

## Extraction d'ADN de levure

Il y a deux types d'extraction d'ADN de levure: en plaque (donc de manière rapide et de l'ADN «sale» est obtenu) ou en tube (donc de l'ADN «propre» est obtenu)

### Extraction en plaque

#### Matériel et Solution :

##### **Tampon A (volume total de 1000 mL):**

- 10 mL NaCl 5M
- 2 mL EDTA 0,5M
- 2mL Triton X-100
- compléter avec de l'eau stérile

#### Méthode :

1. Prélever 1-2 mm<sup>3</sup> de cellules de levure du Master avec un côté d'embout 200µL et mettre dans un des tubes d'une plaque PCR de 96-puits avec cheminée. Laisser l'embout dans le tube. Répéter pour chaque colonie.
  - a. Mettre la plaque avec les tubes accolée en arrière d'un autre support à tubes PCR pour plus de stabilité.
  - b. Afin de faciliter les analyses après PCR et électrophorèse (lorsque chargé avec mutli-channel 12 embouts), il faut alterner les échantillons entre 2 lignes :

1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24

2. Remplir chaque embout avec 100 µL de tampon A avec le repeater – réglé en position 2.
3. Centrifuger la plaque avec les embouts dans la centrifugeuse (rotor JS-5.3) à 3000 rpm pendant 1 minute à 30°C.
4. Enlever les embouts avec une multi-pipette; faire des up and down avant puis jeter les embouts.
5. Centrifuger la plaque dans la centrifugeuse (rotor JS-5.3) à 3000 rpm pendant 1 minute à 30°C.

6. Ajouter 40  $\mu\text{L}$  (0,057 g) de poudre de billes de verre dans chaque puits.
  - a. Mettre le support à plaque dans le plastique pour éviter d'avoir des billes partout.
7. Couvrir chaque colonne avec des bandes de 8 capuchons et appliquer fermement une pression avec un outil afin de bien fermer les tubes
8. Vortexer la plaque pendant 7 minutes en et tenir la plaque en plaçant un bouchon noir de marqueur Permanent (Sharpie) au milieu sur la plaque entre les bandes de capuchons. Appuyer fort.
9. Chauffer la plaque dans l'appareil PCR pendant 10 minutes à 95°C. Attendre jusqu'à ce que la température de l'échantillon atteigne 25°C puis enlever la plaque.
  - a. Programme «boiled 95°C»
10. Vortexer la plaque pendant 3 minutes (comme étape 7).
11. Centrifuger la plaque dans la grosse centrifugeuse (rotor JS-5.3) à 3000 rpm pendant 5 minutes à 30°C.
12. A l'aide d'une multi-pipette, mettre 75 $\mu\text{L}$  d'eau achetée dans chaque puits utilisé dans une autre plaque à fond plat.
13. Quand la centrifugation de la plaque avec les cellules est terminée, enlever doucement les bouchons en ayant les doigts proches de la bande qui est enlevée, en évitant les éclaboussures. Enlever 37,5 $\mu\text{L}$  de la surface aqueuse (supérieure) en utilisant une Multi-Channel en évitant de pipetter les billes de verre. Ajouter les 37,5 $\mu\text{L}$  prélevés à 75 $\mu\text{L}$  d'eau placés dans la plaque préparée à l'étape 12. Attention de placer les échantillons sur la nouvelle plaque à la même position que sur l'ancienne plaque.
14. Mettre un parafilm et congeler si le PCR n'est pas fait tout de suite après.

### ADN en tube

#### Matériel et Solution :

##### **Lysis buffer (volume total de 50 mL):**

- 5 mL Tris 1M
- 5 mL EDTA 0,5M
- 5mL SDS 10%
- compléter avec de l'eau stérile

## **Méthode :**

1. Faire croître les cellules de levure dans 4 mL de milieu jusqu'à la phase stationnaire (30°C une nuit).
2. Centrifuger 2 minutes, 1 800g. Laver les cellules avec 4 mL d'eau stérile. Centrifuger 2 minutes, 1 800g.
3. Resuspendre dans 500µL de «lysis buffer».
4. Ajouter des billes de verre lavées à l'acide jusqu'à environ 2mm du ménisque. Garder les tubes sur glace jusqu'à l'étape 7.
5. Vortexer 30 seconde, ajouter 25µL de NaCl 5M, vortexer 30 secondes, mettre les tubes sur glace 30 secondes et vortexer 30 secondes. Laisser les tubes 3 minutes sur le comptoir, à température pièce.
6. Enlever le surnageant avec la P1000 et transférer dans un microtube.
7. Extraire avec 400 µL de phénol-chloroforme (200 µL phénol, 200µL chloroforme), vortexer 30 secondes et centrifuger 13 000 rpm 2 minutes.
8. Conserver le surnageant. Recommencer étape 7.
9. Recommencer l'étape 7 mais en mettant seulement 400 µL de chloroforme (pas de phénol).
10. Ajouter 1mL d'éthanol froid 100% au surnageant. Vortexer et laisser reposer 20 minutes à -80°C.
11. Centrifuger 15 minutes à température pièce. Laver avec 1mL d'éthanol froid 70% et mélanger par inversion, puis centrifuger 2 minutes à 13 000 rpm. Faire un quick spin et enlever le surnageant.
12. Laisser sécher le culot 15 minutes (ou aller au speed vac) et resuspendre le culot dans 50 µL de TE pH 8.