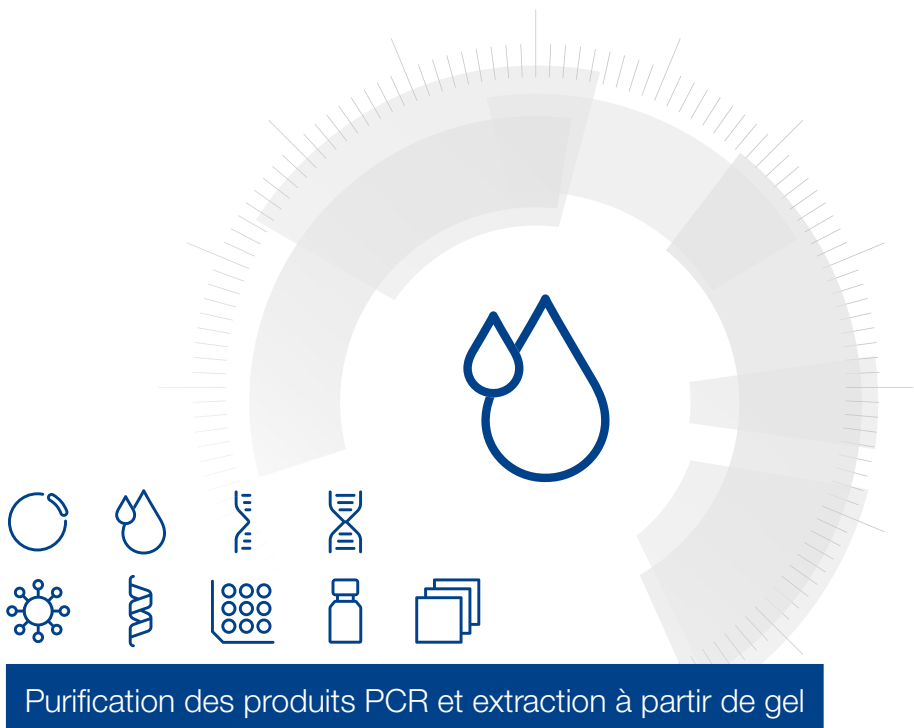


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



Purification des produits PCR et extraction à partir de gel

■ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

Novembre 2024 / Rev. 09



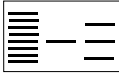






MACHEREY-NAGEL

www.mn-net.com



Purification des produits PCR Extraction à partir de gel

Résumé du protocole (Rev. 09)

	Purification de PCR	Extraction d'ADN de gel	Purification d'ADN (avec SDS)	Purification d'ADN simple brin
Produits PCR, fragments d'ADN ou ADN simple brin : ajuster les conditions de fixation de l'ADN		 		
Extraction à partir de gel : découper & solubiliser le fragment de gel	200 µL NTI/ 100 µL de PCR	200 µL NTI/ 100 mg de gel 50 °C 5 – 10 min	500 µL NTB/ 100 µL d'échantillon	200 µL NTC/ 100 µL d'échantillon
1 Fixer l'ADN			11,000 × g 30 s	
2 Laver la membrane de silice			700 µL NT3 11,000 × g 30 s <u>Recommandé :</u> 2ième lavage 700 µL NT3 11,000 × g 30 s	
3 Sécher la membrane de silice			11,000 × g 1 min	
4 Eluer l'ADN			15 – 30 µL NE TA 1 min 11,000 × g 1 min	

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 du kits	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur	5
1.3 A propos de ce manuel	5
2 Description du produit	6
2.1 Principe général	6
2.2 Caractéristiques du kit	6
2.3 Élimination de petits fragments d'ADN et des dimères d'amorces	8
2.4 Indicateur de pH	9
2.5 Conseils et astuces pour les extractions sur gels d'agarose	10
2.6 La taille des fragments d'ADN et le volume d'élution impactent le rendement	11
2.7 Contamination en sel et faible ratio A_{260} / A_{230}	13
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	15
4 Instructions de sécurité	16
4.1 Élimination des déchets	16
5 Protocoles	17
5.1 Purification des produits PCR	17
5.2 Extraction d'ADN à partir de gels d'agarose	19
5.3 Extraction d'ADN à partir de gels de polyacrylamide	21
5.4 Extraction d'ARN à partir de gels d'agarose (tampon NTC)	23
5.5 Purification de l'ADN des échantillons contenant du SDS (tampon NTB)	24
5.6 Purification de l'ADN simple brin (tampon NTC)	25
5.7 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up avec l'utilisation d'un système à vide	26
6 Annexes	28
6.1 Guide de résolution des problèmes	28
6.2 Informations de commande	31
6.3 Références	31
6.4 Restriction d'utilisation / garantie	32
6.5 Versions linguistiques et prédominance	32

