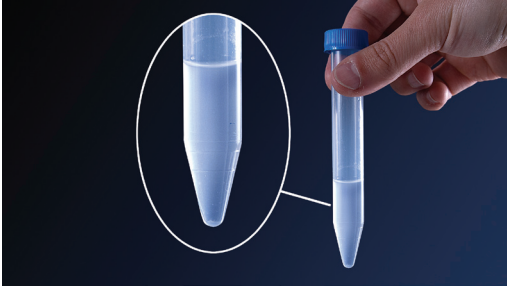
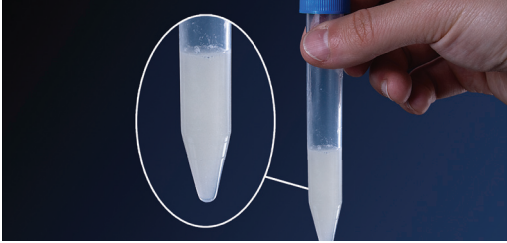
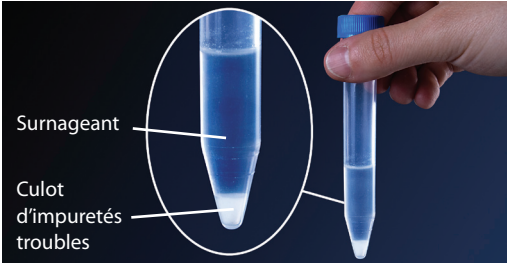
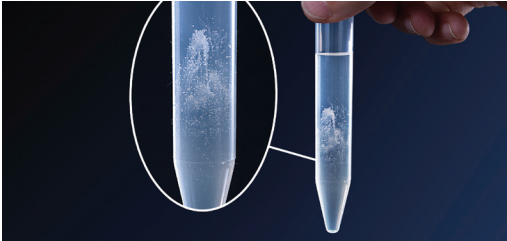
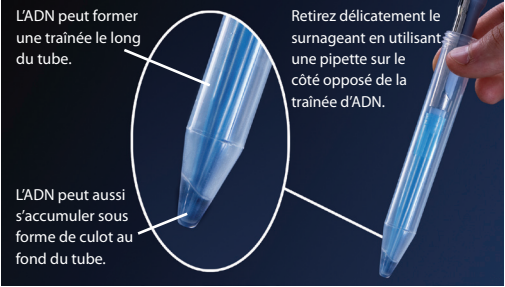



Procédure

Étapes de la purification	Remarques
<p>1. Mélangez l'échantillon dans le kit DNA Genotek en inversant le tube et en l'agitant doucement quelques secondes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Le but est de s'assurer que les échantillons visqueux sont bien mélangés.
<p>2. Incuber l'échantillon à 50°C dans l'incubateur à eau pendant au moins 1 heure ou dans un incubateur à air pendant au moins 2 heures.</p> <p>Remarque : L'utilisation d'un incubateur à air est préférable car, dans un bain d'eau, les tubes peuvent flotter. Si vous devez utiliser un bain d'eau, assurez-vous que la partie du tube contenant l'échantillon reste immergée dans l'eau.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Cette étape de traitement à la chaleur est essentielle pour maximiser la quantité d'ADN extraite et garantir l'inactivation permanente des nucléases. Elle doit s'effectuer dans le tube de prélèvement d'origine. L'échantillon peut être incubé à 50°C pendant une nuit pour plus de commodité. Cette étape d'incubation peut s'effectuer n'importe quand après le prélèvement de l'échantillon et avant la purification de l'ADN. L'incubateur à air demande plus de temps car la température s'équilibre plus lentement que dans un incubateur à eau.
<p>3. Transférez l'intégralité de l'échantillon dans un tube de centrifugeuse de 15 mL (figure 1). Notez le volume de l'échantillon.</p>  <p>Figure 1 : Avant de passer à l'étape 4, assurez-vous que l'intégralité de l'échantillon a été incubée et transférée dans un nouveau tube de centrifugeuse de 15 mL, tel qu'indiqué.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Le transfert peut s'effectuer soit en versant soit en utilisant une pipette en verre ou en plastique.
<p>4. Ajoutez 1/25 de volume de PT-L2P et vortexez pendant quelques secondes (figure 2).</p>  <p>Figure 2 : Après l'ajout de PT-L2P et l'incubation sur glace pendant 10 minutes, l'échantillon ne sera plus limpide mais plutôt trouble.</p>	<ul style="list-style-type: none"> p.ex. 160 µL pour 4 mL d'échantillon dans chaque tube. L'échantillon deviendra trouble en raison de la précipitation des impuretés et des inhibiteurs.
<p>5. Incubez dans la glace pendant 10 minutes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Une incubation à température ambiante est possible mais elle éliminera moins efficacement les impuretés.

