

Extraction d'ADN avec le kit Nucleospin DNA insect.

L'extraction est réalisée sur des tiques, en salle biologie moléculaire (S13).

1/ Nettoyage des tiques

Si les tiques sont reçues conservées dans de l'éthanol, un lavage doit-être effectué.

a. Matériel

- Boite de pétri
- Eau MQ stérile
- Sopalin

b. Protocole

- 1- Mettre l'eau MQ dans les boites de pétri.
- 2- Effectuer 2 bains successifs de 5 min dans des boites de pétri différentes.
- 3- Sécher les tiques sur le sopalin avant de les transférer dans le tube à vis fourni dans le kit, annoté sur le côté et sur le bouchon (couper la tique si celle-ci est volumineuse).
- 4- Conserver à -20°C si la suite du protocole n'est pas poursuivie dans la journée.

2/ Broyage et extraction d'ADN des tiques

a. Matériel

- Broyeur Precellys
- Kit extraction ADN Nucleospin DNA insect
- Bain sec
- Eppendorf 1.5 ml

A vérifier avant de commencer :

- L'éthanol 96-100% doit être ajouté dans le wash buffer B5
- Allumer le bain sec à l'avance

b. Protocole

[Lyse]

- 1- Ajouter 100 µl de tampon d'élution BE dans le tube à vis contenant la tique + 40 µl du tampon de lyse MG + 10 µl de protéinase K liquide. (en ouvrant les tubes, vérifier que la tique est dans le tube et non coincée dans le bouchon ou dans le joint du bouchon)
- 2- Broyeur Precellys : mettre les tubes sur le support (pas besoin d'équilibrer, bien refermer les bouchons) et remettre la plaque blanche sur son support et lancer le programme 3 : 5500 mouvements pendant 20 sec, 2 cycles. (2 cycles suffisent généralement, mais si le broyage n'est pas satisfaisant, refaire un cycle, à condition que les bouchons des tubes ne soient pas fêlés (risque de rupture du tube)).
- 3- Centrifuger les tubes 30 sec à 11000g pour enlever les bulles et nettoyer le bouchon (ne pas centrifuger plus longtemps ou plus vite). En ouvrant les tubes pour l'étape suivante vérifier que la tique est bien broyée.

[Fixation de l'ADN]

- 4- Ajouter 600µl de tampon MG et vortexer 6 sec (les billes doivent être agitées dans le tube), puis centrifuger les tubes 30 sec à 11000g.

- 5- Mettre un micro tube contenant le volume nécessaire de tampon d'élution (BE) à chauffer à 70°C.

6- Transférer le lysat dans la colonne verte et centrifuger 30 sec à 11000g (augmenter le temps de centri si des débris colmatent la membrane). Le faire en 2 fois car volume lysat >600µl (charger 600 puis <200µl). Jeter l'éluat et mettre la colonne dans un nouveau tube de collection.

[Lavages]

7- Ajouter 500 µl de tampon BW et centrifuger pendant 30 sec à 11000g. Eliminer l'éluat.

8- Ajouter 500 µl de tampon B5 et centrifuger 30 sec à 11000g. Eliminer l'éluat.

[Assèchement de la membrane]

9- Centrifuger la colonne à sec 1 min à 11000g pour sécher la membrane.

10- Mettre la colonne dans un micro-tube 1.5ml annoté.

[Elution]

11- Ajouter 30 µl de tampon d'élution BE chaud. Bien le déposer au centre de la membrane, sans la toucher.

12- Incuber 3 min à T°C ambiante (permet à la membrane de se réhydrater et de libérer l'ADN) et centrifuger 1 min à 11000g.

13- Ajouter 20 µl de tampon d'élution BE chaud comme précédemment.

14- Incuber 3 min à T°C ambiante et centrifuger 1 min à 11000g.

15- Jeter la colonne et conserver ADN à -20°C.

Gestion des déchets : les éluats des colonnes sont mis dans des bouteilles prévues à cet effet, rien ne doit être jeté dans l'évier.