
TP2 : Extraction d'ADN et contrôle de sa qualité

But de TP :

- Extraction et purification d'ADN
- Contrôle de qualité d'ADN purifié

Principe :

La présence des bases puriques et pyrimidiques permet aux acides nucléiques d'absorber dans l'Ultraviolet à 260 nm. Les protéines absorbent un peu à 260 nm, mais surtout à 280 nm. Cette absorption dans l'UV permet de doser les acides nucléiques et d'estimer la contamination par les protéines lors de la purification des acides nucléiques.

Matériel et réactifs :

- Petit oignon.
- Solution de chlorure de sodium (NaCl) à 60g/L.
- Solution de détergent (Liquide vaisselle)
- Isopropanol ou éthanol froid
- Eau distillée
- Mortier + pilon
- Gaze ou coton
- Pipette ou compte-goutte
- Spatule longue, tube
- Erlenmeyer ou Bécher.
- Vortex.
- Cuves
- Spectrophotomètre
- Eprouvette de 50 mL

Mode opératoire :

1. Extraction d'ADN

- Couper et broyer un petit oignon.
- Ajouter, à l'aide de l'éprouvette, 40 mL de solution de NaCl à 60 g/L, puis 15 gouttes de solution détergente. Mélanger doucement à l'aide de la spatule pendant environ 20 secondes.

- Filtrer le contenu du bécher sur un coton ou gaz, et récupérer le filtrat dans l'erenmeyer. Presser légèrement et très délicatement le filtre pour récupérer un maximum de filtrat.
- Homogénéiser doucement le contenu de l'Erlenmeyer, puis transférer 10 mL de ce filtrat dans l'éprouvette. Ajuster ensuite le volume jusqu'à 20 mL avec la solution froide d'isopropanol ou d'éthanol (verser très délicatement et lentement l'isopropanol, ne pas mélanger les deux phases).
- Laisser reposer le contenu de l'éprouvette pendant 3 à 5 minutes. L'ADN apparaît sous forme d'une pelote blanche.

2. Contrôle de qualité d'ADN purifié

- Pêcher l'ADN et le placer dans un tube, Réaliser une dilution de l'ADN dans environ 1 ml d'eau distillée, agiter la solution à l'aide d'un vortex
- Tracer le spectre UV de la solution entre 240 et 300 nm.

Longueur d'onde (nm)	230	240	250	260	280	300	310	330
Absorbance (Densité Optique)								

- Déterminer les absorbances à 260 nm et 280 nm
- Déterminer le rapport A_{260} / A_{280}
- Conclure quant à la pureté de l'ADN obtenu.