

Bien purifier et quantifier l'ADN génomique extrait des tissus des organismes

Introduction

Les analyses génomiques reposent essentiellement sur l'exploitation des informations contenues dans l'ADN extrait des tissus des espèces animales ou végétales. Cependant, la qualité et la quantité de l'ADN ont un impact significatif sur la pertinence des études basées sur l'exploitation les données génomiques. Cette fiche technique décrit succinctement une méthode de purification et de quantification de l'ADN extrait des tissus des organismes. Cette fiche est à l'attention des chercheurs, des techniciens de laboratoire et étudiants.

Purification des extraits d'ADN génomique

La purification consiste à éliminer par séparation successives les impuretés contenues dans l'extrait d'ADN. En effet, des molécules comme l'acide ribonucléique (ARN) des protéines, des polysaccharides et autres métabolites peuvent être associées à l'extrait d'acide désoxyribonucléique. Ces molécules, apparaissant comme des impuretés, peuvent affecter négativement la qualité et la quantité de l'ADN et réduire l'efficacité des analyses d'amplification in vitro par la polymérase.

Hydrolyse enzymatique des ARN et des protéines

- Disposer de RNase pour éliminer les ARN et de protéinase pour hydrolyser les liaisons peptidiques et dégrader les protéines;
- dissoudre dans 100 µl d'eau stérile l'échantillon d'ADN génomique en présence de 5 µl de RNase et 5 µl de protéinase.
- incuber l'ensemble à 37 °C pendant 30 min dans un bain marie ou un bain à sec.
- centrifuger les tubes contenant l'ensemble à 12 000 tr/min pendant 10 min.

NB : A défaut de RNase et de protéinase, utiliser un mélange de phénol-chloroforme-alcoolisoamylique dans les proportions (25 :24 :1 (v/v)) pour purifier l'extrait d'ADN.

Précipitation de l'ADN

- Prélever délicatement la phase supérieure aqueuse à l'aide d'une pipette (Figure 1);
- transférer dans un nouveau tube Eppendorf la phase supérieure;
- ajouter, dans les proportions égales 1:1 (v/v), de l'isopropanol conservé de préférence au congélateur à des températures pouvant atteindre -20 °C afin de favoriser la précipitation de l'ADN.

- retourner doucement l'ensemble par inversion du tube plusieurs fois à la main jusqu'à la formation d'une pelote;
- conserver l'ensemble à -20 °C toute la nuit Centrifuger à 12 000 tours/min pendant 10 min la formation du culot d'ADN;
- éliminer délicatement le surnageant;
- laver la pelote avec de l'éthanol absolu (70 %) .



Figure 1. Suspension de l'ADN purifié après centrifugation

Elution de l'ADN

- Suspendre l'ADN dans 50 µl de tampon de reprise TE (Tris-EDTA ou Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid) 10 %.
- Dissoudre la solution, toute une journée, à la température ambiante;
- conserver à -20 °C, la solution d'ADN ainsi purifiée pour l'ensemble des individus en attendant leur utilisation pour les analyses futures.

Quantification de l'ADN

La quantification de l'ADN total est nécessaire pour réaliser les réactions en chaîne de polymérase ou PCR (Polymerase Chain Reaction). Elle permet d'estimer quantitativement et qualitativement la concentration de l'ADN total. La méthode de Spectrophotométrie optique et l'électrophorèse sur gel d'agarose sont les principales techniques utilisées pour déterminer la quantité et évaluer la qualité de l'extrait d'ADN au laboratoire. L'ADN peut simplement être quantifié avec un Nanodrop basé sur la méthode spectrométrique. La quantification sur gel d'agarose utilise des colorants (SYBR Safe, GelRed et le bromure d'éthydium ou BET), substances fluorescentes sous rayonnement Ultra-Violet, qui s'intercalent entre les unités nucléotidiques de chacun des brins d'ADN. NB : Le BET est une substance cancérogène. Il est de plus en plus proscrit et doit être utilisé délicatement.

Méthode de fluorescence au colorant SYBR Safe DNA

Gel Stain ou SafeView

Le colorant SYBR Safe DNA Gel Stain ou le SafeView est un fluorochrome qui s'intercale entre les unités nucléotidiques et permet d'estimer la quantité d'ADN par l'intensité de la fluorescence émise.

Migration sur gel d'agarose

- Ajouter 7 µl du colorant à 5 µl d'ADN de chaque individu;
- déposer 5 µl de chaque solution obtenue dans les puits d'un gel d'agarose à 1 % dans du tampon Tris-Borate-EDTA ou TBE 1X;
- soumettre le mélange à migration électrophorétique sur gel d'agarose 1 % (p/v) pendant 45 min à 100 Volt;
- soumettre également à migration dans les mêmes conditions que les échantillons d'ADN des individus, un extract d'ADN de concentration connue (ladder) et servant de témoin.

Détermination de la concentration de l'ADN

- Visualiser à l'écran d'un ordinateur les spots d'ADN photographiés sous lumière ultra violette dans un Geldoc;
- estimer la concentration de l'ADN de chaque échantillon par comparaison de sa fluorescence sous lumière ultra-violette à celle de l'ADN de concentration connue.

