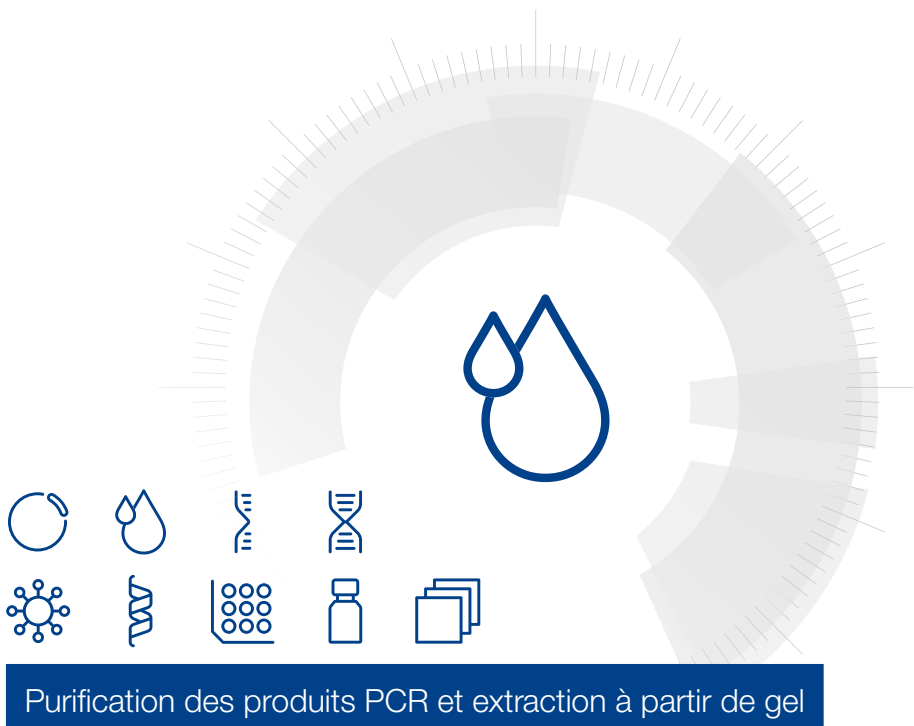


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



■ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS

Janvier 2024 / Rev. 02

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)
E-mail: info@mn-net.com

Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-333
E-mail: support@mn-net.com

USA

MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)
E-mail: sales-us@mn-net.com

France

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France
Tel.: +33 388 68 22 68
E-mail: sales-fr@mn-net.com

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

Switzerland

MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
E-mail: sales-ch@mn-net.com

Sommaire

1 Composants	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur	4
1.3 A propos de ce manuel	5
2 Description du produit	6
2.1 Le principe général	6
2.2 Caractéristiques du kit	6
2.3 Procédure de dilution	6
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	7
4 Instructions de sécurité	8
4.1 Élimination	8
5 Protocole	9
6 Annexes	10
6.1 Guide de résolution des problèmes	10
6.2 Informations de commandes	13
6.3 Références	13
6.4 Restrictions d'utilisation / garantie	13
6.5 Versions linguistiques et prédominance	14

1 Composants

1.1 Contenu du kit

REF	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS		
	10 preps 740611.10	50 preps 740611.50	250 preps 740611.250
Tampon de fixation NT1	10 mL	40 mL	200 mL
Tampon de lavage NT3 (concentré)*	6 mL	12 mL	50 mL
Tampon d'éluion NE**	13 mL	13 mL	13 mL
Colonnes NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS (anneaux jaunes)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	10	50	250
Protocole	1	1	1

1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur

Réactifs

- 96 – 100 % d'éthanol

Consommables

- Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 mL
- Cônes jetables pour pipettes

Équipements

- Pipettes manuelles
- Centrifugeuse pour microtubes
- Bloc chauffant, bain-marie ou thermomixeur pour l'extraction à partir du gel
- Scalpel pour couper les gels d'agarose
- Vortex
- Équipements de protection individuelle (blouse, gants, lunettes)

* Pour la préparation des réactifs et les conditions de stockage, voir le chapitre 3.

