	Extraction d'ADN en plaque à partir de cartilage/poil	Version 3.0
GDB_MOP_03	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 poils et de cartilage.

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 **2,60 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
 - c) **T1** : vérifier la non cristallisation du réactif, si des paillettes sont visibles, le réchauffer rapidement à 56°C
- 2) faire un spin de la plaque TISSUE_AAMMJJ-NN (en laissant le couvercle)
- 3) dispenser **25 μL de PK** et ajouter **180 μL de T1**, sceller avec des barrettes de bouchons
- 4) homogénéiser à **1300 rpm pendant 30 secondes**
- 5) faire un spin
- 6) allumer l'agitateur chauffant, le régler sur **56°C 500 rpm et HLd (= temps infini)**, placer la plaque et incuber toute la nuit
- 7) le lendemain, sortir la plaque de l'agitateur, et faire un spin afin de faire redescendre la condensation accumulée sur les parois des puits et sur les bouchons
- 8) régler l'agitateur chauffant sur **70°C , sans agitation**, et y placer le **TE1X pH8,0** (aliquot dans une bouteille en verre de 50 mL annotée "TE1X pH8" et date de l'aliquot)
- 9) enlever délicatement les bouchons

	Extraction d'ADN en plaque à partir de cartilage/poil	Version 3.0
GDB_MOP_03	Extraction	31/05/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L.LIETAR

10) dispenser **200 µL de BQ1** et ajouter **200 µL d'éthanol absolu** puis remplacer les bouchons

11) homogénéiser à **1300 rpm pendant 1 minute**

12) faire un spin

13) sortir une plaque colonnes du kit, 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 placer sur une plaque collectrice dédiée à l'extraction

14) transférer les lysats sur les colonnes

15) centrifuger à **5600 x g pendant 10 minutes**

16) ajouter **500 µL de BW** (lavage 1)

17) centrifuger à **5600 x g pendant 2 minutes**

18) retirer la plaque collectrice et en mettre une nouvelle

19) ajouter **700 µL de B5** (lavage 2)

20) centrifuger à **5600 x g pendant 4 minutes**

21) sécher les colonnes en plaçant la plaque dans l'agitateur chauffant **10 min à 70°C**, sans agitation, avec un papier absorbant sous les colonnes afin d'éviter une contamination


ALTERNATIVE ÉTAPES 20/21 : centrifuger à 5600 x g pendant 14 minutes

22) 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 TISSUE_AAMMJJ-NN, dans l'ordre de traitement des plaques, à reporter sur le fichier extraction

23) 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

24) ajouter **60 µL de TE1X pH8,0 à 70°C** et laisser incuber un minimum de 15 minutes en couvrant les puits

25) éluer par centrifugation à **3000 x g pendant 2 minutes** puis sceller la plaque à l'aide de bouchons

	Extraction d'ADN en plaque à partir de cartilage/poil	Version 3.0
GDB_MOP_03	Extraction	31/05/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L.LIETAR

26) compléter le fichier extraction [GDB_FORM_15_TISSUE_AAMMJJ-NN](#) correspondant avec les informations d'extraction (versions papier et informatique)

	Noms	Conditions de stockage
Matériel	Agitateur chauffant	
	Centrifugeuse pour plaque	
	Agitateurs	
	Bouteille de verre 50 mL	
	Eprouvette graduée 250 mL	
Réactifs	Kit Tissue 4x96 (core)	Protéinase K solubilisée -21°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_02_Préparation des matrices pour extraction d'ADN à partir de prélèvements de poils et cartilage](#)

[GDB_MOP_07_Elaboration des fichiers d'extraction](#)

[GDB_FORM_03_Habilitation extraction ADN](#)

[GDB_FORM_15_MATRICE_AAMMJJ-NN](#)