

Plasmid DNA purification

**Excerpt from user manual
- Français -**

NucleoBond[®] Xtra Midi
NucleoBond[®] Xtra Maxi
NucleoBond[®] Xtra Midi Plus
NucleoBond[®] Xtra Maxi Plus

January 2013 / Rev. 11

Introduction

Purification de l'ADN plasmidique avec les kits NucleoBond® Xtra Midi (Plus) et Maxi (Plus)

En ce qui concerne ce protocole il s'agit d'un extrait en français du manuel "Plasmid DNA Purification, NucleoBond® Xtra".

Il décrit étape par étape le protocole de purification qui se trouve dans le manuel, en anglais, au chapitre 7.

Les informations détaillées concernant les kits NucleoBond® Xtra ainsi que la procédure de purification (Ex. culture des cellules bactériennes, lyse des cellules, étapes de la purification, stockage des composants du kit, fabrication des tampons et des réactifs, indications de sécurité, troubleshooting) se trouvent dans le manuel en anglais.

Il est recommandé pour les utilisateurs qui utilisent le kit pour la première fois de lire complètement le manuel d'utilisation.

Les utilisateurs expérimentés peuvent travailler directement avec les protocoles spécifiques.

7	NucleoBond® Xtra – purification d'ADN plasmidique	4
7.1	Purification de plasmides high-copy (Midi, Maxi)	4
7.2	Purification de plasmides low-copy (Midi, Maxi)	11
7.3	Concentration des éluats NucleoBond® Xtra avec NucleoBond® Finalizer	15

7 NucleoBond® Xtra – purification d'ADN plasmidique

7.1 Purification de plasmides high-copy (Midi, Maxi)

Remarque : Les renvois dans le protocole se réfèrent aux chapitres correspondant dans le protocole principal en anglais.

Midi

Maxi

1 Préparation d'une pré-culture

Inoculez 3–5 mL d'un milieu de pré-culture LB avec une colonie piquée sur une plaque d'Agar fraîchement striée. Assurez-vous que la plaque et le milieu de culture contiennent le bon antibiotique afin d'être sûr d'obtenir le plasmide (pour d'autres informations voir section 4.3). Agitez à 37 °C à ~ 300 rpm pendant ~ 8 h.

2 Préparation d'une culture overnight



Remarque : Afin d'utiliser au maximum la capacité de fixation des colonnes NucleoBond® Xtra il est nécessaire de charger une grande quantité d'ADN plasmidique. Si la culture présente une faible croissance ou si le plasmide ne se comporte pas comme un plasmide high-copy, consultez la section 4.6 du protocole pour l'utilisation de plus grands volumes de culture. Si vous n'êtes pas sûr du nombre de copies de votre plasmide ou du comportement de la culture vis à vis de la croissance bactérienne, **augmentez le volume de culture** et décidez à l'étape 3 du nombre de cellules à utiliser pour la préparation. **Le volume mentionné ci-après de la culture overnight est calculé pour la valeur de l'OD₆₀₀ de 4 (voir chapitre 4.5 comme référence).**

Inoculez une culture overnight en diluant la pré-culture au 1/1000ième dans un volume donné de milieu LB contenant l'antibiotique sélectif approprié. Faites pousser la culture toute la nuit à 37 °C à ~ 300 rpm pendant 12–16 h.

100 mL

300 mL

3 Récupération des cellules bactériennes

Mesurez la DO₆₀₀ de la culture cellulaire et déterminez le volume de culture recommandé.

$$V \text{ [mL]} = \frac{400}{OD_{600}}$$

$$V \text{ [mL]} = \frac{1200}{OD_{600}}$$

Midi

Maxi

Culottez les cellules par centrifugation à **4,500–6,000 x g** pendant **≥ 10 min** à **4°C** et éliminez complètement le surnageant.

