

### 1 CTAB Extraction d'ADN CTAB à partir de tissus végétaux: À utiliser uniquement lorsque la méthode FTA est inappropriée

| Vous avez besoin de/d'   |
|--|
| Un tissu végétal - congelé ou frais  |
| Un mortier et un pilon ou des tubes et des micro-pilons de 2 ml (tous conservés à -20 ° C pendant environ 1 heure) |
| Une microcentrifugeuse et bloc sec ou bain-marie réglé à 65 ° C  |
| Les solvants - isopropanol, éthanol, chloroforme-alcool isoamylique (24: 1)  |
| Les tampons et les solutions préparés au préalable (voir page 24)  |
| Le rotateur de tubes Stuart (ou vous pouvez mélanger à la main)  |

- Après l'échantillonnage de la plante, laver immédiatement la feuille de plante fraîche avec de l'eau distillée et sécher avec une serviette en papier. Surface stériliser la feuille avec de l'éthanol à 70%.
- Broyez 200 à 500 mg de tissu végétal dans un mortier ou un tube de 2 ml jusqu'à ce que tout le tissu soit rompu. Avec les plus grandes feuilles, les rouler en forme de tube et placer dans le tube de 2 ml avant de les faire macérer.
- Ajoutez 400 µL de tampon d'extraction CTAB chaud (65 ° C) dans chaque tube.
- Mélangez bien en agitant le tube (ne pas vortexer) <sup>1</sup> et incubez les échantillons pendant environ 20 minutes à 65 ° C (idéalement, agitez les échantillons toutes les 5 minutes environ pendant l'incubation pour maintenir le tissu saturé).
- Après incubation, ajoutez 400 µL d'alcool chloroforme-isoamylique (24: 1) dans chaque tube. Effectuez cette opération à l'aide d'une hotte ou similaire.
- Agitez les tubes à l'aide d'un agitateur rotatif à température ambiante pendant 15 minutes.
- Centrifuger les échantillons à ~ 12 000 x g pendant 5 minutes.

Remarques: <sup>1</sup> Ne vortexez jamais l'ADN génomique trop vigoureusement car il le cisaille.

- Transférez la couche aqueuse claire supérieure de chaque échantillon dans un nouveau tube (en évitant les débris végétaux et les couches de chloroforme) et ajoutez 400 µL d'alcool chloroforme-isoamylique 24: 1 (volume égal), puis répétez les étapes 5 et 6.
- Transférez la couche aqueuse supérieure dans un nouveau tube (en évitant de prendre une quelconque couche de chloroforme) et ajoutez un volume égal d'isopropanol (~ 400 µL).
- Mélangez les échantillons (par inversion douce) et incubez à température ambiante pendant 15 à 30 minutes.
- Centrifugez les échantillons à vitesse maximale dans la microcentrifugeuse pendant 5 minutes.
- Jetez le surnageant. Cela peut être fait avec précaution en aspirant le surnageant avec une pipette de 1 ml.
- Ajoutez 400 µL de solution de lavage d'ADN (gardé sur la glace) à chaque échantillon et agitez doucement. Laissez agir 5 minutes avant de centrifuger 3 minutes. Retirez le surnageant. Si le culot de l'échantillon n'est pas propre, répétez cette étape à nouveau<sup>2</sup>.
- C'est un bon point d'arrêt dans le protocole si vous constatez que le temps est limité. Ajoutez la solution de lavage d'ADN à chaque échantillon et laissez reposer une nuit à 4 ° C.
- Placez les tubes ouverts sur une surface propre et absorbante inversée pendant 10 minutes pour sécher le culot ou jusqu'à ce que la majeure partie du réactif se soit évaporée du tube.
- Remettre en suspension le culot dans 100 µL de tampon TE et 6 µL d'ARNase A (10 mg / mL).
- Incubez les échantillons à température ambiante pendant 15-30 minutes.
- Précipitez l'ADN en ajoutant 1 ml d'éthanol froid à 100% (conservé sur la glace) et incubez à température ambiante pendant 30 minutes.
- Centrifugez les échantillons pendant 5 minutes et jetez le surnageant. Laissez le culot sécher à l'air pendant environ 2 heures.
- Remettre le culot en suspension dans 100 µL TE pendant une nuit à 4 ° C.

Remarque: <sup>2</sup> Le culot peut ne pas adhérer fermement au tube après cette étape, il faut donc faire attention.

### 2. Les solutions de stocks de tampons et réactifs:

1. Bromure d'hexadécyltriméthylammonium à 10% (CTAB): Ajoutez 10 g de CTAB à 80 mL H<sub>2</sub>O. Chauffez à 65 °C pour dissoudre et réglez le volume à 100 mL avec H<sub>2</sub>O. Rangez à température ambiante.

**\*\* N'autoclavez pas la solution CTAB \*\***

2. Chlorure de sodium 5 M (NaCl).
3. Acide tris-chlorhydrique 1 M (Tris-HCl) pH 8
4. 0.5 M d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) pH 8<sup>3</sup>.
5. Solution de lavage d'ADN stockée à 4°C: éthanol à 70%, 0.77 g / L d'acétate d'ammonium.  
**\*\*NE stérilisez pas l'autoclave une solution d'acétate d'ammonium<sup>4</sup> \*\***  
Filtrez la solution à l'aide d'une seringue de 10 mL à travers une unité de filtre de 0.2 µm.
6. Dithiothréitol (DTT): pesez juste avant utilisation et ajoutez au tampon CTAB.
7. RNase A (10 mg/mL).
8. Proteinase K (20 mg/mL).

### 3. Une solution opératoire CTAB:

Tampon d'extraction CTAB: CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 et enfin ajouter du DTT à 1% juste avant utilisation.

| Le réactif        | La concentration finale | La concentration des stocks | Pour préparer 5 ml |
|-------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------|
| CTAB              | 2 %                     | 10 %                        | 1 mL               |
| NaCl              | 1.4 M                   | 5 M                         | 1.4 mL             |
| EDTA pH 8         | 20 mM                   | 0.5 M                       | 200 µL             |
| Tris-HCl pH 8     | 100 mM                  | 1 M                         | 500 µL             |
| DTT               | 1 %                     | -                           | 50 mg              |
| dH <sub>2</sub> O | -                       | -                           | 1.85 mL            |

### 4. Rotateur de tube Stuart (mélangeur):

1. Placez les tubes avec les couvercles fermés et tournez vers l'intérieur. Équilibrez les tubes afin que le disque tourne uniformément.
2. Allumez l'appareil à l'aide de l'interrupteur marche / arrêt vert. L'unité tournera à une vitesse fixe de 20 tr / min.
3. Une fois le mélange terminé, éteignez l'unité à l'aide de l'interrupteur marche / arrêt vert et déchargez les tubes.



**Stuart Tube Rotator**  
Positionnez les tubes sur le disque de manière à ce qu'ils soient équilibrés, par exemple placez les tubes en face l'un de l'autre.

Remarque:

3. L'EDTA n'entrera pas dans une solution inférieure à pH 8,0. Ajoutez du NaOH solide avec parcimonie et laissez la solution à équilibrer entre les ajouts pour éviter de dépasser le pH final.
4. L'acétate d'ammonium se décompose dans l'eau chaude et ne doit pas être passé à l'autoclave.