

1. Collecte d'échantillons par presse feuille directe:

Vous avez besoin
Une carte FTA PlantSaver
Un rouleau de Parafilm
Un pilon et un mortier (ou un mini-pilon et un tube)
Une poche supérieure en plastique, le dessiccateur et le dessicant en gel de silice

Portez toujours des gants lors de la manipulation des cartes FTA PlantSaver pour éviter la contamination des cartes.

Stockez les cartes FTA PlantSaver inutilisées dans un dessiccateur. (Évitez la lumière et l'humidité excessive).

1. Étiquetez la carte FTA PlantSaver avec l'identification appropriée de l'échantillon. Divisez chacune des quatre zones d'échantillons de la carte en 2 ou 4 sections afin que la carte puisse contenir de 8 à 16 échantillons (voir la page 18 Utilisation des cartes FTA PlantSaver).
2. Placez la feuille sur la zone marquée (le dessous de la feuille vers le bas) sur le dessus de la carte matrice FTA.
3. Superposez la feuille, soit avec du Parafilm, soit remplacez la feuille de couverture.

1. Collecte d'échantillons par presse feuille directe (suite):

4. À l'aide d'un objet émoussé lourd (comme un petit pilon en porcelaine, un marteau à clou ou une poignée de tournevis), frappez chaque zone d'échantillon avec une force modérée pendant 15 secondes¹. Cela fera éclater les parois cellulaires des tissus végétaux.
5. Il est important que les échantillons soient pressés par une surface lisse afin que la matrice du filtre ne soit pas endommagée.
6. Vérifiez que suffisamment de matériel végétal a été transféré sur le papier en contrôlant le dos de la carte FTA : le tissu végétal doit être visible de l'autre côté de la matrice.
7. **Faites très attention à ne pas endommager la matrice.**
8. Veillez à ce qu'aucun gros morceau de tissu végétal ne reste collé à la carte FTA, car cela pourrait gêner le traitement ultérieur.
9. Une fois les échantillons transférés sur le papier, laissez la carte FTA sécher à l'air libre pendant au moins une heure à température ambiante.
10. Si l'échantillon doit être archivé, le placer dans un sac à pince et le conserver dans le dessiccateur avec du gel de silice actif (tous les articles sont fournis par KT).

Remarques

¹ Une presse à feuilles de qualité est le facteur le plus important pour obtenir un échantillon d'ADN végétal de bonne qualité sur la carte FTA. Une pression sur la feuille exercée avec trop peu de force ne permettra pas de transférer suffisamment d'ADN sur la carte. Pour obtenir les meilleurs résultats, il est important d'appliquer une pression rapide et forte sur le sandwich Parafilm/feuille/carte. Cela fournira un élan suffisant pour briser les parois cellulaires. L'application d'une pression trop forte ou trop faible, ou d'une pression inégale, ne donnera probablement pas de bons résultats. De plus, si vous frappez la carte trop fort, vous endommagerez la matrice, la rendant trop fragile pour être traitée. Lorsque vous appliquez une force, n'utilisez pas un mouvement de frottement.

2. Prélèvement d'échantillons d'homogénat végétal:

Vous avez besoin
Une carte FTA PlantSaver
Un rouleau de Parafilm
Un pilon et un mortier (ou un mini-pilon et un tube)
Un tampon de solution saline tamponnée au phosphate (PBS)
Un sac à pince en plastique, dessiccateur et dessicant en gel de silice

1. Étiquetez la carte FTA PlantSaver avec l'identification appropriée de l'échantillon.
2. Utilisez au moins 10 mg de jeunes tissus végétaux. Ajouter 1 partie de tissu végétal à 5 parties de PBS et utiliser un mortier et un pilon pour broyer le matériau des feuilles dans un homogénat lisse (si vous préférez, utilisez un micropied et un tube de microcentrifugeuse). Le rapport de 1 partie de matériel végétal et 5 parties de PBS est essentiel pour de bons résultats. [Pour le soja et certaines espèces de céréales, il peut être nécessaire d'ajouter du dithiothréitol (DTT) pour améliorer la quantité d'ADN qui se lie à la FTA].
3. Appliquer l'homogénat sur la matrice de la carte FTA PlantSaver à l'intérieur du cercle marqué à l'aide d'une pipette à large ouverture ou d'une pointe de pipette qui a été coupée pour donner une ouverture de 1,5 à 2,0 mm (l'échantillon sera probablement trop visqueux pour utiliser des pointes de pipette avec des ouvertures étroites) . Laissez l'échantillon sécher à l'air sur la carte FTA pendant au moins 2 heures à température ambiante.
4. Si tous les tissus végétaux ne peuvent pas être complètement homogénéisés, le tissu semi-homogénéisé peut être pressé contre la carte, puis jeté.
5. Si l'échantillon doit être archivé, placez-le dans un sac à pince ou conservez-le dans un dessiccateur avec du gel de silice actif (tous les articles fournis par KT).

