 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Extraction d'ADN sur MagnetaPure 96 à partir de poils	Version 2.0
GDB_MOP_32	SMQ	04/06/2024
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.

Mode opératoire

Dans la salle "Extraction ADN" :

- 1) Préparations préalables :
 - a) Protéinase K (PK) : les tubes du kit contiennent la PK lyophilisée et sont stockés à 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.
NB : Les tubes de PK additionnelle achetés en supplément ne contiennent pas la même quantité de PK lyophilisée, ils sont donc à reconstituer avec 1,8 mL de buffer PB.
 - b) T1 : vérifier la non cristallisation du réactif, si des paillettes sont visibles, le réchauffer rapidement à 40°C
- 2) Réaliser la lyse des échantillons (en dehors du MagnetaPure 96) :
 - a) Faire un spin de la plaque TISSUE_AAMMJJ-NN (en laissant le couvercle)
 - b) Préparer un mélange PK + T1 **(Extemporaneément)** : PK **1,5 mL** + T1 **15 mL** dans un réservoir, et dispenser immédiatement le mélange dans la plaque à raison de **165 µL** par puits
 - c) Faire un spin de la plaque
 - d) Incuber la plaque à 56°C pendant **3h** minimum, si possible sous agitation à 700 rpm
 - e) Faire un spin de la plaque
- 3) Préparer les plaques suivantes :
 - a) Annoter **4** plaques deepwell sur le côté gauche : **#2 = BIND**, **#3 = MB3**, **#4 = MB4**, **#5 = MB5**
 - a) 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
 - b) Annoter **1** plaque d'élution SAMAAMMNNN sur le devant ainsi que sur le côté gauche (= plaque **#8**)

	Extraction d'ADN sur MagnetaPure 96 à partir de poils	Version 2.0
GDB_MOP_32	SMQ	04/06/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L. LIETAR


- 4) Préparer les plaques de réactifs suivantes :
 - a) Plaque MB3 **#3** : dispenser 300 µL de tampon MB3
 - b) Plaque MB4 **#4** : dispenser 300 µL de tampon MB4
 - c) Plaque MB5 **#5** : dispenser 450 µL de tampon MB5
 - d) Plaque SAMAAMMNNN **#8** : dispenser 60 µL de tampon MB6

- 5) Préparer le mélange de Binding :
 - a) Mélanger 800 µL de B-beads + 1600 µL d'eau ultrapure dans un mini réservoir et dispenser immédiatement le mélange à raison de 24 µL par puits dans la plaque BIND **#2**
 - b) Ajouter 275 µL de tampon MB2
 - c) Transférer 165 µL de lysat vers la plaque BIND **#2**
 - d) Faire un spin

- 6) Lancement du MagnetaPure 96 :
 - a) Préparation du robot :
 - i) Positionner les plaques délicatement dans leur emplacement colonne 1 vers l'extérieur :
 - (1) Disposer un peigne dans la plaque 1 (plaque fixe)
 - (2) Plaque binding **#2**
 - (3) Plaque MB3 **#3**
 - (4) Plaque MB4 **#4**
 - (5) Plaque MB5 **#5**
 - (6) Plaque SAMAAMMNNN **#8**
 - ii) Valider une dernière fois l'agencement du robot :
 - (1) Chaque plaque à sa place
 - (2) Pas de jeu, la plaque doit être fermement posée
 - (3) La colonne 1 orientée vers vous
 - (4) Le peigne posé bien à plat dans la plaque 1, pas de côté surélevé. Ne pas hésiter à changer la plaque réceptacle ou le peigne si vous constatez un défaut.
 - b) Lancement du programme :
 - i) Sur l'écran de contrôle, aller dans l'onglet "**Run Prog**"
 - ii) Sélectionner le programme "NMPoilsAAMMJJ" (dernière version en application)
 - iii) Appuyer sur le bouton "**Run**"

Remarque : en cas d'anomalie, possibilité de stopper le run via le bouton stop.

- 7) Fin de process :

	Extraction d'ADN sur MagnetaPure 96 à partir de poils	Version 2.0
GDB_MOP_32	SMQ	04/06/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L. LIETAR

- Sceller la plaque d'élution SAMAAMMNNN #8 avec un film alu autocollant, puis la sortir du robot
- Pivoter le plateau tournant pour accéder aux autres plaques
- Laisser la plaque 1 à sa place et jeter les autres plaques DeepWell (2, 3, 4 et 5)
- Si vous constatez la présence de salissures sur l'appareil nettoyer avec de l'éthanol 70% et un papier non pelucheux
- En fin d'utilisation mettre l'appareil sous U.V. pendant 30 min à 1h à l'aide de l'onglet U.V. sterilizer

	Noms	Conditions de stockage
Matériel	<i>MagnetaPure 96</i>	
	<i>Centrifugeuse pour plaque</i>	
	<i>Agitateur chauffant</i>	
	<i>Agitateurs</i>	
Consommables	<i>Plaques Deepwell</i>	
	<i>Plaque d'élution</i>	
	<i>Film aluminium autocollant</i>	
	<i>Peigne 96 dents</i>	
	<i>Plaques Biotubes</i>	
	<i>Bouchons Biotubes</i>	
Réactifs	<i>Nucleomag Tissue</i>	<i>Protéinase K solubilisée -21°C +/- 3°C Autres réactifs à température ambiante</i>
	<i>Tampon T1</i>	
	<i>Tampon MB2</i>	
	<i>Eau ultrapure (ou équivalent)</i>	


Documents associés :

[GDB_PR5_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](#)

	Extraction d'ADN sur MagnetaPure 96 à partir de poils	Version 2.0
GDB_MOP_32	SMQ	04/06/2024
Rédaction : M. BARBET	Vérification : L. LIETAR	Approbation : L. LIETAR

GDB_FORM_15_MATRICE_AAMMJJ-NN