

Protocole ZymoBIOMICS DNA/RNA Minirep Kit (Ref ZR2002)

Recommandation d'usage : Utiliser une blouse et des gants, un espace propre et des conditions DNase/RNase free. Aliquoter les tampons avant usage pour une série d'extractions. Préparer les tubes et les numéroter à l'avance. S'assurer d'avoir de la carboglace. Thermobloc à 60°C.

(I) Préparation des tampons :

- 1) Ajouter 96 mL d'éthanol 100% (ou 104 mL d'éthanol 95%) aux 24 mL de **DNA/RNA Wash Buffer** concentré.
- 2) Reconstituer la **DNase I** lyophilisée (**250 U**) avec 275 µL de **ZymoBIOMICS DNase/RNase-Free Water**. Mélanger par retournements doux et stocker des aliquots congelés.

(II) Préparation des tubes

Pour chaque échantillon, il faut prévoir (par ordre d'apparition dans le protocole):

- un tube 2 mL **ZR BashingBead Lysis Tube (0,1 & 0,5 mm)** avec tube 2 mL collecteur (fourni) [ARN] [ADN]
- un tube 2mL nuclease-free (non fourni). [ARN] [ADN]
- un **Spin-Away Filter (jaune)** installé sur un tube collecteur (fourni) [ARN] [ADN]
- un tube 5 mL nuclease-free (non fourni) [ARN]
- un tube 2 mL collecteur (fourni) [ADN]
- un tube 1,5 mL propre (non fourni) [ADN]
- un **Zymo-Spin III-HRC Filter** dans un tube collecteur 2 mL (fourni) [ADN]
- un tube final propre de 1,5 mL (non fourni) (tube annoté, avec bouchon et compatible avec le stockage à basse température). [ADN]
- un **Zymo-Spin IIICG Column (vert)** installé sur un tube 2 mL collecteur (fourni) [ARN]
- un **Zymo-Spin III-HRC Filter** dans un tube collecteur 2 mL (fourni) [ARN]
- un tube final propre de 1,5 mL (non fourni) (tube annoté, avec bouchon et compatible avec le stockage à basse température). [ARN]

(III) Préparation des échantillons :

- La quantité d'échantillon introduite peut être modifiée à la hausse ou à la baisse proportionnellement.
- 0) Si les échantillons sont conservés dans du PBS, les centrifuger 15 minutes à 15 000 g à 4°C. Puis retirer délicatement le surnageant.
 - 1) Ajouter 1 µL de **D6320 ZymoBIOMICS™ Spike-in Control I (high microbial load)**
Réaliser un mix pour les différents échantillons en diluant le spike-in au 1/5ème dans du DNA/RNA shield. Distribuer 5 µL dans chaque tube **ZR BashingBead Lysis Tube (billes de 0,1 & 0,5 mm)**
 - 2) Ajouter 750 µL de **DNA/RNA Shield** à l'échantillon (voir table ci-dessous), mélanger à la pipette, puis transférer le tout dans un **ZR BashingBead Lysis Tube (billes de 0,1 & 0,5 mm)** et fermer le bouchon fermement. **Mettre les tubes dans de la glace pour les refroidir.**

Si un échantillon est déjà collecté dans un **DNA/RNA Shield**, passer à l'étape 2.

Sol, excréments, plantes, graines	≤ 250 mg
Cellules dans DNA/RNA Shield™ ou tampon isotonique/PBS (bactérien 109 , levure 108 , mammifère 107)	≤ 50-100 mg (wet weight)
Dispositifs de collecte DNA/RNA Shield™ (par exemple, cat. #R1101, R1102-R1105) ou Liquides biologiques et prélèvements d'écouvillons (par exemple, cat. #R1100, R1106-R1109, R1150)	≤ 400 µl

- 3) Installer les tubes de lyse refroidis (**ZR BashingBead Lysis Tube**) sur le portoir du broyeur Precellys, poser le peigne de fixation par-dessus et refermer le Precellys. Remplir le Cryolys de carboglace et l'installer par-dessus le Precellys.
Lancer le programme « CRAPO » qui inclut 6 étapes de broyage de 10 secondes à 10 000 rpm avec 5 pauses de 120 secondes. Faire bien attention à ce que l'option Cryolys soit bien en position ON dans le programme.
- 4) Ajouter 800 µL (2 volumes) de **DNA/RNA Lysis Buffer** dans un tube 2mL nuclease-free (non fourni).
- 5) Centrifuger 1 minute à 13 000 g et transférer jusqu'à 400 µL de surnageant dans les 800 µL de **DNA/RNA Lysis Buffer** et bien homogénéiser par pipetage (5-6 allers retours).

Conserver le tube ZR BashingBead Lysis Tube à -20°C jusqu'à la fin des expériences, il est possible de réaliser de nouvelles extractions sur l'échantillon en cas de problème.

Procéder ensuite à la purification de l'ADN et de l'ARN (partie IV).

(IV) Purification d'ADN et d'ARN (dans deux fractions séparées)

- 1) Transférer 800 µL d'échantillon (mélange surnageant de broyage + DNA/RNA Lysis Buffer) sur un **Spin-Away Filter (jaune)** installé sur un tube collecteur et centrifuger 30 secondes à 13 000 g. **TRANSFERER** et **GARDER** le filtrat dans un tube 5 mL nuclease-free non fourni. Transférer les 400 µL restant d'échantillon sur le **Spin-Away Filter (jaune)** installé sur le tube collecteur et centrifuger 30 secondes à 13 000 g. **TRANSFERER** le filtrat dans le tube 5 mL utilisé précédemment.

