

Etapes de purification	Remarques
5. Incuber sur glace pendant 10 minutes.	<ul style="list-style-type: none"> • Une incubation à température ambiante peut être effectuée mais elle sera moins efficace dans l'élimination des impuretés.
6. Centrifuger à température ambiante pendant 5 minutes à 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Il peut être judicieux de prolonger la période de centrifugation (jusqu'à 15 minutes) pour réduire la turbidité (A₃₂₀ élevée) de la solution finale d'ADN.
7. Transférer délicatement le surnageant clair avec une pipette dans un tube de microcentrifugeuse propre. Jeter le culot contenant des impuretés.	<ul style="list-style-type: none"> • Le culot contient des impuretés troubles. Si le tube est perturbé accidentellement, vous pouvez le re-centrifuger.
8. Ajouter à 500 µL de surnageant 600 µL d'éthanol 95 à 100 % à température ambiante. Mélanger doucement par inversion 10 fois.	<ul style="list-style-type: none"> • Mélangé à l'éthanol, l'ADN est précipité. Un caillot de fibres d'ADN ou une fine précipitation (en fonction de la quantité d'ADN dans l'échantillon) peut apparaître. • Même si aucun caillot n'est détecté, l'ADN sera récupéré en suivant minutieusement les prochaines étapes.
9. Laisser reposer l'échantillon à température ambiante pendant 10 minutes pour que l'ADN précipite complètement.	<ul style="list-style-type: none"> • L'incubation à -20°C est déconseillée car les impuretés peuvent co-précipiter avec l'ADN.
10. Placer le tube dans la microcentrifugeuse dans un sens connu. Centrifuger à température ambiante pendant 2 minutes à 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Par exemple, placer chaque tube dans la microcentrifugeuse avec la charnière du bouchon à l'opposé du centre du rotor. Après centrifugation, le culot (même très petit) peut être localisé : il se trouve à l'extrémité du tube sous la charnière.
11. Retirer soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette puis le jeter. Veiller à ce que le culot d'ADN ne soit pas perturbé.	<ul style="list-style-type: none"> • Ce culot contient l'ADN. La perte du culot entraîne la perte de l'ADN. • Retourner le tube de sorte à placer le culot sur la paroi supérieure permettra d'insérer délicatement l'embout d'une pipette le long de la paroi inférieure pour retirer tout le surnageant. • Le surnageant peut contenir des impuretés; il convient d'en retirer le plus possible. • Le séchage excessif du culot peut compliquer la dissolution de l'ADN.
12. Lavage à l'éthanol : Ajouter délicatement 250 µL d'éthanol à 70 %. Laisser reposer à température ambiante pendant 1 minute. Retirer l'intégralité de l'éthanol tout en préservant le culot.	<ul style="list-style-type: none"> • Il est important de retirer l'intégralité de l'éthanol. La persistance d'éthanol risque de limiter la performance du test. • Ne pas perturber le culot d'ADN. • Le culot d'ADN peut être très petit. • Si le culot se détache, centrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à 15 000 × g. • Une fois l'éthanol à 70 % éliminé, le tube peut être passé à la centrifugeuse à impulsions pour éliminer tout résidu d'éthanol.

Etapes de purification	Remarques
13. Ajouter 100 µL de solution TE (cf. page 1) pour dissoudre le culot d'ADN. Vortexer pendant au moins 5 secondes.	<ul style="list-style-type: none"> • Si une plus forte concentration d'ADN est souhaitée, utiliser 50 µL de TE. • Note : que l'hydratation (dissolution) totale de grandes quantités d'ADN de haut poids moléculaire peut être difficile. • L'hydratation incomplète de l'ADN peut entraîner des erreurs d'estimation de la concentration d'ADN et l'échec d'applications en aval telles que la PCR.
14. Assurer la réhydratation complète de l'ADN (culot et frottis) en effectuant une incubation à température ambiante pendant une nuit suivie d'un mélange sur vortex ou une incubation à 50°C pendant 1 heure avec mélange sur vortex de temps à autre.	<ul style="list-style-type: none"> • Une réhydratation incomplète de l'ADN peut entraîner l'inexactitude des estimations de concentration en ADN et causer des erreurs potentielles des applications dérivées telles que la PCR.
15. Possibilités de conservation de l'ADN totalement réhydraté: a) recommandée dans le TE, en aliquotes à -20°C pour une conservation à long terme ou b) dans TE à 4°C pour une conservation jusqu'à 2 mois.	<ul style="list-style-type: none"> • Congeler l'ADN purifié dans le TE entraîne la précipitation de l'ADN. Lors de la décongélation d'ADN purifié, veiller particulièrement à la réhydratation, tel qu'indiqué à l'étape 14.

Quantification de l'ADN

Par fluorescence

Les analyses par marqueurs fluorescents sont plus précises que l'absorbance à 260 nm pour quantifier la quantité d'ADN double brin (ADNdb) dans un échantillon d'ADN. Nous recommandons l'utilisation de marqueurs fluorescents tels que PicoGreen® ou SYBR® Green I pour quantifier l'ADNdb car il y a moins d'interférences par contamination d'ARN. Un protocole bon marché utilisant SYBR Green I est décrit dans PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹ (« Quantification d'ADN à l'aide du marqueur SYBR Green I et d'un lecteur de microplaques »). Vous pouvez aussi utiliser des kits en vente dans le commerce tels que le kit Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit d'Invitrogen (cat. n° Q-33130). Quel que soit le protocole choisi, nous recommandons de diluer l'ADN purifié au 1/50 avec la solution TE et d'utiliser 5 µL pour l'analyse de quantification.

