

Technique d'extraction d'ADN génomique de végétaux permettant l'amplification de longs fragments à partir d'une petite quantité de matériel

Stéphane Bénédit¹ et Pierre Barret²

Résumé. L'extraction d'ADN génomique à partir d'une faible quantité de matériel végétal est couramment réalisée à l'aide de kits commerciaux qui ont pour avantage la rapidité, la reproductibilité et l'absence d'utilisation de solvants toxiques. Ces kits sont efficaces lorsque les échantillons obtenus sont destinés à des amplifications par PCR de fragments de petite taille. Étant dans l'obligation d'amplifier par PCR (polymerase chain reaction) un fragment d'ADN de grande taille (>3 kpb), nous avons mis au point le protocole décrit dans cet article qui nous permet d'extraire sur de petites quantités de matériel végétal de l'ADN de haut poids moléculaire. Nos résultats montrent que l'amplification PCR attendue peut être réalisée sur nos échantillons, et que ces derniers se conservent bien dans le temps. Nous montrons aussi que ce protocole peut être appliqué à d'autres espèces végétales. De plus, le coût par échantillon est réduit par rapport à une extraction réalisée avec un kit d'un fournisseur de laboratoire.

Mots clés : extraction d'ADN, mini-préparation, grand fragment, PCR (polymerase chain reaction)

Abstract. The extraction of genomic DNA from a small quantity of vegetal material is commonly made/practiced by means of commercial kits, which have the advantages to be rapid, reproducible and toxic solvent-free. These commercial kits are effective when the obtained samples are used to amplify by PCR (polymerase chain reaction) small fragments (<1 kb). As we have to amplify by PCR a large fragment of DNA (> 3kpb), we set up a protocol described in this paper that allows us to extract from small strands of vegetal material a DNA of high molecular weight. Our results show that the expected PCR amplification can be made on our samples and that their shelf-life lasts long. We also show that this protocol can be applied on other vegetal species. Moreover, the cost per sample is reduced in comparison with an extraction made with a laboratory supplier kit.

Keywords : DNA extraction, small preparation, large fragment PCR (polymerase chain reaction)

¹ GDEC, Inra, 63000 Clermont-Ferrand, France
stephane.benedit@inra.fr (auteur référent)

² UMR Inra-UCA Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 63000 Clermont-Ferrand, France
pierre.barret@inra.fr

Introduction

Le protocole décrit a été mis au point au sein de la Plateforme Régionale de Validation Fonctionnelle de Clermont-Ferrand qui travaille essentiellement sur la transformation génétique et l'édition du génome du blé tendre. Cette méthode nous permet d'extraire de l'ADN et de réaliser des analyses sur les plantules génétiquement modifiées à différents stades végétatifs. Du fait de l'extrême fragilité de ces plantes qui, pour la plupart, sortent juste d'une phase de culture *in vitro*, nous nous devons de prélever très peu de matériel végétal. Pour réaliser cette technique, le protocole d'extraction d'ADN décrit dans la publication de Stein et al. (2001) a été adapté pour l'utilisation sur une petite quantité de matériel. Cette technique nécessite peu de matériel de laboratoire, les réactifs sont peu onéreux et elle répond aux exigences de traçabilité et de reproductibilité car l'ADN ne se dégrade pas dans le temps.

Matériel et méthodes

Récolte du matériel végétal

L'objectif est de pouvoir prélever un échantillon sur toutes les plantules provenant de culture *in vitro* tout en ayant un impact minimum sur la viabilité de la plante, ainsi que de pouvoir effectuer ces prélèvements sur les plantules qui sont à des stades végétatifs différents. Les prélèvements de feuilles sont faits en petite quantité pour éviter un trop grand stress des plantes. Pour le blé tendre, on considère qu'un échantillon de trois feuilles de 3 cm représente environ 200 mg de matériel (**Figure 1**). Les échantillons ne sont pas pesés à ce stade, la quantité nécessaire et suffisante pour une bonne réaction avec le tampon de lyse sera estimée après le broyage. Les échantillons sont mis dans des feuilles d'aluminium, étiquetés et rangés dans un bac à glace.

