

Quit DNAnuclospin Plant II

Traduction du kit + ajout des conseils de Delphine LEGRAND. 22 octobre 2016

Principe de base :

La plante est homogénéisée par traitement mécanique ; ensuite, l'ADN est extraite grâce au LYSIS BUFFER PL1 ou PL2...ils contiennent des sels, des agents dénaturants, des détergents.

Le lysat brut est ensuite clarifié par centrifugation et/ou filtration avec les Nucleospin filter du kit ; dans l'ordre, ils enlèvent les polysaccharides, les contaminations les résidus de débris cellulaires.

Le filtrat est mélangé au binding buffer PC pour créer des conditions optimales de liaisons entre l'ADN et la membrane silicatée. Après chargement de ce filtrat dans la colonne de filtration, les contaminants sont éliminés avec les buffers PW1 et PW2.

L'ADN est finalement récupéré grâce à l'éluant Buffer PE.

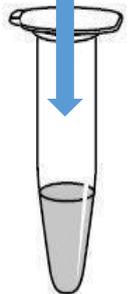
ETAPE 1 : Homogénéisation de la plante :

Le but est d'obtenir une poudre. On travaille dans un mortier avec de l'azote liquide. 100 mg d'échantillon maximum.

Mortier et pilon sont pré-refroidis ; reverser de l'azote liquide de temps en temps en cours de broyage. Remuer le mélange azote liquide végétal .Transférer dans un tube et s'assurer que l'azote s'évapore en totalité avant de fermer le tube.



Broyat de plante
+500 μ L de
Mix PL1 PV40 Rnase



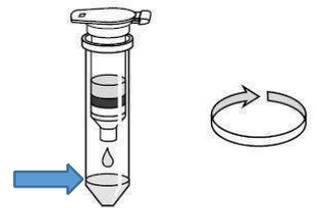
ETAPE 2 : lyse cellulaire

- Travailler avec 10 à 1500 mg---- **typiquement 100 mg de produit frais** (20mg si lyophilisé) semble une valeur intéressante.
- Ajouter au broyat de plante 500 μ L de mix **tampon PL1 +PVP-40 + RNase** • Incuber 30 mn à 1 heure à 70°C (bain marie) **Agiter de temps en temps par retournement.**

ETAPE 3 : Clarification du lysat :

- Centrifuger les échantillons 5 à 10 mn (typiquement 7 mn) à 14 000 g (13300)
- Verser le surnageant sur la colonne violette de filtration. Centrifuger 2 mn à 14 000g.

ADN dans le
lysate

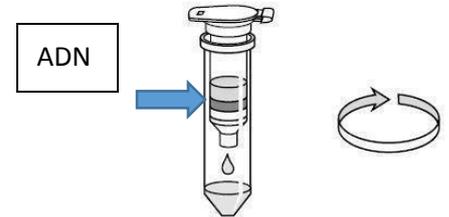


ETAPE 4 : Ajustement des conditions de fixation.

- Mélanger 550 μL de **tampon PC** à la totalité du lysat ; mélanger avec précaution par aspiration refoulement. On obtient le MIX.

ETAPE 5 : Fixation de l'ADN :

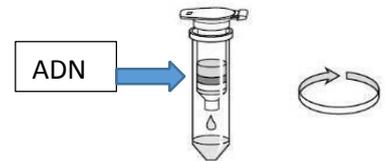
- Mettre 600 μL du **mix dans la colonne verte**
- Centrifuger 1mn à 9 000g Vider le tube collecteur .
- Ajouter le reste du **mix** à la colonne
- Centrifuger 1mn à 9 000g



Remarque : le volume maxi de la colonne est de 700 μL .

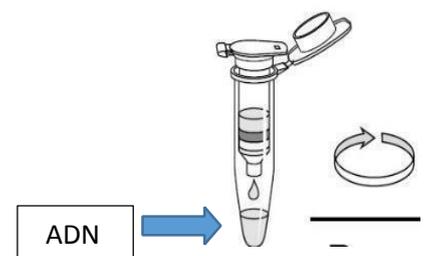
ETAPE 6 : lavage et séchage de la colonne de silice : L'ADN est toujours dans la colonne de filtration.

- 1^{er} lavage : ajouter 400 μL de **tampon PW1** dans la colonne verte.
- Centrifuger 1mn à 11 000g. vider le tube collecteur.
- 2^{ème} lavage : ajouter 700 μL de **tampon PW2**....centrifuger 1mn à 11 000g . vider le tube collecteur.
- 3^{ème} lavage : ajouter 200 μL de **tampon PW2** et centrifuger 3 minutes à 14 000g vider le tube collecteur.



ETAPE 7 : Elution de l'ADN

- Préchauffer le tampon PE à 80°C au bain marie quelques minutes
- Placer la colonne dans un tube de centrifugation neuf. Verser 200 μL de **tampon PE** sur la colonne. Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 1 mn à 11 000 g.
- On obtient 200 μL **d'ADN stock** à conserver à -20°C.
- On fait un lot de 100 μL à envoyer pour analyse et un lot pour nous à stocker au congélateur.



