

Protocole d'extraction de l'ADN

- 1) Préparation du tampon d'extraction: Préchauffer le tampon CTAB dans le bain-marie a 60°C .
- 2) Préparation de l'échantillon : Broyer les feuilles d'haricots jusqu'à obtenir une poudre fine.
- 3) Ajout du tampon CTAB :
 - Ajouter 7,5 mL de CTAB par gramme de feuille broyé.
- 4) Ajout des réactifs :
 - Sous hotte il faut ajouter 10 à15 Mg de charbon actif par gramme de feuille
 - 375µL de B- mercaptoéthanol par gramme de feuille
 - Bien vortexer
- 5) Incubation :
 - Incuber à 65°C pendant 1h avec agitation
- 6) Extraction avec solvant :
 - Ajouter 7,5 mL d'un mélange chloroforme : Alcool isoamylique par gramme de feuille
 - Mélanger doucement en inversant les tubes pendant 5 minutes.
- 7) Centrifugation à 16300 g pendant 10 minutes à 4°C et le répéter si nécessaire pour clarifier la phase aqueuse.
- 8) Précipitation de l'ADN :
 - Récupérer le surnageant : Ajouter 2/3 de volume d'isopropanol froid à 4°C
 - Inverser doucement et laisser précipiter au moins 30 minutes à - 20°C
- 9) Centrifugation de l'ADN : Centrifuger à 13000 g pendant 5 minutes à 4°C.
- 10) Eliminer le surnageant : Jeter le surnageant délicatement sans toucher le culot.
- 11) Lavage de l'ADN:
 - Ajouter 10 mL de tampon de lavage par gramme de feuilles

- Agiter verticalement pendant 30 minutes

12) Nouvelle centrifugation : Centrifuger à 13000 g pendant 5 minutes à 4°C.

13) Séchage de l'ADN : Jeter le surnageant et laisser sécher à l'air libre pendant 20 minutes.

14) Solubiliser l'ADN : Ajouter 100µL-300µL de TE 1X pour suspendre le culot.

15) Incubation : Chauffer à 60°C pendant 10 minutes.

16) Dégradation de l'ARN :

- Ajouter 8µL de RNase pour 100µL d'ADN
- Incuber à 37°C pendant 30 minutes

17) (optionnel) : Clarification finale: Centrifuger à 650 g pendant 2 minutes.

Revision #1

Created 20 June 2025 12:42:12 by Fiot Gwenael

Updated 20 June 2025 13:20:45 by Fiot Gwenael