



EXTRACT-ALL®
REACTIF POUR L'ISOLEMENT DES ARN / ADN / PROTEINES

1/ INTRODUCTION :

Les progrès récents des techniques d'isolement des ARN ont permis de remplacer les protocoles longs et fastidieux par des méthodes en une seule étape.

Ainsi l'EXTRACT-ALL® est un réactif prêt-à-l'emploi permettant l'isolement simultané des ARN, ADN et protéines totaux à partir de tissus ou de cellules d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne ou de levures. Les tests en laboratoire ont montré l'efficacité d'EXTRACT-ALL® ainsi que son exceptionnelle reproductibilité.

2/ UTILISATION :

EXTRACT-ALL® renferme du phénol ainsi que de l'isothiocyanate de guanidine. L'échantillon est homogénéisé dans cette solution.

Après addition de chloroforme, l'homogénat se sépare en trois phases : aqueuse, interphase et organique.

Les ARN restent exclusivement dans la phase aqueuse, les ADN dans l'interphase et les protéines dans la phase organique. Les ARN sont précipités de la phase aqueuse par addition d'isopropanol, lavés par l'éthanol et solubilisés dans l'eau.

Les ADN sont précipités de l'interphase et de la phase phénolique avec de l'éthanol, alors que les protéines sont précipitées du surnageant phénol-éthanol par de l'isopropanol.

Les ADN et protéines sont également lavés par l'éthanol et solubilisés dans l'eau.

3/ REACTIFS FOURNIS :

EXTRACT-ALL® Flacons de 50, 100 ou 200 ml

Stockage : 2-8°C, NE PAS CONGELER

Stabilité : Jusqu'à 12 mois (se référer à la date de péremption indiquée sur l'étiquette).

4/ ISOLEMENT DES ARN :

En dehors de toute autre précision, les manipulations se font à température ambiante.

Homogénéisation :

1ml de EXTRACT-ALL® pour 50-100 mg de tissu, 5-10x10⁶ cellules ou boîte de Pétri 3.5 cm.

Séparation : 1 volume d'homogénat + 0.2 volumes de chloroforme

Précipitation : 1 volume de phase aqueuse + 0.5 ml d'isopropanol

Lavage : 75% éthanol

Solubilisation : eau ou tampon TE

4.1/ Homogénéisation :

Tissus : Homogénéiser 50-100 mg de tissus à l'aide de 1 ml d'EXTRACT-ALL® dans un potter verre-téflon ou au Polytron. Le volume de l'échantillon ne doit pas excéder 10 % du volume d'EXTRACT-ALL® utilisé pour l'homogénéisation.

Cellules : Les cellules cultivées en mono-couche sont lysées directement dans la boîte de Pétri par addition de 1 ml d'EXTRACT-ALL® (pour une boîte de 3,5 cm) puis aspirations successives dans un corps de pipette. Les cellules cultivées en solution sont sédimentées puis lysées à raison de 1 ml d'EXTRACT-ALL® pour 5-10 x 10⁶ cellules.

Il est déconseillé de laver les cellules avant addition d'EXTRACT-ALL® car on risque de provoquer la dégradation des ARNm.

Liquides biologiques : Ajouter 0,75 ml d'EXTRACT-ALL® à 0,25 ml d'échantillon puis lyser les cellules en suspension par pipetages successifs.

4.2/ Extraction :

Après homogénéisation, laisser l'homogénat à température ambiante pendant 5 min. pour permettre la complète dissociation des complexes nucléoprotéiques.

Puis ajouter 0,2 ml de chloroforme par ml d'EXTRACT-ALL®, boucher et agiter vigoureusement pendant 15 secondes. Laisser reposer à température ambiante pendant 2-3 min. Centrifuger l'homogénat à 12.000 g (max.) pendant 15 min. à 4°C.

Après centrifugation, l'homogénat présente trois phases :

la phase inférieure phénol-chloroforme rouge, l'interphase de couleur blanchâtre et la phase aqueuse supérieure qui est incolore.

