

1 PREPARATION D'ARN DE LEVURE

PRINCIPE

Pour extraire l'ARN des cellules de levure, on casse rapidement les cellules avec des billes de verre en présence d'un agent chaotropique (LiCl) pour éviter l'action des RNases cellulaires. Le lysat est ensuite traité au phénol/chloroforme acide. Il est important d'équilibrer le phénol à un pH 5 afin de séparer l'ADN, qui se trouve dans la phase phénolique, de l'ARN qui se trouve dans la phase aqueuse à partir de laquelle il est concentré par précipitation à l'éthanol.

L'ARN peut être quantifié grossièrement sur gel d'agarose ou par mesure de la densité optique à 260 et 280 nm. Si la préparation d'ARN 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'ARN sachant que 1 unité DO_{260nm}/ml correspond à une concentration de 40 μg d'ARN simple brin/ml.

SOLUTIONS

ATTENTION : DEPC, diméthylchlorosilane et phénol sont toxiques
manipuler sous hotte et avec des gants

Toutes les solutions utilisées pour préparer des ARN doivent être stérilisées et préparées avec de l'eau distillée contenant du diéthylpyrocarbonate (DEPC) 0,1% afin d'inactiver les RNases. Il est indispensable de manipuler tout le matériel qui sera au contact avec les ARN avec des gants pour éviter la contamination par RNases humaines.

- Eau distillée stérile contenant du DEPC 0,1% (autoclavée 20 min à 120°C pour éliminer le DEPC qui détruit la quasi-totalité des molécules organiques).

- Solution d'extraction (à conserver à température ambiante) :

Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM	pour 1 ml	50 μl de 1 M
NaCl	100 mM		100 μl de 1 M
EDTA	10 mM		200 μl de 0,5 M

- Billes de verre (0,45 mm de diamètre, Glasperlen Braun Biotech International) nettoyées de la façon suivante : mettre les billes dans une solution de HCl 1 M sous agitation, laver abondamment avec de l'eau DEPC 0,1%, les siliconner avec du diméthylchlorosilane, laver abondamment avec de l'eau DEPC 0,1%, sécher sous vide et passer au four à 180°C pendant 20 min.

- Solution de SDS 10% (p/vol)

- Solution phénol pH 5 pour ARNs

- Acétate de sodium (pH 5,3) 3 M stérile

- Éthanol 100% et 70% (conservés à -20°C)

SOLUTIONS POUR LE PROTOCOLE DE L'ENS

- Tampon TES (à conserver à température ambiante) :

Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM	pour 100 ml	1 ml de 1 M
EDTA	10 mM		2 ml de 0,5 M
SDS	0,5%		2,5 ml de 20%

- Solution phénol pH 5 pour ARNs

- Solution de chloroforme

- Acétate de sodium (pH 5,3) 3 M stérile

- Éthanol 100% (conservés à -20°C)

PROTOCOLE

- La veille, ensemercer 12 ml de milieu YPglu avec une colonie isolée et incuber la nuit à 30°C sous agitation.
- Suivre la DO et laisser croître sous agitation jusqu'à $DO_{600nm} = 0,5-0,6$ ce qui correspond à environ 2×10^7 cellules/ml pour SACE et 5×10^7 cellules/ml pour CAGL.
- Centrifuger à 4°C pendant 5 min à 5 000 t/min dans des tubes Falcon de 15 ml.
- Eliminer le surnageant et rincer le culot dans 0,5 ml d'eau DEPC. Il est possible de congeler les cellules à cette étape à -80°C.
- Ajouter 200 μ l de solution d'extraction et environ 2/3 de billes traitées à l'acide.
- Vortexer rapidement pendant 1 min et refroidir pendant 2 min sur la glace.
- Vortexer rapidement pendant 1 min et mettre sur la glace.
- Ajouter 200 μ l de solution d'extraction et 40 μ l SDS 10%.

Porter des gants et des lunettes et travailler sous hotte pour manipuler le phénol/chloroforme.

