 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Dosage ADN	Version 2.0
GDB_MOP_08	Extraction	19/06/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT	Approbation : L.LIETAR

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

Mode opératoire

Dans la salle "Extraction ADN" :

1) préalablement :

- a) allumer l'ordinateur, puis le SPARK,

Remarque : il se peut que l'appareil ne se connecte pas au PC (lumière bleue 1 minute après allumage). Dans ce cas, il faut redémarrer le PC sans éteindre l'appareil, une lumière rose s'affiche après connexion.

- b) sortir le Kit Picogreen stocké à 4°C contenant l'ADN témoin et le picogreen,

Remarque : éviter l'exposition à la lumière du picogreen (sensible à la lumière).


- c) préparer du TE1X (non filtré) à partir du TE 100X si nécessaire,

2) préparation des échantillons

- a) prévoir le nombre de plaques de dosage selon le nombre d'échantillons et les identifier,
- b) dans les plaques de dosage, dispenser **49 µL de TE1X**,
- c) mettre **1 µL d'échantillon** dans chaque puits,

3) préparation de la gamme étalon

- a) prévoir une colonne pour la gamme,
- b) dispenser **12,5 µL de TE1X** dans le **puits A**, puis **50 µL de TE1X** dans les **puits B à H**,
- c) diluer l'ADN témoin* au **1/50e** dans un tube 1,5 mL : **98 µL TE1X + 2 µL ADN témoin**,
- d) dans le **puits A** ajouter **37,5 µL d'ADN dilué** et faire des up & down,
- e) réaliser une dilution en série du **puits B à G** : dans le puits **B**, dispenser **50µL d'ADN dilué**, puis faire des up & down (x10), **transférer 50µL** de ce puits **vers le puits suivant C**, continuer ainsi **jusqu'en G**,
- f) **en G, jeter les 50 µL** de reliquat,

	Dosage ADN	Version 2.0
GDB_MOP_08	Extraction	19/06/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT	Approbation : L.LIETAR

g) **rien ne doit être transféré dans le puits H, contenant uniquement le TE1X**

Remarque : * La concentration de départ de l'ADN témoin est de 100 ng/μL dans le TE. En diluant, la concentration de la solution est à 2 ng/μL. En complétant la colonne de la gamme sur la plaque, on obtient les concentrations suivantes :

- Puits A : 12.5 μL de TE + 37.5 μL d'ADN témoin (C=2 ng/μL) → 75 ng
- Puits B : 50 μL de TE + 50 μL d'ADN témoin → 50 ng
- Puits C : 50 μL de TE + 50 μL du puits B → 25 ng
- Puits D : 50 μL de TE + 50 μL du puits C → 12.5 ng
- Puits E : 50 μL de TE + 50 μL du puits D → 6.25 ng
- Puits F : 50 μL de TE + 50 μL du puits E → 3.125 ng
- Puits G : 50 μL de TE + 50 μL du puits F → 1.5625 ng (retirer 50 μL du mélange)
- Puits H : 50 μL de TE → 0 ng

4) **préparer la dilution du picogreen au 1/200e**

La solution mère de Picogreen doit être diluée au 1/200e dans du TE1X, et 50 μL de la solution de Picogreen diluée doit être dispensée dans chaque puits

- a) préparer la dilution du picogreen dans un tube Falcon (15 mL, ou 50 mL selon les besoins),
- pour **N dosages** à effectuer (nombre d'échantillons + gamme étalon (8 puits) + volume mort (5 puits))
- le volume total de solution de Picogreen diluée à réaliser correspond à N x 50 (volume de Picogreen dilué à dispenser par puits)


Calcul dilution au 200^{ème} : $(N \times 50)/200 = \text{volume de Picogreen solution mère à diluer}$

- b) **homogénéiser** par retournement du tube Falcon,
- c) **dispenser 50 μL de Picogreen dilué dans chaque puits,**

Remarque : protéger les plaques de la lumière le temps qu'elles passent en analyse. La gamme doit être analysée en premier.