Les ARN restent exclusivement dans la phase aqueuse alors que les ADN et les protéines sont dans l'interphase et la phase organique. Le volume de la phase aqueuse est d'environ 60 % du volume d'EXTRACT-ALL® utilisé pour l'homogénéisation.

4.3/ Précipitation des ARN :

Transférer la phase aqueuse dans un tube propre et rajouter l'isopropanol dans les proportions de 0,5 ml d'isopropanol pour 1 ml d'EXTRACT-ALL® utilisé pour l'homogénéisation. Mélanger puis laisser à température ambiante pendant 5-10 min. Centrifuger ensuite à 12.000 g pendant 10 min à 4 °C. Les ARN forment un précipité blanchâtre au fond du tube.

4.4/ Lavage des ARN :

Éliminer le surnageant et laver le culot d'ARN une fois par l'éthanol à 75 % en vortexant puis en centrifugeant à 7.500 g pendant 5 min. à 4°C. Ajouter au moins 1 ml d'éthanol 75% pour 1 ml d'EXTRACT-ALL® utilisé au départ.

4.5/ Solubilisation des ARN :

Sécher brièvement le culot d'ARN soit à l'air soit sous vide (5-10 min.). Il est important de ne pas laisser le culot d'ARN sécher complètement sinon il sera difficile à solubiliser.

Ne pas sécher au Speed-Vac.

Dissoudre le culot d'ARN dans l'eau ultra-pure (Réf. 018338-018339) ou le tampon TE (Réf. 018768-018769).

Vortexer.

Une incubation de 10-15 min. à 55-60 °C peut être nécessaire.

La préparation finale d'ARN totaux est libre de contaminant ADN ou protéique et présente un rapport $A_{260}/A_{280} > 1,8$.

Les rendements théoriques sont :

- Tissus (en µg/mg de tissu) : foie, rate, 7-10 µg; rein, 3-4 µg; muscles, cerveau, 1-1,5 µg; placenta, 1-4 µg.
- Cellules (en µg/10⁶ cellules) : cellules épithéliales, 10-15 µg; fibroblastes, 5-7 µg

4.6/ Remarques :

a-Pour l'isolement des ARN à partir de peu de cellules ou d'une faible quantité de tissu (1-10 mg), homogénéiser l'échantillon dans 0,8 ml d'EXTRACT-ALL®; transférer l'homogénat dans un tube Eppendorf puis suivre le protocole standard à l'exception de la précipitation qui est réalisée pendant 30 min. à 4 °C.

b-Après homogénéisation (avant l'addition de chloroforme) les échantillons peuvent être stockés à – 70 °C pendant au moins 2 semaines.

c-Une étape de précipitation supplémentaire peut être nécessaire en particulier si les ARN isolés doivent être utilisés dans une réaction enzymatique.

Après solubilisation, précipiter les ARN en présence de NaCl 0,2 M avec 2 volumes d'éthanol pendant 15 min. à 4°C.

d-La poussière et le contact des doigts sont les principales sources de contamination par les RNases. Utiliser des gants et maintenir les tubes fermés.

5/ ISOLEMENT DES ADN :

Les ADN sont isolés à partir de l'interphase et de la phase phénolique obtenue lors de l'homogénéisation initiale. L'ADN est précipité par l'éthanol, lavé, solubilisé dans une solution de NaOH 8 mM, neutralisé puis utilisé pour analyse.

Précipitation phase phénolique et interphase + 0,3 ml éthanol

Lavage 1 ml sodium citrate 0,1M dans l'éthanol 10 %;
2 ml d'éthanol 75 %

Solubilisation NaOH 8 mM

5.1/ Précipitation des ADN :

Éliminer la phase aqueuse résiduelle recouvrant l'interphase. Cette étape est déterminante pour la qualité des ADN extraits. Ajouter 0,3 ml d'éthanol 100 % pour 1 ml d'EXTRACT-ALL® utilisé pour l'homogénéisation initiale. Mélanger par inversions. Laisser ensuite pendant 2-3 min. à température ambiante. Centrifuger à 2.000 g pendant 5 min. à 4 °C.

