



TECHNIQUE D'EXTRACTION DE L'ARN D'UNE CULTURE CELLULAIRE PAR LE TRIZOL

TECHNIQUE FOR EXTRACTING RNA FROM CELL CULTURE BY TRIZOL

| Gueyraud Rolland Kipré ^{1*} | Hriday Shankar Pandey ² | Pankaj Seth ² | and | Allico Joseph Djaman ^{1,3} |

¹. Université Félix Houphouët-Boigny | UFR Biosciences | Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique | Abidjan | Côte d'Ivoire

². National Brain Research Centre | NH-8, Manesar, Gurugram | Inde |

³. Institut Pasteur de Côte d'Ivoire | Laboratoire de Biochimie | Abidjan | Côte d'Ivoire |

| Received 8 May 2019 |

| Accepted 20 June 2019 |

| Published 05 July 2019 |

| ID Article | Kipré-Ref.5-ajira080619 |

RESUME

Introduction : Les méthodes d'extraction et de purification des ARN se sont considérablement simplifiées depuis la méthode décrite par Chirgwin en 1979, cependant isoler des ARN purifiés et non dégradés à partir d'échantillons biologiques reste une étape préanalytique délicate de laquelle dépend la réussite des applications réalisées en aval **Objectif :** Ce travail a pour objectif d'extraire de l'ARN purifié et non dégradé à partir du Trizol. **Méthode :** La méthode utilisée est la séparation de l'ADN et l'ARN par le Trizol. **Conclusion :** Cette technique d'extraction de l'ARN par le Trizol a permis d'obtenir des ARN assez purs et non dégradés. Cette méthode est particulièrement avantageuse dans les situations où les cellules ou les tissus sont enrichis en ARNases endogènes ou lorsque la séparation de l'ARN cytoplasmique de l'ARN nucléaire est peu pratique

Mots-clés: ARN, Culture cellulaire, Trizol.

ABSTRACT

Introduction: The methods for extracting and purifying RNA have been considerably simplified since the method described by Chirgwin in 1979, however, isolating purified and undegraded RNA from biological samples remains a delicate pre-analytical step on which the success of downstream applications depends. **Objective:** The objective of this work is to extract purified and undegraded RNA from Trizol. Method: The method used is the separation of DNA and RNA by Trizol. **Conclusion:** This technique of extraction of RNA by Trizol has made it possible to obtain fairly pure and undegraded RNA. This method is particularly advantageous in situations where cells or tissues are enriched with endogenous RNAases or where the separation of cytoplasmic RNA from nuclear RNA is impractical

Keywords: RNA, Cell culture, Trizol.

1. INTRODUCTION

Les progrès considérables réalisés au cours de ces dernières années dans le séquençage du génome humain, ainsi que celui de nombreux virus et bactéries, associés à la mise au point de nouveaux outils (développement de la PCR en temps réel par exemple) amènent de plus en plus de laboratoires à travailler sur les produits d'expression des gènes. À l'échelle qualitative utilisée depuis de nombreuses années (présence ou non d'un transcrit spécifique) s'est récemment ajoutée une échelle quantitative, ouvrant de nouveaux champs d'applications en génétique, cancérologie, virologie, infectiologie et hématologie. Il est possible de quantifier avec précision désormais une charge virale, marqueur de suivi de l'efficacité thérapeutique, et de caractériser des gènes exprimés dans des cellules uniques ou dans des tissus tumoraux. Par ailleurs, le rôle central de l'ARN messager (ARNm) dans la transmission de l'information génétique le rend de plus en plus utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour des études de criblage à haut débit. Si les méthodes d'extraction et de purification des ARN se sont considérablement simplifiées depuis la méthode décrite par Chirgwin en 1979 [1], isoler des ARN purifiés et non dégradés à partir d'échantillons biologiques reste une étape préanalytique délicate de laquelle dépend la réussite des applications réalisées en aval.

2. PRINCIPE

L'utilisation du Trizol permet de séparer ARN, ADN et protéines en fonction de leurs densités relatives [2].

