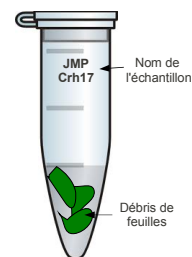


## EXTRACTION DE L'ADN DES PEUPLIERS avec DNeasy® Plant Mini kit de Qiagen

*Il faut absolument éviter 3 écueils : 1° perdre la traçabilité (→ bien nommer les tubes), 2° contaminer les produits (→ changer les embouts de micropipette à chaque prélèvement), 3° ne pas « louper » une seule étape (→ tout oublié ou toute mauvaise manipulation entraîne la nullité de l'opération).*

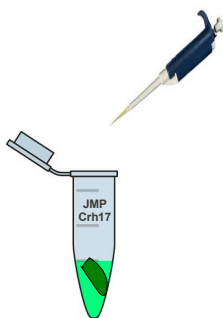


### Mode Opérateur : purification d'ADN

#### Étape 1 : On prélève la matière végétale provenant d'un seul arbre = échantillon

Dans un tube de 1,5ml, **découper** à la main de petits bouts de feuille d'un peuplier et **les enfoncer** dans le tube avec un cure dent. Le volume de feuille ne doit pas dépasser ¼ du tube.

Premier tube



#### Étape 2 : On détruit les cellules (=lyse cellulaire) et l'ARN (molécule proche de l'ADN) qu'elles contiennent

**Ajouter** 400 µl de tampon AP1 et 4 µl de **Rnase**. **Agiter** au vortex vigoureusement. *Attention à ne pas mélanger le tampon AP1 et la RNase avant utilisation.*

Ensuite **placer** l'homogénat au bain à sec pendant 10 minutes à 65°C. Pendant l'incubation **homogénéiser** 2 ou 3 fois par simple renversement.

#### Étape 3 : On neutralise les détergents du tampon précédent, les protéines et les sucres de la cellule

**Ajouter** 300 µl de tampon P3 au lysat, **agiter** et **incuber** pendant 5 minutes sur glace.

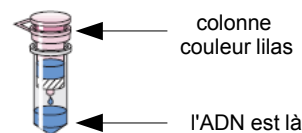
#### Étape 4 : On sépare les gros débris cellulaire de la solution contenant l'ADN

**Centrifuger** le lysat 5 minutes à 20000 g (environ 13000tours/min) → centrifugation par le professeur.

Colonne lilas

#### Étape 5 : On filtre sur colonne la solution pour ne laisser passer que l'ADN

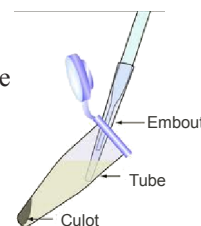
**Verser** la fraction surnageante sur la colonne QIAshredder Mini Spin (couleur lilas), emboîtée sur un tube de 2ml et **centrifuger** pendant 2 minutes à 20000 g (environ 13000tours/min). → centrifugation par le professeur. *Attention si un micro-culot se forme au fond du tube, veillez à ne pas re-suspendre ce culot.*



#### Étape 6 : On récupère la solution contenant l'ADN

**Prélever** à la micropipette sans perturber le micro-culot (technique schéma ci-contre), le filtrat de l'étape 5. **Le mettre** dans un nouveau tube de 1,5 ml.

*En général il est récupéré environ 450 µl de solution, évaluer tout de même le volume avec la micropipette pour l'étape suivante.*



Second tube

#### Étape 7 : On précipite l'ADN pour favoriser sa fixation sur la colonne DNeasy

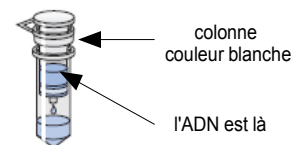
**Ajouter** 1,5 volume du tampon AW1 au lysat et **mixer** immédiatement par pipetage à la micropipette. *Exemple pour 450µl de lysat, ajouter 675 µl de tampon AW1.*

#### Étape 8 : On fixe l'ADN sur la colonne DNeasy et on centrifuge pour le séparer de tous les autres constituants

**Ajouter** 650 µl de la solution de l'étape 7 sur la mini colonne DNeasy (couleur blanche) emboîtée sur un tube de 2 ml. **Centrifuger** 1 minute à  $\geq 6000 \times g$  (correspond à  $\geq 8000 \text{ rpm}$ ).

**Éliminer** la solution filtrée, **conserver** le tube collecteur.

**Renouveler** l'étape 8 avec le reste de l'éluât. **Éliminer** la solution filtrée, **conserver** le tube.



Colonne blanche

#### Étape 9 : On « lave » l'ADN pour le débarrasser de l'alcool contenu dans les tampons précédents

**Placer** la colonne DNeasy Mini Spin sur le tube collecteur précédent, **ajouter** 500 µl de tampon AW2 et **centrifuger** 1min à  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000 \text{ rpm}$ ). Éliminez le filtrat et réutiliser la colonne à l'étape 10.

#### Étape 10 : On sèche la membrane de filtration (avec l'ADN)

**Ajouter** 500 µl de tampon AW2 sur la colonne DNeasy Mini Spin et **centrifuger** 2 minutes à 20,000 x g (14,000 rpm). **Éliminer** le filtrat sans toucher la membrane.

Troisième tube  
Avec bouchon dissocié

#### Étape 11 : On récupère l'ADN

**Transférer** la colonne sur DNeasy Mini Spin sur un nouveau tube de 1,5 ml (*celui au bouchon dissocié*) et **ajouter** 50 µl de solution tampon AE directement sur la membrane, **incuber** 5 minutes à température ambiante (15-25°C) et **centrifuger** 1 minute à  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000 \text{ rpm}$ ) pour éluer.

#### Étape 12 : Pour récupérer la totalité de l'ADN

**Répéter** l'étape 11 dans le même tube. **Fermer** le tube : il renferme l'ADN du peuplier.