

Protocole de laboratoire pour la purification manuelle d'ADN à partir de 0,5 ml d'Oragene[®]•DNA/salive

Rendement en ADN et stabilité avec Oragene•DNA

Oragene•DNA est conçu pour extraire l'ADN présent en grande quantité dans la salive. La médiane de rendement en ADN obtenu à partir de 2 ml de salive extrait par 2 ml d'Oragene•DNA est de 110 µg.

Lorsque la salive est mélangée avec la solution Oragene•DNA, l'ADN est immédiatement stabilisé. Les échantillons Oragene•DNA/salive sont stables à température ambiante pendant des années sans traitement. Si le laboratoire a pour pratique de stocker les échantillons congelés, les échantillons Oragene•DNA/salive peuvent être stockés indéfiniment entre -15 et -20 °C et soumis à de multiples étapes de congélation/décongélation sans détérioration de l'ADN.

La purification manuelle en utilisant le protocole qui suit permettra un rendement élevé d'ADN. En outre, Oragene•DNA est compatible avec de nombreux systèmes de purification d'ADN à haut débit.

Le protocole dont les étapes sont détaillées ci-après décrit la méthode de purification de l'ADN à partir d'un aliquot de 500 µl d'un échantillon d'Oragene•DNA/salive. Des volumes inférieurs à 500 µl peuvent être purifiés en ajustant les volumes de réactifs en conséquence.

Équipement et réactifs à fournir par l'utilisateur

- Microcentrifugeuse capable d'atteindre une vitesse de 13 000 tr/min (15 000 × g)
- Incubateur à air ou à eau à 50° C (remarque : l'incubateur à eau est déconseillé pour OG-500)
- Éthanol (95 à 100 %) à température ambiante
- Tampon ADN : TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ou solution similaire
- (Facultatif) Glycogène (20 mg/ml) (par ex., Invitrogen Cat. N° 10814-010)
- Éthanol (70 %) à température ambiante

Procédure

Purification	Remarques
1. Mélanger l'échantillon d'Oragene•DNA/salive dans le tube Oragene•DNA en inversant le tube et en l'agitant doucement pendant quelques secondes.	<ul style="list-style-type: none"> • Le but de cette opération est de faire en sorte que les échantillons visqueux de salive soient correctement mélangés avec la solution Oragene•DNA.
2. Incuber l'échantillon à 50 °C dans un incubateur à eau pendant un minimum d'une heure ou dans un incubateur à air pendant un minimum de deux heures.	<ul style="list-style-type: none"> • L'ADN dans Oragene•DNA est stable à température ambiante, que l'étape d'incubation ait été réalisée ou non. • Cette étape de traitement à la chaleur est essentielle pour permettre une bonne libération de l'ADN et une inactivation permanente des nucléases. • Cette étape d'incubation peut être réalisée à tout moment après le prélèvement de la salive et avant qu'elle ne soit purifiée. • Il est recommandé d'incuber tout l'échantillon afin de garantir que cette étape a bien été réalisée. • L'échantillon peut être incubé dans le récipient d'origine ou après transfert dans un autre tube. • L'échantillon peut être incubé une nuit à 50 °C pour plus de commodité. • Une période d'incubation plus longue est nécessaire dans un incubateur à air car l'obtention de la température d'équilibre se fait plus lentement que dans un incubateur à eau.