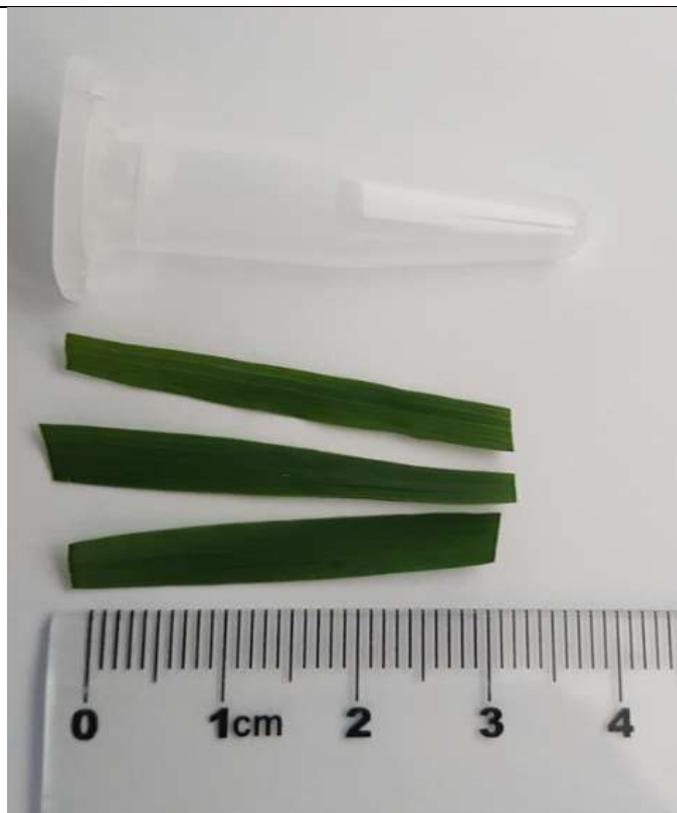


Figure 1. Prélèvement des échantillons végétaux issu de feuille de blé (photo : S. Benedit, Inra, GDEC).

Broyage des échantillons

Il existe différents matériels pour broyer les tissus de végétaux, mais pour obtenir une bonne granulométrie sans altération des tissus, le broyage dans un mini-mortier et au pilon dans l'azote liquide est la méthode la plus fiable. Il faut obtenir une poudre fine sans que l'échantillon subisse une décongélation. La qualité du broyage est essentielle car trop broyés, les tissus sont dégradés, et pas assez broyés, ils ne permettent pas un accès optimum au tampon d'extraction.

La poudre ainsi obtenue est transférée dans un micro tube à vis. On ajuste la quantité de poudre à environ 800 µL et on ajoute 600 µL de tampon d'extraction. On met le micro tube sur un agitateur de type vortex réglé à basse vitesse pour que la poudre soit bien en contact avec le tampon d'extraction. Les échantillons peuvent être ainsi conservés plusieurs jours à l'obscurité à 4° C.

Protocole pour l'extraction de L'ADN génomique de végétaux

Les micro tubes d'échantillons sont mis 30 min au bain marie à 65° C, puis on les place sur agitateur de type vortex réglé à basse vitesse. Ils sont ensuite placés à nouveau 30 min dans le bain marie.

On les centrifuge 10 min à 16 000 g et on récupère 450 µL de surnageant par échantillon auquel sont ajoutés 400 µL de solvant d'extraction sous sorbonne.

Les échantillons sont installés dans un agitateur pendulaire en chambre froide (4° C) pendant 1 h à une vitesse lente.

L'élimination de l'ARN s'effectue grâce à l'action d'une Ribonuclease 3'-pyrimidinooligonucleotidohydrolase qui dégrade l'ARN en ribonucléotide. On utilise 8 µL de RNase A à une concentration de 10 mg/mL par échantillon. On mélange la RNase A par inversion des tubes, et on laisse incuber 20 min au bain marie à 37° C.

On ajoute 280 µL d'isopropanol par tube et la précipitation de l'ADN se réalise dès lors que l'on mélange lentement par inversion. Les pelotes d'ADN sont récupérées à l'aide de pipette pasteur boutonnée, ce qui permet d'éliminer plus de déchets que par centrifugation. Les filaments d'ADN s'accrochent au verre en raison des groupes phosphates.