Étapes de la purification	Remarques
<p>6. Centrifugez à température ambiante pendant 10 minutes à la vitesse maximale (3 500 x g minimum). Toute centrifugeuse dotée d'un rotor à godets mobiles ou angulaire capable de générer cette force centrifuge convient.</p>  <p>Figure 3 : Après la centrifugation, il y aura une accumulation de matières troubles au fond du tube. Le surnageant devrait être clairement limpide.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Une force centrifuge plus élevée minimise la quantité de matières troubles transportées dans l'ADN purifié (figure 3). • Avant de commencer, vérifiez auprès du fabricant que les tubes de centrifugeuse de 15 mL résistent à la force centrifuge. • Vous pouvez prolonger la centrifugation (jusqu'à 20 minutes) s'il est important de réduire la turbidité de la solution finale d'ADN.
<p>7. Transférez délicatement la majorité du surnageant limpide à l'aide d'une pipette dans un nouveau tube centrifugeuse de 15 mL. Jetez le culot.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Laissez une petite quantité de surnageant à l'arrière pour préserver le culot. Le culot contient des impuretés troubles.
<p>8. Ajoutez 1,2 volume d'éthanol à 95-100 % à température ambiante au surnageant limpide. Mélangez doucement en inversant le tube 10 fois.</p>  <p>Figure 4 : Après l'ajout d'éthanol, l'ADN précipite, ce qui peut se traduire par un amas de fibres visibles.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mélangé à l'éthanol, l'ADN précipite. L'ADN précipité peut apparaître sous forme d'amas de fibres (figure 4). Même si aucun amas n'apparaît, vous récupérerez l'ADN dans les étapes suivantes.
<p>9. Laissez l'échantillon reposer à température ambiante pendant 10 minutes pour que l'ADN précipite complètement.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Une incubation à -20°C n'est pas recommandée car il se peut que les impuretés co-précipitent avec l'ADN.
<p>10. Centrifugez à température ambiante pendant 10 minutes à une vitesse maximale (3 500 x g minimum).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Une vitesse minimale de centrifugation de 3500 x g (voir tableau 2) est nécessaire. Toute centrifugeuse avec rotor à godets mobiles ou rotor angulaire capable de générer cette force centrifuge convient.

Étapes de la purification	Remarques
<p>11. Retirer délicatement le surnageant avec une pipette en verre ou en plastique et l'éliminer. Veillez à éviter de perturber le culot d'ADN.</p>  <p>L'ADN peut former une traînée le long du tube.</p> <p>Retirez délicatement le surnageant en utilisant une pipette sur le côté opposé de la traînée d'ADN.</p> <p>L'ADN peut aussi s'accumuler sous forme de culot au fond du tube.</p> <p>Figure 5 : À l'aide de la pointe d'une pipette, gratter délicatement l'intérieur du tube peut révéler la présence d'une traînée d'ADN</p>	<ul style="list-style-type: none"> Le surnageant peut contenir des impuretés et doit être éliminé au maximum. L'ADN précipité apparaît au fond du tube sous forme de culot et peut former une traînée le long de la paroi du tube (figures 5). La traînée d'ADN peut être située sur le côté du tube opposé au centre de la centrifugeuse. Vous pouvez localiser la traînée par un test de « grattage ». Vous pouvez en vérifier la présence en grattant l'intérieur du tube à l'aide d'un embout P1000. Une traînée peut apparaître (figure 5).
<p>12. Lavage à l'éthanol : Ajoutez délicatement 1 mL d'éthanol à 70 % au tube tout en préservant la traînée ou le culot. Laissez-le à température ambiante pendant 1 minute. Agitez délicatement par rotations et retirez l'intégralité de l'éthanol tout en veillant à préserver le culot ou la traînée.</p>	<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. Veillez à ne pas toucher le culot d'ADN ou la traînée. Vous pouvez réaliser une centrifugation de courte durée (moins d'1 minute) afin de faciliter l'élimination totale du surnageant. Si le culot se détache avec le lavage à l'éthanol, centrifugez l'échantillon 5 minutes à la vitesse maximale (3 500 x g minimum).
<p>13. Réhydrater l'ADN en ajoutant 0,2-1,0 mL de solution TE et en vortexant l'échantillon pendant 30 secondes.</p> <p>Pour OC-100 et OCR-100, réhydrater l'ADN en ajoutant 0,2 mL de solution TE et en vortexant l'échantillon pendant 30 secondes.</p>  <p>Figure 6 : Vortexer l'échantillon pendant 30 secondes permet de récupérer la traînée d'ADN située sur la paroi du tube. L'ADN conservera un poids moléculaire élevé.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Si vous souhaitez une plus forte concentration d'ADN, vous pouvez réduire le volume de TE. Il convient d'utiliser une solution TE de 200 µL minimum. Un séchage excessif du culot (> 10 minutes) et l'emploi de moins de 500 µL de solution TE peut rendre la réhydratation (dissolution) de l'ADN difficile et réduire le rendement ou compliquer la quantification. L'ADN précipité apparaît au fond du tube sous forme de culot et peut former une traînée le long de la paroi du tube. Pour garantir une récupération d'ADN maximale, vous devez vortexer l'échantillon après avoir ajouté le solvant d'ADN (solution TE). Le fait de vortexer permet de s'assurer que l'ADN formant une traînée sur le côté du tube est bien récupéré (figure 6). N'hésitez pas à vortexer l'échantillon car l'ADN conservera un poids moléculaire élevé.