3. MATERIEL ET METHODOLOGIE

3.1 Matériel

- Centrifugeuse réfrigérée,
- Culture cellulaire conservée à -30°C,
- Hotte à flux laminaire,
- Tube Eppendorf de 2 mL,
- Pipetman de 200 µL et 1 mL,
- Réfrigérateur à -30°C,
- Spatule en plastique,
- Réactifs : Trizol, Isopropanol, Ethanol 75%,

3.2 Méthode

3.2.1 Homogénéisation

- Faire sortir la culture cellulaire de l'étuve à CO₂,
- Enlever tout le milieu de culture du Flask de culture,
- Ajouter 1 mL de Trizol dans le flask de culture cellulaire,
- Laisser au repos pendant 5 min à la température de la salle,
- Après les 5 min, prendre la spatule pour détacher les cellules adhérentes au flask

3.2.2 Séparation de phases

- Transvaser le contenu du flask de culture dans des tubes Eppendorf de 2 mL,
- Refermer les tubes et bien mélanger vigoureusement à la main afin d'éviter que les cellules ne prennent en masse,
- Ajouter 200 µL de chloroforme au mélange des tubes Eppendorf (*il faut toujours 200 µL de chloroforme pour 1 mL de Trizol utilisé*),
- Refermer les tubes et mélanger vigoureusement à la main,
- Après mélange laisser les tubes au repos pendant 5 min à la température de la salle,
- Après les 5 min, centrifuger les tubes à 12000 tr/min pendant 15 min à 4°C ;

Après centrifugation, on obtient trois phases :

- *une phase aqueuse supérieure contenant l'ARN,*
 - *une phase intermédiaire mousseuse contenant l'ADN,*
 - *une phase inférieure rougeâtre contenant les protéines,*
- Récupérer chacune de ses phases dans un tube Eppendorf de 2 mL,

3.2.3 Précipitation de l'ARN

- A la phase aqueuse récupérée, ajouter 500 µL d'isopropanol,
- Refermer le tube et agiter délicatement jusqu'à homogénéisation totale,
- Laisser ensuite le tube au repos à la température de la salle pendant 10 min,

- Après les 10 min, centrifuger à 12000 tr/min pendant 20 min à 4°C,
- Après les 20 min, rejeter le surnageant et ajouter 1 mL d'éthanol 75%,
- Centrifuger à nouveau à 9000 tr/min pendant 5 min à 4°C,
- Rejeter le surnageant et conserver le culot d'ARN

3.2.4 Lavage de l'ARN :

- Ajouter 500 µL à 1 mL d'alcool 75% au culot d'ARN et mélanger au Vortex pendant 15 s,
- Centrifuger le mélange à 9000 tr/min (7500g) pendant 5 min à 4°C,
- Rejeter le surnageant et répéter l'opération de lavage une seconde fois,
- Après le 2^{ème} lavage, ajouter 500 µL d'éthanol 75% sans mélanger. L'ARN peut être ainsi conservé à -37°C pour une utilisation ultérieure.

4. RESULTATS

On obtient ainsi des ARN totaux non dégradés qui peuvent être utilisés pour des tests futurs.

5. CONCLUSION

Cette technique d'extraction de l'ARN par le Trizol a permis d'obtenir des ARN assez purs et non dégradés. Cette méthode est particulièrement avantageuse dans les situations où les cellules ou les tissus sont enrichis en RNases endogènes ou lorsque la séparation de l'ARN cytoplasmique de l'ARN nucléaire est peu pratique [3].

Note

- *La préparation d'ARN est plus délicate que celle d'ADN car les ribonucléases (RNases) sont très répandues (par ex. sur les doigts) et sont fréquemment capables de se renaturer après de nombreux traitements (même la dénaturation par la chaleur).*
- *les contaminations sont minimisées par le port de gants, l'utilisation de vaisselle et de solutions stériles et/ou traitées au DEPC (agent inhibiteur des RNases).*

6. REFERENCES

- 1.Chirgwin JM, Prybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979 ; 18 : 5294-9.
- 2.Sidiropoulos M, Chang A, Jung K, Diamandis EP. Expression and regulation of prostate androgen regulated transcript-1 (PART-1) and identification of differential expression in prostatic cancer. *Br J Cancer* 2001 ; 85 : 393-7.
- 3.Donald C. Rio, Manuel Ares Jr, Gregory J. Hannon and Timothy W. Nilsen. Purification of RNA using Trizol. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010



Cite this article: **Gueyraud Rolland Kipré, Hriday Shankar Pandey, Pankaj Seth, and Allico Joseph Djaman.** TECHNIQUE D'EXTRACTION DE L'ARN D'UNE CULTURE CELLULAIRE PAR LE TRIZOL. *Am. J. innov. res. appl. sci.* 2019; 8(5): 27-29.

This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>