

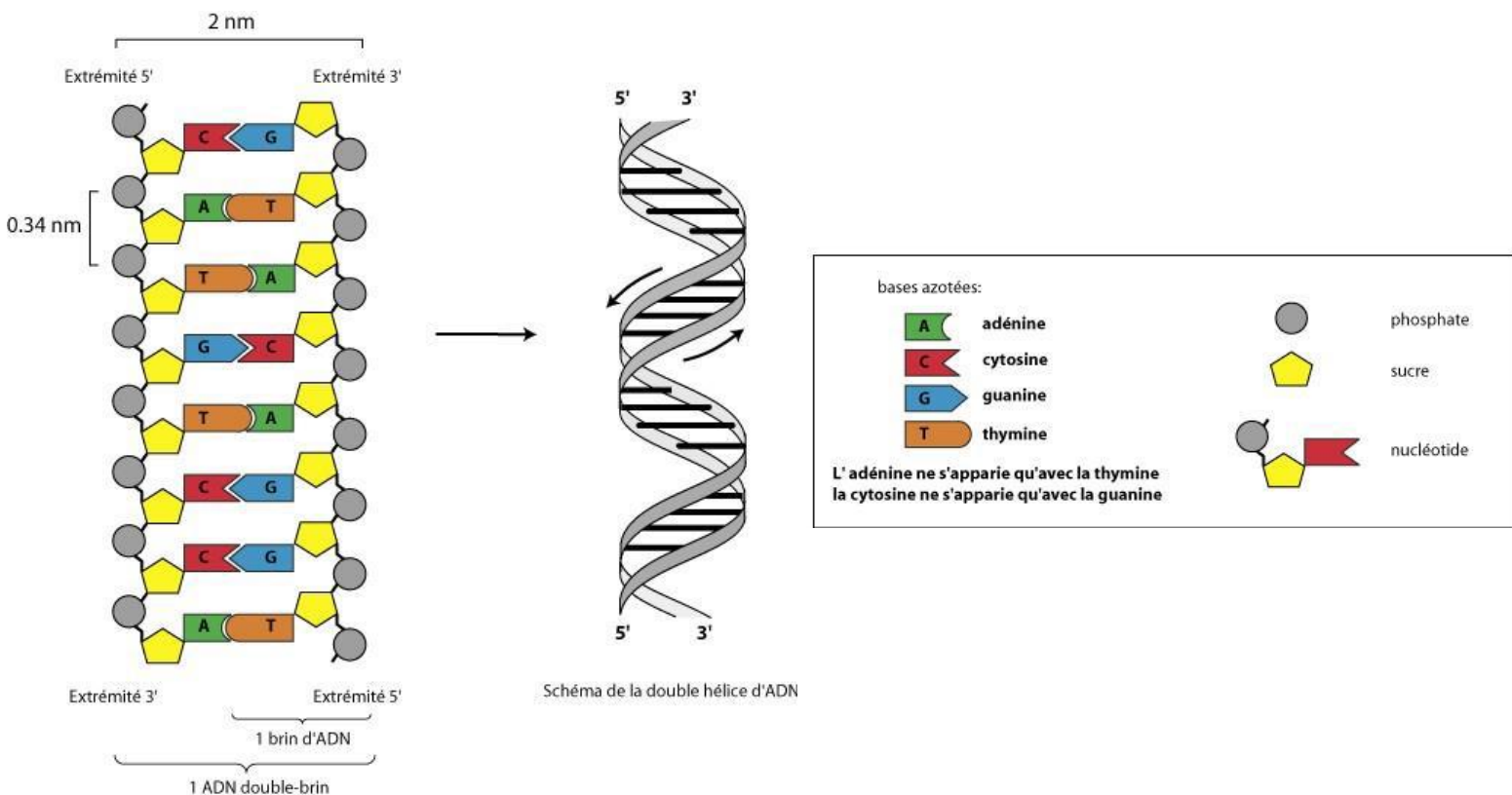
9 : Extraction d'ADN

L'ADN est la molécule essentielle de tous les organismes vivants. Elle porte l'information génétique faisant d'un organisme ou d'une cellule ce qu'elle est.

Thèmes : Purification d'ADN, extraction, dimension et structure de l'ADN.

La structure de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est composée de groupement phosphate lié à un sucre (le désoxyribose) qui est lui-même fixé à une des 4 bases azotée, A (adénine), C (cytosine), G (guanine), T (thymine). Un groupe « phosphate-sucre-base azotée » constitue un nucléotide. Les nucléotides sont liés les uns aux autres pour former un brin d'ADN. L'ADN est donc un polymère de nucléotide. Deux brins d'ADN interagissent entre eux par les bases azotées formant une molécule d'ADN double brin. Cette molécule est similaire à une échelle dans laquelle les groupements phosphate-ribose constitueraient les montants et les bases azotées formeraient les barreaux. Les deux brins d'ADN dans cette échelle sont en orientation opposées (antiparallèle). Cette échelle est torsadée donnant la fameuse forme de double hélice à l'ADN double-brin.

