

Extraction de l'ADN

Michel DREYER, IA-IPR SVT
d'après la proposition de Thomi SCHEUBER, Biovalley College Network
(thomas.scheuber@edubs.ch)

Les protocoles donnés ci-dessous ne constituent pas une séance de travaux pratiques mais une activité à intégrer dans l'une d'entre elles. Par rapport aux pratiques en cours dans l'académie, depuis la parution de l'article des DNA sur ce sujet :

- on s'écarte de « la cuisine » et on donne du sens aux gestes effectués (on prépare les élèves à l'ECE)
- on introduit la rigueur scientifique souvent absente dans les autres protocoles (oignon, chou-fleur): à titre d'exemple le froid protège l'ADN car les enzymes sont inactivées à partir d'une certaine température (cf. les mammoths de Sibérie)
- on peut en profiter pour enrichir l'étude de la cellule en précisant que la membrane contient des lipides, que la cellule contient des protéines, que l'ADN est associé à des protéines,...
- prolongement : coloration avec le vert de méthyle.

En conclusion, la richesse des protocoles proposés ouvre de nouvelles perspectives didactiques pour traiter cette partie du programme de la classe de seconde, dans le respect de votre liberté pédagogique.

Le matériel

- biologique : fruits, légumes, thymus de veau du commerce,
- produits chimiques :
 - sel de cuisine,
 - produit vaisselle,
 - enzymes : protéases contenues dans du jus d'ananas frais ou du produit de nettoyage des lentilles de contact ou de la lessive (vérifier la présence d'enzymes),
 - éthanol à 96 % réfrigéré (sur des glaçons),
- équipement : Becher, éprouvette graduée, spatule, cuillère, pissette, entonnoir, filtre à café, bain-marie à 50 °C, bec Bunsen, pipettes Pasteur

Les deux types de protocoles

▪ Avec les petits pois

Pourquoi préférer le petit pois à l'oignon ? C'est le protocole d'extraction le plus courant, diffusé par la littérature anglo-saxonne. Des protocoles pour le Kiwi, la banane, les fraises sont proches et donnent de bons résultats. Cependant, une grande partie du précipité est constitué de pectines.

Le petit pois présente des avantages :

- *on les écrase facilement : ni broyeur, ni mortier ; une cuillère suffit ;*
- *on peut utiliser des petits pois décongelés (avec possibilité de fractionnement du contenu du sachet) ;*
- *il n'y a pas l'odeur forte de l'oignon ;*
- *la teneur en pectine y est inférieure.*

Le protocole :

- dans un Becher mélanger 10 mL de produit vaisselle avec 90 mL d'eau puis y dissoudre 3 g de sel de cuisine ;
- écraser 50 g de petits pois dans un mortier ;
- mélanger le broyat avec le liquide du Becher ;
- placer le mélange dans un bain-marie à 60°C pendant 15 minutes ;
- refroidir le mélange dans de l'eau glacée pendant 5 minutes en remuant de temps en temps ;
- filtrer et recueillir le filtrat dans un tube à essai (3 à 5 mL) ;
- ajouter au filtrat la solution contenant la protéase (3 gouttes) ;
- faire couler dans le tube à essai incliné de l'éthanol réfrigéré (deux fois le volume du filtrat) ;
- laisser reposer quelques minutes ;
- l'ADN qui a précipité à l'interface du mélange et de l'alcool va migrer dans l'alcool ;
- avec une pipette pasteur recourbée on peut le transférer dans un petit tube (Eppendorf) contenant de l'alcool.

▪ **Avec les autres matériels biologiques (fruits, légumes, thymus de veau)**

Le protocole :

- couper les fruits, légumes, thymus en petits dés (environ 50 mL) et les mettre dans un Becher ;
- compléter à 100 mL avec de l'eau, ajouter 10 mL de produit vaisselle et 3 g de sel de cuisine ;
- mélanger le tout ;
- placer le Becher dans un bain-marie à 50°C pendant 10 minutes ;
- refroidir le Becher dans de l'eau glacée pendant 5 minutes ;
- on peut, sans que cela soit obligatoire, remuer le mélange avec une baguette de verre ;
- filtrer et recueillir le filtrat dans un (ou des) tube(s) à essai (3 à 5 mL) ;
- ajouter au filtrat la solution contenant la protéase (10 gouttes) ;
- faire couler dans le tube à essai incliné de l'éthanol réfrigéré (deux fois le volume du filtrat) ;
- laisser reposer quelques minutes ;
- l'ADN qui a précipité à l'interface du mélange et de l'alcool va migrer dans l'alcool ;
- avec une pipette pasteur recourbée on peut le transférer dans un petit tube (Eppendorf) contenant de l'alcool.

Remarques complémentaires :

- *la réduction des produits biologiques en petits éléments augmente la surface de contact lors des différentes réactions chimiques ;*
- *le rôle du chlorure de sodium : l'ADN est chargé négativement, les sels neutralisent les charges ce qui permet la précipitation de l'ADN ;*
- *le produit vaisselle détruit les membranes biologiques par libération des phospholipides ;*
- *l'incubation à 50-60°C inactive les DNAses ;*
- *le refroidissement évite l'hydrolyse de l'ADN ;*
- *la filtration arrête les débris cellulaires ;*
- *les protéases détruisent les histones et partiellement d'autres protéines liées à l'ADN :*
 - o *le jus extrait d'un ananas frais contient de la bromélaïne (protéase),*
 - o *le produit de nettoyage des lentilles renferme de la trypsine (mais aussi de l'amylase et des lipases),*
 - o *le produit de lessive renferme également des enzymes ;*
- *l'alcool provoque l'agrégation de l'ADN ce qui équivaut à une précipitation.*

Tableau comparatif de la qualité des extractions

	Thymus	Fraises	Petits pois	Courgettes	Kaki
Jus d'ananas frais	++	-	+++	+++	++
Solution pour lentilles	++	+++	(++)	+	
Produit lessive	++	-	+++	++	