- Ajouter 400 μ l de phénol pH 5. Vortexer pendant 20 s.
- Incuber pendant 6 min à 65°C. Ne pas mettre sur la glace.
- Centrifuger à température ambiante pendant 1 min à 12 000 t/min.
- Prélever la phase supérieure et la transvaser dans un autre tube, en évitant de prélever la couche de protéines situées à l'interface entre les phases aqueuse et phénolique.
- Refaire l'extraction jusqu'à ce que l'interface soit propre (si la phase aqueuse est de faible volume, rajouter de la solution d'extraction pour l'augmenter et pouvoir prélever sans mousse).
- Centrifuger à température ambiante pendant 1 min à 12 000 t/min puis prélever la phase supérieure et la transvaser dans un autre tube.
- Ajouter 1/10 de volume de NaOAc 3 M et 3 volumes d'éthanol absolu froid. Homogénéiser soigneusement la solution.
- Placer les tubes à -70°C pendant 30 min.
- Centrifuger 5 min à 4°C à 12 000 t/min en orientant tous les tubes de la même façon dans la centrifugeuse.
- Eliminer délicatement les surnageants à la pipette ou avec un cône et rincer les culots avec 1 ml d'éthanol à 70% froid, fermer le tube et le retourner plusieurs fois pour laver le culot.
- Centrifuger brièvement et éliminer délicatement le surnageant.
- Sécher le culot sous vide (Speed-Vac) pendant 5 min ou pendant 30 min à 37°C.
- Dissoudre le culot dans 40 μ l d'eau DEPC et laisser à 4°C pendant 30 min. Les ARNs sont conservés à -80°C.
- Par cette technique, l'ARN peut être quantifié sur gel d'agarose ou par mesure de la densité optique à 260 et 280 nm. Pour cela, diluer 2 μ l de la solution d'ARN au 1/500 dans un tube Eppendorf avec de l'eau distillée stérile. Transférer dans une

cuvette en quartz gravée "QS" (attention TRES fragile) et mesurer la densité optique.

PROTOCOLE DE L'ENS

- La veille, ensemercer 5 ml de milieu YPglu avec une colonie isolée et incuber la nuit à 30°C sous agitation.
- A partir de cette culture, diluer les cellules et ensemercer 50 ml de milieu YPglu (ensemencer à 3×10^6 cellules/ml pour 4 générations donc environ 5 h à 30°C).
- Suivre la DO et laisser croître sous agitation jusqu'à $DO_{600nm} = 0,5-0,6$ ce qui correspond à environ 2×10^7 cellules/ml pour SACE et 4×10^7 cellules/ml pour CAGL.
- Centrifuger à 4°C pendant 5 min à 5 000 t/min dans des tubes Falcon de 50 ml.
- Eliminer le surnageant et rincer le culot dans 5 ml d'eau DEPC. Il est possible de congeler les cellules à cette étape à -80°C.
- Ajouter 1,2 ml de tampon TES et répartir les cellules dans 3 tubes Eppendorf.

Porter des gants et des lunettes et travailler sous hotte pour manipuler le phénol/chloroforme.

- Ajouter 400 μ l de phénol pH 5.
- Incuber pendant 20 min à 65°C en vortexant toutes les 5 min.
- Refroidir à -80°C pendant 30 min puis incuber 5 min à 65°C.
- Centrifuger à température ambiante pendant 10 min à 15 000 t/min.
- Prélever la phase supérieure et la transvaser dans un autre tube, en évitant de prélever la couche de protéines situées à l'interface entre les phases aqueuse et phénolique. Refaire une seconde extraction.
- Ajouter 300 μ l de chloroforme à la phase aqueuse. Vortexer les tubes 3 fois 20 sec.
- Centrifuger à température ambiante pendant 2 min à 15 000 t/min.
- Prélever la phase supérieure et la transvaser dans un tube contenant 30 μ l de NaOAc 3 M pH 5,3. Ajouter 600 μ l d'éthanol absolu froid. Homogénéiser soigneusement la solution.
- Incuber à -20°C pendant 1 heure.
- Centrifuger 15 min à 4°C à 15 000 t/min en orientant tous les tubes de la même façon dans la centrifugeuse.
- Sécher les culots sous vide (Speed-Vac) pendant 5 min ou pendant 30 min à 37°C.
- Dissoudre les 3 culots dans les mêmes 100 μ l d'eau. Les ARNs sont conservés à -80°C.
- Quantifier les ARNs sur gel d'agarose (déposer 1/10 de 1 μ l) ou par mesure de la densité optique à 260 et 280 nm.
- La purification des ARNs se fait avec le mini kit Quiagen (ref 74106).
- Eluer la colonne avec 50 μ l d'eau la première fois, ensuite éluer avec les mêmes 50 μ l.
- Quantifier les ARNs purifiés, 10 μ g sont nécessaires pour la synthèse des ADNc.