

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 0 :

**Etiqueter l'ensemble des tubes pour l'extraction
4 eppendorf + 2 tubes de 2mL**

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 1 :

Peser 50 à 100 mg de matière végétale (ou $\frac{1}{4}$ d'un tube eppendorf de 1.5 mL).

(ne pas dépasser 130 mg)

On peut découper aux ciseaux (ou cutter) mais nettoyer les ciseaux à l'alcool ensuite

Utiliser les planchettes en bois pour faire de tous petits fragments.



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 2 :

Introduire la matière dans un tube
eppendorf de 1.5mL.

Utiliser les pinces fines



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 3 :

Ajouter 400 μL d'API + 4 μL RNase A (solution stock à 100 mg/L)

Ne pas mélanger les produits AVANT utilisation

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 4 :

Agiter fortement au vortex



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 5 :

Incuber la solution 10 mn à 65°C ;
homogénéiser 2 fois pendant
l'incubation par simple renversement.

On peut poser les tubes bouchés
directement dans l'eau chaude.

ATTENTION à la température du bain-
marie



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 6 :

Ajouter 130 μ L de tampon P3

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 7 :

**Agiter par retournement et incuber
5 min sur glace (bloc aluminium)**



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 8 :

Centrifuger le lysat 5 min à 20.000 g soit 13000 t/min
Ne pas oublier de replacer le couvercle.

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 9 :

Déposer la fraction (au moins 500 μ L) de surnageant sur la colonne QIASredder Mini Spin (**couleur lilas**) emboîtée sur un tube de 2 mL.



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 10 :

Centrifuger pendant 2 min à 20.000 g soit 130000 t/mn

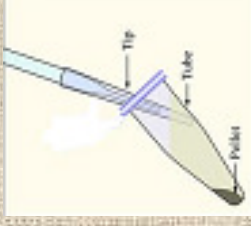
Toute la solution doit être passée.

Ne pas oublier de replacer le couvercle

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 11 :

Pipeter (400 à) 450 μL de filtrat dans un **nouveau tube eppendorf** à identifier sans perturber le micro culot. Evaluer le volume pour l'étape suivante si vous avez récupéré moins de 450 μL .



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 12 :

Vérifier que le tampon AW1 contient bien de l'éthanol

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 13 :

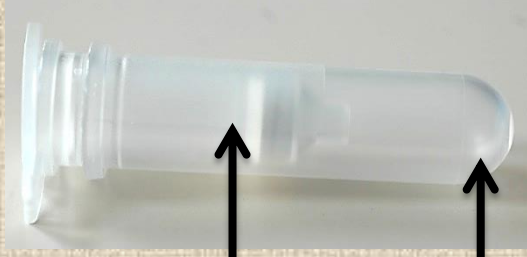
Ajouter 1.5 volume d'AW1 au lysat ($1.5 * 450 = 675$ μL) et **mixer** immédiatement par pipetage (aspirer, refouler avec la micropipette).

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 14 :

Transférer 650 μL de la solution sur mini colonne DNeasy (couleur blanche) emboîtée sur tube de 2 mL.

Ne pas jeter le tube eppendorf.



Tube 2 mL

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 15 :

Centrifuger 1 min > 6000 g soit 8000 T/min

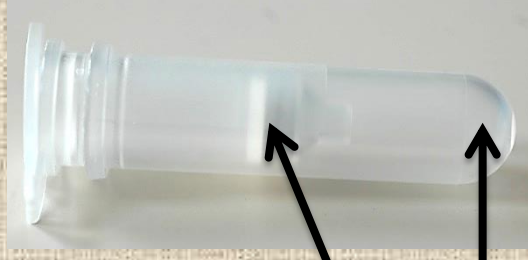
Ne pas oublier de replacer le couvercle.

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 16 :

Vider le tube collecteur puis le remettre sous la colonne pour pouvoir réutiliser la colonne à l'étape suivante.

La colonne (contient ADN)



adn

Solution filtrée

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 17 :

Transférer le reste de la solution sur la mini colonne DNeasy (couleur blanche) emboîtée sur tube de 2 mL. (Répétition des étapes 14, 15 et 16)



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 18 :

Centrifuger 1 min > 6000 g soit 8000 T/min

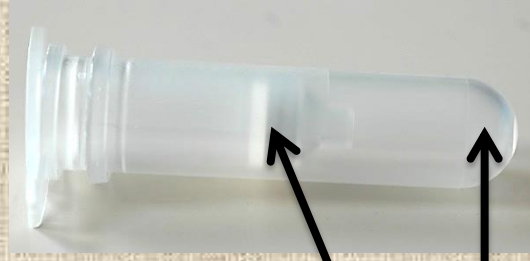
Ne pas oublier de replacer le couvercle.

