

	Mode opératoire	Réf : MO_DNAext_CTAB Version 1 date :07 2004 page 1/2
	MINI EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE Méthode au CTAB	

1. Objet et domaine d'application

Extraction ADNg

2. Documents de référence

Protocole équipe INT (P Tillard et M Lepetit)

3. Hygiène et sécurité

CTAB :



[GHS05, GHS07, GHS08, GHS09](#)

Hazard statements

[H302-H315-H318-H335-H373-H400](#)

Utiliser les EPI !

[dust mask type N95 \(US\)](#), [Eyeshields](#), [Faceshields](#), [Gloves](#)

4. Réactifs (chimiques et biologiques)

CTAB (Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide ; Sigma H6269)

NaCl 5M

EDTA 0.5M pH8

Tris 1M pH8

Chloroforme alcool iso-amylque 24/1 v/v

EtOH 70°C

Eau stérile

5. Contenu du mode opératoire

Tampon d'extraction (préparer extempo, conserver <2jours à 4°C)

Volume final (QSP H ₂ O)	12.5ml	25 ml	50 ml	100ml
CTAB	0.25g	0.5g	1g	2g
NaCl 5M	4.5ml	7ml	14ml	28ml
EDTA 0.5M pH8	0.5	1ml	2ml	4ml
Tris 1M pH8	1.25ml	2.5ml	5ml	10ml

6. Les échantillons sont récoltés dans des microtubes de 2ml, congelés dans N₂ liquide et conservés au congélateur -80°C. Une bille d'acier est ajoutée, soit lors de la congélation, soit avant broyage.

7. **Les tissus sont broyés au broyeur à billes.** Les 2 portoirs Qiagen en téflon blanc (24 places) sont au congélateur -50°C. Pour le temps de la manip on peut les stocker dans le -

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :			C Tournaire

	Mode opératoire	Réf : MO_DNAext_CTAB
	MINI EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE Méthode au CTAB	Version 1 date :07 2004 page 2/2

80°C qui est à proximité du broyeur. Préparer des feuilles de papier 3MM découpées à la taille (80x122mm) pour caler les tubes dans le portoir au dessus et en dessous (évite de casser les tubes).

- a. Sortir les portoirs du congélateur. **Mettre les tubes dans les 2 portoirs** (équilibrer les portoirs). Mettre les feuilles de papier en haut et en bas pour caler les tubes avec les couvercles. Placer les 2 portoirs sur les 2 bras. Régler **1 minute, 25 secousses/seconde**. Broyer.
 - b. **Remettre les portoirs avec les tubes à - 80°C**. Attention vérifier que les tubes ne sont pas cassés (si casse, transférer dans un nouveau tube juste après le rajout du tampon d'extraction). Attendre 5 à 10 minutes que les portoirs refroidissent au congélateur.
 - c. **Effectuer un nouveau broyage de 1 minute**. Remettre les échantillons dans N₂ liquide ou à -80°C.
8. Sortir les tubes de N₂ liquide (bien laisser N₂ s'évaporer). Ajouter **500µl de tampon d'extraction**. Mettre 5 minutes sur agitateur à agitation maximale.
 9. **Mettre les tubes 25 min à 60°C**.
 10. **Centrifuger** 10 min à 12000 rpm
 11. Récolter le surnageant dans un microtube de 1.5 ml. Ajouter **500µl de chloroforme/alc. Iso-amylique 24/1**. Vortexer.
 12. **Centrifuger** 10 min à 12000 rpm.
 13. Récolter le surnageant dans un microtube de 1.5 ml. Ajouter **500µl d'isopropanol**. Mélanger par inversion du tube
 14. **Centrifuger** 10 min à 12000 rpm.
 15. **Eliminer le surnageant. Laver le culot avec EtOH 70°**.
 16. **Centrifuger** 10 min à 12000 rpm.
 17. **Eliminer le surnageant. Faire sécher le culot sur la paillasse ou 5 min sous la cloche à vide. resuspendre dans 50µl d'eau stérile**. Reprendre l'ADN 5min à 65°C. Utiliser 1µl par réaction pCR. Stocker à -20°C.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :			C Tournaire

	Mode opératoire	Réf : MO_DNAext_CTAB
	MINI EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE Méthode au CTAB	Version 1 date :07 2004 page 3/2

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :			C Tournaire



Mode opératoire

**MINI EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE
Méthode au CTAB**

Réf :
MO_DNAext_CTAB
Version 1
date :07 2004
page 4/2