

Université de Nouakchott AL Aasriya
Faculté de Science et techniques
Département de Biologie
Unité de Bio-marqueur dans la population Mauritanienne
(UBPM)



2020-2021

1. Extraction de L'ADN

L'ADN est l'abréviation d'Acide Désoxyribonucléique. Cette molécule est le support de l'information génétique, elle renferme les informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. Il est transmis lors de la reproduction, il porte donc l'information génétique, et constitue le **génom**e des êtres vivants. On peut dire que l'ADN est le support de **l'hérédité**.

L'ADN se trouve dans le noyau de chaque cellule de l'être vivant, il est sous forme de pelotes, qui, déroulées, forment un très long fil constitué de l'enchaînement de différentes séquences appelées nucléotides. Formé de deux brins complémentaires enroulés en hélice, l'ADN a une structure dite de double hélice.

1.1 Principe de l'Extraction de l'ADN par kit

La méthode d'extraction par kit est une technique très efficace en termes de temps. L'échantillon est mélangé avec un tampon de lyse qui permet de rompre les membranes des cellules, puis ce mélange est déposé dans une colonne contenant une membrane de gel de silice QIAamp qui fixe spécifiquement l'ADN, Les inhibiteurs de PCR tels que les protéines sont complètement éliminés par deux étapes de lavage efficaces, l'ADN purifié est ensuite récupéré par centrifugation grâce à un tampon d'élution fourni avec le kit.

Le QIAamp DNA Mini Kit assure une purification rapide d'acide nucléique prêt à l'emploi et de haute qualité, avec un rendement particulièrement élevé et une suppression complète des contaminants et des inhibiteurs.

La procédure de spin-colonne réduit le temps d'extraction à 20 minutes. La purification peut être automatisée sur le QIAcube, tout en respectant les mêmes étapes que la procédure manuelle (Lyse, précipitation, lavage et élution).

1.2 Mode opératoire de l'Extraction de l'ADN

- Dans un tube eppendorf (1.5 ml) on mélange, 15 mg de tissu, 200 µl de tampon de lyse (Buffer AL) et 200 µl (ATL) ; 20µl de la protéinase K (fourni avec le kit).
- Mélangé brièvement à l'aide d'un vortex pendant 40 s puis incubé pendant 2 h à une température de 50 C° et centrifuger brièvement.
- 200 µl d'éthanol (100%) ont été ajoutés au mélange puis centrifuger brièvement.
- Le tout a été transféré dans une colonne spin et centrifuger à (9 000 tr / min) pendant 1 min. 500µl du tampon de lavage1 (Buffer AW1) et 500µl du tampon de

lavage 2 (Buffer AW1) ont été ajoutés successivement suivis à chaquefois par une centrifugation à (9 000 tr / min) pendant 1 min et à (14 000 tr / min) pendant 5min.

- Le spin colonne a été placé dans un tube de collecte de 2 ml et centrifugé brièvement afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Le spin colonne a été placé dans un tube eppendorf sur lequel 100µl de la solution d'élution (Buffer AE) a été ajouté.
- Après une incubation d'une minute une centrifugation a été réalisée à (20000 tr / min) pendant 1min. Le tube à la fin de cette étape contiendra de l'ADN purifié.
- Les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation

2. Control de la qualité de l'ADN

La qualité de l'ADN peut être contrôlée par deux méthodes : le dosage spectrophotométrique et l'électrophorèse sur gel d'agarose.

1. Le dosage spectrophotométrique

Le dosage spectrophotométrique est un contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN. Il permet de déterminer la concentration et la pureté de l'ADN. Cette dernière est déterminée grâce au rapport $R = DO_{260nm} / DO_{280nm}$ (260 et 280 sont respectivement les longueurs d'ondes d'absorption de l'ADN et des protéines).

Si la valeur de R est entre 1.8 et 2 → ADN est pur

Si $R < 1.8$ → l'ADN est, contaminé par les protéines

Au contraire si R est supérieur à 2 → ADN est contaminé par les ARN

2. Electrophorese sur gel agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille et leur charge électrique. Cette technique est utilisée généralement pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN. Comme l'ADN est chargé négativement, grâce aux groupes de phosphates, il migre vers l'anode sous l'influence de la charge électrique qui traverse le gel.

• Protocole expérimental de la préparation du TBE 10X

Déterminer la masse des composés de TBE 10x (**Tris Borat EDTA**) pour un volume final d'un litre.

Les masses des composés sont : $M_{\text{Tris}} = 107.81\text{g}$, $M_{\text{Borat}} = 55.02\text{g}$ et $M_{\text{EDTA}} = 5.84\text{g}$.

- Peser ces masses, et mettre dans la fiole.
- Ajouter 800ml de H₂O distillée. Agiter jusqu'à dissolution totale.
- Mesurer le pH
- Ajouter H₂O distillée, quantité suffisante pour 100 ml.

N.B : TBE 10X c'est la solution mère. Pour préparer une solution de travail TBE 1X pour un volume final de 1L ; on doit prendre 100ml du TBE 10X et on ajoute 900ml d'eau distillé.

