

Protocole de purification manuelle d'Oragene•DNA à l'aide d'une plaque à 96 puits profonds

Matériel :

1. Plaques et couvercles – plaques à 96 puits profonds (ronds) (Axygen n° de référence P-DW-20-C) avec feuille de couverture adhésive ou tapis réutilisable pour 96 puits (Axygen n° de référence AM-2ML-RD-IMP).
2. Centrifugeuse avec godet pouvant recevoir des plaques à 96 puits. Une vitesse d'au moins 3 500 tr/min est nécessaire (p. ex., centrifugeuse Sorvall modèle RT 6000D avec adaptateur pour plaques à 96 puits PN 11093).
3. Purificateur Oragene niveau 2.
4. Dextran bleu (Sigma-Aldrich n° de référence D5751).
5. Éthanol à 95 % (EtOH) (température ambiante).
6. Éthanol à 70 % (EtOH) (température ambiante).
7. Tampon TE (10 mM tris pH 8,0, 1 mM EDTA).
8. Multi-pipeteur à 8 ou 12 canaux.

Méthode :

1. Ajoutez 20 µl de purificateur dans chaque puits de la plaque.
2. Transférez 5 µl de Dextran à 1 mg/ml dans chaque puits de la plaque.
3. Transférez 500 µl d'échantillon Oragene•DNA dans chaque puits.
4. Couvrez la plaque à l'aide de la feuille de couverture adhésive ou du tapis réutilisable. Appuyez en place pour fermer hermétiquement. Mélangez manuellement en inversant cinq fois.
5. Incubez à -20 °C pendant 10 minutes.
6. Centrifugez la plaque à 4 200 g pendant 10 minutes à température ambiante.
7. Pendant que la première plaque est centrifugée, ajoutez 315 µl d'isopropanol (température ambiante) dans chacun des puits d'une seconde plaque à 96 puits.
8. Lorsque la centrifugeuse s'arrête, transférez 450 µl du surnageant de la première plaque à la seconde plaque (contenant l'isopropanol). Prenez soin de ne pas détacher le culot.
9. Couvrez la plaque à l'aide de la feuille de couverture adhésive ou du tapis réutilisable. Appuyez en place pour fermer hermétiquement. Mélangez manuellement en inversant lentement 10 fois. Un amas d'ADN se forme. Incubez à température ambiante pendant 10 minutes.
10. Centrifugez la plaque à 4 200 g pendant 10 minutes à température ambiante.
11. Retirez avec précaution autant de surnageant que possible dans chaque puits sans détacher le culot. Jetez le surnageant. Cette étape doit être effectuée avec une pipette à embout unique pour éviter de déranger le culot. Le culot peut parfois être collé sur le côté du puits ; prenez soin alors de ne pas le prélever avec la pipette.
12. Ajoutez 400 µl d'EtOH à 70 % (température ambiante) dans chaque puits.
13. Couvrez la plaque à l'aide de la feuille de couverture adhésive ou du tapis réutilisable. Appuyez en place pour fermer hermétiquement. Mélangez vigoureusement au vortex.
14. Centrifugez la plaque à 4 200 g pendant 10 minutes à température ambiante.
15. Éliminez soigneusement **TOUT** le surnageant de chaque puits sans déranger le culot. Jetez le surnageant. Cette étape doit être effectuée avec une pipette à embout unique pour éviter de déranger le culot.
16. La plaque doit être centrifugée par impulsion pendant 20 secondes afin de recueillir tout l'EtOH restant.
17. À l'aide d'une pipette, retirez prudemment **TOUT** l'EtOH résiduel.
18. Séchez la plaque à l'air pendant cinq minutes. Dissolvez l'ADN précipité dans 50 à 100 µl de TE. Mélangez vigoureusement au vortex pour déloger et réhydrater tout culot collé sur le côté du puits. Placez la plaque sur une secoueuse ou un agitateur à balancement pour faciliter la réhydratation complète du culot d'ADN – au moins 30 minutes. Selon notre protocole manuel, il sera bénéfique d'attendre plus longtemps et d'utiliser une température plus élevée (37 à 50 °C).
19. Une fois dissous, l'ADN est prêt à être utilisé ou conservé.