** Composition du tampon d'éluion NE : 5 mM Tris/HCl, pH 8,5

1.3 A propos de ce manuel

Il est fortement recommandé de lire les paragraphes détaillés du protocole de ce manuel d'utilisation si le kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS** est utilisé pour la première fois. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Le résumé du protocole est conçu pour être utilisé uniquement comme un outil supplémentaire de référence pour l'exécution de la procédure de purification.

Toute la documentation technique est disponible sur Internet à l'adresse suivante : **www.mn-net.com**.

Veuillez contacter le service technique pour obtenir des informations sur les modifications apportées au présent manuel d'utilisation par rapport aux révisions précédentes.

2 Description du produit

2.1 Le principe général

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS est conçu comme un kit 2 en 1 permettant d'extraire l'ADN de réactions enzymatiques ou de gels d'agarose. Le tampon de fixation NTI inactive les enzymes et favorise la fixation de l'ADN aux couches de silice à l'intérieur des colonnes de fixation. En outre, le tampon NTI est utilisé en combinaison avec une incubation à 50 °C pour faire fondre les gels d'agarose lors de l'extraction de l'ADN sur gel. L'ADN fixé est rigoureusement lavé avec le tampon NT3 et élué dans des volumes d'élué de 6 µL ou plus de tampon NE, ce qui permet d'obtenir un ADN hautement pur et concentré.

2.2 Caractéristiques du kit

- Le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS est réservé à l'usage de la recherche.

Tableau 1: Résumé des caractéristiques du kit

Paramètres	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS
Format	Microspin, format XS
Procédure	Manuelle
Échantillon d'articles	≤ 200 µL de réaction enzymatique ≤ 200 mg de gel d'agarose
Volume d'élué	≥ 6 µL
Temps de préparation	< 15 min/12 preps (purification de réaction PCR) 30 min/12 preps (extraction du gel)
Capacité de fixation	5 µg
Utilisation	Réserver à l'usage de la recherche

2.3 Procédure de dilution

Le format de la colonne XS est conçu pour de faibles volumes d'élué, ce qui permet d'obtenir des concentrations élevées d'ADN. Néanmoins, il existe des conseils et des astuces pour améliorer la récupération de l'ADN, en particulier lorsque l'on travaille avec des volumes d'élué inférieurs à 10 µL.

Les améliorations les plus importantes en termes de récupération des acides nucléiques peuvent être obtenues par une double élué. Dans ce cas, l'élué de l'étape d'élué est rechargé sur la colonne de fixation pour une deuxième procédure d'élué. De cette manière, le volume total d'élué reste faible tandis que le taux de récupération est amélioré.

Cela est particulièrement vrai pour les procédures d'extraction sur gel. L'ADN a tendance à rester collé à la matrice de silice et présente un profil d'élué retardé. Plusieurs cycles d'élué peuvent augmenter considérablement le taux de récupération de l'ADN.

Il faut garder à l'esprit que la contamination en sels chaotropiques augmentera l'absorption à 230 nm sans effets négatifs sur les applications en aval. Même des quantités infimes de thiocyanate, bien inférieures à une concentration pouvant influencer les applications, présentent une forte absorption à 230 nm. Cependant, il n'y a pas d'effet sur l'absorption à 260 nm.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention : Le tampon NTI contient du thiocyanate de guanidine ! Porter des gants et des lunettes !

ATTENTION : Le tampon NTI contient du thiocyanate de guanidine qui peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec de l'eau de Javel (hypochlorure de sodium). NE PAS ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

- Tous les composants du kit peuvent être conservés à température ambiante (18–25 °C) et sont stables pendant au moins un an.

