

Extraction de l'ADN chez l'oignon (*Allium cepa*)

Marcel Lecomte

L'extraction de l'ADN est une manipulation +/- complexe (selon l'utilisation qui en sera faite) qui permet d'isoler et de mettre en évidence l'ADN de cellules animales ou végétales. La technique utilisée permet de mettre assez simplement en évidence une masse d'ADN, communément appelée « méduse » par les laborantins et les biochimistes, et qui peut être colorée avec différentes techniques, telles la méthode de Feulgen, ou l'utilisation du vert de méthyle acétique.



On peut également réaliser cette expérience avec les extrémités des pommes d'un chou fleur.

1ÈRE TECHNIQUE (la plus simple)

→ Peler l'oignon avec soin et retirer toutes les écailles sèches ou défraîchies.

→ Couper l'oignon en petits dés.

→ Placer ces derniers dans un mortier avec 10 cc d'eau bidistillée.

→ Ajouter 5 g de chlorure de sodium (on peut le remplacer par du gros sel de cuisine) : cela va faciliter le broyage et augmenter la dissolution de l'ADN.

→ Broyer avec le pilon jusqu'à obtention d'un mélange homogène et limpide (l'ADN est soluble dans l'eau).

→ Ajouter 1 g de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), un détergent industriel et bien mélanger avec le pilon ; on peut aussi utiliser quelques gouttes de détergent pour vaisselle. Ces produits vont détruire les membranes des structures cellulaires et l'enveloppe des noyaux.

→ Placer 2 compresses de gaze dans un entonnoir.

→ Verser le broyat pâteux et filtrer afin de recueillir quelques cc du filtrat dans une éprouvette graduée (on peut faciliter la chose en pressant doucement les compresses pour faciliter la filtration).

→ Estimer avec précision le volume de filtrat dans l'éprouvette et y ajouter un volume double d'éthanol à 95°. Cette opération s'avère délicate : faire couler lentement l'alcool éthylique le long de la paroi du tube (l'utilisation d'une pissette est conseillée) ; surtout, ne pas agiter le tube.

→ Après quelques dizaines de secondes, une pelote blanchâtre nacrée apparaît dans l'éthanol : c'est l'ADN qui précipite dans l'alcool. C'est cela qu'on appelle « la méduse ».

→ Récupérer délicatement la pelote d'ADN à l'aide d'une baguette de verre, et la placer dans un verre de montre.

→ Ajouter quelques gouttes de vert de méthyle, et laisser agir durant une minute.

→ Rincer à l'eau bidistillée pour éliminer le surplus de colorant. La « méduse » est colorée en vert.

→ Prélever un fragment et observer au microscope.

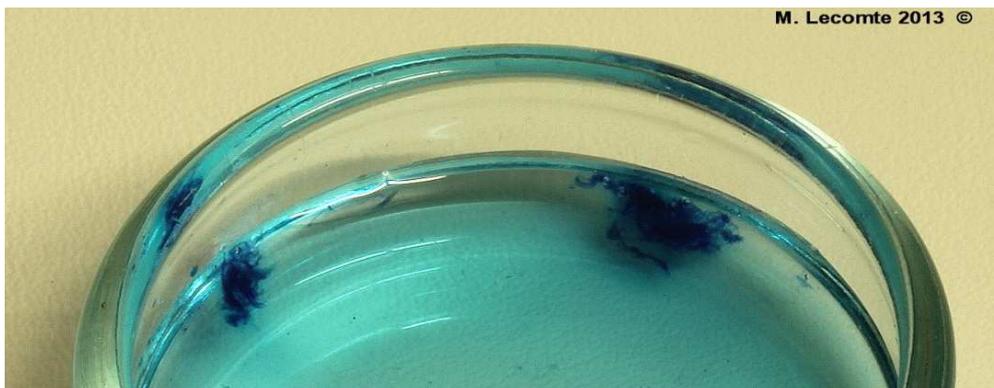




Photo 1 : le mortier avec le broyat en cours.

