

Nexxo-Prep duo, Gel Extraction & PCR Clean-Up

Kit d'extraction d'ADN, par centrifugation sur colonne, composé des éléments nécessaires pour la purification de produits de PCR, de digestion de restriction, de synthèse d'ADNc ainsi que pour la purification de jusqu'à 300 mg de gel d'agarose (TAE, TBE).

La purification à partir de gel d'agarose peut être réalisée en moins de 20 minutes et permet un taux de récupération de jusqu'à 90 % (ADN de 80 bp à 30 kb)

Les produits de PCR, de digestion de restriction ou de synthèse d'ADNc peuvent,

quant à eux, être purifiés en environ 5 minutes, avec une élimination efficace des amorces, enzymes, nucléotides non incorporés, colorants et autres impuretés, avec un taux de récupération de l'ADN de jusqu'à 95 % (ADN de 80 bp à 30 kb, max. 100 µl)

L'ADN obtenu peut être directement utilisé dans les applications down stream courantes (séquençage, clonage, ligation, digestions de restriction, hybridation, transformation, amplification, marquage de l'ADN) ou être stocké pour une utilisation ultérieure.

I. Composants du kit

	10 preps	50 preps	250 preps
Tampon d'éluion	2 ml	2 x 2 ml	15 ml
Amplificateur de fixation	2 ml (volume final 10 ml)	6 ml (volume final 30 ml)	30 ml (volume final 150 ml)
Solution de lavage S	15 ml (prêt à l'emploi)	18 ml (volume final 60 ml)	2 x 45 ml (volume final 2 x 150 ml)
Solution de fixation S1	4 ml (volume final 11 ml)	12 ml (volume final 32 ml)	63 ml (volume final 163 ml)
Gelsol	12 ml	60 ml	2 x 140 ml
Filtres de centrifugation	10	50	5 x 50
Tubes receveurs 1,5 ml	10	50	5 x 50
Tubes receveurs 2,0 ml	10	50	5 x 50
Notice	1	1	1
Réf. Catalogue	2038.10	2038.50	2038.250

Matériels et instruments non fournis

- Isopropanol >99.7 % (propanol-2 >99.7 %)
- Éthanol >96 %
- Microtubes (1.5 ml et 2.0 ml)
- Bloc chauffant ou bain-marie (65 °C)
- Microcentrifugeuse (min 11100 x g ; env. 11000 rpm)
- Pipettes et pointes de pipette
- Gants à usage unique

Certains composants de ce kit sont livrés sous forme concentrée et sont à diluer avant utilisation (voir chapitre « Préparation des réactifs et tampons », page 2).

II. Conditions de stockage et durée de validité

L'ensemble des composants de ce kit sont à stocker à température ambiante (15-30 °C).

L'éthanol et l'isopropanol sont des composés volatils. Bien refermer les flacons **Solution de lavage S**, **Amplificateur de fixation** et **Solution de fixation S1**.

Note : les composants du kit ont une durée de validité minimum de 12 mois (sous réserve de respecter les conditions de stockage).

Avant utilisation du kit, amener l'ensemble des composants à température ambiante et vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.

III. Préparation des réactifs et tampons

1. Kit 10 extractions :

- Ajouter 7 ml de propanol-2 >99.7 % à la **Solution de fixation S1**
- Ajouter 8 ml de propanol-2 >99.7 % à l'**Amplificateur de fixation**

*Remarque : dans le kit 10 extractions la **Solution de lavage S** est fournie prête à l'emploi.*

2. Kit 50 extractions :

- Ajouter 20 ml de propanol-2 >99.7 % à la **Solution de fixation S1**
- Ajouter 24 ml de propanol-2 >99.7 % à l'**Amplificateur de fixation**
- Ajouter 42 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage S**

3. Kit 250 extractions :

- Ajouter 100 ml de propanol-2 >99.7 % à la **Solution de fixation S1**
- Ajouter 120 ml de propanol-2 >99.7 % à l'**Amplificateur de fixation**
- Ajouter 105 ml d'éthanol >96 % à chaque **Solution de lavage S**

IV. Protocole 1: purification de fragments d'ADN issu de PCR, de digestions de restriction ou de synthèse d'ADNc

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).

Remarque : en cas de présence ou d'apparition de précipités, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement.

Selon les caractéristiques/volumes de l'échantillon, commencez par l'étape 1, 1 bis ou 1 ter.