Avant de débiter le protocole NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS, préparer les éléments suivants :

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS			
REF	10 preps 740611.10	50 preps 740611.50	250 preps 740611.250
Tampon de lavage NT3 Concentré	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol	50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS**, portez des vêtements de protection appropriés (p.e. blouse de laboratoire, gants jetables et lunettes de protection). Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité appropriées (FDS disponibles en ligne sur www.mn-net.com/msds).



Attention : le thiocyanate de guanidinium dans le tampon NTI peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

Les déchets générés par le kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS** n'ont pas été testés pour détecter la présence de matériel infectieux résiduel. Une contamination des déchets liquides par du matériel infectieux résiduel est très improbable en raison du tampon de lyse fortement dénaturant, mais elle ne peut pas être totalement exclue. Par conséquent, les déchets liquides doivent être considérés comme infectieux et doivent être manipulés et éliminés conformément aux réglementations de sécurité locales.

4.1 Élimination

Éliminer les substances dangereuses, potentiellement infectieuses ou contaminées par du matériel biologique de manière sûre et conforme aux dispositions réglementaires locales.

5 Protocole

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon de lavage NT3 a été préparé conformément au chapitre 3.
- Lors d'une extraction sur gel, exciser la bande d'ADN du gel d'agarose et déterminer le poids de gel. Préchauffer un bloc chauffant, un thermomixeur ou un bain-marie à 50 °C.

1 Fixation de l'ADN

Mélanger 1 **volume d'échantillon** avec **2 volumes de tampon NT1** (p.e., mélanger 20 µL de réaction PCR avec 40 µL de NT1 ou 150 mg de gel d'agarose avec 300 µL de NT1).



+ 2 vol NT1
pour 1 vol
d'échantillon

Vortex

Extraction sur gel d'agarose uniquement :

Incuber le mélange à 50 °C avec une agitation constante ou vortexer régulièrement toutes les 2 à 3 min jusqu'à ce que le gel soit complètement dissous.

2 Fixation de l'ADN

Placer une **colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS** dans un tube collecteur (2 mL) et charger jusqu'à 500 µL d'échantillon.



Charger
l'échantillon
11,000 x g
30 s

Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 x g**. Jeter le filtrat s'il dépasse 100 µL et replacer la colonne dans le tube collecteur.

Si nécessaire, charger l'échantillon restant et répéter l'étape de centrifugation.

3 Lavage de la membrane de silice

Ajouter **500 µL de tampon NT3** à la colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS. Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 x g**. Jeter le filtrat et placer la colonne dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).



+ 500 µL NT3
11,000 x g
30 s

4 Lavage et séchage de la silice

Ajouter **300 µL de tampon NT3** à la colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS.

Centrifuger pendant **1 min** à **11,000 x g**. Jeter le filtrat et placer la colonne dans un tube de microtubes à centrifugation de 1,5 mL (non fourni).



+ 300 µL NT3
11,000 x g
1 min

5 Eluer l'ADN

Ajouter **6–12 µL de tampon NE** et incuber à température ambiante (18–25 °C) pendant **1 min**.

Centrifuger pendant **1 min** à **11,000 x g**.

Recharger les éluats sur la colonne et répéter l'étape d'éluion.



