

## EXTRACTION CHOMCZINSKI

### PRECAUTIONS GENERALES :

- Toutes les manipulations se font avec des gants de façon à limiter le risque de dépôt de RNAses présentes en grande quantité sur notre peau.
- Tout le matériel utilisé (pointes, tubes...) doit être exempt de RNase, de même que l'eau.
- Pour la préparation de toutes les solutions et la dilution des ARN, utiliser de l'eau milliQ **non-autoclavée**.

### PREPARATION DES SOLUTIONS UTILISEES :

#### SOLUTION D :

Pour 10 ml :

- |                             |     |         |
|-----------------------------|-----|---------|
| - GTC                       | 4 m | 9.65 ml |
| - 2 mercaptoéthanol         |     | 0.1 ml  |
| - Sodium N-Lauryl-sarcosine | 20% | 0.25 ml |

#### PREPARATION DU GTC 4 M

Pour 100ml :

- |                         |          |        |
|-------------------------|----------|--------|
| - Guanidine Thiocyanate |          | 50g    |
| - Na citrate            | 1 M pH 7 | 2.5 ml |
- (ajuster le pH avec 500 µl d'acide citrique pour 100 ml de Na citrate 1 M)
- Filtrer sur filtre nylon de 0.45 µm

### 1. PRELEVEMENT

Les tissus doivent être prélevés avec des instruments autoclavés :

- 1 paire ciseaux/pinces pour la peau (attention aux poils)
- 1 paire ciseaux/pinces pour la paroi abdominale
- 1 paire ciseaux/pinces pour prélever les poumons

Les tissus doivent être posés sur carboglace, puis stockés à -80°C en tube Falcon.

- Polytron rincé 3 - 4 fois 1 minute avec H2O osmosée (robinet).
- Polytron rincé 1 fois 20 minutes avec NaOH 0,4 M.
- Polytron rincé 2 - 3 fois 1 minute avec H2O osmosée (robinet).
- Polytron rincé 1 fois 1 minute avec H2O milliQ.

Entre deux tissus : Polytron rincé 1 fois 1 minute avec H2O milliQ.

#### Homogénéisation:

- Homogénéiser rapidement le tissu ou les cellules dans 10 ml de solution D dans des tubes Falcon 50 ml.



## 2. EXTRACTION

### - Ajouter :

Na acétate 3 M pH 5.2	0.6 ml
Phénol équilibré à l'eau	8 ml
Chloroforme	2 ml

**Attention**, le phénol doit être fraîchement équilibré (moins de 4 semaines à 4°C) ou congelé en aliquots.

- **Mélanger** en inversant le tube plusieurs fois.

---

15 minutes sur glace

- **Centrifugation** 40 minutes / 4°C / 6000 rpm.
- **Surnageant** prélevé : nouveau tube Falcon 15ml, en prenant soin d'éviter l'interface entre les 2 phases.
- + 1 vol Chloroforme.
- **Centrifugation** 20 minutes 6000 rpm.
- **Surnageant** prélevé : nouveau tube Falcon 15ml.
- + 1 vol isopropanol (précipitation de l'ARN).

---

Incuber 1 heure à – 20°C

- **Centrifugation** 40 minutes / 6000 rpm.
- **Surnageant** éliminé. Tube retourné sur papier absorbant.
- **Culot** lavé 3x avec EtOH 70° (préparé à partir d'EtOH 95-96°).
- **Culot** séché sur paillasse.
- **Culot** repris dans 100µl H2O milliQ → sur glace.

