

TP 4 : Vérification de la quantité et la qualité d'ADN extrait

1. Analyse de la concentration de l'ADN extrait (Dosage de l'ADN par spectrophotométrie)

Toutes les molécules absorbent de l'énergie radiante à une longueur d'onde spécifique à partir de laquelle il est possible d'extrapoler la concentration d'un soluté à l'intérieur d'une solution. Selon la loi de Beer-Lambert, il existe une relation linéaire entre l'absorption A (également appelée densité optique, DO) et la concentration de la macromolécule qui est donnée par l'équation suivante :

$$A = OD = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Où ϵ est égal au coefficient d'extinction molaire ;

C indique la concentration ;

l représente la longueur de parcours de la cuvette.

Les acides nucléiques ont la propriété d'absorber les U.V très fortement à une longueur d'onde de 260 nm, ce qui permet de déterminer sa concentration. Sur une longueur de parcours de 10 mm avec une longueur d'onde de 260 nm, l'absorption $A = 1$ correspond à environ 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin, 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN.

Réglage : afin de calibrer le spectrophotomètre, il est essentiel de :

- sélectionner la longueur de chemin optique de la cuve ;
- mesurer une solution vierge (référence) constituée soit d'eau, soit d'une solution tampon ($A_{260} = 0$) ;

- veiller à ce que la référence réglée soit renouvelée périodiquement ;
- mesurer une quantité connue d'acide nucléique pur afin de contrôler la fiabilité de la référence fixée ;
- mesure d'un échantillon inconnu.

Calcul de la concentration

Préparer des dilutions de l'échantillon au 1/50. Après une lecture au spectrophotomètre, une absorbance de **1,0 unité** à **260 nm**, elle correspond à **50 µg/ml d'ADN double brin** (1 unité de $DO_{260nm} = 50 \mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin).

La concentration d'ADN en ug/ml pour un échantillon pur dilué 1/50 est égale à :

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times 50 \text{ (facteur de dilution)}$$

Calcul de la masse à partir de la concentration

Masse d'ADN : $C = m/v$

C : concentration d'ADN en (µg/ml) .

m : masse de l'ADN en (µg).

v : volume de l'eau bidistillée utilisée pour resuspendre l'ADN en (ml) = 50 µl= 0,05ml.

Donc $m = C.v$

Le rendement d'ADN extrait par g de feuille sèche (R) :

Le rendement a été calculé en réalisant le rapport entre la quantité d'ADN obtenue et le volume ou la masse initial de l'échantillon. La détermination de la masse est effectuée après calcul de la concentration.

$$R \text{ (}\mu\text{g/g)} = \text{Masse d'ADN (}\mu\text{g)} / \text{Quantité de l'échantillon de départ en (g)}$$

Par exemple :

Echantillon (100mg des feuilles de persil ‘voir le TP3)	Absorbance à 260 nm	facteur de dilution	Concentration en ADN (µg/ml)	Masse d'ADN (µg)	Rendement d'extraction (µg d'ADN par g de feuille ou tissu)
X	0,6632	50	1658	82,9	829

2. Détermination de la pureté de l'ADN

Le rapport **$R = A_{260nm} / A_{280nm}$** constitue un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN par les protéines ou par les ARN.

Le ratio de l'absorbance à 260 nm sur 280 nm (A_{260nm}/A_{280nm}) est entre 1,8 et 2.

Un ratio inférieur à 1,8 indiquerait une **contamination protéique**. Les protéines, principaux contaminant des préparations absorbent aussi à 260 nm, mais avec maximum d'absorption qui se situe vers 280 nm à cause des acides aminés aromatiques.

Une **contamination par les ARN** est indiquée par un ratio supérieur à 2. Les ARN étant en simple brin, le coefficient moyen d'absorption d'un nucléotide est supérieur à celui du même nucléotide dans la double hélice à cause de l'hypochromisme.

$$R = A_{260nm}/A_{280nm}$$

$$\text{ADN pur : } 1,8 < R < 2$$

$$\text{ADN contaminé par les protéines : } R < 1,8$$

$$\text{ADN contaminé par les ARN : } R > 2$$

Un deuxième ratio de l'absorbance à 260 nm sur 230 nm (A_{260nm}/A_{230nm}), compris entre 2,0 et 2,2 indique une bonne pureté des acides nucléiques. Un ratio faible, signifie une contamination par des polysaccharides, du phénol ou des sels.

Les références :

1. Denis Tagu, Stéphanie Jaubert-Possamai, Agnès Méreau, coord. 2018. Principe des techniques de biologie moléculaire et génomique, 3^{ème} édition, Quae, France, page 47.
2. Joëlle Brodeur, Martin Toussaint. 2007. Biologie moléculaire concepts. Technique. Application. CCDMD, Canada, Chapitre: 6.
3. M. Somma. Extraction et purification de l'ADN.OMS.
4. T. Bienvenu, C. Meunier, S. Bousquet, S. Chiron, L. Richard, A. Gautheret-Dejean, J.-F. Rouselle, D. Feldmann. 1999. Annales de Biologie Clinique, Vol. 57, Paris.
5. <http://microbiologiefr.blogspot.com/2016/05/extraction-et-purification-des-acides.html>