



Exemple d'extraction semi-automatique d'ADN de végétaux à l'aide du pipeteur CyBi®-Selma 96/1000 µL et du kit Nucleospin® 96 Plant II

Vanessa Clouet, Maryse Lode and Angélique Lesné, INRA UMR 1349 IGEPP, 35653 Le Rheu

Contact : CyBioFrance - Daniel Frayssinhes,

Tel.: +33-1 83 62 14 24 **Fax:** +33-1 83 62 14 25 - www.cybio.fr

Marques déposées : CyBi®-SELMA : CYBIO-AG

NucleoSpin® 96 Plant II kit, Plant genomic DNA extraction : MACHEREY-NAGEL

Résumé

Le pipeteur CyBi®-SELMA 96/1000 µl a été utilisé pour automatiser le kit de MACHEREY-NAGEL : NucleoSpin 96 Plant II technology for plant genomic DNA extraction. L'utilisation d'une tête 96 permet des procédures semi-automatiques rapides tout en garantissant les performances de la purification. Les résultats sont de bons rendements (1-8 µg selon les espèces) ainsi que des ADN hautement purifiés (A260/280 > 1.8).

Introduction

Cette méthode d'extraction est basée sur les méthodes de lyses connues CTAB et SDS (1). Comme les végétaux sont très hétérogènes et contiennent des métabolites variés tels que polyphénols, polysaccharides, ou des composés acides, NucleoSpin® Plant II offre 2 types de lyses pour des résultats optimaux. Nous avons utilisé le tampon de lyse PL1 d'après la méthode de lyse CTAB. En complément, la membrane de silice des colonnes du kit NucleoSpin® Plant II est optimisée pour favoriser l'ADN binding, des filtres NucleoSpin® sont inclus pour faciliter la clarification du lysat. Le Kit NucleoSpin® Plant II permet le traitement jusqu'à 100 mg (poids humide) ou 20 mg (poids sec) de matériel de départ avec un rendement typique de 1 à 8 µg d'ADN. Les éluats d'ADN sont alors prêts pour la réaction PCR.

Le CyBi®-SELMA 96/1000µl est un pipeteur semi-automatique qui travaille rapidement, précisément et avec une grande reproductibilité. La possibilité de travailler sur 96 Puits simultanément à avantageusement été utilisée pour automatiser le kit NucleoSpin® 96 Plant II, le SELMA a été évalué pour sa capacité à accélérer le traitement des microplaques en comparaison d'une multipipette manuelle à 8 Canaux.

Matériels et Méthodes

Le protocole d'extraction du kit MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® 96 Plant II a été mis en place sur un ensemble pipeteur CyBi®-SELMA 96/ 1000 µl constitué d'un plateau à 2 positions ainsi que d'une tête de pipetage à 96 Cônes de 1000 µL jetables. La procédure de purification utilisée est celle préconisée par le protocole standard du kit de MACHEREY-NAGEL. 100 mg de feuilles fraîches ont été utilisées avec 5 billes de verres de 3mm par puits, lyophilisées par congélation puis mixées au shaker. La pureté et le rendement d'extraction ont été effectués par mesure de DO à 260 et 280 nm puis calcul du ratio A260/280.

Appareillage

- CyBi®-SELMA 96/1000 µl (CyBio)
- Shaker/Gyromixer SO-20a Fluid Management



Figure1: Le CyBi®-SELMA 96/1000 µl avec des microplaques deep well et 2 positions de travail.

