

TP 3 : Extraction de l'ADN génomique d'une cellule végétale

I. Préparation de l'échantillon

L'extraction d'ADN a été réalisée sur des feuilles de persil, l'espèce *petroselinum sativum*,

- Broyer les feuilles dans un mortier ;
- Ensuite, on pèse 100mg de broyat ;
- on met les échantillons dans le tube eppendorf 1,5 ml.

II. Extraction de l'ADN génomique

Le protocole utilisé est une modification de protocole de base préparé par **Dellaporta et al., 1983** :

1. Ajouter **1 millilitre** de **tampon d'extraction** (10% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mg PVP et 20 uL/ml b-mercaptoethanol (ajouté juste avant l'utilisation **sous la hotte**) aux 100 mg feuilles broyées ;
2. Incuber les tubes à **65°C** pendant **1h 30min** avec agitation chaque 10 min ;
3. Ajouter **1 ml d'acétate de sodium 1 M** à chaque tube ;
4. Incuber les tubes pendant **20 min** dans la glace, puis les centrifuger à **13000 tpm** pendant **10 min**;
5. Transférer minutieusement le surnageant contenant l'ADN, presque **500 µl**/tube dans un nouveau tube,
6. Ajouter **500 µl d'isopropanol** et incuber les tubes à **-20°C** pendant **20 min**;
7. La pelote d'ADN a été culotée grâce à une centrifugation prolongée à vitesse maximale de **14500 tpm/10 min** à température ambiante ;
8. Enlever l'isopropanol par pipetage. Le culot d'ADN devrait rester coller au fond du tube ;
9. Laver l'ADN par l'ajout d'**éthanol 70%** ;
10. Centrifuger quelques secondes ;

11. éliminer l'éthanol. Le culot d'ADN devra être séché à température ambiante pendant **15 min** (tube renversé) ;
12. Resuspendre l'ADN dans de l'eau distillée, grâce à l'ajout de **50 µl d'H₂O distillée**.
13. L'ADN est ensuite conservé à -20°C jusqu'à usage ultérieur.