Remarque : Il est possible, bien sûr, d'utiliser de plus grands volumes, par ex. si le plasmide ne se comporte pas comme un vecteur high-copy (voir section 4.6 pour plus d'informations). Dans ces conditions il est nécessaire d'augmenter proportionnellement les volumes des tampons RES, LYS et NEU dans les étapes 4, 5 et 7. *Éventuellement, il faudra commander un volume supplémentaire de tampon de lyse (voir l'information de commande du NucleoBond® Xtra Buffer Set I).* Si le volume de culture est plus du double du volume recommandé, il est plus judicieux de centrifuger pour clarifier le lysat (étape 8), plutôt que d'utiliser le filtre NucleoBond® Xtra.

4 Resuspension (Buffer RES)

Reprenre complètement le culot cellulaire dans le tampon de resuspension **Resuspension Buffer RES + RNase A** en pipettant par aspiration-refoulement ou en vortexant.

Important : pour une lyse efficace des cellules il ne doit plus subsister d'agrégats en suspension.

Remarque : Augmentez proportionnellement le volume du tampon RES si vous avez utilisé une masse cellulaire supérieure à celle recommandée (voir la section 4.7 pour plus d'informations sur les conditions de lyse optimales des cellules et la section 4.8 pour les souches difficiles à lyser).

8 mL

12 mL

Midi

Maxi

5 Lyse cellulaire (Buffer LYS)

- ! **Avant d'utiliser le tampon LYS vérifiez que le SDS n'a pas précipité.** Si un précipité blanc est visible, chauffez le tampon quelques minutes à 30–40 °C
- jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissout. Ramenez le tampon à température ambiante (18–25 °C).

Ajoutez le tampon de lyse **Lysis Buffer LYS** à la suspension.

Mélangez avec précaution en **inversant** le tube **5 fois**. **Ne pas utiliser de vortex**, sinon l'ADN chromosomique se fractionnerait, se détacherait des débris cellulaires et contaminerait alors la suspension.

Incubez le mélange à température ambiante (18–25 °C) pendant **5 min**.

Attention : Un temps d'incubation trop long sous des conditions alcalines peut dénaturer et dégrader irréversiblement l'ADN plasmidique et libérer l'ADN chromosomique dans le lysat.

Remarque : Augmentez proportionnellement le volume du tampon LYS si vous avez utilisé une masse cellulaire supérieure à celle recommandée (voir section 4.7 pour plus d'informations sur la lyse optimale des cellules).

8 mL

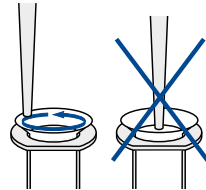
12 mL

6 Equilibration (Buffer EQU)

Equilibrez la colonne NucleoBond® Xtra **avec** le filtre intégré avec le tampon d'équilibration **Equilibration Buffer EQU**.

Déposez le tampon sur la collerette du filtre comme le montre le schéma et assurez-vous que le filtre est entièrement mouillé.

Laissez la colonne se vider par gravité. La colonne ne s'assèche pas.



12 mL

25 mL

Midi

Maxi

7 Neutralisation (Buffer NEU)

Ajoutez le tampon de neutralisation **Neutralization Buffer NEU** à la suspension et mélangez immédiatement avec précaution le lysat en **inversant** le tube **10–15 fois. Ne pas utiliser de vortex.**

- ! Le flacon ou le tube utilisé pour cette étape ne doit pas être rempli au plus des deux tiers afin de permettre un mélange homogène. Veillez à neutraliser complètement pour précipiter toutes les protéines et l'ADN chromosomique. Le lysat doit passer d'une forme gluante et visqueuse à une forme moins visqueuse, une suspension homogène et un flocculat blanc.

Procédez immédiatement à l'étape 8. **Une incubation du lysat n'est pas nécessaire.**

Remarque : Augmentez proportionnellement le volume du tampon NEU si vous avez utilisé une masse cellulaire supérieure à celle recommandée (voir section 4.7 pour des informations sur la lyse optimale des cellules).

8 mL

12 mL

8 Clarification et chargement

- ! Assurez-vous d'avoir une suspension homogène du précipité en **inversant le tube 3 fois** avant d'appliquer directement le lysat sur le filtre NucleoBond® Xtra préalablement équilibré, afin d'éviter que le filtre ne se bouche.

