

MINIPREPARATION D'ADN DE LEVURE EN MICROPLAQUES**PRINCIPE**

Cette technique permet l'extraction de l'ADN total (chromosomique, mitochondrial et plasmidique) des cellules. Le traitement des cellules de levure se fait à l'aide de la zymolyase en présence de β -mercaptoéthanol ce qui permet la digestion des parois. La zymolyase digère les liaisons β 1-4 glucane des protéines glycosylées de la paroi et le β -mercaptoéthanol est un agent réducteur qui rompt les ponts disulfure des protéines. Un traitement des cellules avec du dodécyl sulfate de sodium (SDS) permet la dénaturation des protéines. L'addition d'acétate de potassium neutralise le milieu, précipite le SDS ainsi que certaines protéines, sous forme de complexes associés aux molécules de SDS et de potassium. Ces agrégats sont éliminés par centrifugation. L'ADN est concentré par précipitation à l'isopropanol.

Référence : Johnston, J. R. (1988) In *Yeast, a practical approach*. (Eds: I. Campbell et J. H. Duffus) IRL Press, 107-123.

MATERIEL

- Microplaques 2 ml et centrifugeuse à microplaques
- Scotchs à microplaques
- Etruves à 37°C et 65°C
- Speed-Vac

SOLUTIONS

- Solution I : (à conserver à l'obscurité à 4°C)

EDTA (pH 8)	25 mM	pour 100 ml	5 ml de 0,5 M
Tris-HCl (pH 8)	50 mM		5 ml de 1 M
β -mercaptoéthanol (vol/vol)	1%		1 ml
- Solution II : (à conserver à température ambiante)

Diéthanolamine (pH 9)	200 mM	pour 100 ml	20 ml de 1 M
EDTA (pH 9)	80 mM		16 ml de 0,5 M
SDS (p/vol)	1%		5 ml de 20%
- Solution III : (à conserver à 4°C)

Acétate de potassium	5 M		
----------------------	-----	--	--
- Zymolyase (100 T) 100 mg/ml (à dissoudre dans du sucrose 10% (p/vol))
- β -mercaptoéthanol (*ATTENTION : toxique s'il est inhalé ou absorbé à travers la peau. Porter des gants et travailler sous la hotte*).
- Isopropanol
- Ethanol à 70% et à 100% (conservé à -20°C)
- Solution TE 10 X :

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM	pour 500 ml	50 ml de 1 M
EDTA	10 mM		10 ml de 0,5 M

----> autoclaver

PROTOCOLE

- La veille,ensemencer 2 ml de milieu YPglu dans chaque puits avec une colonie isolée. Recouvrir d'un scotch spécial pour cultures, qui laisse passer l'air. Incuber pendant la nuit à 30°C sans agitation. Il faut compter 20-24 H à 30°C pour avoir suffisamment de cellules.
- Centrifuger à 4 000 t/min pendant 5 min à température ambiante.
- Éliminer le surnageant par inversion de la microplaque.

A cette étape, il est nécessaire de manipuler le β -mercaptoéthanol sous la hotte

- Resuspendre le culot de cellules dans 200 μ l de solution I. Ajouter 2 μ l de la solution de zymolyase. Incuber 30 min à 37°C.
- Ajouter 200 μ l de solution II. Recouvrir d'un scotch métallique. Mélanger le contenu par inversion. Incuber 30 min à 65°C puis mettre dans la glace.
- Ajouter 100 μ l de solution III froide. Recouvrir d'un scotch métallique. Mélanger doucement en retournant plusieurs fois. Il se forme un précipité blanc. Laisser 45 min dans la glace (ou plus).
- Centrifuger 30 min à 4 000 t/min à température ambiante.
- Transférer les surnageants dans une nouvelle microplaque 2 ml en utilisant le programme 2 de l'Hydra. A cette étape il peut arriver que les surnageants ne soient pas très propres. Dans ce cas:
- Centrifuger 30 min à 4 000 t/min à température ambiante.
- Transférer les surnageants dans une nouvelle microplaque 2 ml en utilisant le programme 2 de l'Hydra.
- Ajouter 300 μ l d'isopropanol (ou 1ml d'EtOH) et homogénéiser soigneusement la solution, après avoir recouvert d'un scotch métallique.
- Centrifuger pendant 15 min à 4 000 t/min à 4°C.
- Éliminer le surnageant par inversion.
- Rincer les culots avec 200 μ l d'éthanol à 70%.
- Éliminer le surnageant par inversion.
- Sécher les culots sous vide (Speed-Vac) pendant 5 min.
- Resuspendre les culots dans 50 μ l de TE. L'ADN est conservé à -20°C. On obtient suffisamment d'ADN pour 2-3 Southern blots. Dépend cependant des souches; peut-être nécessaire de digérer tout l'ADN (dans la microplaque) et reprécipiter ensuite avant dépôt.

