

Extraction d'ADN avec le kit Nucleospin tissue « Genomic DNA from tissue », « Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells ».

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
- Tubes à vis contenant 6 billes en inox
- 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 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 des tiques

a. Matériel

- Broyeur Precellys
- Milieu DMEM + 10 % SVF ou tampon de lyse du kit utilisé (bien solubilisé)

b. Protocole

- 1- Ajouter 300 µl de milieu [DMEM + 10%SVF] ou 180 µl de tampon de lyse T1 dans le tube à vis contenant la tique.
- 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 X 2 cycles. 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 pour enlever les bulles 11000g voire plus, pendant 15 min ou plus si besoin. (1min ou 1min30 min à 11000g pour tube en DMEM)
- 4- Si le broyage a été effectué dans le tampon de lyse T1, transférer le lysat dans un tube 2ml. Si le broyage a été effectué dans le milieu DMEM, prélever 100 µl du lysat et le transférer dans un tube 2 ml contenant 180µl de tampon de de lyse T1.

NB : Si l'extraction ne peut être faite en 1 seule fois, une congélation peut être effectuée à l'étape 1 « tube à bille + tique » ou après l'étape 4 « lysat T1 dans nouveau tube 2 ml » ou le lysat milieu seul dans un tube 2 ml). Eviter de congeler les tubes contenant les billes et le tampon de lyse (risque d'oxydation des billes).

3/ Extraction ADN

a. Matériel

- Kit extraction ADN Nucleospin tissue
- Bain sec
- Eppendorf 1.5 ml

b. Protocole

A vérifier avant de commencer :

- Proteinase K doit être solubilisée avec le tampon PB
- L'éthanol 96-100% doit être ajouté dans le wash buffer B5
- Avoir de l'éthanol absolu
- Le tampon de lyse T1 doit être limpide, s'il y a de la cristallisation chauffer le flacon à 56°C
- Allumer les bains secs à l'avance

[Lyse]

(Si l'aliquot est en DMEM, mettre 180µl de tampon T1 si cela n'a pas déjà été fait)

1- Ajouter 25 µl de proteinase K solubilisée dans chaque échantillon, vortexer et incuber 3h à 56°C avec une agitation de 850 rpm.

2- Ajouter 200 µl de tampon B3, vortexer vigoureusement et incuber 10 min à 70°C. Vortexer brièvement.

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

[Fixation de l'ADN]

4- Ajouter 210 µl d'éthanol absolu et vortexer vigoureusement. Centrifuger qq sec avec une centri de paillasse pour culotter les gouttes qui seraient sur les parois ou dans le bouchon.

5- Transférer le lysat dans la colonne verte et centrifuger 1 min à 11000g (augmenter le temps de centri si des débris colmatent la membrane). Jeter l'éluat et mettre la colonne dans un nouveau tube de collection.

[Lavages]

6- Ajouter 500 µl de tampon BW et centrifuger pendant 1 min à 11000g. Eliminer l'éluat.

7- Ajouter 600 µl de tampon B5 et centrifuger 1 min à 11000g. Eliminer l'éluat.

[Assèchement de la membrane]

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

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

[Elution]

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

11- 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.

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

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

14- 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.