5.2/ Lavage des ADN :

Éliminer avec précaution le surnageant phénol-éthanol et le réserver pour l'extraction des protéines. Laver le culot d'ADN deux fois par du sodium citrate 0,1 M dans l'éthanol 10 %.

Ajouter 1ml de solution de lavage par ml d'EXTRACT-ALL utilisé pour l'homogénéisation initiale. Laisser le culot d'ADN dans la solution de lavage pendant 30 min. à température ambiante (mélanger de temps en temps).

Centrifuger à 2.000 g pendant 5 min. à 4°C. Renouveler le lavage.

Après deux lavages, suspendre le culot d'ADN dans l'éthanol 75 % (1,5-2 ml pour 1 ml d'EXTRACT-ALL® de départ) et laisser 10-20 min. à température ambiante (mélanger de temps en temps).

Centrifuger à 2.000g pendant 5 min. à 4°C.

5.3/ Solubilisation des ADN :

Sécher brièvement le culot d'ADN pendant 5-10 min. sous vide puis dissoudre dans NaOH 8 mM.
Ajouter la quantité de NaOH 8 mM nécessaire pour obtenir une concentration finale d'environ 0,2-0,3 µg/ml. (classiquement on utilise 0,3-0,6 ml de NaOH 8 mM pour l'ADN obtenu à partir de 50-70 mg de tissu ou de 10⁷ cellules).
La solubilisation doit être complète. A cette étape il peut néanmoins rester du matériel insoluble (à l'aspect gélatineux) provenant de fragments membranaires, etc... Eliminer ces éléments insolubles par une centrifugation à 12.000 g pendant 10 min.
Récupérer le surnageant.
Une forte viscosité du surnageant indique la présence d'ADN de haut poids moléculaire.

5.4/ Quantification des ADN :

Prélever un aliquot de la préparation d'ADN, mélanger à de l'eau et mesurer la DO à 260nm.
Calculer la quantité d'ADN : 1 unité A₂₆₀ correspond à 50 µg d'ADN double-brin/ml.
Pour le calcul du nombre de cellules dans l'échantillon analysé, considérer que la quantité d'ADN pour 10⁶ cellules diploïdes d'origine humaine, rat ou souris est de 7,1 µg, 6,5 µg et 5,8 µg respectivement.

Une préparation type isolée de tissus est composée d'ADN 60-100 kb (70 %) et d'ADN ≈ 20kb (30 %).
L'ADN extrait de cellules en culture renferme plus de 80 % d'ADN de 60-100 kb et moins de 10 % d'ADN ≈20kb.

La préparation d'ADN est exempte d'ARN et de protéines et présente un rapport A₂₆₀/A₂₈₀ >1,7.

Rendements théoriques :

- Tissus (en µg ADN/mg de tissu) : foie, rein, 3-4 µg, muscles, cerveau et placenta, 2-3 µg.
- Cellules humaines, de rat ou de souris: 5-7 µg d'ADN/10⁶ cellules.

5.5/ Amplification de l'ADN par PCR* :

Après solubilisation en NaOH 8 mM, ajuster le pH à 8,4 à l'aide d'une solution d'HEPES 0,1 M ou 1 M selon le tableau ci-dessous.
Ajouter un aliquot de l'échantillon (typiquement 0,1-1 µg d'ADN) au milieu réactionnel de PCR* et réaliser l'amplification selon votre protocole standard.

Pour 1 ml de NaOH 8 mM utiliser les quantités suivantes :

pH final	HEPES 0,1 M (µl)	pH final	HEPES 1 M (µl)
8,4	66	7,2	30
8,2	90	7,0	42
8,0	115		
7,8	135		
7,5	180		

5.6/ Remarques :

a-Si nécessaire, la phase phénolique et l'interphase peuvent être stockées à 4 °C une nuit.
Les échantillons solubilisés en NaOH 8 mM peuvent être stockés à 4 °C une nuit; pour un stockage prolongé ajuster le pH à 7-8 et compléter avec de l'EDTA 1 mM.

b-Le poids moléculaire des ADN obtenus dépend de la méthode d'homogénéisation choisie. Afin d'obtenir des ADN de haut poids moléculaire, éviter d'utiliser un Polytron.

c-Ne pas raccourcir les temps d'incubation des échantillons en présence de la solution de lavage. Ce sont les durées minimales pour lesquelles on aura une élimination efficace du phénol du culot d'ADN.