Coin préparateur :

Plante	Stockage de la plante : dans l'alcool ou lyophilisé ou congelée. Le matériel frais peut être gardé à 4°C pendant 24h ou à -20°C pendant une longue période.
Matériel	Mortier et pilon sont pré-refroidis ; reverser de l'azote liquide de temps en temps en cours de broyage. Transférer dans un tube et s'assurer que l'azote s'évapore en totalité avant de fermer le tube.
PL1	Ce tampon est préparé juste avant et chauffé légèrement pour dissoudre les cristaux si nécessaire préparation du tampon PL1 : remuer pour précipiter le détergent surtout si il a été stocké à des T° < à 20°C. Si nécessaire chauffer à 30-40°C et mélanger pour tout redissoudre. stockage des solutions 18-25°C pendant un an.
Solution de lavage PW2	Préparer avec le volume d'éthanol indiqué sur le flacon stable à température 18-25°C pendant au moins 1 an Préparation : 25mL de PW2 + 100 mL d'éthanol
RNase A	Ajouter le volume donné d'eau indiqué sur le flacon pour la RNase A lyophilisée Conserver à 4°C pour 3 mois. Pour une conservation d'un an, on aliquote en petites fractions à et on met à -20°C. Préparation : Dissoudre 6 mg dans 600 µL d'eau.
Tampon PC et PW	Rien à préparer
Mix PL1	<ul style="list-style-type: none">• Chauffer le tampon PL1 :Le tampon PL1 est préparé juste avant et chauffé légèrement pour dissoudre les cristaux si nécessaires. Vortexer PL1 pour tout dissoudre si nécessaire. Le vortex est à éviter afin de ne pas faire de mousse.• On prélève 500 µL de PL1 Ajouter <u>1% de PVP-40</u> (c'est-à-dire 5 mg à déposer dans les 500 µL de PL1)• Ajouter enfin 10 µL de RNase A On obtient 510 µL de Mix (dose pour une extraction) Remarque 1 : stockage des solutions 18-25°C pendant un an. Remarque 2 : préparation du tampon PL1 : remuer pour précipiter le détergent surtout si il a été stocké à des T° < à 20°C. Si nécessaire chauffer à 30-40°C et mélanger pour tout redissoudre.

--	--

Contenu du Kit 50 préparation

NucleoSpin® Plant II

50 preps

740770.50

25 mL

20 mL

10 mL

30 mL

30 mL

25 mL

13 mL

6 mg

50

50

100

1

Table 1: Kit specifications at a glance

Parameter	NucleoSpin® Plant II
Technology	Silica-membrane technology
Format	Mini spin columns
Sample material	Up to 100 mg wet weight Up to 20 mg dry weight
Lysate clarification	NucleoSpin® Filters
Fragment size	50 bp– approx. 50 kbp
Typical yield	1–30 µg
A_{260}/A_{280}	1.8–1.9
Elution volume	2 x 50 µL
Preparation time	30 min/prep
Binding capacity	50 µg

Table 2: Plant species tested with NucleoSpin® Plant II

Plant species	Plant tissue / organ	Lysis buffer successfully tested	
		PL1	PL2
<i>Abies alba</i> (fir)	Needle	✓	✓
<i>Acer griseum</i>	Leaf	✓	✓
<i>Amorphophallus titanum</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Apium graveolens</i> (celery)	Corm	✓	✓
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Leaf	✓	✓
<i>Boreava orientalis</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Carex annectens</i>	Leaf	✓	✓
<i>Carex waponahkikensis</i>	Leaf, silica-gel dried	✓	✓
<i>Cleisostoma racemiferum</i>	Inflorescence rachis, silica-gel dried	✓	Not tested
<i>Doritis pulcherrima</i>	Leaf, silica-gel dried	✓	Not tested
<i>Eichornia azurea</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Encephalartos natalensis</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Galium aparine</i>	Leaf	✓	✓
<i>Hordeum</i> sp. (barley)	Leaf	✓	✓
<i>Isatis kotschyana</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Laurus azorica</i> (laurel)	Leaf	✓	Not tested
<i>Lupinus</i> sp. (lupin)	Leaf	✓	✓
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	Stem	✓	✓
<i>Myagrum perfoliatum</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Oryza sativa</i> (rice)	Leaf	✓	✓
<i>Persea feru./caerulea</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Pteridium</i> sp.	Leaf	✓	Not tested
<i>Pterocarya fraxinifolia</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Quercus cerris</i>	Leaf	✓	✓
<i>Quercus frainetto</i>	Leaf	✓	✓
<i>Rosa</i> sp. (rose)	Leaf	✓	✓
<i>Rubus fruticosus</i> (blackberry)	Leaf	✓	✓
<i>Sameraria nummularia</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Secale</i> sp. (rye)	Leaf	✓	✓
<i>Stereochilus</i> sp.	Leaf, silica-gel dried	✓	Not tested
<i>Tauscheria lasiocarpum</i>	Leaf, herbarium sample	✓	✓
<i>Trachycarpus takil</i>	Leaf	✓	Not tested
<i>Trichoglottis</i> sp.	Leaf, silica-gel dried	✓	Not tested
<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	Leaf	✓	✓
<i>Vigna radiata</i> (mung bean)	Root	✓	✓
<i>Zea mays</i> (maize)	Leaf	✓	✓
<i>Zea mays</i> (maize)	Grain, dried, ground coarsely	✓	✓
Fungal mycel (not specified)		✓	Not tested

NucleoSpin® Plant II**50 preps****REF 740770.50**

Wash Buffer PW2 (Concentrate)	25 mL add 100 mL ethanol
----------------------------------	--------------------------------

RNase A	6 mg dissolve in 600 μ L H ₂ O
---------	---