	Extraction d'ADN en plaque à partir de sang	Version 3.0
GDB_MOP_05	Extraction	31/05/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L.LIETAR


Ce protocole s'adresse aux personnes habilitées à l'extraction d'ADN.

Cette étape fait suite à la préparation des matrices pour extraction d'ADN à partir de prélèvements de sang.


Mode opératoire

Dans la salle "Extraction ADN" :

- 1) préparation à vérifier :
 - a) **Buffer B5** : lors de l'ouverture d'une nouvelle bouteille (non annotée), ajouter **400 mL d'éthanol absolu**, indiquer la date de préparation sur la bouteille et cocher la case correspondante précisant que cela a été fait. Le buffer est stocké à température ambiante après reprise
 - b) **Protéinase K (PK)** : les tubes contiennent la PK lyophilisée et sont stockés à température ambiante (T_{amb}). Afin de la reconstituer, il faut ajouter **3,35 mL de buffer PB** (protéinase buffer), mélanger (vortex quelques secondes) et laisser resuspendre quelques minutes. Noter la date de resuspension. La PK est ensuite stockée à -20°C
- 2) sortir la plaque BLOOD_AAMMJJ-NN contenant les échantillons de sang, stockée à 4°C en salle "Traitement des prélèvements" et la mettre à T_{amb} en salle "Extraction ADN" **20 minutes** avant l'extraction
- 3) allumer l'agitateur chauffant et le régler sur **70°C , sans agitation**. Y placer un aliquot de **TE1X pH8,0** (aliquot dans une bouteille en verre de 50mL annotée "TE1X pH8" et date de l'aliquot)
- 4) dans chaque puits, ajouter **25 μL de PK** puis **200 μL de réactif BQ1** et placer un film aluminium adhésif sur toute la plaque (puits inutilisés compris)
- 5) placer **10 minutes** sur le mixmate à **1250 rpm** à T_{amb}
- 6) les plaques colonnes d'extraction sont stockées à 4°C . Sortir une plaque 10-15 minutes avant le transfert des lysats, filmer les puits non utilisés à l'aide d'un film aluminium adhésif, l'annoter à l'identique de la plaque de lyse, et la mettre sur une plaque collectrice dédiée à l'extraction
- 7) faire un spin de la plaque de lyse

	Extraction d'ADN en plaque à partir de sang	Version 3.0
GDB_MOP_05	Extraction	31/05/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L.LIETAR

- 8) ajouter **200 µL d'éthanol absolu**, filmer à nouveau avec le film aluminium adhésif et mélanger **30 secondes** au mixmate à **1200 rpm**, puis faire un spin
- 9) transférer les lysats sur les colonnes et **ajouter 150 µL de B5**, délicatement, le long de la paroi, de manière à former deux phases (conserver le film aluminium adhésif sur la plaque de lyse, les puits restants seront utilisés lors d'une prochaine série)
- 10) centrifuger à **5600 x g pendant 10 minutes**
- 11) ajouter **600 µL de tampon BW**
- 12) centrifuger à **5600 x g pendant 3 minutes**
- 13) retirer la plaque collectrice et en mettre une nouvelle sous la plaque de colonnes
- 14) ajouter **900 µL de tampon B5**
- 15) centrifuger à **5600 x g pendant 3 minutes**
- 16) retirer la plaque collectrice et en mettre une nouvelle sous la plaque de colonnes
- 17) ajouter **900 µL de tampon B5**
- 18) centrifuger à **5600 x g pendant 10 minutes** pour sécher la plaque colonnes
- 19) attribuer une référence de plaque SAM de la forme SAMAAMMNNN (où AAMM correspond à l'année et au mois en cours, et NNN au numéro de plaque créée dans ce mois) pour chaque plaque BLOOD_AAMMJJ-NN, dans l'ordre de traitement des plaques, à reporter sur le fichier extraction
- 20) placer la plaque colonnes sur une plaque d'élution dédiée et annotée : "SAMAAMMNNN" devant la plaque (la coordonnée A01 en haut à gauche), ainsi que sur le côté droit et le couvercle, barrettes numérotée de 1 à 12
- 21) ajouter **60 µL de TE1X pH8,0 à 70°C** et laisser incuber un minimum de 15 minutes en couvrant les puits
- 22) éluer en centrifugeant à **3000 x g pendant 2 minutes** puis sceller la plaque à l'aide de bouchons
- 23) une plaque colonnes contenant encore des puits non utilisés doit être conservée à 4°C
- 24) compléter le fichier extraction [GDB_FORM_15_BLOOD_AAMMJJ-NN](#) correspondant avec les informations d'extraction (versions papier et informatique)

	Extraction d'ADN en plaque à partir de sang	Version 3.0
GDB_MOP_05	Extraction	31/05/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L.LIETAR

	Noms	Conditions de stockage
Matériel	Agitateur chauffant	
	Centrifugeuse pour plaque	
	Agitateurs	
	Bouteille de verre 50 mL	
	Eprouvette graduée 250 mL	
Réactifs	Kit Blood 4x96 (core)	Protéinase K solubilisée -21°C +/- 3°C Colonnes à 5°C +/- 3°C Autres réactifs à température ambiante
	Ethanol absolu	Température ambiante
	TE1X pH8.0	Température ambiante

Documents associés :

[GDB_PRS_05_Extraction d'ADN](#)

[GDB_MOP_01_Préparation des matrices pour extraction d'ADN à partir de prélèvements de sang](#)

[GDB_MOP_07_Elaboration des fichiers d'extraction](#)

[GDB_FORM_03_Habilitation extraction ADN](#)

[GDB_FORM_15_MATRICE_AAMMJJ-NN](#)