

## Extraction de l'ADN des tissus de bivalves marins

Laboratoire National de Référence des maladies des mollusques marins

Unité ASIM – IFREMER – La Tremblade

## Suivi des modifications

| <b>Version</b> | <b>Modifications</b> | <b>Date</b>  |
|----------------|----------------------|--------------|
| V1             | Création             | Janvier 2025 |

## Sommaire

|   |          |
|---|----------|
| <b>1. Objet et domaine d'application.....</b>   | <b>4</b> |
| <b>2. Documents de référence.....</b>   | <b>4</b> |
| <b>3. Equipements, réactifs et environnement.....</b>   | <b>4</b> |
| 3.1. Equipements et consommables .....  | 4        |
| 3.2. Réactifs .....   | 4        |
| 3.3. Environnement.....   | 5        |
| <b>4. Protocole.....</b>  | <b>5</b> |
| 4.1. Témoins d'extraction .....   | 5        |
| 4.2. Extraction d'ADN.....  | 5        |
| 4.2.1. Extraction avec le QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) : Protocole Tissue.....                               | 6        |
| 4.2.2. Extraction avec le QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) : Protocole Blood or Body Fluids (Spin protocol)..... | 7        |
| 4.3. Gestion des déchets .....  | 8        |

## 1. Objet et domaine d'application

Ce protocole décrit la technique d'extraction d'ADN total à partir de tissus de mollusques bivalves marins en utilisant un kit commercial utilisant des colonnes de silice. Le Kit généralement utilisé est celui de Qiagen®. Deux protocoles d'extraction sont disponibles :

- soit le protocole Blood,
- soit le protocole Tissue.

D'autres kits commerciaux peuvent être utilisés pour les extractions d'ADN à condition qu'il ait été démontré qu'ils donnent des résultats similaires.

## 2. Documents de référence

- **QIAamp® DNA Mini Kit and Blood Mini Handbook march 2024, QIAGEN®.**

## 3. Equipements, réactifs et environnement

Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits, matériels et appareils nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Ifremer recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 3.1. Equipements et consommables

- Balance
- Hotte ou sorbonne
- Pinces
- Portoir de tubes
- Bains à sec ou bain Marie
- Micropipettes et pointes à filtres pour des volumes compris entre 20µL et 1000µL
- Mélangeur de type vortex
- Centrifugeuse pour microtubes de 1,5 mL ou 2 mL
- Microtubes de 1,5 mL ou 2 mL
- Compteur temps

### 3.2. Réactifs

- Ethanol absolu
- Kit d'extraction QIAamp® DNA Mini Kit

### 3.3. Environnement

Le personnel doit porter une blouse de laboratoire et des gants durant toutes les étapes et doit connaître les pratiques courantes de laboratoire. Le personnel réalisant cette méthode doit également avoir reçu une formation appropriée.

Il est à noter que dans le cas d'échantillons conservés en éthanol, les échantillons, entre la pesée et l'extraction, doivent être mis en attente sous une hotte ou sorbonne.

## 4. Protocole

### 4.1. Témoins d'extraction

Afin de contrôler l'étape d'extraction, les témoins suivants peuvent être inclus :

- **Un témoin négatif d'extraction par série de centrifugation.** On entend par série de centrifugation tous les tubes qui sont dans la même centrifugeuse en même temps. Le nombre de tubes varie selon la capacité de la centrifugeuse. Ce témoin consiste à réaliser une extraction à partir d'un tube vide qui va suivre toutes les étapes de l'extraction,
- **Un témoin positif d'extraction par série d'extraction.** On entend par série d'extraction, tous les tubes d'échantillons extraits le même jour en même temps. Une série d'extraction peut comporter plusieurs séries de centrifugation. Ce témoin peut, par exemple, consister en l'ajout d'une concentration connue de plasmides contenant la séquence cible dans une matrice de tissus négatif avant l'étape d'extraction. Les plasmides sont ajoutés après l'étape de lyse pour éviter leur dégradation.

### 4.2. Extraction d'ADN

Au préalable,

- Allumer les bains à sec ou les bains Marie et régler les aux températures désirées.
- Si les réactifs sont conservés au réfrigérateur, les sortir à température ambiante environ 1 heure avant l'extraction.
- A l'ouverture d'un nouveau kit, les tampons AW1 et AW2 doivent être supplémentés d'éthanol absolu (125 mL pour AW1 et 160 mL pour AW2) puis la case « ethanol added yes » sur le bouchon des flacons doit être cochée.

Toutes les centrifugations mentionnées dans les protocoles ci-dessous sont réalisées à température ambiante.

#### 4.2.1. Extraction avec le QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) : Protocole Tissue

- Ajouter 180 µL de tampon ATL (si nécessaire, chauffer quelques minutes l'ATL et l'AL pour dissoudre le précipité) dans le tube contenant le broyat de tissus.
- Ajouter 20 µL de Protéinase K (fournie dans le kit et à conserver à température ambiante), mélanger par vortex et incuber à 56°C entre 1 et 3 heures jusqu'à ce que les tissus soient complètement lysés. Centrifuger brièvement les tubes pour détacher les gouttes du couvercle.

*Remarque : la lyse peut également être réalisée sur une nuit.*

- Ajouter 200µL de tampon AL aux échantillons, mélanger au vortex par impulsion pendant environ 15 secondes et incuber à 70°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement les tubes pour détacher les gouttes du couvercle.