Par absorbance

Si vous choisissez de quantifier l'ADN par absorbance, nous vous recommandons de traiter d'abord l'échantillon purifié par RNase pour synthétiser l'ARN contaminant, puis d'éliminer les fragments d'ARN par précipitation de l'ADN à l'éthanol. Un protocole détaillé est dans PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*². (« Élimination de l'ARN par synthèse double RNase »). Noter que l'ADN d'un échantillon oral contient généralement bien plus d'ARN que l'ADN d'échantillons sanguins. Veiller à ce que l'ADN précipité à l'alcool soit totalement dissout avant de lire l'absorbance.

Facteur de conversion : Une absorbance de 1,0 à 260 nm correspond à une concentration de 50 ng/µL (50 µg/mL) pour de l'ADNdb pur.

Vérifier que les valeurs d'absorbance sont comprises dans la fourchette linéaire du spectrophotomètre. Rediluer et remesurer les échantillons dont les valeurs sont en dehors de cette fourchette. Consulter la notice de votre appareil pour plus d'informations.

Méthode :

1. Diluer une aliquote de 10 µL d'ADN purifié traité par RNase dans 90 µL de TE (dilution 1/10). Mélanger en agitant délicatement de haut en bas avec une pipette. Attendre que les bulles disparaissent.
2. Utiliser le TE dans la cellule (vide) de référence.
3. Mesurer l'absorbance à 320 nm, 280 nm et 260 nm.
4. Calculer les valeurs A_{280} et A_{260} corrigées en soustrayant l'absorbance à 320 nm (A_{320}) aux valeurs A_{280} et A_{260} .
5. Concentration d'ADN en ng/µL = valeur A_{260} corrigée \times 10 (facteur de dilution) \times 50 (facteur de conversion).
6. Ratio A_{260}/A_{280} : diviser la valeur A_{260} corrigée par la valeur A_{280} corrigée.

Exemple

1. Imaginons les valeurs mesurées $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ et $A_{260} = 0,295$.
2. La concentration en ADN de l'échantillon non dilué sera la suivante :
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [facteur de dilution] \times 50 [facteur de conversion]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ou $135 \mu\text{g}/\text{mL}$
3. Le bon ratio A_{260}/A_{280} sera le suivant :
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Références

- ¹ DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Remplacé par DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
- ² RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

Le service technique est disponible du lundi au vendredi de 9h00 à 17h00 EST :

- Numéro sans frais Amérique du Nord : 1.866.813.6354, option 6
- Pour tout autre pays, composez : 613.723.5757, option 6
- Email : support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA et ORAcollect®-DNA ne sont pas disponibles à la vente aux Etats-Unis.

Oragene®-DISCOVER est destiné exclusivement à la recherche et non au diagnostic.

Certains produits DNA Genotek peuvent ne pas être disponibles dans certaines régions.

*Oragene, prepli et ORAcollect sont des marques déposées de DNA Genotek Inc. Tous les autres noms et marques cités appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Tous les protocoles DNA Genotek, rapports et notes d'applications sont disponibles dans la rubrique "support" de notre site Internet www.dnagenotek.com.

Guide rapide de référence:

Protocole de laboratoire pour la purification manuelle de l'ADN d'un échantillon de 0,5 mL

Etapes de purification
1. Mélanger l'échantillon dans le kit DNA Genotek par inversion et agiter doucement pendant quelques secondes.
2. Incuber l'échantillon à 50°C dans un incubateur à eau pendant 1 heure au minimum ou dans un incubateur à air pendant 2 heures au minimum.
3. Transférer 500 µL de l'échantillon mélangé dans un tube de microcentrifugation.
4. Ajouter 20 µL de PT-L2P au tube de microcentrifugeuse et mélanger sur vortex pendant quelques secondes.
5. Incuber sur glace pendant 10 minutes.
6. Centrifuger à température ambiante pendant 5 minutes à 15 000 × g.
7. Transférer délicatement le surnageant clair avec le bout d'une pipette dans un tube de microcentrifugeuse propre. Jeter le culot.
8. Ajouter à 600 µL de surnageant 600 µL d'éthanol 95 à 100 % à température ambiante. Mélanger doucement par inversion 10 fois.
9. Laisser reposer l'échantillon à température ambiante pendant 10 minutes pour que l'ADN précipite complètement.
10. Placer le tube dans la microcentrifugeuse dans un sens connu. Centrifuger à température ambiante pendant 2 minutes à 15 000 × g.
11. Retirer soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette puis le jeter. Veiller à ce que le culot d'ADN ne soit pas abîmé.
12. Ajouter 250 µL d'éthanol à 70 % et laisser reposer à température ambiante pendant 1 minute. Retirer l'intégralité de l'éthanol tout en préservant le culot.
13. Ajouter 100 µL de solution TE et mélanger sur vortex pendant au moins 5 secondes.
14. Effectuer une incubation à température ambiante pendant une nuit ou une incubation à 50°C pendant 1 heure avec mélange sur vortex de temps à autre.
15. Conservation : recommandée en aliquotes à -20°C pour une conservation à long terme ou à 4°C pour une conservation jusqu'à 2 mois.