5) **SPARK : lancement de l'analyse**

- a) ouvrir le logiciel **SPARKCONTROL Dashboard** (étoile blanche dans rectangle bleu) et cliquer sur la flèche à gauche,
- b) choisir "**method editor**" → **open** → "**plusieurs plaques**",
- c) vérifier les paramètres suivants :

	Dosage ADN	Version 2.0
GDB_MOP_08	Extraction	19/06/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT	Approbation : L.LIETAR


- i) sélectionner l'ensemble des puits (A01-H12) et sur **Kinetic loop** : indiquer le nombre de cycles correspondant au nombre de plaques,
- ii) **Shaking** : time : 5 min (300 secondes) / mode : orbital / amplitude 1,
- iii) **Fluorescence intensity** : mode : top / fluorophore : picogreen / excitation : 485 nm / emission : 535 nm,
- iv) **Show advanced settings** : flash 30, gain : optimal,
- d) mettre la plaque dans l'appareil et cliquer sur **start** pour lancer,
- e) lorsque la plaque a été lue, placer la seconde plaque et cliquer sur "nouvelle plaque",

6) Analyse et calcul

- a) une fois toutes les plaques lues, un **fichier excel est extrait⁽¹⁾** avec les informations de lecture d'intensité de fluorescence,
- b) associer les valeurs RFU (Relative Fluorescence Units) de la gamme étalon avec les quantités d'ADN théoriques :
 - RFU puits A -> 75 ng,
 - RFU puits B -> 50 ng,
 - RFU puits C -> 25 ng,
 - RFU puits D -> 12,5 ng,
 - RFU puits E -> 6,25 ng,
 - RFU puits F -> 3,125 ng,
 - RFU puits G -> 1,5625 ng,
 - RFU puits H -> 0 ng,
- c) insérer un graphique en nuage de points avec courbe de tendance (visualisation de l'équation + coefficient de détermination R^2) pour la gamme étalon. La courbe de régression linéaire doit présenter un R^2 supérieur ou égal à 0,99 pour que l'analyse soit validée. Si ce n'est pas le cas, refaire le dosage depuis le début,
- d) convertir les valeurs RFU des échantillons dosés en concentrations (ng/μL) à partir de l'équation de la courbe de tendance,
- e) enregistrer si besoin et fermer le fichier ainsi que le logiciel.

Remarque : indications du SPARK

1) Une lumière bleue indique que l'appareil est allumé, en veille, non connecté au PC

	Dosage ADN	Version 2.0
GDB_MOP_08	Extraction	19/06/2024
Rédaction : K. LE ROUX	Vérification : C. AUDEBERT	Approbation : L.LIETAR

- 2) Une lumière rose indique que l'appareil est allumé, et connecté au PC
- 3) Une lumière verte indique que l'appareil est en fonction
- 4) Une lumière orange indique que l'appareil est en attente
- 5) Une lumière rouge indique que l'appareil est en défaut, il faut l'éteindre ou le débrancher, puis le rallumer

(1) **fichier Excel SPARK** enregistré automatiquement dans : Ce PC / Disque local (C:) / Utilisateurs / Public / Documents publics / Tecan / Sparkcontrol / Export / xlsc sous le nom "plusieurs plaques_AAAAMMJJ_NNNNNN"

	Noms	Références / Fournisseur	Conditions de stockage
Matériel	Spark	Tecan	
	Ordinateur	Dell	
Réactifs	Tampon TE (100X) pH 8.0 500 mL	348659 (Dutscher) ou équivalent	Température ambiante
	Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Invitrogen	P7581 (P7589 avec ADN) (Life Technologies)	5°C +/- 3°C, à l'obscurité

Documents associés :

GDB_FORM_03_Habilitation extraction ADN

GDB_PRO_06_Contrôle de reproductibilité et répétabilité de la phase d'extraction