Le **filtrat** sera utilisé pour la purification de l'ARN et la **colonne** pour la purification de l'ADN.

<u>Purification de l'ADN</u> (l'ADN est lié à la colonne)	<u>Purification de l'ARN</u> (l'ARN est dans le filtrat)
2) Transférer le Spin-Away Filter (jaune) dans un nouveau tube collecteur.	2) Ajouter 1,2 mL (1 volume) d'éthanol 100% au filtrat (1:1) et bien mélanger (à la pipette). Laisser ce mélange sur la paillasse le temps de s'occuper de la purification de l'ADN. Ensuite, transférer 800 µL d'échantillon (mélange filtrat + éthanol) dans un Zymo-Spin IICG Column (vert) installé sur un tube collecteur. Centrifuger 30 secondes à 13 000 g et jeter le filtrat. Répéter l'opération 2 fois. A cette étape, un traitement DNase I sur la colonne peut être effectué (voir "Traitement DNase I" en annexe).

Etapes communes aux 2 purifications : ADN et ARN

- 3) Ajouter 400 µL de **DNA/RNA Prep Buffer** à la colonne et centrifuger 30 secondes à 13 000g. Jeter le filtrat.
- 4) Ajouter 700 µL de **DNA/RNA Wash Buffer** à la colonne et centrifuger 30 secondes à 13 000g. Jeter le filtrat.
- 5) Ajouter 400 µL de **DNA/RNA Wash Buffer** à la colonne et centrifuger 2 minutes à 13 000 g pour s'assurer de l'élimination complète du tampon de lavage. Transférer délicatement la colonne sur un tube 1,5 mL propre (non fourni).
- 6) Ajouter 75 µL de **ZymoBIOMICS DNase/RNase-Free Water** directement sur la matrice de la colonne (en raison du faible volume, il est important de bien déposer l'eau sur le filtre et non sur les rebords de la colonne). Incuber 5 minutes à température ambiante. Puis centrifuger 30 secondes à 13 000 g pour éluer l'ADN et l'ARN de leurs colonnes respectives.

Pour augmenter le rendement, vous pouvez recharger l'éluat (75 µl) sur la matrice de la colonne, incuber à température ambiante pendant 3 minutes et recentrifuger.

Pour augmenter la concentration, chauffer l'eau ZymoBIOMICS™ DNase/RNase Free à 60°C avant utilisation. (ADN ?)

- 7) Placer un **Zymo-Spin III-HRC Filter** dans un tube collecteur et ajouter 600 µL de **ZymoBIOMICS HRC Prep Solution**. Centrifuger à 8 000 g pendant 3 minutes.

- 8) Installer la colonne **Zymo-Spin III-HRC Filter** préparée sur un tube final propre de 1,5 mL (non fourni) (tube annoté, avec bouchon et compatible avec le stockage à basse température). Transférer l'ADN et l'ARN élués (75 µL étape 6) sur la colonne préparée **Zymo-Spin III-HRC Filter**. Puis, centrifuger exactement à 16 000 g pendant 3 minutes.
- Les ADN et ARN filtrés peuvent être utilisés immédiatement ou stockés au congélateur (-20°C pour l'ADN et -80°C pour l'ARN).
- Mesurer les concentrations au Qubit (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit et Qubit™ RNA BR Assay Kit) et au Nanodrop.
Pour vérifier la qualité, déposer ~100 ng d'ADN (max 5µL) sur un gel d'agarose 0,8% et 1,5µL d'ARN sur une puce Agilent RNA 6000 Nano.

Annexes

➔ Traitement DNase I (en colonne)

- 1) Après l'étape de fixation de l'ARN (étape numéro 2 "Purification de l'ARN"), ajouter 400 µL de **DNA/RNA Wash Buffer** à la colonne et centrifuger 30 secondes à 13 000 g. Jeter le filtrat.
- 2) Pour chaque échantillon à traiter, préparer du **DNase I Reaction Mix** dans un tube sans nucléase (non fourni) et mélanger par retournements doux. Ajouter ensuite 80 µL de cette solution directement dans la colonne (en raison du faible volume, il est important de déposer cette solution sur le filtre et non sur les bords de la colonne) et incubé à température ambiante (20-30°C) durant 15 minutes. Puis, continuer la suite protocole de purification (étape 3).

DNase Reaction Mix

DNase I (reconstituée).....	5 µL
DNA Digestion Buffer	75 µL

➔ Echantillons stabilisés et stockés dans du DNA/RNA Shield

Recommandation : le **DNA/RNA Shield** lyse efficacement les cellules, inactive les nucléases et les agents infectieux et est idéal pour le stockage/transport d'échantillons à température ambiante avant la purification d'acide nucléique.

Échantillons liquides : Mélangez un volume égal de **DNA/RNA Shield** (concentré 2X) et d'échantillon (1:1).

Échantillons solides : Immerger l'échantillon (ne pas dépasser 10 % (v/v ou m/v)) dans du **DNA/RNA Shield** (1X).

Bien mélanger / homogénéiser l'échantillon avant stockage. Les échantillons dans le **DNA/RNA Shield** peuvent être stockés à température ambiante pour une durée supérieure ou égale à un mois ou plus longtemps à -20°C.