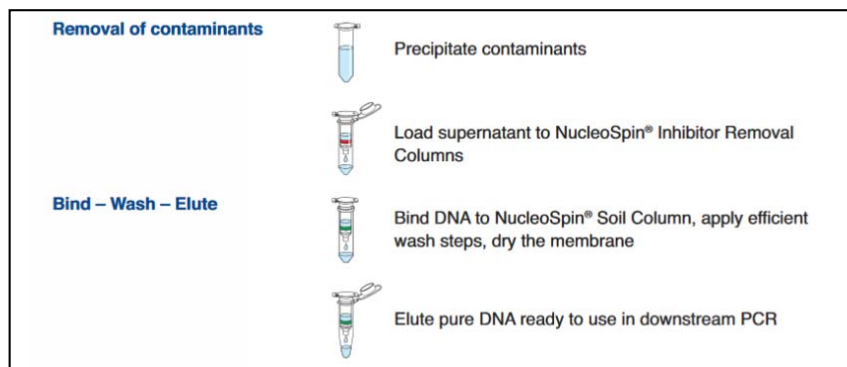


1- Objectif / principe

L'objectif est de purifier des ADN sales après extraction d'ADN de sol, de boues ou de sédiments. La purification se fait en deux étapes, un tamis moléculaire réalisé sur colonne *NucleoSpin Inhibitor Removal Column* et une affinité exclusion sur colonne contenant une membrane de silice, *NucleoSpin Soil Column*.

Ces colonnes sont capables de fixer jusqu'à 50µg d'ADN génomique et une capacité d'éluion entre 30 et 100µL.

Ces deux étapes sont complémentaires et permettent de d'éliminer d'éventuels éléments polluants tels que les protéines, sucres, macromolécules phénoliques, acides humiques...



L'ADN obtenu est conservé à -20°C en DNAtèque et est la base des futures analyses moléculaires.

2- Consignes de sécurité

- Porter obligatoirement une blouse fermée et des gants
- Manipuler les solvants sous sorbonne

3- Matériel et produits nécessaires

Matériel

- Micropipettes
- Centrifugeuse pour tubes 1,5mL – 2mL

Consommable

Microtubes 1,5mL, pointes micropipettes

Solutions à préparer ou à commander

- Ethanol absolu

Références spécifiques à commander

- Kit Nucleospin soil – Macherey Nagel

4- Méthode

Remarque préliminaire : **Porter des gants.**

Ajouter l'éthanol absolu dans le tampon *Buffer SW2*.

ATTENTION SEULEMENT UNE PARTIE DU KIT EST UTILISE POUR PURIFIER

- Ajouter 500 µL d'eau UP à 100 µL d'ADN brut obtenu avec le mode opératoire d'extraction : étape 1
- Homogénéiser par aspiration refoulement puis ajouter **150 µL de solution SL3** du kit
- Homogénéiser par retournement et incubé 5 minutes dans la glace
- Centrifuger 1 minute à 11000 g
- Transférer le surnageant (maximum 600µL) dans la colonne (bouchon rouge) **NucleoSpin Inhibitor Removal Column** (dans un tube collection 2mL LID fourni dans le kit).
- Centrifuger 1 minute à 11000 g (NE SURTOUT PAS ELIMINER L'ELUAT)
- Renouveler l'opération pour passer tout le surnageant dans la colonne puis jeter la colonne (rouge).
- Ajouter 250 µL de tampon **Buffer SB** dans le tube contenant l'éluat, homogénéiser par aspiration refoulement jusqu'à ce que le mélange paraisse homogène.
- Transférer ce mélange (max 600µL) dans une colonne (bouchon vert) **NucleoSpin Soil Column** (dans un tube collection 2mL fourni dans le kit).
- Centrifuger 1 minute à 11000g. Vider le tube et remettre la colonne dedans. Renouveler l'opération s'il reste de l'éluat.
- Ajouter 500 µL de tampon **Buffer SB** dans la colonne.
- Centrifuger 30 secondes à 11000g. Vider le tube et remettre la colonne dans le tube.
- Ajouter 550 µL de tampon **Buffer SW1** dans la colonne. Attention ce tampon est visqueux, il faut le pipeter doucement
- Centrifuger 30 secondes à 11000g. Vider le tube et remettre la colonne dans le tube.
- Ajouter 700 µL de tampon **Buffer SW2** dans la colonne.
- Centrifuger 30 secondes à 11000g. Vider et éponger le tube sur du papier absorbant et replacer la colonne dans le tube.
- Recommencer le lavage avec 700 µL de tampon **Buffer SW2**, centrifuger 30 secondes à 11000g.
- Vider le tube (éponger la colonne et le bord du tube sur papier absorbant) et centrifuger à vide pendant 2 minutes à 11000g pour éliminer l'alcool.
- Annoter les tubes de 1.5 mL (non fourni par le kit) et placer la colonne dans un tube de 1.5 mL.
- Ajouter 30µL de tampon **Buffer SE** dans la colonne.
- Laisser reposer 1 minute à température ambiante (ou dans la glace) et centrifuger 30 secondes à 11000g.
- Renouveler l'opération (20.) pour un meilleur rendement.
- Si l'éluat est encore coloré à cette étape, renouveler le protocole à partir de l'étape 8.

Vous avez obtenu 60µL d'une solution d'ADN en deuxième sortie de colonne qui servira de matrice à toutes les analyses. Ils seront à doser par d'être utilisés. GenoSol réalise les dosages avec le kit QuantiFluor ds DNA system (Promega) et un lecteur de plaque (TECAN infinite Pro 200)*.

La plateforme recommande :

- De stocker les ADN au réfrigérateur à 4°C pas plus de 72h et à -20°C à long terme
- D'éviter les cycles de congélation-décongélation et préférer l'aliquotage

5- Référence(s) bibliographique(s)

PLoS One 2013 July;8(7):e67699. doi:101371/journal.pone.0067699.

Comparison of DNA Extraction Methods in Analysis of Salivary Bacterial Communities

Lazarevic V, Gaia N, Girard M, Francois P, Schrenzel J.