Méthode de quantification au spectrophotomètre optique

La méthode de spectrophotométrie optique permet de déterminer l'absorbance (capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse) ou la densité optique (DO) d'un échantillon à l'aide d'un Nanodrop.

Calibrage du Nanodrop 2000

- Allumer le spectrophotomètre Nanodrop 2000 ;
- calibrer le Nanodrop 2000;
- nettoyer le canon de lecture du Nanodrop à l'aide du

papier absorbant imbébé d'eau distillée

- sélectionner à l'écran de l'ordinateur connecté au Nanodrop le type de matériel (ADN, ARN ou protéine) à analyser
- faire la tare (blanc) en déposant 2 µl de tampon de reprise de la solution d'ADN sur la surface de détection du Nanodrop.

Lecture de la densité optique des échantillons

- Déposer 1 ou 2 µl de solution d'ADN de chaque individu sur la surface de détection du Nanodrop ;
- mesurer les valeurs à différentes longueurs d'onde 230, 260 et 280 nm.
- nettoyer le canon de lecture après la lecture de la densité optique (DO) de chaque solution d'ADN avant de déposer la prochaine solution;
- répéter l'opération jusqu'à l'épuisement de l'ensemble des individus de l'échantillon étudié.

Pour chaque solution, l'appareil calcule la concentration d'ADN en ng/µl, donne la densité optique aux différentes longueurs d'onde de 230, 260 et 280 nm. Le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ est l'indicateur principal qui permet d'estimer la bonne qualité de l'ADN extrait. La valeur normale de ce rapport pour un ADN de bonne qualité est comprise entre 1,8 et 2.

Résultats

Profils électrophorétiques de l'ADN total par la méthode de fluorescence au colorant SYBR

La figure 2 montre les différents extraits d'ADN dans les puits de migration. La teinte de chaque bande illustre la concentration de l'extrait d'ADN. Les extraits ayant la même intensité de fluorescence avec l'ADN de concentration connue ont des concentrations identiques. La concentration est plus élevée ou faible lorsque l'intensité de fluorescence est plus forte ou faible par rapport à celle de l'ADN de référence. Les zones vides indiquent une absence ou une très faible concentration d'ADN.

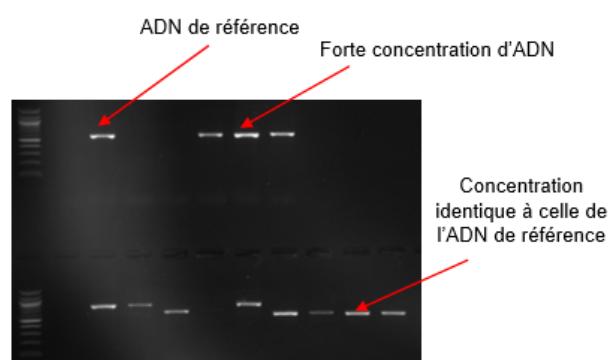


Figure 2. Profils électrophorétiques de l'ADN génomique sur gel d'agarose

Profil normal de l'ADN par la méthode de spectrophotométrie optique

La courbe de la figure 3 montre le profil idéal des extraits d'ADN brut visualisé au spectrophotomètre Nanodrop UV Vis 2000. Elle indique que l'ADN extrait de l'échantillon présent est de bonne qualité car le rapport DO260/DO280 est de 1.93, compris entre 1.8 et 2. La concentration de l'ADN de cet échantillon est de 2886,6 ng/µl. Pour des extraits ayant des profils différents, cela suppose que 'extrait d'ADN est de moindre qualité et pourrait contenir d'éventuelles impuretés. Il faudrait alors reprendre la phase de purification et refaire le test au Nanodrop. Si le profil ne change toujours pas, alors il pourrait s'agir d'une absence quasi-totale d'ADN dans la solution. Dans ces conditions, il est conseillé de reprendre l'extraction de l'ADN de cet échantillon.

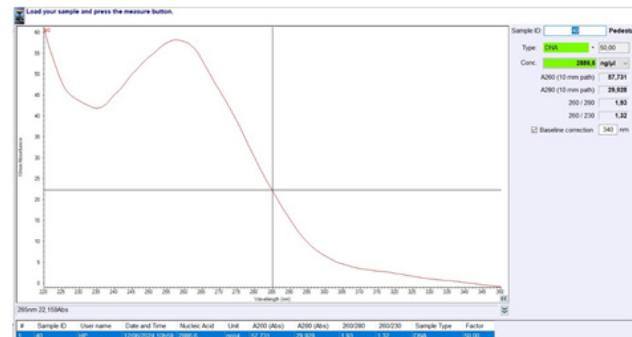


Figure 3. Courbe d'absorbance de l'ADN en fonction des longueurs d'ondes (nm)

Conclusion

La pureté et la quantité de l'ADN extrait des tissus des organismes conditionnent la qualité et l'efficacité des études portant sur l'exploitation des données génomiques. Les instructions de cette fiche technique constituent les fondements des analyses moléculaires au niveau génomique pour des études subséquentes.