

3.1 On peut voir l'ADN!!

Bonjour à nouveau. Aujourd'hui nous allons extraire l'ADN et nous le verrons. Pouvez-vous croire? Visualiser l'ADN!

L'ADN est à l'intérieur des cellules, bien protégé par la membrane nucléaire, par le cytoplasme et la membrane plasmique. Nous devons donc éliminer progressivement tous ces composants et retenir seulement l'ADN. Nous allons vous dire comment c'est fait dans le laboratoire de virologie, mais dans les informations complémentaires vous verrez que vous pouvez extraire l'ADN, par exemple, d'une plante, ou de n'importe quelle autre cellule.

Dans quelques échantillons, nous aurons besoin d'isoler première les cellules qui nous intéressent. Par exemple, dans un échantillon de sang, nous aurons besoin de supprimer les globules rouges (ou érythrocytes), qui, comme vous le savez, n'ont aucun noyau et donc l'absence d'ADN. Pour ce faire, il suffit de diluer le sang dans l'eau distillée alors les globules rouges éclatent lorsqu'ils remplissent avec de l'eau. Après centrifugation, nous aurons un sédiment de cellules nucléées.

L'étape suivante consiste à rompre les membranes cellulaires et de séparer les composants. Comme les membranes sont formées par les lipides, il est préférable d'utiliser un détergent ou un agent tensio-actif. Les protéines, les lipides et les ARN sont agrégés au moyen d'une solution de milieu hypersalin, ou éliminés à l'aide de protéases et ARNases que les détruire. Avec toutes ces options, quand nous centrifugeons les restes cellulaires sont conservés dans le culot tandis que le surnageant contient l'ADN.

Bon. Nous avons séparé l'ADN des autres composantes cellulaires, mais il est accompagné par des quantités résiduelles de lipides, protéines, sels, détergents et autres réactifs utilisés. Pour les supprimer, un mélange de phénol et chloroforme/isoamylique alcool est fréquemment utilisé. Après centrifugation, nous pouvons voir une phase organique inférieure qui contient des protéines qui sont dégradées par le phénol, et une phase aqueuse supérieure avec l'ADN conservé par le chloroforme et l'alcool isoamylique alors que les lipides restent dans l'interface. Nous retirer délicatement la phase aqueuse supérieure, qui contient l'ADN.

Le dernier problème que nous rencontrons consiste à concentrer l'ADN dans le chloroforme. Eh bien, l'ADN précipite avec de l'isopropanol froid, ainsi en ajoutant ce réactif et en inversant le tube quelques fois, Nous pouvons voir une sorte de matière cotonneuse. Il s'agit précisément de l'ADN. Lorsque nous centrifuger ADN sera conservée dans le culot que nous lavera avec de l'éthanol pour éliminer toute trace de isopropanol et réactifs préalables. Après le séchage nous aurons notre échantillon d'ADN prêt à travailler avec elle. Bravo!!!!

Cette procédure est utile lors de la manipulation des échantillons, mais quand le volume d'échantillons à traiter est élevé, ou il y a de petites quantités de cellules dans le matériel de départ (et donc peu d'ADN), il est plus pratique d'utiliser les mini-colonnes commerciales cet isolat et purifie l'ADN à haute performance. Il y a aussi des colonnes pour isoler et purifier les ARN.

Quand nous avons purifié l'acide nucléique, il est habituellement dissous dans un adéquat tampon ou de l'eau bi distillée. On peut estimer sa concentration dans un spectrophotomètre, en évaluant la relation entre l'absorbance à 260 nm et 280 nm. L'ADN pur aura une absorbance supérieure ou égale à 1,8, alors que s'il y a des protéines résiduelles, la valeur sera plus faible.

Nous avons déjà notre ADN. Maintenant nous allons travailler avec elle ! Retrouvez-moi dans la vidéo suivante.

Je vous remercie pour votre attention.