen est un système de fixation et d'élution sur une colonne de silice. Les matrices de silice ont des propriétés uniques pour la fixation de l'ADN. Elles sont chargées positivement et ont une grande affinité pour la charge négative du squelette de l'ADN. Après lyse cellulaire et précipitation à l'éthanol, les acides nucléiques sont liés à la colonne de silice. Les contaminants sont éliminés par une série d'étapes de lavage, suivies d'une élution de l'ADN à l'aide d'un tampon d'élution fourni avec le kit.

### Les Réactifs du kit Qiagen

Les réactifs du Kit Qiagen et leurs fonctions sont présentés dans le (**Tableau 4**).

**Tableau.** Réactifs du kit Qiagen d'extraction d'ADN.

Réactifs	Fonction
Colonnes QIAamp spin	Immobilisation de l'ADN
Protéase QIAGEN lyophilisée	Enzyme de la dégradation des protéines
Tampon AL	Tampon de lyse cellulaire
Tampon AW1	Solution de lavage
Tampon AW2	Solution de lavage
Tampon AE	Tampon d'élution

## Protocol expérimental

### I. Phase préparatoire avant manipulation

- Vérifier le branchement des appareils.
- Désinfecter l'espace de travail (éthanol + eau distillée) ainsi que les pipettes à utiliser.
- Allumer le bain-marie sec, réglé à 56°C.
- Calculer le volume du tampon AE nécessaire pour la manipulation, puis le placer dans le bain-marie (n'oubliez pas de marquer le microtube utilisé).
- Marquer les tubes Eppendorf que vous souhaitez utiliser pour y placer le culot leucocytaire.

### II. Mode opératoire

#### A) Lyse cellulaire :

- Dans un tube Eppendorf de 1.5ml, on ajoute 200µl du culot leucocytaire.
- Addition de 200µl du tampon de lyse des globules (AL) et 20µl de protéinase K.
- Vortex par pulses pendant 30 secondes (sec).
- Centrifugation brève pendant 10 sec.
- Incubation 15 minutes à 56°C dans un bain - marie sec.
- Centrifugation brève pendant 10 sec.
- Addition de 200µl d'éthanol absolu.
- Vortex par pulses pendant 15 sec.
- Centrifugation brève pendant 10 sec.

#### B) Fixation sur la matrice de silice :

- Mettre soigneusement le mélange sur une colonne QIAamp spin dans un tube collecteur de 2ml sans toucher la membrane ni en mettre sur les bords puis fermer la colonne.
- Centrifuger pendant 1min à 9000 rpm.
- Mettre la colonne sur un nouveau tube de collecteur propre.

### C) Lavage :

- Ajouter 500 µl de tampon AW1 sans toucher la membrane ni en mettre sur les bords puis fermer la colonne.
- Centrifuger 1 min à vitesse 9000 rpm.
- Mettre la colonne sur un nouveau tube de collecteur propre.
- Ajouter 500 µl de Tampon AW2 sans toucher la membrane ni en mettre sur les bords puis fermer la colonne.
- Centrifuger 5 min à 14000 rpm. Bien sécher et enlever les gouttes de tampon en appuyant le tube sur un essuie tout.

### D) Elution de l'ADN :

- Mettre la colonne sur un nouveau tube de collecteur de 1.5ml.
- Ajouter 100µl de tampon d'éluion (AE).
- Incuber 10 min à température ambiante.
- Centrifuger 2 min à une vitesse de 9000 rpm.
- Reprendre l'éluât et reposer sur la colonne puis reprendre les deux dernières étapes.

Les acides nucléiques recueillis sont stockés à -20°C jusqu'à usage.

## III. Phase de nettoyage et de rangement post-travail

### 1. Nettoyage et désinfection post-travail

Cette étape fait référence au processus de **nettoyage** des surfaces de travail pour enlever toute contamination, suivi de la **désinfection** pour tuer les micro-organismes potentiellement présents. Cela comprend la **désinfection des surfaces de travail**, des **équipements**, des **appareils** et la remise en place de tout le matériel utilisé.

### 2. Rangement et organisation du poste de travail

Après la désinfection, il est important de **ranger** et de **réorganiser** tous les équipements et outils utilisés, en veillant à remettre les **kits** et autres **matériels** à leur place. Cela garantit que le poste de travail est propre, organisé et prêt pour la prochaine utilisation.