Les pelotes d'ADN se sont fixées à la pointe des pipettes pasteur que l'on place 15 min dans des tubes contenant 1000 µL de solution de lavage 1.

On transfère les pipettes dans des tubes contenant 1000 µL d'éthanol 70 % et on les laisse 5 min maximum.

Les pipettes sont retournées pendant 10 min sur un portoir permettant ainsi l'évaporation de l'éthanol.

On plonge ensuite l'ADN fixé sur les pointes des pipettes dans des tubes contenant 50 µL de TE 10/1, et une attente d'une demi-heure est nécessaire pour que la pelote d'ADN se décroche correctement.

Les tubes sont mis à 4° C pendant 12 h, ce qui laisse le temps à la pelote d'ADN de se diluer dans le tampon TE.

Vérification de la qualité de l'ADN génomique

Dosage et ajustement des concentrations

Les pelotes d'ADN sont homogénéisées dans le TE à l'aide d'une micropipette, en effectuant des aspirations lentes et ainsi que des refoulements lents aussi, cette opération étant répétée plusieurs fois dans la solution.

Le dosage des acides nucléiques se réalise au spectrophotomètre. L'analyse permet aussi d'évaluer la pureté de la solution. L'ADN pur a un maximum d'absorbance à la longueur d'onde 260 nm. La pureté de l'ADN est déterminée grâce aux rapports

260/280 et 260/230. La mesure de l'absorbance à 230 nm caractérise les acides phénoliques et celle à 280 nm caractérise les protéines. Un rapport 260/280 supérieur à 1,7 signifie que l'acide nucléique est pur, tandis qu'une faible valeur indique une contamination par des protéines. Un rapport 260/230 supérieur à 2 est également un indicateur de pureté, alors qu'une faible valeur est le signe d'une contamination par des acides phénoliques.

La quantité d'ADN par échantillon est comprise entre 250 ng à 650 ng/ μ L. On prépare pour chaque échantillon, une solution de travail de 200 μ L à une concentration de 10 ng/ μ L.

ADN génomique de blé tendre	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
ADN extrait avec ce protocole	497,32	9,946	5,467	1,82	2,2

Contrôle quantité et de qualité par électrophorèse

On récupère un volume de 10 μ L par échantillon de la solution de travail (soit 100 ng) auquel on ajoute un front d'électrophorèse 1X qui sert aussi à alourdir l'échantillon afin qu'il puisse être déposé au fond du puits. On dépose l'échantillon résultant sur un gel d'agarose à 0,8 % dans un tampon Tris Acétate EDTA 1X et on laisse migrer l'ADN 30 min à 10 volts/cm.

Amplification PCR

L'amplification PCR a été réalisée en utilisant de la polymérase Phusion (Thermo Fisher F531S) selon les recommandations du fournisseur et en utilisant 50 ng d'ADN par réaction. Les amorces utilisées pour amplifier le fragment de 3,2 kpb avaient été définies sur le gène Stb6 voir la publication de Saintenac C et al. (2018).

Composition du Mix PCR :

2X phusion Master MIX	10 μ L
Amorce forward 10 μ M	1 μ L
Amorce reverse 10 μ M	1 μ L
EAU Ultra Pure stérile	3 μ L
ADNg à 10ng/ μ l	5 μ L
Volume final	20 μ L

Les cycles réalisés pour cette amplification sont : un cycle de 30 s à 98° C, suivi de 40 cycles de 10 s à 98° C puis 30 s à 69° C et 4 min à 72° C, suivis d'une élongation finale de 5 min à 72° C.

Résultats

Validation de la méthode d'extraction d'ADN pour diverses espèces végétales

Le protocole d'extraction a été mis en œuvre pour diverses espèces végétales (**Figure 2**), toujours en utilisant de petites quantités de matériel. Les résultats montrent que l'ADN extrait est de très bonne qualité, sans aucune trace de dégradation. Un échantillon conservé au froid à 4° C pendant 4 ans a aussi été testé. Il présente un léger voile de dégradation mais est tout à fait utilisable en l'état. L'ADN du kit commercial utilisé pour le test d'amplification de grands fragments (Kit SIGMA réf XNAP2-1KT) n'a pas été déposé sur le gel car il est extrait en quantités trop faibles pour être visible par ce procédé.