Le lysat est simultanément clarifié et chargé sur la colonne. Rechargez le filtre si le volume de lyse est plus important que la capacité du filtre. Laissez la colonne se vider par gravité.

Alternative : Le précipité peut être éliminé par centrifugation $\geq 5,000 \times g$ pendant au moins 10 min, par ex. si plus du double de la masse cellulaire recommandée a été utilisé. S'il reste des matières en suspension, transférez dans un nouveau tube et répétez l'étape de centrifugation, de préférence à une vitesse plus élevée, ou chargez le lysat sur le filtre NucleoBond® Xtra préalablement équilibré.

Cette étape de clarification est extrêmement importante. En effet, les résidus du précipité peuvent boucher la colonne NucleoBond® Xtra. Pour charger la colonne vous pouvez appliquer le lysat clarifié sur le filtre préalablement équilibré ou enlever préalablement le filtre s'il est inutilisé. Laissez la colonne se vider par gravité.

Remarque : Vous pouvez garder tous les filtrats pour les analyser (voir section 8.1)

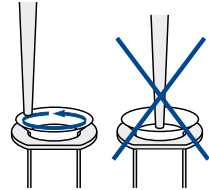
Midi

Maxi

9 Lavage du filtre et de la colonne (Buffer EQU)

- ! Lavez le filtre NucleoBond® Xtra et la colonne NucleoBond® Xtra avec le tampon **Equilibration Buffer EQU**.

Déposez le tampon sur la collerette du filtre et assurez-vous que le lysat est bien lavé. Omettre cette étape ou déposer simplement le tampon dans le filtre réduit le rendement d'ADN plasmidique.

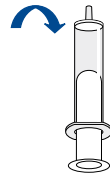


5 mL

15 mL

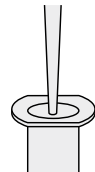
10 Eliminer le filtre

Retirez le filtre NucleoBond® Xtra ou éliminez le en retournant la colonne.



11 Lavage de la colonne (Buffer WASH)

- ! Lavez la colonne NucleoBond® Xtra avec le tampon de lavage **Wash Buffer WASH**. Il est important d'éliminer le filtre avant d'appliquer le tampon de lavage. En effet, ceci pourrait avoir un mauvais impact sur la pureté de l'ADN.



8 mL

25 mL

Midi

Maxi

12 Elution (Buffer ELU)

Eluez l'ADN plasmidique avec le tampon d'élu­tion **Elution Buffer ELU**. Collectez le tampon d'élu­tion avec l'ADN plasmidique dans un tube de centrifugation de 15 mL ou 50 mL.

Remarque : Chauffer tampon d'élu­tion ELU à 50°C avant l'élu­tion peut améliorer le rendement d'ADN plasmidique de gros taille comme des BACs.

Passez à l'**éta­pe 13** pour le protocole de centrifugation après la précipitation à l' isopropanol ou continuez avec la **section 7.9** pour la concentration de l'ADN plasmidique et son désalage au moyen du système NucleoBond® Finalizer (NucleoBond® Xtra Midi Plus) ou NucleoBond® Finalizer Large (NucleoBond® Xtra Maxi Plus).

Option : Déterminez le rendement d'ADN plasmidique par spectrophotométrie UV afin d'ajuster la concentration de l'ADN à l'éta­pe 15 et calculez le taux de récupération après l'éta­pe de précipitation.

5 mL

15 mL

13 Précipitation

Ajoutez l'**isopropanol** à **température ambiante** pour précipiter l'ADN plasmidique élué.

Vortexez précautionneusement.

Centrifugez à $\geq 5,000 \times g$ pendant ≥ 5 min à \leq **température ambiante**, de préférence à $15,000 \times g$ pendant 30 min à 4°C. Eliminez précautionneusement le surnageant.

3.5 mL

10.5 mL

14 Lavage et séchage du culot d'ADN

Ajoutez l'**éthanol 70 %** à **température ambiante** sur les culots.

