Extraction d'ADN

1. Equipements utilisés

Les extractions d'ADN effectuées par la Plateforme de Ressources Biologiques sont réalisées sur l'automate Maxwell 16® (Promega, Lyon, France). Cet automate utilise une technologie innovante de capture par billes magnétiques, sans distribution, filtration, ni aspiration de réactifs, limitant le temps de manipulation et les risques d'erreurs.

Cet appareil bénéficie d'un entretien mensuel réalisé par les techniciens de la PRB et d'une maintenance préventive annuelle effectuée par le fabriquant.

2. Personnel

Les extractions d'ADN sont effectuées par les techniciens de laboratoire de la Plateforme de Ressources Biologiques qui sont formés et habilités à fréquence régulière sur chaque technique spécifiquement.

3. Matrices prises en charge

L'automate Maxwell 16® permet l'extraction de 16 échantillons maximum simultanément.

Matrice	***Buffy-coat***	**Sang total**	**Tissus**		**Urine**
Support du prélèvement	EDTA* ; citrate**	EDTA* ; citrate**	Congélation immédiate en azote puis conservation à -80°C	Fixation au formol et inclusion en paraffine (FFPE)	Norgen®*; Falcon®*
Quantité d'échantillon	500 µL à 1 mL*	12 mL*	4 coupes de 50 µm*	2 coupes de 8 µm*	50 mL*
Nature	Frais* (< 24 h) ; congelé (< 1 mois à -80°C)*	Frais (< 24 h)* ; congelé (< 1 mois à -80°C)*	Congelé (-80°C)	Fixé et conservé à température ambiante ou à 4°C	Frais (2 semaines)*
Volume d'élution	400 µL* (de 300 à 600 µL**)	400 µL* (de 300 à 600 µL**)	50 à 100 µL*	50 à 100 µL*	60 µL*
Tampon d'élution	Tris EDTA 10 mM, pH 7-8	Tris EDTA 10 mM, pH 7-8	Eau nucléase-free	Eau nucléase-free	Tris EDTA 10 mM, pH 7-8
Délai technique interne	2 heures	24 heures	48 heures	48 heures	2 heures

*validation fournisseur +validation PRB, **validation fournisseur uniquement

Points de vigilance :

- L'héparine est connue pour être un inhibiteur de PCR ;
- Préparation du *buffy-coat* : les modalités de centrifugation influencent fortement la qualité du *buffy-coat*. Il est recommandé de privilégier une centrifugation à vitesse faible (400 g, 10 min, 4°C*) et sans frein.

4. Contrôles qualité disponibles sur les échantillons d'ADN obtenus

La qualité et la pureté de l'ADN obtenu doivent être adéquates pour l'application prévue en aval. C'est pourquoi la Plateforme de Ressources Biologiques accorde une grande importance aux contrôles qualité réalisés sur les échantillons d'ADN extraits. Les différents contrôles qualité décrits ci-dessous sont disponibles et peuvent être réalisés sur demande.

- Dosage spectrophotométrique *(Nanodrop 2000®)*

La zone d'absorbance maximale des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminants des solutions d'acides nucléiques, absorbent à 260 nm mais présentent un maximum d'absorption autour de 280 nm par les acides aminés aromatiques. La mesure du rapport de DO 260/280 permet donc de contrôler la pureté des échantillons d'ADN obtenus en évaluant la présence de contaminants (solvants organiques, ARN, protéines résiduelles) dans la solution d'ADN.

On attend un rapport 260/280 supérieur ou égal à 1,7 dans le cas d'un ADN double brin pur. Un rapport plus faible traduit généralement une contamination en protéines.

- Dosage fluorimétrique *(Quantus®, Qubit®)*

Il existe des méthodes fluorimétriques sensibles pour le dosage de l'ADN double brin (forme native) qui sont basées sur une interaction entre un fluorophore et la molécule d'ADN. Le fluorophore se fixe sur l'ADN et émet de la fluorescence. Le taux de fixation du fluorophore étant directement lié à la quantité d'ADN, l'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présente. Cette technique est très précise pour quantifier l'ADN double brin, plus sensible et plus spécifique que le dosage spectrophotométrique UV.