La distance entre 2 résidus est de 0.34 nm (0.34×10^{-9} m). 1 tour d'hélice contient 10 paires de bases (3,4 nm). Le diamètre de l'hélice d'ADN est de 2 nm. La taille d'un génome humain est de 3.2 milliard de paires de bases par génome haploïde soit 6.4 milliard de paires de bases réparties sur les 23 paires de chromosomes. Mis bout à bout, cela donne plus de 2 mètres d'ADN par cellule ! Pour emballer tout cet ADN dans le noyau, l'ADN est fortement replié et compressé avec l'aide de protéines pour former la chromatine. L'empaquetage extrême de l'ADN forme les chromosomes mitotiques.



Historiquement, on doit la mise en évidence d'acides nucléiques (dénommés alors nucléine) à un biologiste suisse Friedrich Miescher en 1869. Phoebus Lavene découvre dans les années 1920 que les acides nucléiques sont constitués de nucléotides et Oswald Avery en 1944 démontre que l'ADN est le support de l'information génétique. La structure de la double hélice fut découverte en 1953 par Francis Crick et James Watson qui reçurent le prix Nobel en 1962.

L'EXPERIENCE:

Il existe de nombreux protocoles pour extraire simplement de l'ADN de différents organismes vivants. Nous allons vous en présenter 2, l'un à partir de banane et l'autre à partir des cellules de l'épithélium buccal. Ces expériences ne nécessitent aucun appareillage particulier et peuvent être effectuées à l'aide de produits achetés en grandes surfaces. Il est à noter que l'ADN obtenu n'est pas d'excellente qualité. Il ne permettrait pas d'effectuer des expériences fines de biologie moléculaire. L'ADN ainsi purifié est en effet encore contaminé par d'autres molécules (comme des protéines) et est probablement partiellement dégradé par des nucléases. Cependant ces protocoles permettent de visualiser facilement son propre ADN et d'apprécier l'aspect filamenteux de cette molécule.

PROTOCOLE :

A) Extraction d'ADN de bananes :



1) Purée de banane

- Peler une banane
- Couper la banane en 2
- Écraser la moitié de la banane avec une fourchette dans un bœcher

Cette étape permet de désagréger les tissus et de fragiliser les parois cellulaires.

2) Lyse des cellules

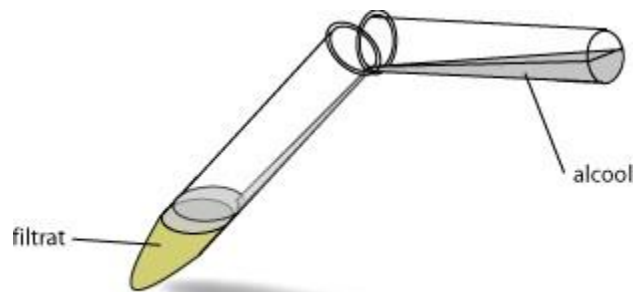
- Ajouter 50 ml d'H₂O, 2 cuillères à café de sel de cuisine et une cuillère de liquide vaisselle.
- Mélanger délicatement avec la fourchette afin d'obtenir une mixture homogène.

Le détergent permet de lyser les cellules en dissolvant les membranes cellulaires. L'ADN est ainsi libéré. Le détergent permet également de débarrasser une partie des protéines liées à l'ADN. Le sel permet de neutraliser les charges négatives (portées par les groupements phosphates) de l'ADN en éliminant les molécules d'H₂O qui entoure la double hélice. Cela permettra ainsi sa précipitation dans l'alcool.

3) Elimination des débris

- Passer le mélange à travers un filtre à café. Le mélange est très visqueux. Pour faciliter la filtration il convient de presser le filtre pour faire passer la solution. Récupérer le filtrat
- Refiltrer une deuxième fois à travers un nouveau filtre à café comme précédemment. Récupérer le filtrat.

La filtration permet de retenir les débris cellulaires et les morceaux de tissus non désagrégés.



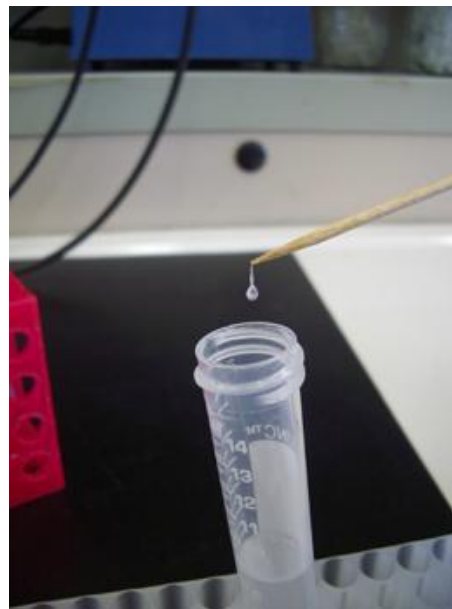
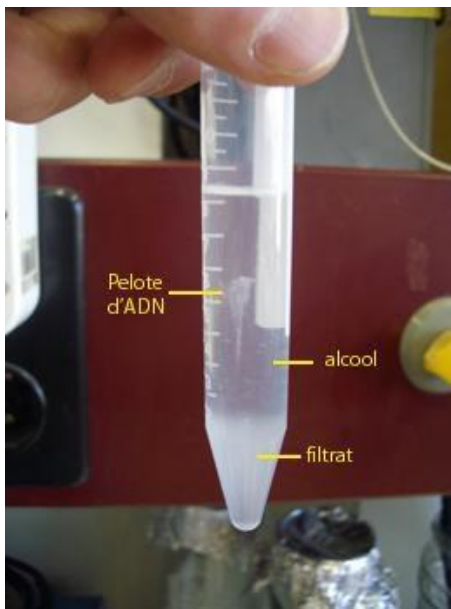
4) Précipitation de l'ADN