Étapes de la purification	Remarques
14. Assurer la réhydratation complète de l'ADN (culot et traînée sur la paroi du tube) en effectuant une incubation à température ambiante pour la nuit, puis vortexer ou à 50°C pour 1 heure et vortexer occasionnellement.	<ul style="list-style-type: none"> L'hydratation incomplète de l'ADN peut entraîner un manque de précision dans l'estimation de la concentration de l'ADN et l'échec éventuel des applications en aval telles que la PCR.
15. Transférez l'ADN réhydraté dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL pour le stockage.	
<p>Étape optionnelle :</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifugez l'ADN réhydraté à température ambiante pendant 15 minutes à 15 000 x g. Transférez le surnageant dans un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL tout en préservant le culot. 	<p>Remarque : le culot contient des matières insolubles et troubles.</p> <ul style="list-style-type: none"> Afin de maximiser l'extraction d'ADN, il faut s'assurer que l'ADN a été entièrement réhydraté (étape 14) avant de réaliser cette étape de centrifugation. Cette étape de centrifugation permet d'éliminer les matières troubles résiduelles de l'échantillon d'ADN. Veillez à préserver le culot lors du transfert du surnageant limpide dans un nouveau tube.
<p>16. Possibilités de conservation de l'ADN totalement réhydraté :</p> <ol style="list-style-type: none"> recommandé dans TE, en aliquotes à -20°C pour une conservation de longue durée ou dans TE à 4°C pour une durée maximale de 2 mois. 	<ul style="list-style-type: none"> La congélation de l'ADN purifié dans un tampon TE peut provoquer la précipitation de l'ADN. Lors de la décongélation de l'ADN purifié, portez une attention particulière à la réhydratation, comme décrit 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 à l'ARN. Un protocole peu onéreux 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 tels que le 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. Vous trouverez un protocole détaillé dans PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*². («Élimination de l'ARN par synthèse double RNase»). Veuillez noter que l'ADN d'un échantillon oral contient généralement bien plus d'ARN que dans les échantillons sanguins. Assurez-vous que l'ADN précipité à l'alcool est 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.

Vérifiez que les valeurs d'absorbance sont comprises dans la fourchette linéaire du spectrophotomètre. Rediluez et remesurez les échantillons dont les valeurs sont en dehors de cette fourchette. Reportez-vous à la notice de votre appareil pour plus d'informations.

Méthode :

1. Diluez une aliquote de 10 μL d'ADN purifié traité par RNase avec 90 μL de TE (dilution 1/10). Mélangez doucement en agitant la pipette de haut en bas. Attendez que les bulles disparaissent.
2. Utilisez le TE dans la cellule (vide) de référence.
3. Mesurez l'absorbance à 320 nm, 280 nm et 260 nm.
4. Calculez 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} : divisez 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 $135 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$
3. Le ratio des valeurs corrigées A_{260}/A_{280} sera le suivant :
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

