Isolation de l'ADN de plantes deshydratées

Des techniques utilisées précédemment consistaient a lyophiliser les plantes avant extraction.

Avantages

Dans ce processus de lyophilisation il n'est pas nécessaire de laisser le tissu dans le congélateur. Cette technique nous permet de pouvoir facilement transporter et traiter mécaniquement le tissu.

Inconvénients

Les lyophilisateurs sont relativement chères et ont une capacité limité. La lyophilisation nécessite plusieurs jours. Des erreurs dans l'opération peuvent causer la dégradation de l'ADN.

Méthode d'Isolation

Il existe une autre méthode qui consiste a déshydrater les tissus de plantes et traiter et extraire l'ADN ayant une masse moléculaire élevée. Elle peut être utilisé sur une grande variété de plantes et sur un grand nombre d'échantillons. Cette technique permet d'obtenir un rendement entre 70 à 150 mg d'ADN totale par gramme de tissue hydraté. Quand le tissu est déshydraté il peut être préservé et rester stable pendant plusieurs jours sans perte de rendement ou de qualité. Il est aussi plus facile a manipuler.

Matériel

- Déshydrateur alimentaire
- Moulin à café
- Billes de verre
- Mélangeur de peinture
- Petites pochettes en tissue 7,6cm x 12,7 cm

Tampon d'Extraction

- 100 mM Tris-HCl pH 8
- 50 mM EDTA pH 8
- 500 mM NaCl
- 1.25% SDS (w/v)
- 0.38 g sodium bisulfite par 100 mL (tampon ajouté avant utilisation = TE tampon)

- 50 mM Tris-HCl pH 8
- 10 mM EDTA
- acétate de potassium 5M

Méthodes

Prétraitement

1. Collecter les tissues de feuilles (3 à 5g poids avant séchage)
2. Les placer dans des sachets fermés puis dans le déshydrateur et sécher à 45-55°C pendant 12 à 24 heures.
3. Broyer le tissu sec et placer dans un tube de centrifugation de 50mL de polypropylène contenant des billes de verre (10 g).
4. Mélanger avec un mixeur de peinture jusqu'à obtenir une poudre fine (30s à 3min)
5. Les billes de verre sont laissées dans le tube pendant la première centrifugation et ils sont éliminées avec le culot de centrifugation ou ils sont enlevées et rincées pour une réutilisation futur.

Les tissus fibreux (riz...) sont broyés avec un moulin a café (20 à 40s) puis transféré dans un tube de 50mL

Après le prétraitement des tissus des plantes on commence l'isolation (d’après Dellaporta et al. (1983))

Isolation

1. Ajouter 16 mL de tampon d'extraction (chauffer à 65°) au tissu poudré. Mélanger avec une spatule ou inversant le tube et incuber a 65° pendant 10 à 15 min.
2. Ajouter 5 mL d'acétate de potassium à 5M. Bien mélanger et incuber sur glace pendant 20 min.
3. Centrifuger a 3000 rpm pendant 20 min. Verser le surnageant à travers un filtre Miracloth dans un autre tube de 50 mL.
4. Ajouter 2/3 vol. d'isopropanol ou 2 vol éthanol et incuber les tubes à 20°C pendant 30 min pour précipiter l'ADN.
5. Centrifuger à 3000 rpm pendant 5 à 10 min. Laver avec 70% d'éthanol et sécher à l'air pendant 10 à 15 min.
6. Suspendre le culot d'ADN dans 500 a 1000 µL de tampon TE. Transférer dans un tube de 5mL et centrifuger à 3000 rpm pendant 15 à 20 min. Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 5mL.
7. Ajouter 10µL de RNAase (10 mg/mL) a l'échantillon et incuber à température ambiante pendant 10 à 15 min. Ajouter 1/10 vol. 3 M d'acétate de sodium et 2 vol 95% éthanol puis incuber à -20°C pendant 30 min pour précipiter l'ADN.
8. Centrifuger le culot d'ADN à 3000 rpm pendant 5 à 10 min. Laver avec 70% éthanol, sécher, et suspendre dans 1/2 vol. de tampon TE dans un tube de 1.5 mL. Centrifuger à 10000 rpm pendant 15 à 20 min. Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 1.5 mL.

Revision #5
Created 3 April 2024 12:03:39 by Maryam Hamdy
Updated 17 June 2024 15:00:55 by Steve Hubert