+ 6–12 µL NE
TA
1 min
11,000 x g
1 min

6 Annexes

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
Dissolution incomplète du gel	<p><i>Durée et température</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Augmenter le temps d'incubation et vortexer le mélange à plusieurs reprises toutes les 2 à 3 min jusqu'à ce que le gel soit complètement dissout. Ne pas augmenter la température d'incubation pour éviter la perte d'ADN simple brin dénaturé par une température trop élevée.
	<p><i>Réactifs préparés ou conservés de manière inappropriée</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96–100% au tampon NT3. Bien mélanger et garder le flacon bien fermé. Éviter les conditions dans lesquelles l'éthanol pourrait s'évaporer (p.e. températures élevées, flacons ouverts). <p><i>Dissolution incomplète du gel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Peser le bloc d'agarose et ajouter 2 volumes de tampon NT1. Agiter le mélange en continu ou vortexer le tube toutes les 2 à 3 minutes. Si nécessaire, augmenter les temps d'incubation, mais ne pas augmenter la température d'incubation.
Faible rendement d'ADN	<p><i>Élimination de l'éthanol</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Veiller à ce que les sorties ou les parois des colonnes n'entrent pas en contact avec le filtrat NT3 après la deuxième étape de lavage. En cas de doute, replacer la colonne dans le tube collecteur vide et refaire une centrifugation <p><i>Élution incomplète</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Si la récupération de l'ADN est faible, il est probable que l'ADN restant adhère encore à la silice. Les pertes au cours de l'étape de fixation ou de lavage sont peu probables si les tampons sont utilisés, conservés et préparés conformément au protocole. Pour améliorer la récupération de l'ADN, il est recommandé d'augmenter le volume d'élution total ou de répéter les étapes d'élution avec la même aliquote, en particulier lors de l'utilisation de faibles volumes d'élution inférieurs à 10 µL. Il suffit de recharger l'éluat sur la silice et de répéter la centrifugation.

Problème **Causes possibles et suggestions**

Faible rendement d'ADN	<p><i>Surestimation de la quantité d'échantillon avant purification</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Il faut garder à l'esprit que la photométrie additionne l'absorption de toute molécule qui absorbe à une certaine longueur d'onde, p.e. 260 nm. Une réaction PCR contiendra non seulement les amplifiats d'ADN souhaités, mais aussi des amorces résiduelles, des dNTP inutilisés, des enzymes, certains détergents ou substances tampons, qui absorbent tous à 260 nm et augmentent la concentration d'ADN mesurée.• Une détermination photométrique de la récupération du produit n'est pas possible. Pour évaluer la récupération du produit, des techniques alternatives telles que l'électrophorèse sur gel, l'électrophorèse capillaire ou la fluorométrie spécifique à l'ADNdb doivent être utilisées. En fonction du mélange PCR, 80 à 90 % de l'absorption initiale à 260 nm seront éliminés par la procédure de purification.
	<p><i>Bandes diffuses sur gel</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Les gels d'agarose peuvent présenter des artefacts lorsque la maille d'agarose est irrégulière en raison d'une homogénéisation insuffisante de l'agarose dans le tampon TAE / TBE, de différences de solidification, d'épaisseur locale ou d'autres influences qui modifient la vitesse de migration. L'ADN lui-même peut également migrer dans différentes conformations, en fonction de la séquence et de la température du tampon. Bien que la bande principale puisse afficher un signal fort, il est tout de même possible que certains fragments migrent légèrement plus vite ou plus lentement, mais en quantités insuffisantes pour produire un signal détectable ou apparaissent sous forme de traînée. L'excision de la bande éliminera ces fragments, mais il est néanmoins recommandé de réduire la quantité d'agarose.
Faible $A_{260/230}$	<p><i>Contamination par des sels chaotropiques</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Les sels de thiocyanate se sont avérés efficaces et fiables pour faire fondre les gels d'agarose et pour lier les acides nucléiques à une surface de silice. Ils ont fait leurs preuves à long terme en matière de purification d'acides nucléiques à partir de divers types d'échantillons et pour diverses applications en aval.• Néanmoins, ces sels chaotropiques expriment une absorption très élevée à 230 nm, même à des concentrations négligeables de l'ordre de la micromole, alors que l'absorption à 260 nm est nulle. Les sels de thiocyanate vont donc biaiser le rapport de pureté A_{260}/A_{230} mais pas la quantification de l'ADN. Dans ce cas, un faible rapport A_{260}/A_{230} n'est pas un indicateur de performance sous-optimale dans les applications en aval et peut être ignoré.• Pour améliorer l'A_{260}/A_{230}, des étapes de lavage supplémentaires avec le tampon NT3 peuvent être effectuées. Du tampon NT3 supplémentaire sera nécessaire et peut être commandé auprès de MACHEREY-NAGEL (REF 740598).