Nous montrons donc que le protocole présenté permet d'extraire de l'ADN génomique de bonne qualité sur de petites quantités de matériel, et cela sur plusieurs espèces différentes de plantes. Nous montrons également que cet ADN peut être conservé pendant plusieurs années à 4°C, ce qui indique que le protocole autorise un bon niveau de purification, en particulier

protéique, permettant de limiter au maximum la dégradation de l'ADN de l'échantillon par les DNases. Ceci pourra permettre par exemple de reproduire des expérimentations dans le temps sur un même échantillon, ou bien d'en réaliser de nouvelles.

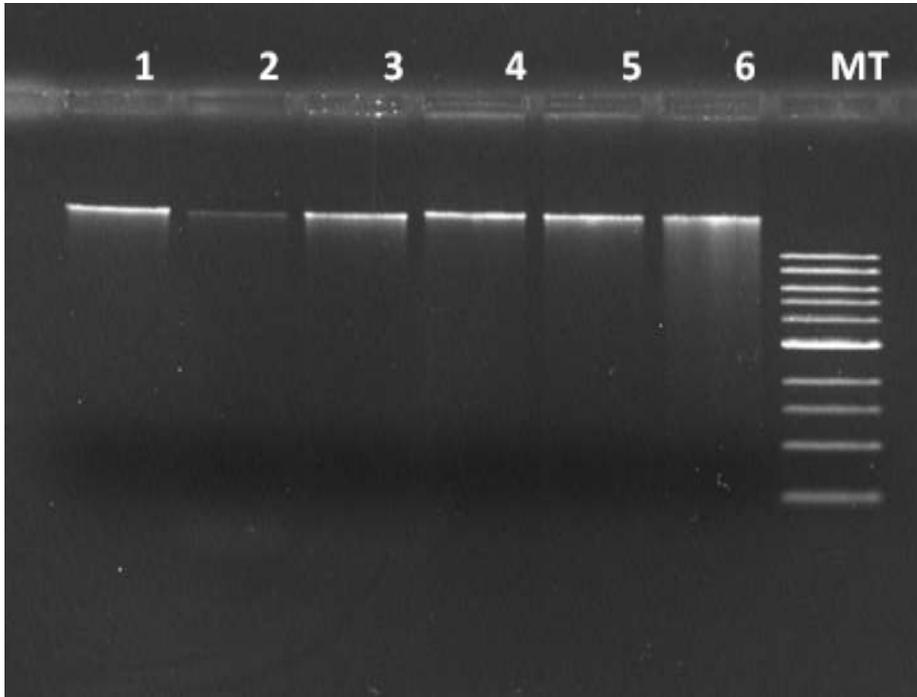


Figure 2. Électrophorèse en gel d'agarose de l'ADN extrait de différentes espèces végétales.
1 : *Solanum lycopersicum* L. (tomate). **2** : *Populus nigra* L. (peuplier noir) **3** : *Zea mays* L. (maïs) **4** : *Triticum durum* L. (blé dur)
5 : *Triticum monococcum* L. (petit épeautre) **6** : *Triticum aestivum* L (blé tendre) ADN conservé 4 ans à 4° C
MT : marqueur de taille 1 kpb (BioLabs N3232L). (Photo : S. Benedit Inra, GDEC).

Amplification PCR d'un fragment de grande taille

Nous avons réalisé une amplification PCR d'un fragment de 3,2 kpb afin de valider la qualité de l'ADN extrait (**Figure 3**). L'amplification peut être réalisée sur l'échantillon extrait par notre méthode, mais pas sur un échantillon témoin extrait avec un kit commercial.

