

Salt DNA extraction (C. Lovejoy)

Note: The numbering is our protocol for 0.22 μm Sterivex (Millipore) filters, The step b is for cases when we used 47 mm polycarbonate filters, .

Step:

0. Put 70% ethanol in the freezer. You need \pm 6 ml per sample.
1. Thaw your sample (RT or 37°C).
 - 1b. Transfer filters and lysis buffer in a 15 ml tube.
2. Add 50 μl of lysozyme, incubate 45 min at 37°C, with rotation.
3. Add 50 μl of proteinase K and 200 μl of SDS 10%, incubate 1h at 55°C, with rotation.
4. Transfer sterivex content in a new 15ml tube and add 1ml of lysis buffer in the sterivex. Incubate for 15 min at 55°C with rotation and then transfer to the 15 ml tube.
 - 4b. For 47 mm filters, add 1 ml of lysis buffer in the 15 ml tubes.
5. Add 1.9 ml of NaCl 6M. Vortex 1 min. Centrifuge at maximum speed for 20 minutes.
6. Transfer flow through in a new 15 ml tube (At this step you there you can often see a white fuzzy form, you can centrifuge longer. Be careful to not transfer too much of that in the new tube.).
7. Add 5 ml of cold 70% ethanol, mix by inverting the tubes and put at -20 (or on the ice) for at least 10 minutes.
8. Transfer 2 ml of this solution in 2 ml tubes (you can use two 2 ml tubes per sample to go faster).
9. Spin 10 minutes at maximum speed and discard flow through.
10. Using the same 2 ml tube, repeat steps 8-9 until all the solution has been centrifuge.
11. Quick spin to remove remaining ethanol. Be careful to not remove the pellet, it can be invisible.
12. Add 200 μl of cold ethanol. Spin 5 minutes at maximum speed. Remove ethanol. Let pellets dry (no alcohol trace, but do not let dry for too long).
13. Add 100ml of TE, stand for 1-5 min. Dissolve by up and down and vortex. Transfer in a clean tube.

14. Make aliquot, check on gel and quantify. Keep DNA samples at -20 or -80.

Solutions needed:

70% ethanol, for 500 ml
mix 368,4 ml of 95% ethanol with 131,6 ml of milliQ water.

Lysozyme (SIGMA Cat# L-7651) 2 mg lysozyme in 50 µl lysis buffer. Prepare fresh.

Proteinase k (SIGMA Cat# P-2308) 0.4 mg proteinase K in 50 µl lysis buffer. Prepare fresh.

10% SDS

Lysis buffer (40 mM EDTA; 50 mM Tris
pH=8.3; 0.75 M Sucrose)

6M NaCl

Adapted from Barcelona protocol (Ramon Massana et collègues) and manual pratique
BIO 14825 Université Laval Biologie cellulaire et moléculaire (Lucie Papillon)

Protocole d'extraction au sel (A)

Matériel :

Lysozyme

Protéinase K

SDS 10%

NaCl 6M (la solution est sur saturée il est normal qu'il y ait du sel qui n'est pas dissout)

Éthanol 70%

0. Pour la fraction $>3 \mu\text{m}$, transférer le filtre et le tampon dans un tube de 15ml.

1. Ajouter 50 μl de lysozyme et incubé 45 min à 37C.

2. Ajouter 50 μl de protéinase K et 200 μl de SDS 10%. Incuber 1h à 55C.

3. Transférer le contenu du stérivex dans un tube de 15mL, ou laisser dans le présent tube pour le $>3 \mu\text{m}$.

4. Ajouter 1ml de lysis buffer dans le stérivex (tube de 15ml pour $>3 \mu\text{m}$, pour ajuster le volume) incubé 15 min à 55C. Transférer le contenu du stérivex dans le tube de 15ml.

5. Ajouter 1900 μl de NaCl 6M, vortexer 1 min, centrifuger 10 000 rpm 10 min.

6. Transférer le surnageant dans un nouveau tube (c'est normal qu'il y ait un nuage blanc en surface et que le culot se suspende un peu, vous pouvez re-centrifuger si vous désirez).

7. Ajouter 5 ml d'éthanol froid, mélanger en inversant les tubes et incubé un minimum de 10 minutes sur glace. Les tubes peuvent aussi être placés au congélateur.

8. Transférez environ 2ml de la solution dans 1 tube de 2ml.

9. Centrifuger 10 minutes à vitesse maximale à 4°C

10. Éliminer le surnageant. Dans ce même tube répéter les étapes 8-10 jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de liquide dans le tube de 15ml.

11. Faire un quick spin et éliminer le reste du surnageant, faire attention pour ne pas aspirer le culot qui peut être invisible.

12. Ajouter 200 μl d'éthanol froid. Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale.

13. Éliminer le surnageant, laisser sécher le culot.

14. Solubiliser les culots dans 100 μl de tampon TE et transférer de tube.

15. Observer sur gel et/ou quantifier.