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 19 :

Eliminer la solution filtrée et le tube collecteur.

Conserver la colonne (contient ADN)



adn

Solution filtrée

Extraction ADN *Populus*

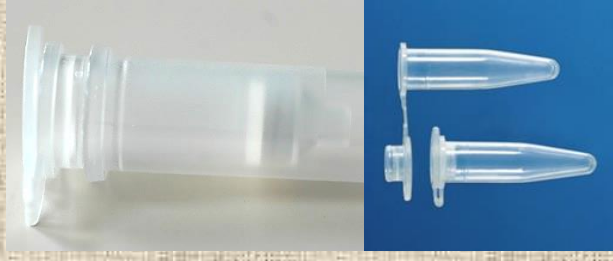
ETAPE 20 :

Vérifier que l'éthanol a bien été ajouté à A W2

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 21 :

Placer la colonne DNeasy mini spin sur un nouveau tube eppendorf



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 22 :

Ajouter 500 μL de AW2

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 23 :

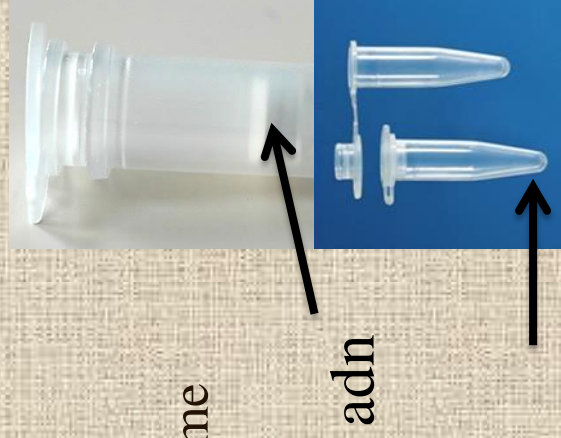
Centrifuger 1 min à 6.000g soit 8000T/min

Ne pas oublier de replacer le couvercle

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 24 :

Eliminer le filtrat et réutiliser la même colonne pour l'étape suivante.



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 25 :

Ajouter 500 μL de AW2 sur la colonne DNeasy mini spin

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 26 :

Centrifuger 2 min à 20.000 g soit 13000 T/min

Ne pas oublier de replacer le couvercle

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 27 :

Eliminer le filtrat SANS TOUCHER la membrane.

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 28 :

Transférer la colonne DN easy mini spin
sur un **nouveau tube eppendorf.**



Extraction ADN *Populus*

ETAPE 29 :

Ajouter 50 μ L de tampon AE au plus près de la membrane sans la toucher.

Extraction ADN *Populus*

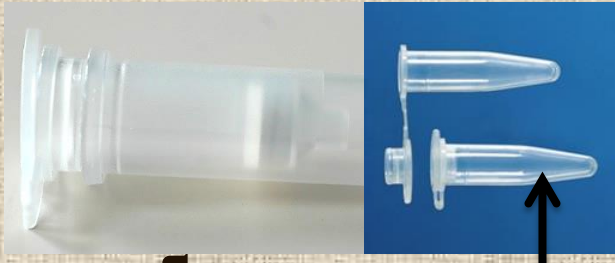
ETAPE 30 :

Incuber 5 min à température ambiante (15 à 25 °C)

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 31 :

Centrifuger 1 min à 6.000 g soit 8000 T/min
Ne pas oublier de replacer le couvercle
(récupération de la première fraction d'ADN)



ADN

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 32 :

Ajouter 50 μ L de tampon AE au plus près de la membrane sans la toucher. (répétition des étapes 29 à

31)

Extraction ADN *Populus*

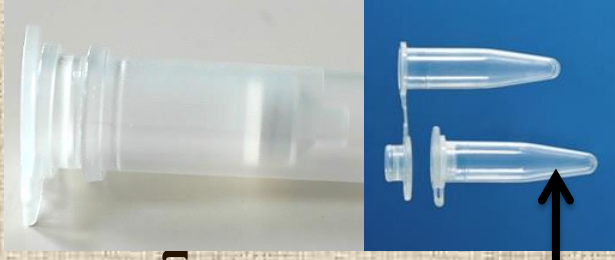
ETAPE 33 :

Incuber 5 min à température ambiante (15 à 25 °C)

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 34 :

Centrifuger 1 min à 6.000 g soit 8000 T/min
Ne pas oublier de replacer le couvercle
(récupération de la deuxième fraction d'ADN)



ADN

Extraction ADN *Populus*

ETAPE 35 :

L'ADN est dans l'éluat (fraction liquide)

TERMINE