

## Extraction d'ADN constitutionnel sur sang total

Matériels nécessaires : Agitateur rotatif  
 Centrifugeuse Eppendorf X  
 Nanovue  
 Pipette Pasteur

Réactifs nécessaires : Ethanol 100%  
 Solution de RNase A, 100 mg/mL  
 BLB 1X, WLB 1X  
 SDS10%  
 NaCl 5M  
 TE  
 Proteinase K 100mg/mL

Préparation des solutions de travail :

## BLB (Blood Lysis Buffer) 20X, 1L

	Masse molaire	Pesée ou volume utilisée
NH <sub>4</sub> Cl, 3.1M	53.49 g/mol	165,8 g
KHCO <sub>3</sub> , 0.2M	100,12 g/mol	20 g
EDTA (pH 7.4), 20 mM	372,24 g/mol	40 mL d'EDTA 0,5 M

## WLB (White Lysis Buffer) 1X, 1L

	Masse molaire	Pesée ou volume utilisée
Tris Cl (pH 7.5 ou 8), 10 mM		6,7 mL de Tris HCl 1,5 M
NaCl, 400 mM	58,44 g/mol	23.4 g
EDTA (pH 8.2), 2 mM		4 mL de EDTA 0,5 M

## NaCl 5M, 500mL

	Masse molaire	Pesée ou volume utilisée
NaCl 5M	58,44 g/mol	146,1 g

## Tris EDTA 0,1mM (pH 7.5 - 8), 1L

	Masse molaire	Pesée ou volume utilisée
Tris Cl, 10 mM	121.14 g/mol	6,5 mL de Tris à 1,5 M
EDTA (pH 7.4), 0.1mM	M= 372,24 g/mol	200 µL EDTA à 0,5 M

Procédure :

**JOUR 1**

1. Vider les tubes de sang dans des Falcons 15mL préalablement annotés
2. Remplir les Falcons jusqu'à 15mL avec du BLB 1X à l'aide de la pompe doseuse. Placer à 4°C pendant 30min.
3. Centrifuger 15min à 5000 rpm, et éliminer le surnageant délicatement.
4. Remplir les Falcons jusqu'à 15mL avec du BLB 1X à l'aide de la pompe doseuse.
5. Dissocier le culot en tapant le tube à l'envers sur la paillasse
6. Recommencer les étapes 3 à 5, jusqu'à ce que le culot soit blanc
7. Centrifuger 15min à 5000 rpm, et jeter le surnageant
8. Suspendre le culot dans 3mL de WLB 1X à l'aide de la pompe doseuse. Vortexer.
9. Ajouter 300µL de SDS 10% et 100µL de protéinase K (20mg/mL).
10. Vortexer, bien fermer les bouchons des tubes et les placer sur l'agitateur rotatif
11. Placer l'agitateur rotatif dans une étuve ou pièce à 37°C, pendant la nuit.

**JOUR 2**

1. Enlever les tubes de 15mL de l'agitateur rotatif.
2. Ajouter 1mL de NaCl 5M à l'aide de la pompe doseuse. Vortexer jusqu'à ce que le mélange soit blanc mousseux.
3. Centrifuger 15min à 3600 rpm.
4. Pendant ce temps, préparer des flacons de prélèvement avec 5mL d'éthanol 100%, et des tubes de 1.5mL annotés contenant 500µL de TE 0.1mM
5. Renverser le surnageant dans le flacon de prélèvement contenant l'éthanol, il se forme une « méduse ».
6. Récupérer la méduse avec une pipette Pasteur, la mettre à sécher et la resuspendre dans le tube 1.5mL contenant la solution de TE.
7. Parafilmer les tubes et les placer à 65°C pendant 30min pour casser les nucléases.
8. Faire tourner les tubes sur la roue pendant 2 jours
9. Prendre la DO au Nanovue. correspondantes.