Purification	Remarques
3. Transférer 500 µl de l'échantillon mélangé Oragene•DNA/salive dans un microtube de centrifugation de 1,5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Le restant de l'échantillon Oragene•DNA/salive peut être stocké à température ambiante ou congelé (-15 °C à -20 °C).
4. Pour 500 µl d'Oragene•DNA/salive, ajouter 20 µl (1/25 ^e du volume) d'Oragene•DNA Purifier (OG-L2P, fourni) dans le microtube de centrifugation et mélanger en vortexant pendant quelques secondes.	<ul style="list-style-type: none"> L'échantillon deviendra trouble en raison de la précipitation des impuretés et des inhibiteurs.
5. Laisser incuber dans la glace pendant 10 minutes.	<ul style="list-style-type: none"> Cette incubation peut avoir lieu à température ambiante, mais elle éliminera légèrement moins efficacement les impuretés.
6. Centrifuger à température ambiante pendant 5 minutes à 13 000 tr/min (15 000 × g).	<ul style="list-style-type: none"> Une durée de centrifugation plus longue (jusqu'à 15 min) peut être utile pour réduire la turbidité (valeur élevée A₃₂₀) de la solution d'ADN finale.
<p>7. Transférer le surnageant limpide à l'aide d'un cône de pipette dans un nouveau microtube. Éliminer le culot contenant les impuretés.</p> <p>Facultatif : Ajout de glycogène</p>	<ul style="list-style-type: none"> Le culot contient des impuretés turbides. Si le tube est agité accidentellement, il doit être de nouveau centrifugé. <p><i>Facultatif : Ajout de glycogène</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Certains utilisateurs préféreront ajouter 5 µl (100 µg) de glycogène au surnageant pour rendre le culot plus visible.
8. Ajouter 500 µl (c.-à-d. un volume égal) d'éthanol à 95-100 % conservé à température ambiante aux 500 µl de surnageant. Mélanger doucement en inversant le tube 10 fois.	<ul style="list-style-type: none"> Au cours du mélange avec l'éthanol, l'ADN formera un précipité. Il peut se présenter sous la forme d'un amas de fibres d'ADN ou d'un précipité effilé, selon la quantité d'ADN se trouvant dans l'échantillon. Même si aucun culot n'est visible, l'ADN sera récupéré en effectuant les étapes suivantes avec précaution.
9. Laisser l'échantillon reposer 10 minutes à température ambiante pour permettre à l'ADN de précipiter complètement.	<ul style="list-style-type: none"> Une incubation à -20 °C est déconseillée en raison des impuretés qui peuvent co-précipiter avec l'ADN.
10. Placer le tube dans la microcentrifugeuse suivant une orientation connue. Centrifuger à température ambiante pendant 2 minutes à 13 000 tr/min (15 000 × g).	<ul style="list-style-type: none"> Par exemple, placer chaque tube dans la microcentrifugeuse avec la charnière du capuchon pointant dans la direction opposée au centre du rotor. Après la centrifugation, la position du culot peut être localisée (même si le culot est trop petit pour être vu facilement.) : le culot se trouvera à l'extrémité du tube sous la charnière.

Purification	Remarques
11. Éliminer le surnageant en le prélevant avec soin à l'aide d'un cône de pipette. Veiller à ne pas perturber le culot d'ADN.	<ul style="list-style-type: none"> • Ce culot contient l'ADN. La perte du culot signifie également la perte de l'ADN. • Le fait de tourner le tube de façon à ce que le culot se trouve sur la paroi supérieure permet la manipulation sans risque d'un cône de pipette le long de la paroi inférieure et l'élimination de tout le surnageant. • Le surnageant peut contenir des impuretés et doit être éliminé d'une manière aussi complète que possible. • Un séchage excessif du culot peut rendre l'ADN plus difficile à dissoudre.
12. Lavage à l'éthanol Ajouter lentement 250 µl d'éthanol à 70 %. Laisser reposer 1 minute à température ambiante. Prélever la totalité de l'éthanol sans perturber le culot.	<ul style="list-style-type: none"> • Veiller à ne pas perturber le culot d'ADN. • Le culot d'ADN peut être de petite taille. L'ajout d'une molécule porteuse telle que le glycogène au cours de l'étape n° 7 augmentera la visibilité du culot. • Si le culot se détache, centrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à 13 000 tr/min (15 000 x g). • Le lavage à l'éthanol à 70 % permet d'éliminer les inhibiteurs résiduels.
13. Ajouter 100 µl de tampon ADN (voir Réactifs) pour dissoudre le culot d'ADN. Vortexer pendant au moins 5 secondes.	<ul style="list-style-type: none"> • Remarque : l'hydratation (dissolution) complète de quantités importantes d'ADN de poids moléculaire élevé peut être lente. • L'hydratation incomplète de l'ADN provoque des erreurs d'estimation de la concentration de l'ADN et l'échec des applications suivantes telles que la PCR.
14. (Facultatif) Étapes supplémentaires pour assurer l'hydratation complète de l'ADN.	a) Pipetages et agitations au vortex supplémentaires vigoureux, et/ou b) Incubation à 50 °C pendant 1 heure en vortexant occasionnellement, et/ou c) Incubation à température ambiante pendant 1 à 2 jours <ul style="list-style-type: none"> • Pour des applications telles que le buvardage de type Southern qui requiert de l'ADN d'un poids moléculaire très élevé, l'étape (c) est recommandée.
15. Conservation de l'ADN complètement réhydraté.	<ul style="list-style-type: none"> • Dans du tampon TE à 4 °C jusqu'à un maximum de 1 à 2 mois. • Recommandé aliquoté en tampon TE à -20 °C pour la conservation de longue durée. • Remarque : la congélation de l'ADN purifié en tampon TE entraînera la précipitation de l'ADN. Lors de la décongélation d'un échantillon d'ADN purifié congelé, porter une attention particulière à la réhydratation, comme décrit à l'étape 13.