Problème Causes possibles et suggestions

Abrasion de la silice

A_{320} élevée

- Dans de rares cas, des fibres de silice cisailées peuvent passer le filtre des colonnes et être éluées. Lorsqu'elles sont mesurées dans un photomètre, ces fibres diffusent la lumière, ce qui entraîne une surestimation globale des valeurs d'absorption. Une valeur A_{320} élevée, supérieure à 0,05, est un indicateur de particules qui diffusent la lumière.
- La silice abrasive peut être facilement culotté par centrifugation et est généralement déjà centrifugée par l'éluion. Le fait de mélanger les éluats à l'aide d'un vortex risque de remettre ces particules en suspension. Pour éviter cela, il est recommandé de transférer l'éluat clarifié sans le culot blanc facilement visible dans un nouveau tube à centrifuger.

L'ADN a été endommagé par la lumière UV

- Réduire au minimum le temps d'exposition aux UV lors de l'excision d'un fragment d'ADN dans un gel d'agarose.

Elimination de l'éthanol

Performance sous-optimale dans les applications en aval

- En raison des faibles volumes d'éluion, l'éthanol entraîné par la deuxième étape de lavage peut atteindre une concentration élevée dans les éluats et risque d'inactiver les enzymes. Veiller à ce que les sorties ou les parois des colonnes n'entrent pas en contact avec le filtrat NT3 de la deuxième étape de lavage. En cas de doute, jeter le filtrat et remplacer les colonnes dans les tubes collecteurs vides. Répéter l'étape de centrifugation.

Abrasion de la silice

- Les débris de silice peuvent disperser ou éteindre les signaux lors des mesures photométriques ou de fluorescence. En outre, les canaux de l'électrophorèse capillaire peuvent être bloqués. Si un culot blanc est visible, centrifuger les éluats et transférer le surnageant clarifié sans culot blanc dans un nouveau tube de réaction.

Tampon NTC

Purification de l'ARN ou de l'ADN simple brin

- Le tampon NT1 est utilisé pour l'ADN double brin ou l'ADN simple brin de longueur supérieure à 500 pb. Pour l'ADN ou l'ARN simple brin plus court, il est recommandé d'utiliser le tampon NTC. Ce tampon peut être utilisé à la fois pour la purification de la réaction et pour l'extraction du gel.
- Le tampon NTC peut être commandé auprès de MACHEREY-NAGEL (REF 740654.100)

6.2 Informations de commandes

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS	740611.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
Tampon NTI	740305.120	200 mL
Tampon NTB	740595.150	150 mL
Tampon NTC	740654.100	100 mL
Tampon NT3 (Concentré) (pour 125 mL de tampon NT3)	740598	25 mL
Tubes collecteurs (2 mL)	740600	1000
NucleoVac 24 Vacuum Manifold	740299	1
Adaptateur NucleoVac Mini	740297.100	100
Vannes NucleoVac	740298.24	24
NucleoTrap®	740584.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoTraP®CR	740587.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250

Visitez le site www.mn-net.com pour obtenir des informations plus détaillées sur le produit.

6.3 References

Vogelstein B., and D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 615–619.

6.4 Restrictions d'utilisation / garantie

Tous les produits MACHEREY-NAGEL sont conçus uniquement pour l'usage auquel ils sont destinés. Ils ne sont pas destinés à être utilisés pour un autre usage. La description de l'usage prévu des produits est disponible dans les notices originales des produits MACHEREY-NAGEL. Avant d'utiliser nos produits, veuillez lire attentivement le mode d'emploi et les consignes de sécurité figurant dans la Fiche de Données de Sécurité du produit.