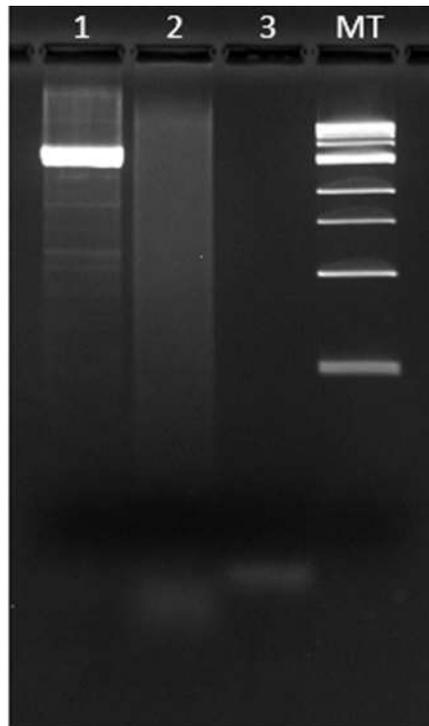


Figure 3. Amplification PCR d'un fragment d'ADN génomique de blé tendre de 3,2 kpb réalisé sur deux types d'extraction d'ADN. **1** : ADN extrait avec ce protocole. **2** : ADN extrait avec un kit extraction. **3** : témoin négatif sans ADN. MT : marqueur de taille 1 kpb (BioLabs N3232L). (Photo : S. Benedit, Inra, GDEC).

Calcul des coûts par échantillon par comparaison avec un kit commercial

Le coût par échantillon extrait a été calculé. Il représente à peu près la moitié du coût d'un échantillon extrait avec un kit commercial, avec *in fine* l'obtention d'un ADN de meilleure qualité. Cependant ce protocole nécessite deux fois plus de temps de préparation par rapport à un kit commercial, et nécessite des installations particulières telles qu'un agitateur orbital placé en chambre froide ainsi qu'une sorbonne pour la manipulation du B mercaptoéthanol et des alcools.

Tableau 1. Calcul du coût (consommables) de l'extraction d'ADN par échantillon. Comparaison avec le coût d'un kit couramment utilisé (Fournisseur SIGMA)

Tampon d'extraction				Quantité/L	Prix HT	
Produits chimique	Fournisseur	Réf	Prix			
CTAB	sigma	H6269-1KG	372	20g	7,42	
Tris	sigma	T1503-1KG	151	24,2g	3,63	
Acide chlorhydrique	VWR	20252.290	27,5	8,4mL	0,23	
EDTA	SIGMA	E5134-1KG	170	7,44g	1,26	
Sodium Hydroxide	VWR	28245.265-500	24,2	0,8g	0,04	
Chlorure de sodium	VWR	27800-291	22,8	81,8g	1,8	
PVP40	SIGMA	PVP40-500g	165	10g	1,65	
Total					16,03	
					Quantité prix échantillon	
					600µL	0,01

Tampon de lyse				Quantité/L	prix échantillon
Réactif	Fournisseur	Réf	Prix		
Dichlorométhane	SIGMA	2700997	53	960mL	0,02
Alcool isoamylalcool	SIGMA	309435	174	40mL	0,002

Produits chimique	Fournisseur	Réf	Prix	Quantité/L	prix échantillon
Propanol-2	VWR	20842.298	40,1	280µL	0,011
RnaseA 10mg/mL (100mL)	SIGMA	R48-75-1G	444	8µL	0,035

Solutions de lavage				Quantité/L	prix échantillon
Produits chimique	Fournisseur	Réf	Prix		
sodium acetate	VWR	27650.292	49,6	16,4g	0,001
Ethanol Anhydre(25L)	ELVETEC	PC200109	45,7	760mL	0,92
Ethanol Anhydre(25L)	ELVETEC	PC200109	45,7	760mL	0,001

TE 0,1X	Quantité	prix échantillon
	200µL	0,001

Comsommmables plastique				Quantité	prix échantillon
micro tubes à vis 2mL	DUTSCHER	O39155	88,4	3	0,26
micro tubes 1,5mL	DUTSCHER	O33290	36,2	1	0,036
micro tubes 2mL	DUTSCHER	O33297	49,3	2	0,1
Pipette pasteur 150mm	DUTSCHER	O42011	17,6	1	0,03

Total: 1,43€

Kit b Extrait N-dupi Plant PC Kit XNAP2-1KT 139,40 €
 50 échantillons
 2,8€ par échantillon

Conclusion

Le protocole d'extraction d'ADN génomique de matériel végétal que nous avons décrit permet d'obtenir de l'ADN de bonne qualité à partir d'une très petite quantité de matériel végétal. La qualité de l'ADN qui est ainsi extrait permet de réaliser des amplifications par PCR de fragments de grande taille (de plus de 3 kpb), et autorise une longue conservation afin de pouvoir si nécessaire reproduire les expérimentations ou bien en réaliser de nouvelles.