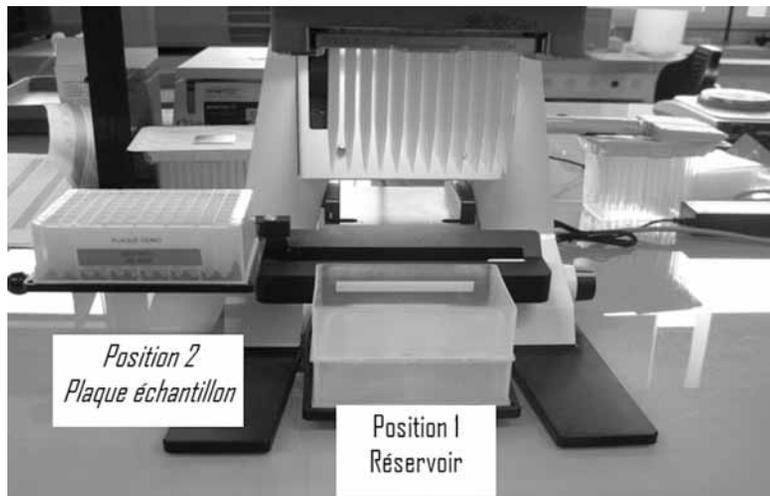


Figure2: Configuration du plan de travail du CyBi®-SELMA 96/1000 µl avec le kit NucleoSpin® 96 Plant II : Etape de transfert de réactif

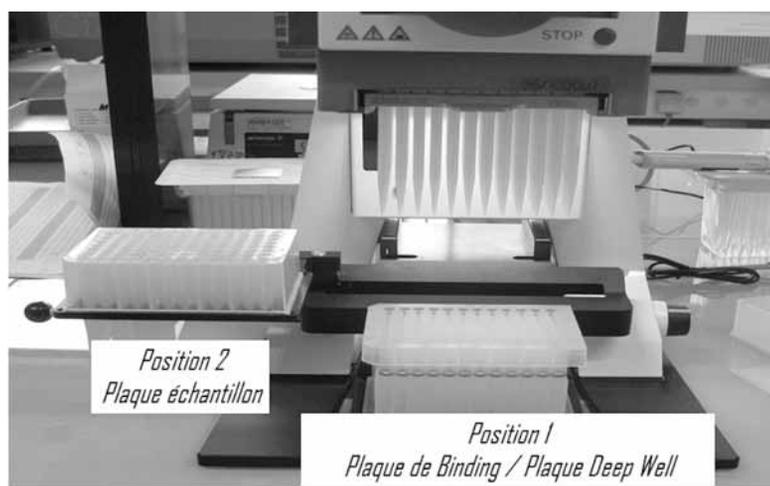


Figure3: Configuration du plan de travail du CyBi®-SELMA 96/1000 µl avec le kit NucleoSpin® 96 Plant II : Etape de binding

- Centrifugeuse Eppendorf 5810R
- Centrifugeuse Beckman Coulter Allegra X-15R
- PherastarFS (BMG Labtech)
- Freeze Dryer (LABCONCO)

Réactifs

- Kit MACHEREY-NAGEL NucleoSpin 96 Plant II incluant : NucleoSpin® Plant II Binding Plates, cap strips, buffers, RNase A (# 740468.4)

Procédure semi-automatique

Les étapes d'extraction sont résumés table 1.

1. Placer le tampon PL1 avec 2% RNase A dans le réservoir en position 1 et l'échantillon en position 2 du plateau du CyBi®-SELMA comme indiqué figure 2.
2. Transférer 500 µl de tampon PL1 avec 2% RNase A du réservoir en position 1 vers l'échantillon en position 2. Fermer les puits avec un film de scellage ▶▶▶



La France possède le train le plus rapide au monde.
Nous proposons les équipements de laboratoire SCALA.

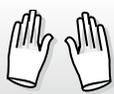
ACHEMA, Hall 4.1 Stand J 38



Équipements de laboratoire
Made in Germany

WALDNER

WALDNER S.A.R.L. · Route d'Ingrémare · 27400 Heudebouville · Tel. +33 2 32 25 79 79 · Fax +33 2 32 25 79 80 · info@waldner.fr · www.waldner.fr



Des outils utiles!