Quantification de l'ADN :

Les analyses utilisant des colorants fluorescents Picogreen ou Sybrgreen sont plus spécifiques que l'absorption à 260 nm pour mesurer la quantité d'ADN bicaténaire se trouvant dans un échantillon d'ADN salivaire. Nous recommandons l'utilisation de colorants fluorescents tels que Picogreen ou Sybrgreen pour quantifier l'ADN bicaténaire en raison d'une interférence plus faible par des ARN contaminants. Un protocole au prix abordable utilisant Sybrgreen peut être consulté sur notre site Internet à [http://www.dnagenotek.com/pdf_files/PD-PR-075Issue1.0_DNAQuantificationusingSYBRGreen1.pdf.] Par ailleurs, des kits disponibles dans le commerce tels que le kit Invitrogen Quant-iT™ Pico Green® dsDNA Assay Cat. N° Q-33130 peuvent être utilisés. Pour chacun des protocoles, nous recommandons une dilution de l'ADN purifié au 1/50^e en tampon TE et l'utilisation de 5 µl pour l'analyse de quantification.

Suggestions pour la quantification par mesure de l'absorption :

Si l'on choisit de quantifier l'ADN en mesurant l'absorption, nous recommandons un traitement préalable de l'échantillon purifié avec une RNase pour digérer l'ARN contaminant puis une précipitation de l'ADN à l'éthanol pour éliminer les fragments d'ARN. Un protocole détaillé est disponible sur notre site Internet à [http://www.dnagenotek.com/pdf_files/RNA_removal_by_double-RNase_Digestion_Issue_1.2.pdf.] Noter que l'ADN provenant de la salive contient généralement sensiblement plus d'ARN que les échantillons sanguins. Vérifier que l'ADN précipité à l'alcool est complètement dissous avant de lire l'absorption.

Facteur de conversion : 1 unité d'absorption à 260 nm correspond à une concentration de 50 ng/µl (50 µg/ml) d'ADN bicaténaire pur.

- Une cuvette de spectrophotomètre permettant une lecture d'un volume de 100 µl ou moins est préférable pour éviter l'utilisation d'un trop grand volume d'échantillon.
- Les valeurs d'absorption à 260 nm doivent se situer entre 0,1 et 1,5. Des valeurs inférieures sont sujettes à caution. Si l'échantillon non dilué est utilisé, des précautions doivent être prises pour s'assurer de la propreté de la cuvette ou de la disponibilité de cuves jetables pour éviter les contaminations croisées d'échantillons. Les valeurs d'absorption > 1,5 à 260 nm ne sont pas fiables ; l'échantillon doit être dilué et lu de nouveau.

Méthode :

1. Diluer un aliquot de 10 µl d'ADN purifié traité à la RNase dans 90 µl de TE (dilution au 1/10^e). Mélanger doucement à l'aide d'une pipette. Attendre que les bulles disparaissent.
2. Utiliser du TE dans la cuve de référence (blanche).
3. Mesurer l'absorption à 320 nm, 280 nm et 260 nm.
4. Calculer les valeurs corrigées A_{280} et A_{260} en soustrayant l'absorption à 320 nm (A_{320}) des valeurs A_{280} et A_{260} .
5. Concentration d'ADN en ng/µl = A_{260} corrigée × 10 (facteur de dilution) × 50 (facteur de conversion).
6. Rapport A_{260}/A_{280} : Diviser A_{260} corrigée par A_{280} corrigée.

Exemple :

1. Si les valeurs mesurées sont les suivantes $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ et $A_{260} = 0,295$
2. La concentration d'ADN de l'échantillon non dilué sera
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [facteur de dilution]} \times 50 \text{ [facteur de conversion]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{l ou } 135 \text{ }\mu\text{g/ml}$$
3. Le rapport des valeurs corrigées A_{260}/A_{280} sera
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$