- **Protocole expérimental de l'électrophorèse sur gel d'agarose**

- Diluer le tampon concentré 10x avec de l'eau distillé afin d'obtenir du tampon 1x, ensuite mélanger la poudre d'agarose avec le tampon.
- Dissoudre la poudre d'agarose en faisant bouillir la solution. Chauffer la solution sur la plaque chauffante pour quelque minute.
- Laisser refroidir jusqu'à 50°C, ajouter 1 à 2 gouttes BET puis verser la solution d'agarose dans le support de coulage. Laisser le 15 à 20 minutes pour qu'il bien se solidifier.
- Enlever soigneuses les vis de jointure et le peigne de la cuve contenant le gel d'agarose solidifié. Placer le gel avec le support dans la cassette d'électrophorèse. Couvrir le gel avec le tampon electrophoreses 1x.
- Mélanger sur un papier 4µl d'ADN et 2µl du bleu de migration. Déposer les échantillons dans les puis, fermer le couvercle de sécurité. Vérifier que le gel soit placé dans la direction correcte.
- Brancher les prises à la source de courant avec un voltage de 80U en 40 minutes.
- Une fois l'électrophorèse a été complète retirer le gel support de coulage de la cassette d'électrophorèse.
- Visualisation du gel sous Ultraviolet.

3. Amplification d'ADN par PCR

I-Principe :

La méthode d'amplification d'ADN *in vitro* ou PCR (**Polymerase chain reaction**) consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces nucléotidiques, qui permettent la copie du brin qu'elles encadrent, à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante. Chaque couple d'amorces est composé d'un oligomère de 12 à 25 nucléotides environ, complémentaire de l'extrémité 3' du **monobrin** d'ADN à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' du brin **antiparallèle**. La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates (**dATP, dTTP, dCTP, dGTP**) et d'ADN polymérase (Taq) isolée de *Thermusa'luaticus*. La répétition de trois étapes : **dénaturation, hybridation** et **polymérisation** ou **élongation**, aboutit à une amplification exponentielle de la séquence ciblée.



Image d'un Thermocycleur

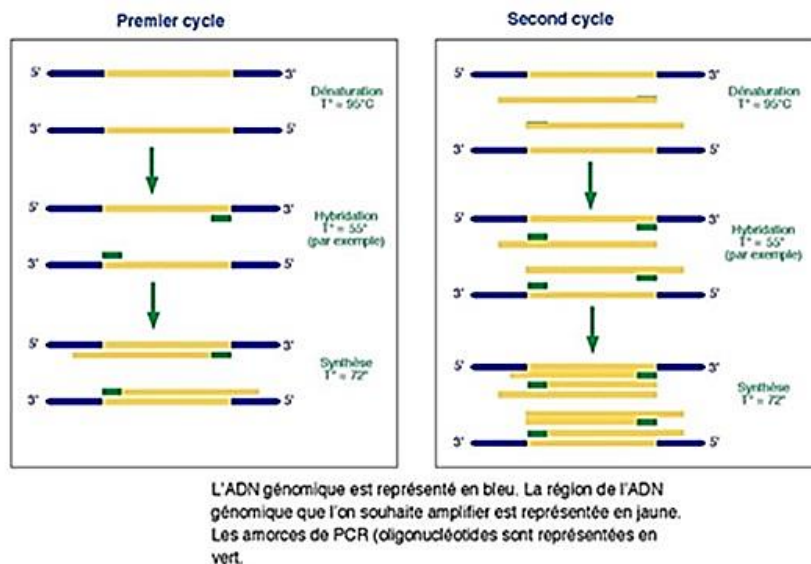
II-Mode opératoire

- ❖ La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend :
 - L'extrait d'ADN
 - Les amorces
 - Les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (DNTP)
 - La Taq polymérase

❖ Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs fois dans le bloc chauffant du thermocycleur qui permet :

- Dénaturation à 94°C
- Hybridation à 40-70°C
- Elongation à 72°C

N.B : Les réactions de PCR sont réalisées, en utilisant des programmes différents en fonction du couple d'amorces choisi.



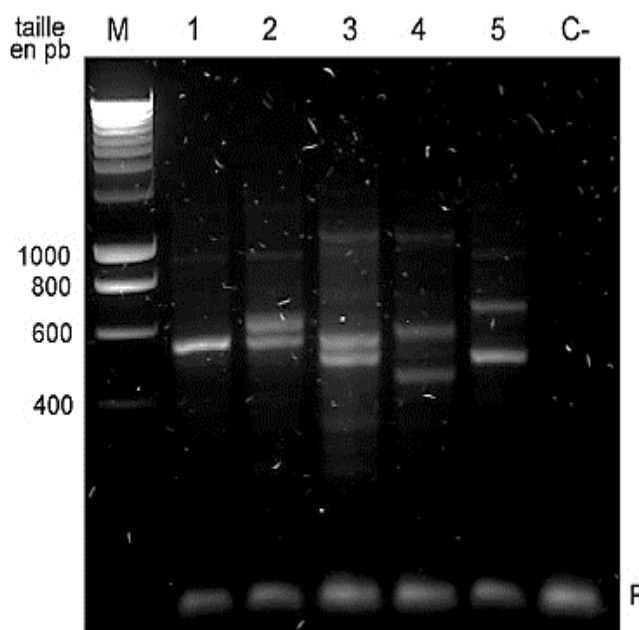
III- Vérification des amplifiants de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation de gels : 2% d'agarose

1. Addition de **2g** d'agarose dans 100ml de tampon **TBE** 1x (130 mM Tris, 45 mM Borate, 2,5 mM EDTA)
2. Chauffer le mélange jusqu'à l'obtention de gel homogène transparent
3. Refroidir le tampon à la température ambiante quelque seconde
4. Addition de 2µl du **BET**
5. Mettre le tampon dans une cuve avec des peignes
6. Attendre jusqu'à ce que le gel se forme

7. Enlever les peignes
8. Mettre la cuve dans une solution de TBE
9. Déposer le produit de PCR dans les puits
10. Brancher le générateur avec les pôles (- et +) voltage constant 140V
11. Lancer la migration 5min

IV-visualisation des amplifiants sous l'effet des UV dans l'appareil GelDoc



Profil des produits PCR

GelDoc de visualisation