- Prélever 3 ml de filtrat et les transférer dans un tube 12 ou 15 ml.
- En inclinant le tube, ajouter délicatement 8 ml d'alcool à brûler.
- L'alcool reste au-dessus du filtrat. Ne pas secouer le tube

5) Visualisation de l'ADN

- L'ADN précipite en formant une « pelote », qui remonte lentement à la surface.
- A l'aide d'un cure-dent il est possible de prélever la pelote et de se rendre compte de l'aspect visqueux des filaments d'ADN.

L'alcool est de densité plus légère que l'eau et reste au-dessus. L'ADN, insoluble dans l'alcool, va précipiter, formant un amas blanchâtre de filaments qui s'échappe de la phase inférieure. Tourner ou incliner délicatement le tube si l'ADN n'arrive pas sortir de cette phase. Il s'agit ici de millions de filaments d'ADN provenant de nombreuses cellules.



B) Extraction de son propre ADN

Obtention de cellules de l'épithélium buccal

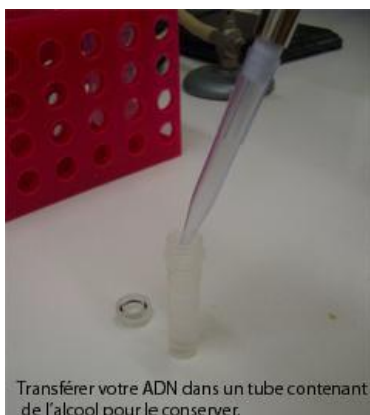
- Se frotter les joues contre les dents, mordiller ses joues pendant 1 minute. Ne pas avaler.
- Prendre environ 10 ml d'H₂O salée (1 cuillère à soupe de sel de cuisine dans 1 demi-litre d'eau) et se gargariser pendant 1 minute.
- Recrachter le liquide dans un récipient

Lyse des cellules

- Ajouter 5 à 10 gouttes de liquide vaisselle et remuer **délicatement**.

Précipitation et visualisation de l'ADN

- Ajouter délicatement 12 ml d'alcool à brûler comme décrit plus haut
- Votre ADN précipite.
- Vous pouvez récupérer l'ADN avec un cure-dent ou une micropipette et les transférer dans un tube contenant de l'alcool pour le conserver.

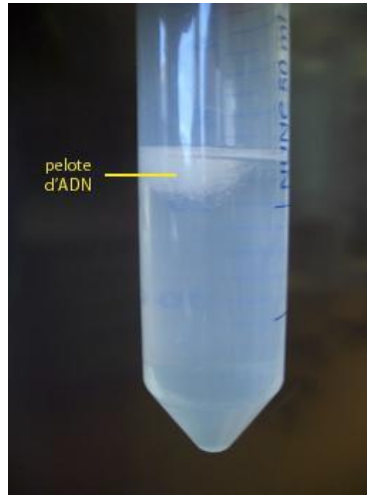
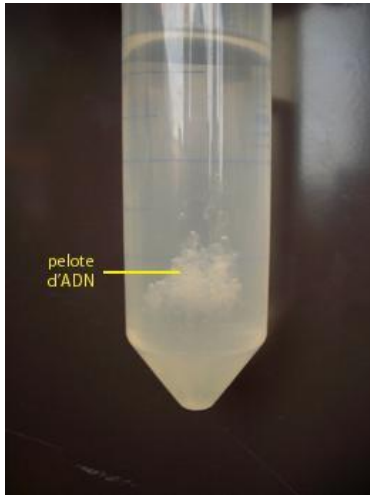


Transférer votre ADN dans un tube contenant de l'alcool pour le conserver.

C) Remarques:

L'extraction peut être effectuée avec d'autres fruits ou légumes (tomates, kiwi, orange pressée,...) en suivant le même protocole.

Les volumes peuvent être augmentés si la pelote n'est pas visible. Cela peut donner les résultats suivants:



Matériel:

- alcool à brûler
- liquide vaisselle
- sel de cuisine
- filtre à café
- H₂O
- bananes (ou autre)
- récipient (béchers, tubes...)