2 mL

5 mL

Centrifugez à $\geq 5,000 \times g$, de préférence $\geq 15,000 \times g$ pendant 5 min à **température ambiante** (18–25°C).

Midi

Maxi

Éliminez précautionneusement l'éthanol complètement avec une pipette. Laissez sécher le culot à température ambiante (18–25 °C).

Remarque : l'ADN plasmidique peut être plus difficile à dissoudre si le culot est très sec.

5–10 min

10–15 min

15 Reconstitution de l'ADN

Dissoudre le culot d'ADN dans un volume adéquat de tampon TE ou d'eau stérile. En fonction du type de tube utilisé pour la centrifugation, dissoudre par aspiration - refoulement ou par rotation constante dans un volume approprié de tampon pendant 10–60 min (3D-shaker).

Déterminez le rendement d'ADN plasmidique par spectrophotométrie UV. Confirmez l'intégrité du plasmide par électrophorèse sur gel d'agarose (voir la section 4.13).

7.2 Purification de plasmides low-copy (Midi, Maxi)

Remarque : Les renvois dans le protocole se réfèrent aux chapitres correspondant dans le protocole principal en anglais.

Le volume de tampon de lysis contenu dans le kit est calculé pour la purification d'ADN plasmidique high-copy. En conséquence, il faut commander des tampons supplémentaires pour la purification continue d'ADN plasmidique low-copy (voir section 8.2 sur l'information de commande).

Midi

Maxi

1 Préparation d'une pré-culture

Inoculez 3–5 mL d'un milieu de pré-culture LB avec une colonie piquée sur une plaque d'Agar fraîchement striée. Assurez-vous que la plaque et le milieu de culture contiennent le bon antibiotique afin d'être sûr d'obtenir le plasmide (pour d'autres informations voir sections 4.3). Agitez à 37 °C à ~ 300 rpm pendant ~ 8 h.

2 Préparation d'une culture overnight



Remarque : Afin d'utiliser au maximum la capacité de fixation des colonnes NucleoBond® Xtra il est nécessaire de charger une quantité suffisante d'ADN plasmidique. Pour le protocole low-copy standard, le volume de culture recommandé est doublé par rapport au protocole high-copy. Cependant, étant donné que le contenu plasmidique des cellules peut être 10–100 fois inférieur, le volume de culture peut être insuffisant. Si vous avez besoin de grandes quantités de plasmides low-copy, augmentez à nouveau le volume de culture d'un facteur 3–5 (voir la section 4.6 pour plus d'informations) et décidez à l'étape 3 de la quantité de cellules à utiliser pour la préparation. Le volume mentionné ci-après de la culture overnight est calculé pour la valeur de l' OD_{600} de 4 (voir chapitre 4.6 comme référence).

Inoculez une culture overnight en diluant la pré-culture au 1/1000^{ème} dans un volume donné de milieu LB contenant l'antibiotique sélectif approprié. Faites pousser la culture toute la nuit à 37 °C à ~ 300 rpm pendant 12–16 h.

200 mL

600 mL

Midi

Maxi

3 Récupération des cellules bactériennes

Mesurez la DO_{600} de la culture cellulaire et déterminez le volume de culture recommandé.

$$V \text{ [mL]} = \frac{800}{OD_{600}}$$

$$V \text{ [mL]} = \frac{2400}{OD_{600}}$$

Centrifugez les cellules par centrifugation à **4,500–6,000 x g** pendant **≥ 10 min** à **4 °C** et éliminez le surnageant complètement.

Remarque : il est possible, bien sûr, d'utiliser de plus grands volumes de culture, par ex. si une grande quantité de plasmides low-copy doit être récupérée, (voir la partie 4.6 pour plus d'informations). Dans ce cas, augmentez les volumes des tampons RES, LYS et NEU proportionnellement aux étapes 4, 5 et 7. *Éventuellement, il faudra commander un volume supplémentaire de tampon de lyse (voir l'information de commande du NucleoBond® Xtra Buffer Set I).* Utilisez la centrifugation pour la clarification du lysat plutôt que les colonnes filtres NucleoBond® Xtra.