Les techniques d'extraction proposées par la Plateforme de Ressources Biologiques sont optimisées pour permettre d'obtenir la concentration la plus élevée possible de manière à avoir suffisamment de matériel pour toutes les applications prévues en aval.

- Evaluation de l'intégrité de l'ADN (TapeStation®)

Il est également primordial d'évaluer l'intégrité de l'ADN, soit par une migration sur gel d'agarose, soit par une technique de PCR permettant d'estimer la taille des fragments. La Plateforme de Ressources Biologiques a fait le choix de la technologie Agilent sur TapeStation® qui permet de déterminer précisément la qualité de l'ADN à partir de faibles quantités d'échantillon (1 µL) en un temps très court. L'apport majeur est le calcul automatique d'un score qualité appelé DIN (*DNA Integrity Number*). Sa valeur est comprise de 1 à 10, un DIN de 10 correspondant à un ADN de qualité parfaite et un DIN de 1 correspondant à un ADN totalement dégradé.

La Plateforme de Ressources Biologiques veille à ce que les techniques d'extraction d'ADN validées limitent au maximum la fragmentation de l'ADN et permettent d'obtenir un DIN le plus élevé possible.

- Amplification et inhibiteurs de PCR

Lors de la mise au point d'une technique d'extraction d'ADN, la Plateforme de Ressources Biologiques s'assure de l'efficacité d'amplification de l'ADN par différentes réactions de PCR permettant d'amplifier différents exons (137 pb, 230 pb, 250 pb, 289 pb, 370 pb, 650 pb et jusqu'à 1500 pb).

La Plateforme de Ressources Biologiques vérifie également avec une technique de PCR standard que les techniques d'extraction mises en œuvre n'entraînent pas de co-élution de substances pouvant inhiber les applications en aval comme la PCR.

- Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au rapport entre la quantité d'ADN extraite en ng et la quantité de la matrice initiale utilisée. Le rendement d'extraction moyen doit être calculé pour pouvoir comparer entre elles différentes techniques d'extraction d'acides nucléiques. Cette donnée est essentielle car elle permet de s'assurer que la quantité d'ADN obtenue est suffisante pour les applications en aval.

La Plateforme de Ressources Biologiques a soigneusement validé les différentes techniques d'extraction proposées pour pouvoir garantir un rendement d'extraction compatible avec les applications en aval souhaitées par les chercheurs.

5. Performances attendues

Le tableau ci-dessous résume les performances des différentes techniques d'extraction d'ADN mises en œuvre par la Plateforme de Ressources Biologiques.

	Rapport DO 260/280	**Concentration des ADN**	**DIN (TapeStation®)**	**Amplification (PCR)**	**Rendement d'extraction**
Buffy-coat	>1,7	> 50 ng/µL	> 7	Jusqu'à 1500 pb	5900 ng d'ADN / mL de sang total
Sang total	>1,7	> 50 ng/µL	> 7	Jusqu'à 1500 pb	7800 ng d'ADN / mL de sang total
Tissus congelés	>1,6	> 30 ng/µL	> 6	Jusqu'à 137 pb	2800 ng d'ADN / coupe à 50 µm
Tissus fixés	>1,6	> 30 ng/µL	> 6	Jusqu'à 137 pb	3450 ng d'ADN / coupe à 8 µm
Urine	>1,4	> 4 ng/µL	Non disponible	Jusqu'à 650 pb	123 ng d'ADN / mL d'urine

6. Conclusion

La Plateforme de Ressources Biologiques s'assure que la qualité et la pureté des ADN obtenus avec les techniques d'extraction mises au point sont compatibles avec les applications prévue en aval, qui peuvent être du séquençage, du *fingerprinting*, de la PCR, de la qPCR, du *southern blotting*, du RAPD, de l'AFLP, du RFLP ou des digestions avec des enzymes de restriction.

L'ensemble des résultats générés lors de la mise au point et de la validation des techniques d'extraction d'ADN mises en œuvre à la Plateforme de Ressources Biologiques fait l'objet d'un rapport détaillé. La mise en œuvre de la technique d'extraction d'ADN est ensuite clairement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

Mise à jour : juin 2017