Références bibliographiques

Stein N, Herren G, Keller B (2001) A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* **120** : 354-356.

Saintenac C et al. (2018) Wheat receptor kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genet* **50**: 368-374.

Annexes

Préparation des solutions employées pour le protocole d'extraction d'ADN

Préparation des solutions tampon

Préparation de Na₂EDTA 0.5 M au pH 8.0 (Na₂EDTA : sel disodique de l'acide éthylènediaminetétracétique dihydrate)

produits chimique	Concentration finale	Poids moléculaire
Na ₂ EDTA	0.5M	372.24 g/mol

L'EDTA ne se dissout qu'à un pH basique, le pH de la solution est ajusté à 8 par l'ajout de pastilles de soude. Cette solution est stérilisée pendant 20 min à l'autoclave à une température de 120° C.

Préparation Tris HCl 1M (Tris : Trizma base - HCl : acide chlorhydrique)

produits chimique	Concentration finale	Poids moléculaire
Tris HCl	1M	121.14 g/mol

On prépare 920 mL de solution à laquelle on additionne 42 mL d'acide chlorhydrique concentré et on ajuste la solution afin d'obtenir un pH à 8. Cette solution est stérilisée pendant 20 min à l'autoclave à une température de 120° C.

Préparation du tampon d'extraction

produits chimique	Concentration finale	Poids moléculaire	Quantité Pour 1Litre
CTAB	2% poids/volume	364.45 g/mol	20 g
Tris HCl 1 M pH 8.0	200mM	121,14g/mol	200 mL
Na ₂ EDTA 0.5 M pH 8.0	20mM	292,24g/mol	40 mL
NaCl	1.4M	58,44 g/mol	81.8 g
PVP 40	1% poids/volume	40 000 g/mol	10 g
2-mercaptoethanol	1% volume/volume	78.13 g/mol	10 mL
Eau Ultra Pure			qsp 1000mL

CTAB : bromure de hexadécyltriméthylammonium est pesée dans un poste sécurisé.

NaCl : chlorure de sodium

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2018 (95)

PVP 40 : polyvinylpyrrolidone

Le β mercaptoethanol est ajouté au tampon d'extraction sous sorbonne après autoclavage.

Préparation du solvant d'extraction

On utilise 24 volumes de dichlorométhane pour 1 volume d'alcool isoamylique.

On ajoute donc 41,6 mL d'alcool isoamylique dans 1 L de dichlorométhane sous sorbonne.

Alcool isoamylique : 3-méthyl-1-butanol

Préparation des solutions de lavage

Solution de lavage 1

produits chimique	Concentration finale	Poids moléculaire	Quantité Pour 1Litre
Acétate de sodium	200mM	82.03 g/mol	16.4 g
Eau Ultra Pure			240 mL
Ethanol 99.5%			760 mL

La dissolution de l'acétate de sodium s'effectue dans de l'eau ultra pure, ensuite on ajoute l'éthanol à la solution.

Solution de lavage 2

Ethanol 70 %

1000 mL éthanol 99 % et 460 mL d'eau ultra pure

Préparation du tampon pour suspendre l'ADN et le conserver

Le tampon le plus couramment utilisé est le TE. Le TE est composé de Tris et EDTA.

Tampon TE 10/1

produits chimique	Concentration finale	Poids moléculaire	Quantité Pour 1Litre
Tris HCl 1 M pH 8.0	10mM	121,14g/mol	10 mL
Na ₂ EDTA 0.5 M pH 8.0	1mM	292,24g/mol	2 mL
Eau Ultra Pure			qsp 1000mL

On vérifie si le pH de solution est à 8, 0 puis on stérilise pendant 20 min à l'autoclave à une température de 120° C.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'INRA », la date de sa publication et son URL).