4 Resuspension (Buffer RES)

Reprenre complètement le culot cellulaire dans le tampon de resuspension **Resuspension Buffer RES + RNase A** en pipettant par aspiration-refoulement ou en vortexant.

Important: pour une lyse efficace des cellules il ne doit plus subsister d'agrégats en suspension.

Remarque : augmentez proportionnellement le volume de tampon RES si vous avez utilisé une masse cellulaire supérieure à celle recommandée (voir la section 4.7 pour plus d'informations sur les conditions de lyse optimales des cellules et la section 4.8 pour les souches difficiles à lyser).

16 mL

24 mL

Midi

Maxi

5 Lyse cellulaire (Buffer LYS)

- ! **Avant d'utiliser le tampon LYS vérifiez que le SDS n'a pas précipité.** Si un précipité blanc est visible, chauffer le tampon quelques minutes à 30–40 °C
- jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissout. Ramenez le tampon à température ambiante (18–25 °C).

Ajoutez le tampon de lyse **Lysis Buffer LYS** à la suspension.

Remarque : augmentez proportionnellement le volume de tampon LYS si vous avez utilisé une masse cellulaire supérieure à celle recommandée (voir la section 4.7 pour plus d'informations sur la lyse optimale des cellules).

16 mL

24 mL

Mélangez avec précaution en **inversant** le tube **5 fois**. **Ne pas utiliser de vortex**, sinon l'ADN chromosomique se fractionnerait, se détacherait des débris cellulaires et contaminerait alors la suspension.

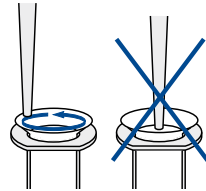
Incubez le mélange à température ambiante (18–25 °C) pendant **5 min**.

Attention : Un temps d'incubation trop long sous des conditions alcalines peut dénaturer et dégrader irréversiblement l'ADN plasmidique et libérer l'ADN chromosomique dans le lysat.

6 Equilibration (Buffer EQU)

Equilibrez la colonne NucleoBond® Xtra **avec** le filtre intégré avec le tampon d'équilibration **Equilibration Buffer EQU**.

Déposez le tampon sur la collerette du filtre comme le montre le schéma et assurez vous que le filtre est entièrement mouillé.



Laissez la colonne se vider par gravité. La colonne ne s'assèche pas.

12 mL

25 mL

Midi

Maxi

7 Neutralisation (Buffer NEU)

Ajoutez le tampon de neutralisation **Neutralization Buffer NEU** à la suspension et mélangez immédiatement avec précaution le lysat en inversant le tube **10–15 fois. Ne pas utiliser de vortex.**

- ! Le flacon ou le tube utilisé pour cette étape ne doit pas être rempli au plus des deux tiers afin de permettre un mélange homogène. Veillez à neutraliser complètement pour précipiter toutes les protéines et l'ADN chromosomique. Le lysat doit passer d'une forme gluante et visqueuse à une forme moins visqueuse, une suspension homogène et un flocculat blanc.

Passez à l'étape 8 du protocole de purification des plasmides high-copy, section 7.7. **Une incubation du lysat n'est pas nécessaire.**

Remarque : augmentez proportionnellement le volume de tampon NEU si vous avez utilisé une masse cellulaire supérieure à celle recommandée (voir la section 4.7 pour plus d'informations sur la lyse optimale des cellules).

16 mL

24 mL

7.3 Concentration des éluates NucleoBond® Xtra avec NucleoBond® Finalizer

Remarque : Les renvois dans le protocole se réfèrent aux chapitres correspondant dans le protocole principal en anglais.

Utilisez les NucleoBond® Finalizers seulement pour les vecteurs inférieur à 50 kbp.

Midi - NucleoBond®
Finalizer

Maxi - NucleoBond®
Finalizer Large

1 Précipitation de l'ADN

Remarque : Contrôler la concentration en ADN avant la précipitation. Vérifier le contenu d'ADN plasmidique de vos éluats avant de passer à l'étape de précipitation en mesurant A_{260} (voir la section 4.13).