1 Composants du kits

1.1 Contenu du kit

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up			
REF	10 preps 740609.10	50 preps 740609.50	250 preps 740609.250
Tampon de fixation NT1	10 mL	40 mL	200 mL
Tampon de lavage NT3 (concentré)*	6 mL	25 mL	2 × 50 mL
Tampon d'élution NE**	13 mL	13 mL	30 mL
Colonnes NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (anneaux jaunes)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	10	50	250
Manuel d'utilisation	1	1	1

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

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

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

Equipment

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

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** 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 rapide pendant 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 Principe général

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up est un kit 2 en 1 qui permet de purifier des fragments d'ADN à partir de réactions enzymatiques, telles que la PCR, ainsi qu'à partir de gels d'agarose.

L'échantillon est mélangé au tampon de fixation NT1 et, dans le cas d'une bande de gel découpée, il est chauffé pour dissoudre l'agarose. En présence de sel chaotropique, l'ADN est fixé à la membrane de silice d'une colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Les contaminations sont éliminées par de simples étapes de lavage avec le tampon de lavage éthanolique NT3. Enfin, l'ADN pur est élué dans des conditions de faible teneur en sel avec le tampon d'éluion NE légèrement alcalin (5 mM Tris/HCl, pH 8,5).

2.2 Caractéristiques du kit

- **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** est conçu pour la purification rapide des produits PCR, tels que l'ADN provenant de réactions enzymatiques, ainsi que pour l'extraction de fragments d'ADN à partir de gels d'agarose TAE ou TBE.
- Seuls deux volumes de tampon de fixation par volume d'échantillon sont nécessaires pour traiter jusqu'à 200 µL de réaction PCR/ enzymatique, ou 200 mg de gel d'agarose, avec une seule étape de chargement. En ajoutant du tampon de fixation NT1 supplémentaire (voir les informations de commande), il est possible de charger un nombre illimité de volumes d'échantillons sur une seule colonne (astuces et conseils au paragraphe 2.5).
- Jusqu'à ~ 15 µg d'ADN de 50 pb à au moins ~ 20 kbp peuvent être purifiés efficacement en 10–20 min avec des récupérations moyennes de ~ 60 à ~ 90 % en fonction de la taille du fragment et de la procédure d'éluion (détails au paragraphe 2.6).
- La formulation du tampon **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** garantit l'élimination complète de toutes sortes de contaminations telles que
 - nucléotides, amorces
 - enzymes
 - huile minérale
 - additifs PCR (p.e., sels, bétaïne, DMSO)
 - détergents (p.e. Tween 20, Triton X-100)
 - colorants (p.e. bromure d'éthidium, cristal violet, Stain G, Midori Green, Roti®-Safe GelStain, DNA SafeStain)
 - tags non liés

- Les amorces issues des réactions PCR sont quantitativement éliminées, tandis que les petits fragments d'ADN restent liés et purifiés avec un taux de récupération élevé (détails au paragraphe 2.6).
- La taille minimale des fragments fixés peut être ajustée à moins de 50 bp à plusieurs centaines de pb en diluant le tampon de fixation NTI afin d'éliminer les dimères d'amorces des produits PCR d'intérêts (détails au chapitre 2.3).
- L'indicateur de pH dans le tampon de fixation NTI garantit des conditions de fixation optimales avec un pH < 7,0 (détails au paragraphe 2.4). La couleur jaune facilite la visualisation d'agarose non dissous lors de l'extraction du gel d'ADN.
- **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** peut être utilisé avec tous les types de gels d'agarose (à température de fusion élevée ou faible) avec 1 % à 5 % d'agarose et différents tampons comme du TAE ou du TBE (astuces et conseils dans le paragraphe 2.5). Le kit fonctionne également avec du tampon d'électrophorèse au borate à faible conductivité.
- L'élution peut être effectuée dans un volume réduit de 15 µL de tampon d'élution NE (détails au paragraphe 2.6).

Plusieurs protocoles additionnels permettent d'étendre le champ d'application du **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** à la(!) :

- Purification de l'ADN à partir de mélanges réactionnels contenant du SDS (paragraphe 5.5)
- Purification de l'ADN simple brin (paragraphe 5.6)
- Extraction de l'ARN à partir de gels d'agarose (paragraphe 5.4)
- Extraction d'ADN à partir de gels de polyacrylamide (paragraphe 5.3)
- L'ADN purifié et concentré peut être directement utilisé pour l'hybridation, le séquençage, la PCR, les restrictions et ligations enzymatique, la transcription *in vitro*, le marquage ou tout autre type de réaction enzymatique.

