

Extraction d'ADN avec le kit Nucleospin tissue « Genomic DNA from tissue », « Genomic DNA and viral DNA from blood sample ».

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

Extraction ADN :

a. Matériel

- Kit extraction ADN Nucleospin tissue
- Bain sec
- Eppendorf 1.5 ml et 2ml

b. Protocole

A vérifier avant de commencer :

- Protéinase K doit être solubilisée
- L'éthanol 96-100% doit être ajouté dans le wash buffer B5
- Avoir de l'éthanol absolu

[Lyse]

- 1- Dans un micro-tube 2 ml, mettre 200 µl de sang (équilibré à T°C ambiante) + 25 µl de protéinase K + 200 µl de buffer B3. Vortex vigoureusement.
- 2- Incuber à T°C ambiante pendant 5 min, et vortexer à nouveau.
- 3- Incuber à 70°C pendant 15-30 min avec vortex toutes les 15 min (le sang doit devenir marron).

[Fixation de l'ADN]

- 4- Ajouter 210 µl d'éthanol absolu et vortexer vigoureusement. Faire une centri de quelques sec pour culotter les gouttes.
- 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). Eliminer l'éluat et changer le 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.

[Elution]

- 10- Ajouter 30 µl de tampon d'élution BE préalablement chauffé à 70°C. 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. Bien le déposer au centre de la membrane, sans la toucher.
- 13- Incuber 3 min à T°C ambiante et centrifuger 1 min à 11000g.

14- Jeter la colonne et conserver l'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.