1	Fixation de l'ADN au filtre de centrifugation (échantillons : <u>max. 50 µl</u>)
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 250 µl de Solution de fixation S1 à l'échantillon (max. 50 µl) <hr/> <p><i>Remarque : pour les échantillons contenant de l'huile minérale (ex. échantillon de PCR), utiliser l'étape 1bis.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette ou vortexer• Placer un Filtre de centrifugation dans un Tube receveur 2.0 ml• Transférer la totalité de l'échantillon contenant la Solution de fixation S1 dans le Filtre de centrifugation• Centrifuger 2 min. à 11000 x g• Continuer avec l'étape 2 « Élution de l'ADN »

1 bis	Fixation de l'ADN au filtre de centrifugation (échantillons: <u>50 à 100 µl</u>)
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 500 µl de Solution de fixation S1 à l'échantillon (50 à 100 µl)• Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette ou vortexer• Placer un Filtre de centrifugation dans un Tube receveur 2.0 ml• Transférer la totalité de l'échantillon contenant la Solution de fixation S1 dans le Filtre de centrifugation• Centrifuger 2 min. à 11000 x g• Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml• Centrifuger 3 min. à 11000 x g• Continuer avec l'étape 2 « Élution de l'ADN »

Étapes 1 ter et 2 →

1 ter	Fixation de l'ADN au filtre de centrifugation (échantillons : <u>200 µl</u>)
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 1000 µl de Solution de fixation S1 à l'échantillon (max. 200 µl) <hr/> <p><i>Remarque : ajouter 500 µl de Solution de fixation S1 supplémentaire si l'échantillon contient de l'huile minérale.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette ou vortexer • Placer un Filtre de centrifugation dans un Tube receveur 2.0 ml • Transférer 600 µl de l'échantillon contenant la Solution de fixation S1 dans le Filtre de centrifugation • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Transférer les 600 µl restant de l'échantillon contenant la Solution de fixation S1 dans le Filtre de centrifugation • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Centrifuger 3 min. à 11000 x g • Continuer avec l'étape 2 « Élution de l'ADN »

2	Élution de l'ADN
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter au minimum 10 µl de Tampon d'élution (ou ddH₂O, ou tampon Tris), au centre du filtre • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g <p><i>Remarque : une augmentation du temps d'incubation à 5 min. accroît légèrement le rendement d'extraction.</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que le séquençage, le clonage, les ligations, les digestions de restrictions, l'hybridation, les transformations, le marquage de l'ADN, etc. ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Remarque : le kit a été calculé pour des échantillons de jusqu'à 100 µl. La variante du protocole pour les échantillons de 200 µl (1 ter) réduit le nombre de purifications.

V. Protocole 2: extraction et purification de l'ADN à partir de jusqu'à 300 mg de gels d'agarose (TAE, TBE)

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Préchauffer un bloc chauffant à 50 °C, pour l'étape de solubilisation.
- Vérifier que l'ensemble des composants sont à température ambiante.

Remarque : en cas de présence ou d'apparition de précipités, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement.

1	Solubilisation du gel d'agarose
	<ul style="list-style-type: none">• Exciser un fragment de gel (jusqu'à 300 mg)• Transférer le fragment dans un microtube 1.5 ml ou 2.0 ml• Ajouter la quantité requise(*) en Gelsol
	(*) Fragments de gel de jusqu'à 150 mg : 500 µl de Gelsol Fragments de gel de 150 à 300 mg : 1 ml de Gelsol
	<ul style="list-style-type: none">• Incuber 10 min. à 50 °C jusqu'à dissolution totale du fragment de gel

2	Fixation de l'ADN au filtre de centrifugation
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter la quantité requise(*) en Amplificateur de fixation au mélange obtenu à l'étape précédente
	(*) Fragments de gel de jusqu'à 150 mg : 250 µl d' Amplificateur de fixation Fragments de gel de 150 à 300 mg : 500 µl d' Amplificateur de fixation
	<ul style="list-style-type: none">• Mélanger à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en conséquent) ou vortexer• Placer un Filtre de centrifugation dans un Tube receveur 2.0 ml• Transférer 800 µl du mélange contenant l'Amplificateur de fixation dans le Filtre de centrifugation• Centrifuger 2 min. à 11000 x g• Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml
	<i>Remarque : s'il reste une fraction résiduelle du mélange contenant l'Amplificateur de fixation, répéter l'étape de centrifugation avec la fraction résiduelle.</i>

Étapes 3 à 4 →

Lavage ADN	
3	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Solution de lavage S au Filtre de centrifugation • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Répéter 1 X cette étape de lavage-centrifugation • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Centrifuger 4 min à 11000 x g, afin d'éliminer l'éthanol résiduel du Filtre de centrifugation

Élution de l'ADN	
4	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 20 - 50 µl de Tampon d'élution (ou ddH₂O ou tampon Tris), au centre du filtre • Incuber 5 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g <p><i>Remarque : une augmentation du temps d'incubation à 10 min. accroît légèrement le rendement d'extraction.</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que le séquençage, le clonage, les ligations, les digestions de restriction, l'hybridation, la transformation, l'amplification, le marquage de l'ADN, etc. ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.