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques du kit

Paramètres	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up
Échantillon	Jusqu'à 200 µL de réaction PCR ou 200 mg de gel (voire plus d'échantillon en ajustant le tampon de fixation NTI et en réalisant plusieurs étapes de chargement).
Capacité de fixation	25 µg
Longueur du fragment	50 bp – ~ 20 kbp
Volume d'élution	15–30 µL
Récupération optimale	< 15 µg, 100–500 bp, 30 µL
Temps de préparation	10 min pour 6 purifications de produits PCR 20 min pour 6 extractions à partir de gel
Utilisation	Réserver à l'usage de la recherche

2.3 Élimination de petits fragments d'ADN et des dimères d'amorces

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up est conçu pour éliminer les traces d'amorces non utilisées tout en purifiant les produits PCR jusqu'à 50 pb. Cependant, dans certains cas, il est nécessaire d'exclure ces petits fragments. Par exemple, les dimères d'amorce ou les produits secondaires résultant d'hybridation non spécifique peuvent interférer avec les applications de séquençage ou de clonage en aval.

L'élimination de l'ADN double brin > 50 pb peut être réalisée en diluant une aliquote de tampon NTI avec de l'eau stérile dans un rapport approprié et en procédant ensuite au protocole standard (voir paragraphe 5.1). La dilution du tampon NTI dans une certaine proportion diminue l'efficacité de la fixation pour les petits fragments sans compromettre la récupération des produits PCR plus grands. Cependant, le rapport de dilution dépend fortement du fragment. Par conséquent, pour chaque taille de petits fragments > 50 pb qui doit être éliminée, ainsi que pour chaque système PCR, le rapport approprié de dilution du Tampon NTI peut être déterminé à l'avance.

Influence de la taille du fragment : *Plus le fragment en question est petit, moins il faut diluer le tampon NTI.*

Influence du système de tampon PCR :L'influence du système de tampon PCR sur l'élimination des petits fragments est plus complexe. Certains tampons de réaction contiennent des détergents comme le Tween ou de fortes concentrations d'additifs comme la bêtaïne pour abaisser la température de fusion de la matrice d'ADN. Ces substances se trouvent généralement dans les tampons pour PCR 'high fidelity' ou 'long range'. Elles ont tendance à réduire l'efficacité de la fixation de l'ADN sur la membrane de silice et doivent donc être prises en compte lors du choix du rapport de dilution du tampon NTI. ***En règle générale, si un système de tampon PCR sans additifs spéciaux est utilisé, l'ajout de 3 à 5 volumes d'eau à 1 volume de tampon NTI entraînera l'élimination de petits fragments jusqu'à 100 pb. Dans le cas contraire, l'ajout de 1 à 3 volumes d'eau à 1 volume de tampon NTI est suffisant.***

Par conséquent, pour chaque taille de petits fragments > 50 pb qui doit être éliminée, et pour chaque système PCR, vous pouvez déterminer à l'avance le rapport approprié de dilution du tampon NTI.

La figure 1 montre un résultat de purification avec une série de dilutions du tampon NTI. Le tampon NTI pur (piste 3), ainsi que le tampon NTI additionné d'un volume d'eau (voie 4), permettent de récupérer 100 % d'une échelle de fragments PCR (piste 2). L'augmentation de la dilution du tampon NTI entraîne un déplacement du seuil de coupure vers des fragments plus grands. En général, une dilution avec 5 volumes d'eau est suffisante pour éliminer même les plus grands dimères d'amorces tout en permettant la récupération d'un fragment de 164 pb avec un rendement > 90 %.

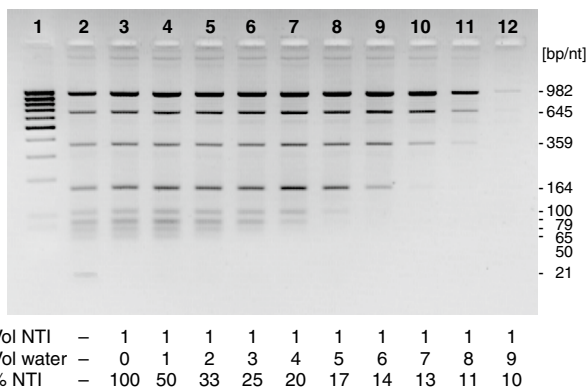


Figure 1 Purification des réactions PCR à l'aide des dilutions du tampon NTI

Piste 1 : Marqueur de taille d'ADN de 100 pb GeneRuler (MBI Fermentas)

Piste 2 : Marqueur de taille initial d'ADN (amorce de 21 bases, 50, 65, 79, 100, 164, 359, 645 et 982 pb de fragment) amplifiée à l'aide de l'ADN polymérase Biotaq (Bioline)

Piste 3: Purification avec 100 % de tampon NTI

Piste 4 – 12 : Purification avec du tampon NTI dilué avec 1 à 9 volumes d'eau

2.4 Indicateur de pH

Le pH optimal pour fixer même de petits fragments d'ADN à la membrane de silice des colonnes NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up est d'environ 5,0–6,0. Le tampon de fixation NTI est suffisamment tamponné pour maintenir ce pH pour tous les tampons de réaction PCR standard ou les systèmes de tampons pour gel d'agarose.