3. Retrait d'un exemple de disque d'une carte FTA pour analyse:

Vous avez besoin
Une carte FTA PlantSaver
Un poinçon Harris 2 mm ou similaire
Un tapis de coupe

1. Pour éviter tout transfert entre les échantillons, assurez-vous toujours que l'échantillon appliqué est sec avant de prendre un poinçon.
2. Placez la carte FTA PlantSaver sur un tapis de découpe. Pour les cartes avec des couches de papier externes, assurez-vous que le tapis est directement sous la carte FTA sans couche de papier entre les deux.
3. Placez la pointe du poinçon de carottage, par ex. un micropoinçon Harris de 2 mm, sur la zone à échantillonner. N'appuyez PAS sur le piston d'éjection pour le moment.
4. Appuyez fermement sur le cylindre du dispositif de carottage et tournez d'un quart de tour pour couper le disque de la carte.
5. Une fois le disque dans le carottier, transférez le disque dans le tube ou le plateau PCR souhaité en appuyant sur le piston d'éjection et en éjectant le disque.
6. Des précautions doivent être prises lors de la manipulation des disques FTA secs car la charge statique qui peut se développer sur certains articles de laboratoire en plastique peut provoquer l'éjection du disque des tubes et l'adhésion à d'autres surfaces..
7. Afin de garantir l'absence de contamination croisée entre les échantillons, le dispositif de carottage peut être nettoyé en utilisant l'une des deux méthodes décrites ci-dessous. Utilisez la méthode qui correspond le mieux à votre flux de travail de laboratoire.

4. Nettoyage de la pointe du carottier:

1. Rincer l'embout avec de l'éthanol entre les échantillons et sécher avec un lingette stérile.

OU

2. Prenez un poinçon de papier filtre vierge ou une zone non tachée de la carte FTA PlantSaver entre les échantillons.

5. Préparation de FTA pour l'analyse de l'ADN:

Vous avez besoin
Un réactif de purification FTA - tampon TE pH 8 1X avec 1% de Triton X
Les tubes de microfuges
TE ⁻¹ pH 8.0 tampon

1. Prélevez un disque d'échantillon à partir de la tache séchée (suivez les instructions du protocole 3, page 20). Pour les échantillons de plantes, un disque de 2 mm est recommandé.
2. Placez le disque dans un tube de micro-centrifugation de 0,5 ou 1,5 ml.
3. Ajoutez 200 µL de réactif de purification de FTA dans le tube.
4. Incuber pendant 5 minutes à température ambiante avec un mélange manuel modéré.

5. Préparation de FTA pour l'analyse de l'AND a continué

5. Retirez et jetez le réactif de purification FTA utilisé à l'aide d'une pipette.
6. Répétez les étapes 3-5 une fois, pour un total de 2 lavages avec le réactif de purification FTA.
7. À ce stade, le disque FTA doit être blanc (c'est-à-dire sans chlorophylle). Si le disque est encore très vert, répétez les étapes 3 à 5 avec un lavage supplémentaire au réactif FTA.
8. Ajouter 200 µL de tampon TE-1 (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0).
9. Incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
10. Retirer et jeter tout le tampon TE-1 utilisé avec une pipette.
11. Répétez les étapes 8-10 une fois pour un total de 2 lavages avec le tampon TE-1.
12. Assurez-vous que tout le liquide a été éliminé avant de procéder à l'analyse. On peut laisser sécher le disque¹.

Remarques:

¹ Il est recommandé d'effectuer l'analyse dans les 3 heures suivant le lavage du disque. Si cela n'est pas possible, le poinçon peut être conservé à 4 °C ou -20 °C dans un environnement sombre pendant une semaine maximum.

6. Protocole modifié pour un meilleur lavage des échantillons

Avec certaines espèces végétales, l'élimination de la chlorophylle du poinçon devient difficile. Cela peut interférer avec l'analyse en aval. Le protocole suivant est une méthode de lavage améliorée développée pour éliminer la chlorophylle de tels échantillons :

1. Après le lavage avec le réactif de purification de FTA, laver les poinçons avec 200 µL d'iso-propanol.
2. Incuber pendant 2 minutes, pipeter de haut en bas plusieurs fois et jeter. Répétez pour un total de 2 lavages avec de l'isopropanol.
3. Sécher les poinçons à température ambiante pour s'assurer que l'isopropanol a été complètement éliminé.

7. PCR du poinçon lavé :

1. Le disque lavé et séché à l'air est maintenant prêt à être analysé par PCR en utilisant les protocoles standards.
2. Le disque est inclus dans la réaction PCR.
3. Il n'est pas nécessaire de modifier le volume de réaction ou les conditions PCR en raison de la présence du disque.
4. Pour la PCR, on peut supposer sans risque que le poinçon + ADN constitue un volume ajouté nul.
5. Le volume de réaction recommandé pour l'analyse PCR de l'ADN végétal est compris entre 25 et 50 µL.
6. Pour certaines espèces de plantes, un poinçon de 2 mm peut contenir trop d'ADN, ce qui inhibe la réaction PCR. Dans cette situation, un poinçon plus petit de 1,2 mm ou similaire peut être utilisé dans 50 µL de mélange de réaction PCR.