6/ ISOLEMENT DES PROTEINES :

Les protéines sont extraites à partir du surnageant phénol-éthanol obtenu après précipitation de l'ADN par l'éthanol (cf. 5.1).

Précipitation : surnageant phénol-éthanol + 1,5 ml isopropanol

Lavage 2 ml de chlorhydrate de guanidine 0,3 M en solution dans l'éthanol 95 %
2 ml éthanol 75 %

Solubilisation : 1 % SDS

En dehors de toute autre précision, les manipulations se font à température ambiante.

6.1/ Précipitation des protéines :

Précipiter les protéines du surnageant phénol-éthanol par l'isopropanol; ajouter pour cela 1,5 ml d'isopropanol pour 1 ml d'EXTRACT-ALL® utilisé pour l'homogénéisation initiale. Laisser les échantillons au minimum pendant 10 min. à température ambiante. Centrifuger à 12.000 g pendant 10 min. à 4 °C.

6.2/ Lavage des protéines :

Éliminer le surnageant et laver le culot de protéines trois fois par une solution de chlorhydrate de guanidine 0,3 M dans l'éthanol 95 %. Ajouter 2 ml de cette solution par ml d'EXTRACT-ALL® utilisé au départ. Lors de chaque lavage, laisser l'échantillon dans la solution de lavage pendant 20 min. à température ambiante. Centrifuger à 7.500 g pendant 5 min. à 4 °C.

Vortexer ensuite le culot protéique en présence de 2 ml d'éthanol 100 %, laisser pendant 20 min. à température ambiante et centrifuger à 7.500 g pendant 5 min. à 4 °C.

6.3/ Solubilisation des protéines :

Sécher brièvement le culot protéique sous vide pendant 5-10 min. puis le dissoudre dans une solution de SDS à 1 % par pipetages successifs.

Il peut s'avérer nécessaire d'incuber les échantillons à 50 °C pour solubiliser complètement le culot protéique.

Sédimenter tout matériel insoluble par centrifugation à 10.000 g pendant 10 min. à 4 °C puis transférer le surnageant dans un tube propre.

Utiliser immédiatement la préparation protéique ainsi obtenue pour un transfert de type Western ou stocker à -20 °C.

Le culot de protéines repris dans le chlorhydrate de guanidine 0,3 M - éthanol 95 % peut être stocké ainsi pendant au moins un mois à 4°C ou pour au moins un an à -20 °C.

Remarque: l'étape critique dans l'isolement des protéines est l'extraction des protéines à partir du culot en fin de protocole. Pour une meilleure efficacité on peut procéder comme suit :

a-dialyser le surnageant phénol-éthanol contre une solution de SDS à 0,1 % à 4 °C (renouveler trois fois la solution de SDS),

b-centrifuger le dialysat à 10.000 g pendant 10 min. à 4 °C,

c-utiliser le surnageant pour le Western blot.

7/ REFERENCES:

- 1-Chomczynski P. et Sacchi N. (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159
- 2-Chomczynski P. (1993), A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples, *BioTechniques*, **15**, 532-537
- 3-Ausubel F.M., Bront R., Kingston R.E., Moore D.D., Seldmann J.G., Smith J.A. et Struhl K. (1990) Appendix 1, « *Current protocols in Molecular Biology* », Vol. 2, p. A.1.5., Greene Publishing Assoc. & Wiley-Interscience, New-York.

8/ CONDITIONNEMENT :

Conditionnement	Référence
50 ml	GEXEXT04-0T
100 ml	GEXEXT04-0U

* La technologie PCR est couverte par les brevets Hoffmann-La Roche Inc.