

## **Protocole d'extraction de l'ADNe à partir d'échantillons d'eau de mer** **(EL et EAA)**

A réception, les demi-filtres sont triés et la moitié de chaque filtre est stockée à -80°C et l'autre moitié est utilisée pour l'extraction.

### ***Filtres 20 µm (45 mm) Kit Nucleospin Plant II Mini Kit (Macherey Nagel ref 740770.50)***

#### • **Matériel et équipement**

- Gants, Eppendorf 1.5ml et 2ml, Centrifugeuse
- Préchauffer le thermomixer à eppendorf à 56°C
- Stériliser des ciseaux et des pinces (sinon les décontaminer à chaque filtre)
- Préparer la Proteinase K 20mg/ml (Macherey Nagel ref 740506): 100mg de poudre additionnée de 2.5ml de tampon PB. Ne pas vortexer, Incuber 1 min à température ambiante, aliquoter et conserver à -20°C
- Préparer le Lysozyme 20mg/ml (Sigma ref 4403-5g) : peser 80mg additionné de 4ml d'eau biologie moléculaire. Aliquoter et conserver à -20°C
- Préchauffer le tampon de lyse PL1 si observation d'un précipité de SDS
- Le tampon de lavage PW2 doit être additionné de 100ml d'éthanol 96-100%
- Le tampon d'élution PE est préchauffé à 65°C

#### • **Lyse**

- Découper chaque demi-filtre (congelé) en petits bouts dans un eppendorf de 2ml
- Ajouter 400µl PL1 dès le découpage
- Ajouter 25µl de proteinase K puis 100µl de lysozyme
- Vortexer (attention à la mousse) et incuber 5min à température ambiante
- Incuber dans le thermomixer 2h à 56°C agitation 900rpm

NB : Etiqueter les eppendorfs de 1,5ml et annoter les colonnes, nettoyer ciseaux et pinces

#### • **Clarification du lysat**

- Transférer le lysat sur la colonne mauve
- Centrifuger 5min à 11000g
- Transférer l'éluat dans un eppendorf 2ml

#### • **Précipitation / Purification**

- Ajouter 450µl PC et mélanger par pipetage 5 fois
- Transférer sur la colonne verte (650µl max)
- Centrifuger 1min à 11000g et éliminer le filtrat
- Répéter cette étape jusqu'à ce que tout le liquide soit passé
- Ajouter 400µl PW1 sur la membrane de la colonne
- Centrifuger 1min 11000g et éliminer le filtrat
- Ajouter 700µl PW2 sur la membrane de la colonne
- Centrifuger 1min 11000g et éliminer le filtrat
- Ajouter 200µl PW2 sur la membrane de la colonne
- Centrifuger 2min 11000g et éliminer le filtrat
- Transférer la colonne dans un eppendorf 1.5ml

#### • **Elution**

- Ajouter 50µl PE (préchauffé) sur la membrane de la colonne
- Incuber 5min à 65°C
- Centrifuger 1min à 11000g
- Répéter ces étapes avec 50µl PE supplémentaire

#### • **Conservation**

- Aliquoter les 100µl d'élution : 10µl pour la mesure de concentration ADN, 30µl pour les analyses de biologie moléculaire, le reste (60µl) est conservé à -80°C.

#### • **Blancs**

- Effectuer un blanc extraction tous les deux 2mois

Nb : En cas de 2 filtres/échantillon, l'extraction est faite séparément et les 2 éluations sont réunies en un volume de 200µl.

### **Filtres 3 et 0.2 µm (142 mm) Kit Nucleospin Plant II Midi Kit (Macherey Nagel ref740771.20)**

- **Matériel et équipement**

- Gants, Eppendorf 1.5ml tubes à centrifuger de 15ml, centrifugeuse, four à hybridation (ou thermomixer pour tubes de 15 ml). Préchauffer four à hybridation à 56°C
- Stériliser des ciseaux et des pinces (sinon les décontaminer à chaque filtre)
- Préparer la Proteinase K 20mg/ml (Macherey Nagel ref 740506): 100mg de poudre additionnée de 2.5ml de tampon PB. Ne pas vortexer, Incuber 1 min à température ambiante, aliquoter et conserver à -20°C
- Préparer le Lysozyme 20mg/ml (Sigma ref 4403-5g) : peser 80mg additionné de 4ml d'eau biologie moléculaire. Aliquoter et conserver à -20°C
- Préchauffer le tampon de lyse PL1 si observation d'un précipité de SDS
- Le tampon de lavage PW2 doit être additionné de 100ml d'éthanol 96-100%
- Le tampon d'élution PE est préchauffé à 65°C

- **Lyse**

- Découper chaque demi-filtre (congelé) en petits bouts dans un tube de 15ml (garder les tubes de 15 ml fournis dans le kit pour l'élution.
- Ajouter 3.4ml (4\* 850µl) PL1 dès le découpage
- Ajouter 50µl de proteinase K puis 100µl de lysozyme
- Vortexer (attention à la mousse) et incuber 5min à température ambiante
- Incuber dans le four à hybridation ou le thermomixer 2h à 56°C agitation

Nb : Etiqueter eppendorfs de 1,5ml pour les aliquots et annoter les tubes de 15ml, nettoyer ciseaux et pinces

- **Clarification du lysat**

- Transférer le lysat dans le tube Nucleospin filter Midi
- Centrifuger 10min à 4500g
- Transférer l'éluat dans un tube de 15 ml (non fourni)

- **Précipitation / Purification**

- Ajouter 3ml PC et vortexer 30s
- Transférer dans le tube Nucleospin plant II midi (5ml max)
- Centrifuger 2min à 4500g et éliminer le filtrat
- Répéter cette étape jusqu'à ce que tout le liquide soit passé
- Ajouter 1ml PW1 sur la membrane de la colonne
- Centrifuger 2min 4500g et éliminer le filtrat
- Ajouter 3ml PW2 sur la membrane de la colonne
- Centrifuger 2min 4500g et éliminer le filtrat
- Ajouter 1ml PW2 sur la membrane de la colonne
- Centrifuger 10min 4500g et éliminer le filtrat
- Transférer la colonne dans un tube de 15 ml (fourni)

- **Elution**

- Ajouter 200µl PE (préchauffé) sur la membrane de la colonne
- Incuber 5min à 65°C
- Centrifuger 2min à 4500g
- Répéter ces étapes en reprenant les même 200µl

- **Conservation**

- Aliquoter les 200µl d'élution : 10µl pour la mesure de concentration ADN, 30µl pour les analyses de biologie moléculaire, le reste est conservé à -80°C (= 4 aliquots de 40µl. le dernier peut contenir moins de 40µl à cause du volume perdu sur la membrane lors de l'élution)

- **Blancs**

- Effectuer un blanc extraction tous les deux mois

Nb : En cas de 2 filtres/échantillon, l'extraction est faite séparément et les 2 éluations sont réunies en un volume de 200µl. 24 échantillons en 4-5heures.