

PREPARATION D'ADN DE LEVURE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE

PRINCIPE

Cette technique permet l'extraction de l'ADN total des cellules. Suivant le même principe que pour les minipréparation d'ADN de levure, le traitement des cellules se fait à l'aide de la zymolyase en présence de dithiothreitol suivi d'une incubation avec du dodécyl sulfate de sodium (SDS). Les protéines restées en solution avec l'ADN sont ensuite éliminées par traitement à la protéinase K. L'ADN est ensuite purifié sur gradient de sucrose afin d'obtenir l'ADN de haut poids moléculaire. Cette technique permet d'obtenir des fragments d'ADN d'une taille supérieur à 100 kb.

L'ADN peut être quantifié grossièrement sur gel d'agarose ou par mesure de la densité optique à 260 et 280 nm. Il est indispensable que la préparation d'ADN ait été au préalable traitée à la RNase afin de se débarrasser des ARNs qui gêneraient la mesure optique. Si la préparation d'ADN est propre, le rapport de ces absorptions (DO_{260nm}/DO_{280nm}) doit être compris entre 1,8 et 2. Il suffit ensuite de calculer la concentration d'ADN sachant que 1 unité DO_{260nm}/ml correspond à une concentration de 50 μg d'ADN double brin/ml.

MATERIEL

- Pots stériles de centrifugation de 250 ml
- Tubes d'acétate et centrifugeuse rotor SW28
- Etuves à 37°C et 65°C

SOLUTIONS

- Solution 1 (à conserver à 4°C) :

Sorbitol	1 M	pour 100 ml	50 ml de 2 M
Citrate de sodium (ajusté à pH 5,8 avec acide citrique)	100 mM		1 ml de 1 M
EDTA (pH 8)	60 mM		1,2 ml de 0,5 M
Dithiothreitol	20 mM		2 ml de 1 M

- Solution 2 (à faire extemporanément) :

N-lauryl sarcosyl (vol/vol)	3%	pour 100 ml	3 ml
diéthanolamine (pH 9)	500 mM		50 ml de 1 M
EDTA (pH 9)	200 mM		40 ml de 0,5 M
SDS (p/vol)	1%		5 ml de 20%
protéinase K	150 $\mu g/ml$		

- Solution 3 (à conserver à température ambiante) :

Sucrose (p/vol)	n%	pour 100 ml	n g
NaCl	800 mM		16 ml de 5 M
Tris-Cl (pH 8)	200 mM		20 ml de 1 M
EDTA (pH 8)	100 mM		20 ml de 0,5 M

- Zymolyase (100 T) 100 mg/ml (à dissoudre dans du sucrose 10% (p/vol))

PROTCOLE

- La veille, ensemercer à partir d'un patch provenant d'une colonie isolée, 200 ml de milieu YPglu. Incuber pendant la nuit à 30°C sous agitation jusqu'en phase non stationnaire (maximum 10⁸ cellules/ml).
- Centrifuger à 5000 t/min pendant 10 min à 4°C. Eliminer le surnageant et rincer le culot en reprenant les cellules avec 30 ml d'eau distillée à l'aide d'une pipette.
- Centrifuger à 5000 t/min 10 min à 4°C. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre à la pipette le culot de cellules de levure dans 16 ml de solution 1. Répartir les 16 ml de la suspension dans 4 erlens de 100 ml et ajouter 100 µl de la solution de zymolyase par erlen. Incuber 2 heures à 37°C avec une agitation *douce* (indispensable pour ne pas casser l'ADN).
- Vérifier le taux de sphéroplastes : mettre 100 µl de cellules dans 1 ml d'eau distillée et 100 µl de cellules dans 1 ml de sorbitol 1 M.
Dans l'eau, les sphéroplastes éclatent tandis que les cellules non digérées restent intactes, dans le sorbitol les sphéroplastes et les cellules non digérées restent intactes.
- Si le taux de sphéroplastes est suffisant, la suspension dans l'eau s'éclaircit, sinon rajouter de la zymolyase et prolonger l'incubation à 37°C.
- Ajouter à la pipette *doucement* 7 ml de la solution 2. Incuber 3 heures à 65°C avec une agitation *douce* (indispensable pour ne pas casser l'ADN).
- Préparer des gradients de sucrose dans 4 tubes d'acétate comme suit :
 - 12 ml de la solution 3 (sucrose 20%) est placée au fond du tube
 - 12 ml de la solution 3 (sucrose 15%)
 - 3 ml de la solution 3 (sucrose 50%)
- Ajouter à l'aide d'une pipette *retournée* 10 ml des cellules lysées en haut des 4 tubes d'acétate contenant les gradients de sucrose.
- Centrifuger à 26 000 rpm pendant 3 heures à 15°C dans un rotor SW28.
- A l'aide d'une pipette *retournée*, on prélève 7 à 10 ml du fond du gradient. L'ADN de haut poids moléculaire se trouve au fond du tube (grande viscosité).
- Dialyser dans des boudins de dialyse contre du TE à 4°C.
- Concentrer la solution par dépôt du boudin de dialyse sur du NaCl sec.
- Par cette technique, l'ADN peut être quantifié sur gel d'agarose ou par mesure de la densité optique à 260 et 280 nm. Pour cela, diluer 2 µl de la solution d'ADN au 1/500 dans un tube Eppendorf avec de l'eau distillée stérile.
- Transférer dans une cuvette en quartz gravée "QS" (attention TRES fragile).
- Mesurer la densité optique à 260 et 280 nm puis diluer l'ADN dans une solution de TE stérile de façon à obtenir une concentration finale inférieure ou égale à 1 µg/µl.