Rendez vous au Salon Achema, Hall 4.2, Stand F15

Etape	Réactif SELMA Position 1	Réactif SELMA Position 2	Action	Mode de pipetage
Lyse cellulaire	Réservoir tampon PL1 avec 2%RNase A	Microplaque échantillon (Deep-Well 2.2ml)	Pipeter 500 µl tampon PL1 avec 2% RNase A vers la microplaque échantillon Deep-Well 2.2ml	Pipetting
Transfert du tampon de Binding	Réservoir tampon de Binding PC	Microplaque Deep-Well 1.2 ml	Pipeter 450 µl de tampon de binding PC dans une microplaque Deep-Well 1,2 ml	Pipetting
Transfert d'échantillon	Microplaque échantillon (Deep-Well 2.2ml)	Microplaque Deep-Well 1.2 ml avec tampon PC	Pipeter 400 µl du lysat clarifié vers la microplaque Deep-Well 1.2 ml, mixer 15 x (500 µl)	Pipetting, mixing
Binding ADN	Microplaque Deep-Well 1.2 ml de l'étape précédente	Microplaque de binding NucleoSpin® Plant II positionnée sur une microplaque Deep-Well 2.2 ml	Pipeter l'échantillon vers la microplaque de binding NucleoSpin Plant II	Dispensing
Lavage 1	Réservoir tampon PW1	Idem étape précédente	Pipeter 400 µl de PW1 vers la microplaque de binding	Pipetting
Lavage 2	Réservoir tampon PW2	Idem étape précédente	Pipeter 700 µl de tampon PW2 vers la microplaque de binding	Pipetting
Lavage 3	Idem étape précédente	Idem étape précédente	Idem étape précédente	Pipetting
Elution des ADN	Reservoir tampon PE	Microplaque de binding NucleoSpin® Plant II positionnée sur une microplaque Deep-Well 370 µL	Pipeter 130 µl du tampon PE préchauffé vers la microplaque de binding	Pipetting

Table 1. Les différentes étapes de pipetage lors de l'utilisation du kit NucleoSpin Plant II Genomic DNA purification avec le CyBi®-SELMA 96/1000 µl

à chaud. Mixer fortement 30 sec avec un agitateur. Faire tourner brièvement 30 sec à 1,500 x g pour récupérer les échantillons puis incubé à 65 °C pendant 30 min. Centrifuger ensuite les échantillons pendant 20 min à pleine vitesse (5,600-6,000 x g). Enlever le film de scellage.

- Pipeter 450 µl de tampon de binding PC du réservoir en position 1 vers une plaque 96 Deep-Well 1,2 ml en position 2.
- Positionner la microplaque du lysat clarifié de l'étape 2 en position 1. Pipeter 400 µl du lysat clarifié vers la microplaque Deep-Well de la position 2 et mixer au moins 15 fois avec 500 µL du volume de mélange.
- Placer la NucleoSpin® Plant II binding plate sur une microplaque 96 Deep-Well de 2.2 ml. Distribuer 800 µl d'échantillon dans la microplaque NucleoSpin® Plant II de binding avec le CyBi®-SELMA comme indiqué figure 3.
- Centrifuger la plaque de binding à 5,600-6,000 x g pendant 7 min.
- Pipeter 400 µl du tampon PW1 dans la microplaque de binding NucleoSpin® Plant II avec le CyBi®-SELMA comme décrit Figure 3. Sceller la plaque avec un film et centrifuger encore à 5,600-6,000 x g pendant 2 min. Placer la microplaque de binding NucleoSpin® Plant II sur une microplaque 96 Deep-Well de 2.2 ml.
- Pipeter 700 µl du tampon PW2 vers la microplaque de binding NucleoSpin® Plant II avec le CyBi®-SELMA comme indiqué Figure 2. Sceller la plaque et centrifuger encore à 5,600-6,000 x g pendant 2 min.
- Répéter l'étape 8 et placer la microplaque de binding NucleoSpin® Plant II sur une nouvelle microplaque 96 Deep-Well de 370 µl.
- Pipeter 130 µl de tampon PE (préchauffé à 70 °C) vers la microplaque de binding NucleoSpin® Plant II avec le CyBi®-SELMA comme indiqué Figure 2. Distribuer le tampon directement sur la membrane et incubé à température ambiante pendant 2 min.
- Centrifuger à 5,600-6,000 x g pendant 2 min puis retirer la microplaque de binding NucleoSpin® Plant II.

