

## Protocole : L'extraction nondestructive d'ADN de Psylles

*Ce protocole est utilisé pour extraire l'ADN de Psylles en les perçant avec une broche ou aiguille, conservant ainsi un spécimen de référence (exosquelette) après extraction. Les Psylles ont été préalablement conservés dans un mélange d'éthanol à 95% et de glycérol à 5%. Ce protocole utilise le kit 'QIAGEN DNeasy Blood & Tissue' et a été modifié depuis Percy(2003) Evolution: 57, 2540-56. Ce protocole a été réalisé dans le cadre du projet CRF Psyllid financé par le gouvernement écossais et du projet POnTE. Pour plus d'informations, veuillez contacter Jennifer Sjölund ([jennifer.sjolund@sasa.gsi.gov.uk](mailto:jennifer.sjolund@sasa.gsi.gov.uk)).*

### Avant de commencer

- Préparer les tampons du kit selon les instructions du fabricant

### Préparation des échantillons de Psylles

1. Retirer le Psylle du tube et épongez sur papier (type essuie-tout, serviette papier).
2. Placer sur un morceau de mousse ou de matériel mou (type mousse/ emballage de protection) et sous un microscope de dissection.
3. A l'aide d'une broche ou aiguille de 0.1mm, percer le Psylle à deux endroits : à travers l'abdomen et en partie à travers le haut du thorax.
4. Placer dans un tube verrouillable de microcentrifugeuse de 1.5mL/2mL

### Extraction d'ADN : Jour 1

5. Ajouter 180 µL de tampon ATL et 20 µL de Protéinase K à chaque échantillon.
6. Mélanger au vortex et centrifuger brièvement.
7. Incuber pendant la nuit à 56°C sur un bloc chauffant secouant lentement.

### Extraction d'ADN : Jour 2

8. Mélanger au vortex pendant 15s et centrifuger brièvement.
9. Ajouter 200 µL de tampon AL. Mélanger au vortex et centrifuger brièvement.
10. Incuber à 56°C pendant 10 min.
11. Ajouter 200 µL d'éthanol (96-100 %). Mélanger au vortex et centrifuger.
12. Transférer le liquide dans la colonne à centrifuger placée dans un tube de collection de 2mL, laissant ainsi le spécimen Psylle au fond du tube. Centrifuger à 8000 Tr/min pendant 1min.
  - *Conserver le psylle de référence restant dans un mélange d'éthanol à 95% et de glycérol à 5%.*
13. Se débarrasser du liquide en jetant le tube de collection (uniquement la partie récoltant le liquide après centrifugation et garder la colonne de silice à centrifuger = filtre). Placer la colonne (filtre) dans un nouveau tube de collection.
14. Ajouter 500 µL de tampon AW1. Centrifuger pendant 1 min à 8000 Tr/min.
15. Se débarrasser du liquide en jetant le tube de collection. Placer le filtre dans un nouveau tube de collection.
16. Ajouter 500 µL de tampon AW2. Centrifuger pendant 3 min à 14000 Tr/min.
17. Se débarrasser du liquide en jetant le tube de collection. Placer dans un tube de microcentrifugeuse de 1.5 mL.
18. Ajouter 100 µL de tampon AE. Incuber pendant 1 min à température ambiante. Centrifuger pendant 1 min à 8000 Tr/min.