GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Extraction d'ADN en tube à partir de semence	Version 3.0
GDB_MOP_04	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 semence.

## Mode opératoire

Dans la salle "Extraction ADN":

- 1) allumer l'agitateur chauffant, le régler sur 56°C 500 rpm et HLd (= temps infini)
- 2) décongeler un aliquot de 100µl de **DL-Dithiothréolitol (DTT) 1M** conservé à -20°C (GDD-CONG-002).

<u>Remarque</u> : les aliquots de 100µL sont réalisés à partir d'une solution mère de DL-Dithiothréolitol (DTT) 1M aliquotée en micro-tubes dès l'ouverture de la bouteille et sur l'entièreté du volume, puis conservés à -20°C. Leur usage est unique.

- 3) ajouter 20 µL de DTT 1M, 200 µL de AL et 40 µL de PK
- 4) agiter sur mixmate 2000 rpm pendant 5 minutes
- 5) incuber 2h à 3h à 56°C à 500 rpm
- 6) une fois la lyse terminée, sortir les tubes et faire un spin
- 7) régler l'agitateur chauffant à **70°C** (sans agitation) et y placer le **TE1X pH8.0 à 70°C** (aliquot dans une bouteille en verre de 50 mL annotée "TE1X pH8" et date de l'aliquot)
- 8) ajouter **200 μL d'éthanol absolu**, vortex 30 sec + spin, puis chauffer 2 minutes **maximum** à 70°C
- 9) effectuer un spin puis transférer le tout dans une colonne QIAamp placée sur un tube collecteur fourni dans le kit
- 10) centrifuger à 10000 x g pendant 1 minute

<u>Remarque</u>: dans le cas où une colonne est saturée (une partie du lysat n'est pas passé), renouveler l'étape 10

- 11) jeter le tube collecteur et prendre un nouveau tube
- 12) ajouter 500 µL de tampon AW1
- 13) centrifuger à 6000 x g pendant 1 minute

GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Extraction d'ADN en tube à partir de semence	Version 3.0
GDB_MOP_04	Extraction	31/05/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L.LIETAR

- 14) jeter le tube collecteur et prendre un nouveau tube
- 15) ajouter 500 µL de tampon AW2
- 16) centrifuger à 14000 x g pendant 3 minutes
- 17) prendre un nouveau tube collecteur
- 18) centrifuger à 14000 x g pendant 1 minute pour éliminer l'AW2 résiduel
- 19) placer la colonne sur un tube 1,5 mL (préalablement numéroté selon l'ordre de la liste d'extractions établie) et dispenser **40 µL de TE1X pH8.0** chauffé à 70°C et laisser incuber environ 1 heure
- 20) éluer en centrifugeant à 10000 x g pendant 1 minute
- 21) compléter le fichier extraction GDB\_FORM\_15\_SEMENCE\_AAMMJJ-NN correspondant avec les informations d'extraction (versions papier et informatique)

	Noms	Conditions de stockage
Matériel	Agitateur chauffant	
	Centrifugeuse de paillasse	
	Agitateur	
	Bouteille de verre 50 mL	
Consommables	Microtubes (> 100µL)	
Réactifs	QIAamp DNA mini kit	Température ambiante
	DL-Dithiothreitol (DTT) 1M	Flacon source à 5°C +/- 3°C Aliquots de 100µl à -21°C +/- 3°C
	Ethanol absolu	Température ambiante
	TE1X pH8.0	Température ambiante

## **Documents associés:**

GDB\_PRS\_05\_Extraction d'ADN

GDB\_MOP\_30\_Préparation des matrices pour extraction d'ADN à partir de prélèvements de semence

GDB MOP 07 Elaboration des fichiers d'extraction

GDB\_FORM\_03\_Habilitation extraction ADN

GDB\_FORM\_15\_MATRICE\_AAMMJJ-NN