

# 1 PREPARATION DE CHROMOSOMES DE LEVURE EN MICROPLAQUE 96 PUIITS

## PRINCIPE

Cette technique permet l'extraction de l'ADN total en bloc d'agarose comme le protocole précédent.

Référence : Schwarz, D. C., and Cantor, C. R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.

## MATERIEL

- Microplaques 96 puits et centrifugeuse
- Portoir à 96 tubes PCR dont le fond est bouché avec du scotch de couleur
- Etuves à 30°C, 50°C et 65°C
- Anses jetables

## SOLUTIONS

- Agarose InCert (à conserver à 50°C) :

EDTA (pH 9)	125 mM	pour 1 ml	250 µl de 0,5 M
Incert (p/vol)	1%		0,01 g
- SCE (à conserver à température ambiante) :

Sorbitol	1 M	pour 10 ml	5 ml de 2 M
EDTA (pH 9)	10 mM		200 µl de 0,5 M
Citrate de sodium (ajusté à pH 5,8 avec acide citrique)	100 mM		1 ml de 1 M
- Solution I (à conserver à 4°C) :

SCE	1 M	pour 1 ml	1 ml
β-mercaptoéthanol (vol/vol)	5%		50 µl
Zymolyase (extemporanément) 100 unités/ml			10 µl de 100 mg/ml
- Solution II (à conserver à 4°C) :

EDTA (pH 9)	450 mM	pour 10 ml	9 ml de 0,5 M
Tris-HCl (pH 8)	10 mM		100 µl de 1 M
β-mercaptoéthanol (vol/vol)	7,5%		750 µl
- Solution III (à conserver à température ambiante) :

EDTA (pH 9)	450 mM	pour 10 ml	9 ml de 0,5 M
Tris-HCl (pH 8)	10 mM		100 µl de 1 M
N-lauryl sarcosyl (vol/vol)	1%		100 µl
Protéinase K (extemporanément)	1 mg/ml		10 mg
- β-mercaptoéthanol (*ATTENTION : toxique s'il est inhalé ou absorbé à travers la peau. Porter des gants et travailler sous la hotte.*)
- Protéinase K
- Solutions d'EDTA 50 mM pH 8 et EDTA 0,5 M pH 8

*Toujours travailler avec des gants et utiliser des solutions autoclavées, manipuler les blocs d'agarose le moins possible et avec précaution.*

## PROTCOLE

- La veille, ensemercer 1,8 ml de milieu YPglu dans les 96 puits d'une microplaque profonde (puits de 2 ml) avec une colonie isolée. Incuber pendant la nuit à 30°C sans agitation.
- Centrifuger à 3500 rpm pendant 5 min à température ambiante.
- Eliminer le surnageant par retournement de la microplaque. Positionner la microplaque à l'envers sur un kleenex afin de bien enlever tout le surnageant.
- Rincer les culots de cellules avec 0,5 ml d'EDTA 50 mM à la multipipette.
- Centrifuger à 3500 rpm pendant 5 min à température ambiante.
- Eliminer le surnageant par retournement de la microplaque. Positionner la microplaque à l'envers sur un kleenex afin de bien enlever tout le surnageant.
- Resuspendre le culot de cellules dans 100  $\mu$ l EDTA 50 mM à la multipipette.

*A cette étape, il est nécessaire de manipuler le  $\beta$ -mercaptoéthanol sous la hotte*

- Ajouter délicatement 50  $\mu$ l de solution I à la multipipette sans mélanger.
- Ajouter rapidement 250  $\mu$ l d'agarose InCert 1% (conservé à 50°C) à la multipipette.
- Homogénéiser délicatement le mélange par aspiration/refoulement (1 à 2 fois) et le verser rapidement dans un moule à blocs (portoir à 96 tubes PCR dont le fond a été préalablement scotché). Couvrir la microplaque (afin d'éviter l'évaporation) et la laisser sous la hotte pendant 10 min.
- Pendant ce temps ajouter dans une microplaque 96 de 2,2 ml 500  $\mu$ l de solution II.
- Enlever le scotch du moule à blocs et positionner ce moule sur la microplaque contenant la solution II.
- Démouler les blocs en les poussant délicatement à l'aide d'une anse jetable dans la microplaque contenant la solution II. Fermer hermétiquement la microplaque à l'aide d'un scotch approprié.
- Incuber pendant au moins 6 h à 37°C dans une étuve.
- Sortir la microplaque et la placer dans la glace.
- Éliminer la solution II sous la hotte par retournement de la microplaque avec le portoir à 96 tubes PCR au dessus afin d'éviter que les blocs ne tombent. Effectuer cette opération au dessus d'une boîte Plastora.
- Ajouter 500  $\mu$ l de la solution III.
- Incuber pendant au moins 6 h à 65°C dans une étuve.
- Éliminer la solution III sous la hotte de la même manière que ci-dessus.
- Rincer les blocs avec 1 ml d'EDTA 0,5 M.
- Éliminer cette solution sous la hotte de la même manière que ci-dessus.
- Pour une conservation longue des blocs, ajouter 1 ml d'EDTA 0,5 M. Les blocs d'agarose se conservent alors à 4°C pendant plusieurs mois. On obtient environ 1  $\mu$ g d'ADN par bloc.