

Purification des produits de PCR de séquence
--

<u>Matériels nécessaires :</u>	Centrifugeuse à plaque Eppendorf 5804 Joint bleu d'assemblage (millipore MACF 096 04) Plaque de récupération Plaque de remplissage noire
<u>Réactifs nécessaires :</u>	Plaque MultiScreen-HV, 0.45 µm, Millipore, réf : MAHV N45, Sephadex G-50 superfine, GE Healthcare, réf : 17-0041-01 Eau stérile

Notes importantes :

- Pour les centrifugations des plaques avec la centrifugeuse Eppendorf 5804R, le réglage en g est indiqué à l'aide d'une étoile « * » à côté de la vitesse indiqué. **NE PAS CONFONDRE AVEC LA VITESSE EN RPM.**

Procédure :

1. Remplir les trous de la plaque de remplissage noire avec du Sephadex G-50 superfine
2. Retourner la plaque de remplissage noir sur une plaque MultiScreen-HV.
3. Tapoter la plaque noire pour que le Sephadex tombe dans la plaque MultiScreen-HV.
4. Placer 300µL d'eau stérile dans chaque puits avec la micropipette multicanaux.
5. Laisser reposer au minimum 3 heures à 4°C.
6. Effectuer le montage de purification : mettre le joint bleu sur la plaque de récupération, puis la plaque MultiScreen-HV sur le joint bleu.
7. Centrifuger à 1000g pendant 4min (2min de chaque côté).
8. Placer 125µL d'eau stérile dans chaque puis avec la micropipette multicanaux.
9. Centrifuger à 1000g pendant 4min (2min de chaque côté).
10. Ajouter 10 µL d'eau stérile aux produits de PCR de séquence
11. Enlever la plaque de récupération et la remplacer par une autre qui recevra les produits de PCR purifiés.
12. Déposer tout le volume de la PCR sans toucher le gel.
13. Centrifuger à 1000g pendant 4 min (2min de chaque côté).
14. Le produit purifié se trouve dans la plaque de récupération.
15. Si le nombre d'échantillons est inférieur à 48, transférer les échantillons dans une nouvelle plaque AB-1100, en remplissant seulement les colonnes impaires. Remplir les puits vides des colonnes impaires avec 20 µL d'eau distillée
16. Si le nombre d'échantillons est compris entre 48 et 96, compléter les puits vides avec 20µL d'eau distillée.