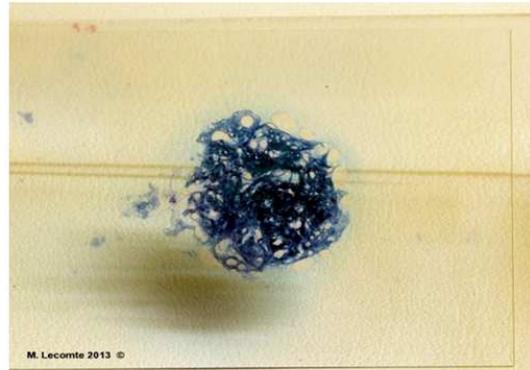
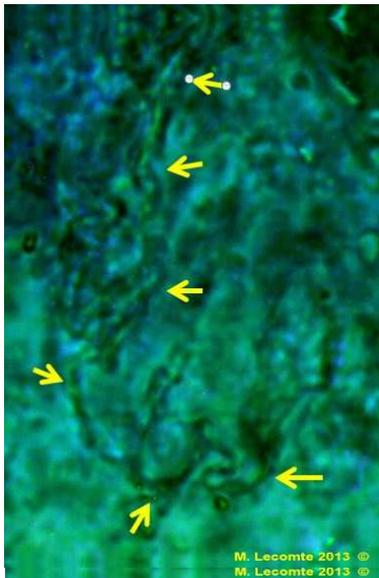


Photo 2 : l'éprouvette avec la zone de séparation très distincte entre le filtrat et l'éthanol à 95° ; la méduse s'est formée et a migré vers la surface.

Photo 3 : les filaments d'ADN colorés et en cours de rinçage, dans une BP.

Photo 4 : la méduse en formation dans la zone de contact des deux liquides.

Photo 5 : les filaments d'ADN, colorés en bleu, et étalés sur une LPO.



◀ le filament d'ADN, sinueux et tortueux, est nettement visible.

2ÈME TECHNIQUE (plus longue, mais plus efficace)

PRÉALABLE

- + placer un mortier et un pilon au surgélateur durant plusieurs heures (le froid a la propriété de neutraliser fortement la molécule responsable du larmolement chez l'oignon)
- + préparer 40 cc de liquide d'extraction (solution aqueuse d'acide acétique glacial additionnée de chlorure de sodium), et le conserver au frigidaire, à 4°C
- + préparer 80 cc de liquide de précipitation (éthanol à 95°)
- + se procurer un oignon de belle taille

MODE OPÉRATOIRE

- + enlever la cuticule sèche de l'oignon
- + trancher l'oignon en petits dés
- + placer les morceaux dans le mortier très froid
- + avec le pilon, broyer le contenu jusqu'à obtenir une purée épaisse
- + ajouter 40 cc du liquide extracteur (il est fortement conseillé de travailler sous hotte, vu la présence d'acide acétique)
- + continuer de broyer l'oignon
- + verser le contenu du mortier sur un filtre en papier (ou sur du papier absorbant) placé sur un entonnoir
- + récolter le liquide dans un flacon (cela peut prendre quelques minutes)
- + presser avec les mains (gants fortement conseillés) le filtre contenant la purée, de façon à bien extraire tout le liquide
- + verser lentement les 80 cc d'éthanol, en inclinant le flacon, afin que les deux liquides (on va parler de « phases ») se mélangent le moins possible
- + un précipité se forme entre les 2 phases
- + à l'aide d'un bâtonnet, récupérer les amas de « méduses » blanchâtres et gluantes qui apparaissent entre les deux phases, et les placer dans un verre de montre → ils contiennent des filaments d'ADN
- + Ajouter quelques gouttes de vert de méthyle, et laisser agir durant une minute.
- + Rincer à l'eau bidistillée pour éliminer le surplus de colorant. La « méduse » est colorée en vert.
- + Prélever un fragment et observer au microscope.

NB : Les amas récoltés contiennent également des protéines et d'autres constituants cellulaires, en plus des filaments clairement visibles