

EXTRAIRE L'ADN DU KIWI.

Isoler l'ADN de tissus végétaux.



Niveau : 2^{ème} et 3^{ème} degré

Expérience présentée au stand ...(?)

Matériel nécessaire :

- √ 1 beau Kiwi (√ ± 100 g)
- √ 1 filtre à café
- √ 1 mortier et son pilon
- √ 2 béchers ou récipients en verre ou en plastique (250 ml)
- √ 1 erlenmeyer
- √ 1 entonnoir
- √ une petite passoire
- √ 1 thermomètre
- √ 1 bain-marie
- √ pince en bois
- √ 2 tubes à essai
- √ 1 verre de montre

Produits chimiques

- √ Sel de cuisine : (NaCl ± 3 g)
- √ Ethanol glacé 
- √ Eau déminéralisée
- √ Détergent vaisselle (10 ml)
- √ HCl 1 N (t° ambiante) 
- √ Réactif de Schiff

Sécurité

Les précautions d'usage en T.P seront adoptées avec le bain- marie et la verrerie. Le port de lunettes et de gants de protection est

indispensable pour manipuler l'acide chlorhydrique (HCl) qui est corrosif



Protocole à suivre

1. **Eplucher** le kiwi, couper la pulpe en petits morceaux et déposer dans le mortier.
2. **Préparer le milieu d'extraction** dans un bécher ou un récipient de 250 ml : dissoudre le NaCl dans 20 ml d'eau déminéralisée (en chauffant doucement). Ajouter le liquide de vaisselle. Amener à 100 ml avec de l'eau déminéralisée.
3. **Verser** le milieu d'extraction dans le mortier et broyer avec le pilon jusqu'à obtenir une panade.
4. **Verser** cette mixture dans un bécher (250 ml) et placer le bécher dans le bain-marie maintenu à 60° C pendant 15 min.
5. **Retirer** le bécher du bain-marie et le placer dans un récipient contenant de l'eau glacée (eau + glaçons) pendant 5 min.
6. **Filtrer** la mixture à travers la passoire et extraire un maximum de jus en écrasant la mixture avec le pilon.
7. **Placer** ce premier filtrat dans un entonnoir équipé d'un papier filtre (à café), plié de façon adéquate et filtrer.
8. Verser 10 ml de ce second filtrat dans un tube à essai propre.
9. **Verser** l'éthanol glacé, sortant du congélateur dans un tube à essai propre et refroidi (dans le frigidaire).
10. **Verser** doucement l'éthanol glacé le long de la paroi du tube à essai contenant le filtrat.
11. **Recouvrir** ce tube d'un film étirable et incliner lentement le tube plusieurs fois jusqu'à ce que l'ADN, insoluble

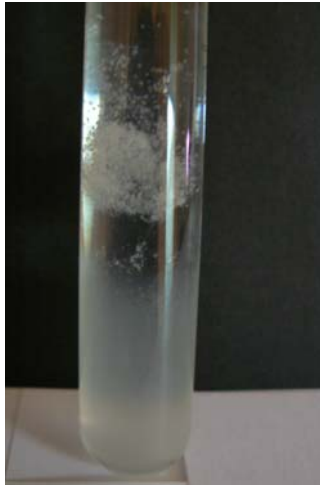
dans l'éthanol, précipite et forme une pelote blanc nacré qui flotte entre 2 couches.

12. **Avec une tige** en verre (agitateur) ou en plastique ou encore avec une pipette Pasteur, prélever le précipité et le placer dans un verre de montre.
13. **Colorer selon la technique de Feulgen qui colore spécifiquement l'ADN :**
Rincer le précipité à l'eau déminéralisée pendant 10 s. et absorber l'eau avec du papier absorbant.
Ajouter HCl 1N à t° ambiante, ensuite rincer à nouveau à l'eau déminéralisée plusieurs fois.
14. **Ajouter** quelques gouttes du réactif de Schiff.

Vous observez

Le précipité se colore en rose à magenta. Il s'agit bien de l'ADN du kiwi.

Que s'est-il passé ?



Dans cette expérience, Le **broyage** détruit les parois cellulosesiques des cellules végétales. Le **détergent vaisselle** détruit les membranes phospholipidiques (cellulaire et nucléaire). Le **sel (NaCl)** précipite l'ADN enroulé autour des histones de nature protéique (phénomène du « salting out »). Le **chauffage** au bain-marie (**60°**) détruit les enzymes qui digèrent l'ADN. Dans cette expérience, il est inutile d'ajouter une protéase pour détruire les protéines car le kiwi contient **ses propres protéases**. Le papier filtre de laboratoire a des pores trop petits pour laisser passer l'ADN et c'est la raison pour laquelle on utilise des **filtres à café** dont les pores sont plus grands.

L'éthanol glacé glisse lentement le long de la paroi du tube et flotte à la surface tandis que **l'ADN** flotte à l'interface éthanol - filtrat.

L'ADN est insoluble dans l'éthanol glacé.

Commentaires et photos (B. Lourtie)

Approfondir le sujet

- **Refaire cette expérience avec une banane en ajoutant un comprimé de déprotéinisation** (pour le nettoyage de lentilles de contact) au second filtrat et laisser reposer quelques minutes. Qu'observez-vous ?

Technique de labo.

Préparation du réactif de Schiff pour la méthode de coloration de Feulgen

1. 200 cc d'H₂O bouillante
2. **dissoudre** 1 g de Fuschine basique dans l'eau bouillante, agiter et laisser refroidir à 50° C.
3. **Filtrer**
4. Ajouter 30 ml d'HCl 1N
5. Ajouter 3 g de bisulfite de potassium (K₂S₂O₅)
6. **Laisser décolorer** pendant 24 h à l'obscurité.
7. **Purifier** avec du « noir animal ».
8. **Filtrer et conserver** au réfrigérateur, à l'obscurité dans un récipient étanche.