Ajoutez **0.7 volumes d'isopropanol à température ambiante** (non fourni dans les kits). Vortexez précautionneusement et laissez le mélange reposer pendant **2 minutes**.

(ex. pour 5 mL d'éluat NucleoBond® Xtra Midi ajoutez **3.5 mL** d'isopropanol, pour 15 mL d'éluat NucleoBond® Xtra Maxi, ajoutez **10.5 mL** d'isopropanol)

**3.5 mL pour
5 mL d'éluat**

**10.5 mL pour
15 mL d'éluat**

2 Chargement du précipité

Enlevez le piston de la **seringue 30 mL** et fixez un NucleoBond® Finalizer en sortie.

Versez le mélange de précipitation dans la seringue, insérez le piston, gardez la seringue en position verticale, et pressez le mélange afin de le faire passer **doucelement** à travers le NucleoBond® Finalizer en utilisant une **force minimale**. Éliminez le filtrat.

3 Lavage du précipité

Enlevez le NucleoBond® Finalizer de la seringue, retirez le piston et rattachiez le NucleoBond® Finalizer à la sortie de la seringue.

Versez **d'éthanol 70 %** (non fourni dans les kits) dans la seringue, insérez le piston, gardez la seringue en position verticale, et pressez l'éthanol **doucelement** à travers le NucleoBond® Finalizer. Éliminez l'éthanol.

2 mL

5 mL

Midi - NucleoBond®
Finalizer

Maxi - NucleoBond®
Finalizer Large

4 Séchage de la membrane

Enlevez le NucleoBond® Finalizer de la seringue, retirez le piston et rattachiez le NucleoBond® Finalizer. Faites passer de l'air à travers le NucleoBond® Finalizer tout en touchant un tissu ou papier propre avec la pointe du NucleoBond® Finalizer pour absorber l'éthanol aussi fort que possible.

Répétez cette étape au moins les fois déclarés en bas jusqu'à ce que plus aucune goutte d'éthanol ne sorte du NucleoBond® Finalizer.

Remarque : une nouvelle seringue sèche peut être utilisée pour accélérer la procédure (non fournie).

≥ 3 fois jusqu'à ce
que ce soit sec

≥ 6 fois jusqu'à ce
que ce soit sec

Option : vous pouvez incuber NucleoBond® Finalizer pendant 10 minutes à 80 °C pour minimiser la contamination éthanolique. Cependant, le taux de récupération final peut être réduit en raison d'un séchage excessif de l'ADN.

5 Elution de l'ADN

Enlevez le NucleoBond® Finalizer de la seringue, retirez le piston d'une **seringue 1 mL** et fixez le NucleoBond® Finalizer à la sortie.

Remarque : voir la section 4.12, Tableau 4 (Midi) ou 5 (Maxi) pour choisir le volume approprié de tampon d'éluion.

Pipetez un volume approprié de tampon d'éluion **Buffer TRIS** (5 mM Tris/HCl, pH 8.5, fourni dans le kit) ou le tampon TE (voir la section 4.12) dans la seringue. Placez la pointe du NucleoBond® Finalizer en position verticale au dessus d'un nouveau tube collecteur et **éluez goutte à goutte l'ADN plasmidique** en insérant le piston.

200–800 µL

400–1000 µL

Enlevez le NucleoBond® Finalizer de la seringue, retirez le piston et rattachiez le NucleoBond® Finalizer à la sortie de la seringue.



Transférez le premier éluat dans la seringue et éluez dans le même tube collecteur une seconde fois.

Charger
complètement le
premier éluat

Charger
complètement le
premier éluat

**Midi - NucleoBond®
Finalizer**

**Maxi - NucleoBond®
Finalizer Large**

Retirer le NucleoBond® Finalizer de la seringue, remonter le piston de la seringue pour aspirer de l'air, remettre en place le NucleoBond® Finalizer et **presser l'air pour expulser le maximum d'éluat.**

Déterminez le rendement d'ADN plasmidique par spectrophotométrie UV et confirmez l'intégrité du plasmide par électrophorèse sur gel d'agarose (voir section 4.12)