Résultats et discussion

Nous avons obtenues des ADN génomique purifiés de grandes qualités. Les ADN ont ensuite été utilisés avec succès lors d'une amplification par PCR avec des primers fluorescents (Figure 4). L'amplification des fragments de PCR ont indiqué une absence d'inhibition de la PCR. Le rendement d'extraction d'ADN a été évalué à 5 µg pour 100 mg de végétaux. La pureté a été évaluée par la mesure du ratio OD 260 nm/280 nm et ressort à 1.8.

La méthode semi-automatique décrite ci-dessus a permis l'extraction d'ADN de tissus de feuilles avec de bons résultats en terme de rendement et de qualité de purification. Les résultats ont ainsi démontrés les qualités du pipeteur CyBi-SELMA et notamment le haut-débit de l'appareil du fait de son cycle de pipetage très court, sa simplicité d'utilisation, sa grande flexibilité dans les paramètres de méthodes et sa très petite taille qui nous ont permis de l'utiliser sous une hotte stérile.

En comparaison, nous utilisions précédemment un robot totalement automatisé équipé de 3 x 8 canaux de 1000 µl, en une journée de travail (8 heures) nous obtenions seulement 4 x 96 extractions d'ADN. Avec le CyBi®-SELMA 96/1000 µl nous réalisons 8 x 96 extractions d'ADN sur la même durée (8 heures), et nous l'utilisons sous une hotte stérile.

Conclusion

Les résultats montrent que le pipeteur semi-automatique CyBi®-SELMA 96/ 1000 µl est très adapté à l'extraction fiable d'ADN de végétaux au format 96 puits tel que proposé par le kit NucléoSpin® 96 Plant II. L'extraction de 8 x 96 ADN hautement purifiés peut être réalisée en 8 heures de travail quotidien. La petite taille du CyBi®-SELMA permet son utilisation sous hotte stérile.

Les résultats sont excellents et n'importe qui peut les obtenir sans être un expert de programmation de robot.

Références

- (1) Moeller E. M., Bahnweg G., Sandermann H. and Geiger G. G. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids research* 20: 22, 6115-6116.

Les auteurs

Vanessa Clouet
INRA UMR 1349 IGEPP, 35653 Le Rheu - France
E-Mail: vanessa.clouet@rennes.inra.fr

Katrin Undisz, PhD
CyBio AG - Goeschwitzer Strasse 40 -07745 Jena - Germany
E-Mail: Katrin.Undisz@cybio-ag.com



Robot de pipetage LISSY



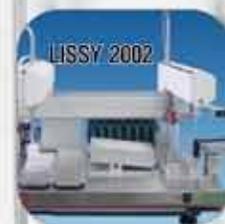
Sondes de pipetage



Des flacons, encore des flacons



Robot de remplissage TraySy X



Robot de pipetage LISSY 2002 a deux bras



Distributeur acoustique de nano-volumes



Scanner CT pour petits animaux



Collecteurs de cellules



Cocktails de scintillation liquide



Evaporateur CombiDancer

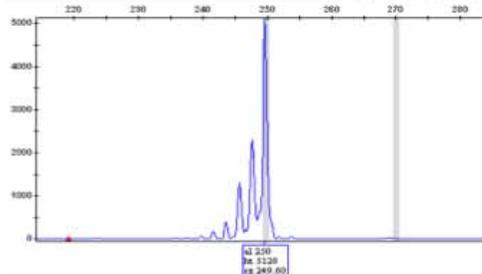


Figure 4: Amplification par PCR de marqueur de fragments SSR (250bp) après électrophorèse sur 3130 xl Genetic Applied Biosystem

ZINSSER ANALYTIC

D-60489 Frankfurt, Eschborner Landstraße 135
Tél.: +49 69 789 106-0, Fax +49 69 789 106-80
GB-Maidenhead, Berks; Tél.: +44 1628 773202
USA-Northridge, CA; Tél.: +1 818 341-2906

Hotline en France: Michel Serralunga
Tél.: +33 (0)6 70858390, email: france@zinsser-analytic.com
Internet: www.zinsser-analytic.com