

Etape 2 : Protocole d'extraction et de purification d'ADN

Protocole

L'extraction et la purification de l'ADN sont réalisées avec le kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN). Le kit peut être conservé à température ambiante (15-25°C) jusqu'à 12 mois. Le kit QIAamp DNA Mini contient une solution de Protéinase K prête à l'emploi, qui est conservée à 4°C (réfrigérateur).

Equipement et réactifs à fournir par l'utilisateur :

- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), catalog Nos. 51304 (50) & 51306 (250)
- Ethanol absolu (96-100%) (conservé à 4°C)
- Seringue 2.5 ml avec aiguille de 21 Gx25 mm (Terumo) (VWR_613-3877)
- Micropipettes et pointes stériles avec filtre
- Microcentrifugeuse avec rotor pour microtubes de 1,5-2 ml
- Vortex
- Bain-marie ou bloc chauffant (56°C)
- Tampon PBS 1X (Phosphate-buffered saline), sans Mg & Ca (conservé à 4°C) (Dutscher_702594)

Préparation des solutions :

Préparation des solutions de lavage (flacons Wash Buffer- AW1 et AW2)- Additionner le volume d'éthanol comme indiqué sur le flacon. Les solutions AW1 et AW2 sont stables pendant 12 mois à température du laboratoire (15-25°C).

Préparation de la solution de lyse cellulaire

1. Introduire 220 μ l de tampon **PBS 1X** et 22 μ l de **Protéinase K** dans un microtube de 1,5 ml.
2. Mélanger au vortex pendant 1 seconde et centrifuger brièvement le tube pendant 2 secondes.
3. Additionner 220 μ l du tampon **Buffer AL**. Mélanger au vortex pendant 2-5 secondes et centrifuger brièvement le tube pendant 2 secondes.

Note: *Bien mélanger le tampon Buffer AL avant utilisation. Ne pas ajouter la Protéinase K directement dans le tampon Buffer AL.*

1. Déconnecter l'aiguille et le piston de la seringue.
2. Connecter le **Filtre** (filtre récupéré après la filtration de l'urine) à la seringue, puis l'aiguille, et placer le dispositif dans un microtube de 2 ml.

Note: *Si le filtre a été conservé à -20°C, laissez-le sur la paillasse 5 min à température ambiante avant l'étape de lyse*

3. Introduire 462 μ l de la **solution de lyse cellulaire** à l'intérieur de la seringue, puis réinsérer le piston.

4. Faire passer le lysat 3 fois à travers le filtre par une opération d'aspiration / refoulement en poussant/tirant lentement le piston.

Note: *En cas de formation de mousse, il est recommandé de centrifuger brièvement le tube pendant 2 secondes.*

5. Incuber l'échantillon à 56°C pendant 15 minutes (bain-marie ou bloc chauffant).

6. Centrifuger brièvement l'échantillon d'ADN pendant 2 secondes pour retirer les gouttes du couvercle ou des côtés du tube.

7. Additionner 220 µl d'**Ethanol** à l'échantillon et vortexer 10 secondes. Centrifuger brièvement l'échantillon d'ADN pendant 2 secondes pour retirer les gouttes du couvercle ou des côtés du tube.

8. Introduire l'échantillon (682 µl) à l'intérieur de la colonne **QIAamp Mini spin column** munie d'un **tube collecteur**. Fermer la colonne, et centrifuger à vitesse maximale (14,000 rpm, 16,800 rcf) pendant 1 min. Jeter le filtrat et le tube collecteur.

9. Placer la colonne QIAamp Mini spin column dans un nouveau tube collecteur et introduire 500 µl de la solution de lavage **Buffer AW1**. Fermer la colonne, et centrifuger à vitesse maximale (14,000 rpm, 16,800 rcf) pendant 1 min. Jeter le filtrat et le tube collecteur.

10. Placer la colonne QIAamp Mini spin column dans un nouveau tube collecteur et introduire 500 µl de la solution de lavage **Buffer AW2**. Fermer la colonne, et centrifuger à vitesse maximale (14,000 rpm, 16,800 rcf) pendant 3 min. Jeter le filtrat et le tube collecteur.

Note: Protocole alternatif. *Les étapes 8, 9 et 10 peuvent être réalisées à l'aide du **QIAvac 24 Plus** (Qiagen). Allumer la pompe à vide en appuyant sur l'interrupteur d'alimentation. Ajuster l'aiguille du vide à environ **-600 mbar**. Connecter le dispositif VacConnector/colonne QIAamp Mini spin column du QIAvac 24 Plus. Introduire l'échantillon de l'étape 7 (682 µl) dans la colonne QIAamp Mini spin column et laisser le couvercle de la colonne ouvert. Ouvrir la soupape de dépression principale et assurez-vous que l'aiguille est stabilisée à près de -600 mbar. Une fois que tout le lysat a été aspiré à travers la colonne de centrifugation, éteindre la pompe à vide. Introduire 750 µl de la solution de lavage **Buffer AW1** dans la colonne et allumer la pompe à vide. Une fois que toute la solution Buffer AW1 a été aspirée à travers la colonne, éteindre la pompe à vide. Introduire 750 µl de la solution de lavage **Buffer AW2** dans la colonne et allumer la pompe à vide. Une fois que toute la solution AW2 a été aspirée à travers la colonne, éteignez la pompe à vide. Fermer la colonne, retirez-la du système d'aspiration QIAvac et jeter le VacConnector.*

11. Placer la colonne dans un microtube de 1,5 ml et centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 min pour retirer par pipetage les traces éventuelles de la solution de lavage Buffer AW2.

12. Introduire 50 µl de la solution d'élution **Buffer AE** au centre de la colonne (contact avec la matrice), et laisser en contact 5 minutes à 15-25°C. Centrifuger le microtube à la vitesse maximale pendant 1 min pour éluer la solution d'ADN.

13. Déterminer la concentration d'ADN par fluorométrie (fluoromètre Qubit® recommandé) ou spectrométrie UV (par exemple, NanoDrop).

La solution d'ADN est prête pour l'analyse immédiate ou peut être conservée à -20°C pour une utilisation ultérieure.