*Remarque : Dans le cas d'utilisation d'un positif d'extraction et s'il s'agit d'un plasmide, ajouter à partir de cette étape ce témoin dans le tube adéquat.*

- Ajouter 200µL d'éthanol absolu à température ambiante (non fourni dans le kit) aux échantillons et mélanger au vortex par impulsion pendant 15 secondes. Centrifuger brièvement les tubes pour détacher les gouttes du couvercle. Un précipité peut se former.
- Déposer doucement le mélange de l'étape 4 sur le système de filtration (QIAamp Spin Column avec un tube de récupération de 2mL) sans mouiller le bord. Fermer le couvercle et centrifuger au minimum à 6000 G (ou 8000 rpm) pendant 1 minute. Eliminer le tube contenant le filtrat.
- Placer le QIAamp Spin Column dans un tube de récupération de 2mL (fourni dans le kit). Ouvrir avec précaution le QIAamp Spin Column et ajouter 500µL de tampon AW1 sans mouiller le bord. Fermer le couvercle de la colonne et centrifuger à 6000 G (ou 8000 rpm) pendant 1 minute. Comme précédemment, jeter le tube de récupération contenant le filtrat.
- Placer le QIAamp Spin Column dans un tube de récupération de 2mL (fourni dans le kit). Ouvrir avec précaution le QIAamp Spin Column et ajouter 500µL de tampon AW2 sans mouiller le bord. Fermer le couvercle et centrifuger à 20 000 G (ou 14000 rpm) pendant 3 minutes. Jeter le tube de récupération contenant le filtrat.
- Placer le QIAamp Spin Column dans un tube de récupération de 1,5mL ou 2mL (non fourni dans le kit). Centrifuger à vitesse maximum pendant 1 minute et jeter le tube de récupération contenant le filtrat.

- Placer le QIAamp Spin Column dans un tube à micro centrifugation propre de 1,5mL (non fourni dans le kit). Ouvrir avec précaution le QIAamp Spin Column et ajouter 100µl de solution d'éluion (tampon AE fourni). Incuber au moins 5 minutes à température ambiante et centrifuger à 6000 G (ou 8000 rpm) pendant 1 minute.
- Jeter le QIAamp Spin Column.

*(Facultatif) Contrôler la qualité et l'efficacité de l'extraction (par exemple en mesurant la DO à 260 nm sous spectrophotomètre).*

Les solutions d'ADN sont conservées au réfrigérateur si les analyses sont réalisées dans les 7 jours ou au congélateur jusqu'à l'analyse.

#### 4.2.2. Extraction avec le QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) : Protocole Blood or Body Fluids (Spin protocol)

- Ajouter 20 µL de Protéinase K (fournie dans le kit et à conserver à température ambiante) à la prise d'essai.
- Ajouter 200 µL de tampon AL à l'échantillon, puis mélanger au vortex pendant 15 secondes. Centrifuger brièvement le tube pour récupérer les gouttelettes présentes à l'intérieur du capuchon.
- Incuber à 56°C pendant 10 minutes.

*Remarque : Dans le cas d'utilisation d'un positif d'extraction et s'il s'agit d'un plasmide, ajouter à partir de cette étape ce témoin dans le tube adéquat.*

- Ajouter 200 µL d'éthanol absolu à l'échantillon et mélanger par aspiration/refoulement avec la pipette. Centrifuger brièvement le tube pour récupérer les gouttelettes présentes à l'intérieur du capuchon.
- Charger soigneusement le mélange sur la colonne QIAamp (dans un tube collecteur de 2 mL). Fermer le capuchon et centrifuger à 6 000 G (ou 8000 rpm) pendant 1 minute. Placer la colonne QIAamp dans un tube collecteur neuf de 2 mL (fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat.
- Ouvrir soigneusement la colonne QIAamp et ajouter 500 µL de tampon AW1. Fermer le capuchon et centrifuger à 6 000 G (ou 8000 rpm) pendant 1 minute. Placer la colonne QIAamp dans un tube collecteur de 2 mL (fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat.
- Ouvrir soigneusement la colonne QIAamp et ajouter 500 µL de tampon AW2. Fermer le capuchon et centrifuger à 20 000 G (ou 14000 rpm) pendant 3 minutes.

- Placer la colonne QIAamp dans un tube collecteur de 2 mL neuf (non fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat. Centrifuger à 20 000 G (ou 14000 rpm) pendant 1 minute.
- Placer la colonne QIAamp dans un tube propre de 1,5 mL à centrifuger (non fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat. Ouvrez soigneusement la colonne QIAamp et ajouter 100 µL de tampon d'éluion (tampon AE fourni).
- Incuber 5 minutes à température ambiante et centrifuger à 6 000 G (ou 8000 rpm) pendant 1 minute.
- Jeter le QIAamp Spin Column.

*(Facultatif) Contrôler la qualité et l'efficacité de l'extraction (par exemple en mesurant la DO à 260 nm sous spectrophotomètre).*

Les solutions d'ADN sont conservées au réfrigérateur si les analyses sont réalisées dans les 7 jours ou au congélateur jusqu'à l'analyse.

### **4.3. Gestion des déchets**

Les déchets doivent être traités selon les conditions autorisées par la réglementation. Le laboratoire doit également mettre en œuvre des mesures pour garantir la non-dissémination des organismes pathogènes dans l'environnement.

FIN DU DOCUMENT