Ce produit MACHEREY-NAGEL comporte une documentation énonçant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La garantie fournie est limitée aux spécifications et descriptions des données indiquées dans la documentation originale MACHEREY-NAGEL.

Aucune autre déclaration, verbale ou écrite, par des employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL n'est autorisée, à l'exception des déclarations écrites signées par un représentant dûment habilité de MACHEREY-NAGEL. Le client ne doit pas s'y fier et elles ne font pas partie d'un contrat de vente ou de la présente garantie.

La responsabilité pour tous les dommages éventuels survenant en lien avec nos produits est limitée au strict minimum, comme indiqué dans les conditions générales de vente de MACHEREY-NAGEL, dans leur dernière version, disponibles sur le site internet de la société. MACHEREY-NAGEL n'assume aucune autre garantie.

Les produits et leur application sont susceptibles de modifications. Par conséquent, veuillez contacter notre Equipe Service Technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur local pour obtenir des informations scientifiques à caractère général. Les descriptions figurant dans la documentation MACHEREY-NAGEL sont fournies à titre d'information uniquement.

Dernière mise à jour, Rev. 04

Veuillez contacter :
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Tel. : +49 24 21 969-333
support@mn-net.com

6.5 Versions linguistiques et prédominance

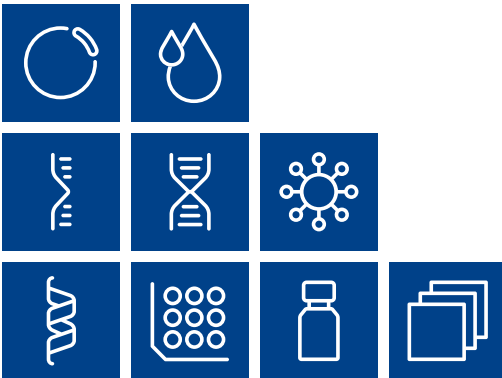
Ce document est disponible en plusieurs langues. En cas de divergence ou de problème d'interprétation, la version anglaise prévaut.

Marques déposées :

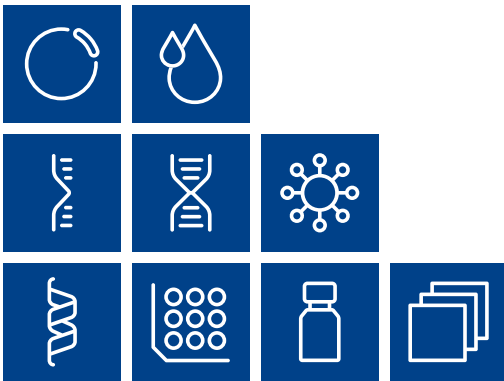
NucleoSpin® est une marque déposée de MACHEREY NAGEL GmbH & Co KG.

NucleoTrap® est une marque déposée de MACHEREY NAGEL GmbH & Co KG.

Tous les noms et dénominations utilisés peuvent être des marques, des marques déposées ou des marques enregistrées par leurs propriétaires respectifs, même s'ils ne sont pas des dénominations spéciales. La mention de produits et de marques n'est qu'une information (c'est-à-dire qu'elle ne porte pas atteinte aux marques et aux marques déposées et ne peut être considérée comme une recommandation ou une évaluation). En ce qui concerne ces produits ou services, nous ne pouvons accorder aucune garantie quant à leur sélection, leur efficacité ou leur fonctionnement.



Plasmid DNA
Clean up
RNA
DNA
Viral RNA and DNA
Protein
High throughput
Accessories
Auxiliary tools



MACHEREY-NAGEL

www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germany

DE +49 24 21 969-0 info@mn-net.com

CH +41 62 388 55 00 sales-ch@mn-net.com

FR +33 388 68 22 68 sales-fr@mn-net.com

US +1 888 321 62 24 sales-us@mn-net.com