De plus, le tampon de fixation coloré permet d'identifier les morceaux d'agarose non dissous lors de l'extraction du gel d'ADN

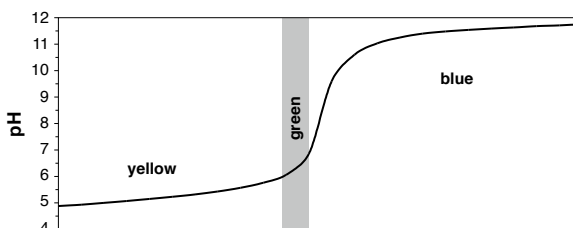


Figure 2 Courbe de titrage du tampon de fixation NTI avec indicateur de pH

Une couleur jaune indique un pH optimal < 6,0 (figure 2). Si le pH augmente jusqu'à environ 7 après l'ajout de l'échantillon, la solution devient verte. Si le pH est supérieur à 7, la solution devient bleue. Si un changement de couleur est observé, le pH doit être ajusté en ajoutant plus de tampon NTI ou en ajustant le pH à < 6,0 avec de l'acétate de sodium 4 M pH 5,0 ou de petites quantités d'acide chlorhydrique (HCl).

2.5 Conseils et astuces pour les extractions sur gels d'agarose

Sujet	Recommandation
<p>Système de tampon</p>	<p>Le tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) a un pouvoir tampon plus élevé que le TAE (Tris-Acetate-EDTA) qui, lui, est nécessaire pour les électrophorèses de nuit et offre une meilleure résolution pour les petits fragments d'ADN. Le tampon TBE peut être utilisé en combinaison avec NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up.</p> <p>Cependant, il est préférable d'utiliser le tampon TAE frais plutôt que le TBE pour les préparations de gels d'agarose. Le TAE n'interagit pas avec l'agarose, ce qui permet d'obtenir des rendements d'ADN plus élevés. De plus, l'ADN linéaire s'écoule plus rapidement et la résolution des grands fragments d'ADN est plus élevée. Par ailleurs, le plasmide super enroulé est séparé plus efficacement de l'ADN linéaire et de l'ADN en cercle ouvert.</p>
<p>Conditions de migration</p>	<p>La température pendant l'électrophorèse doit être basse afin d'augmenter la résolution de la séparation de l'ADN et d'éviter la fonte du gel, ce qui entraînerait la dénaturation de l'ADN. Utilisez du tampon frais et un faible voltage (< 60 V) pour une migration devant être aussi courte que possible. Dès que la bande d'ADN d'intérêt est suffisamment séparée, arrêter le gel et découper le fragment.</p>
<p>Découpage de la bande</p>	<p>Exposer le gel à la lumière UV aussi brièvement que possible. Utilisez la longueur d'onde UV la plus longue autorisée par votre système d'analyse des gels. Une exposition prolongée et des longueurs d'onde courtes peuvent endommager l'ADN. Portez des gants et un masque pour protéger votre peau et vos yeux de la lumière UV. Veillez à couper le gel verticalement et à éliminer tout excès d'agarose. Utilisez des gels d'agarose de 0,7 à 1,0 % plutôt que des pourcentages plus élevés.</p>
<p>Taille du morceau de gel</p>	<p>Veillez à peser réellement le gel car son poids est facilement sous-estimé. Jusqu'à 200 mg de gel d'agarose peuvent être dissous avec 400 µL de tampon NTI et chargés sur la colonne en une seule étape.</p> <p>Cependant, il est possible d'utiliser une quantité de gel illimité en augmentant proportionnellement le volume de tampon NTI utilisé et en effectuant des chargements de la colonne par étapes répétées.</p> <p>Pour l'achat de NTI supplémentaire voir les informations de commande.</p>

2.6 La taille des fragments d'ADN et le volume d'élution impactent le rendement

Lors des étapes de lavage avec le tampon NT3, l'ADN reste fixé à la membrane de silice. Le nombre d'interactions avec les groupes Si-OH de la silice augmente avec la taille du fragment d'ADN. Par conséquent, un ADN de grande taille comportant plusieurs kpb se fixe beaucoup plus fortement et est beaucoup plus difficile à éluer qu'un ADN de petite taille comportant seulement quelques centaines de pb. **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** est recommandé pour l'ADN jusqu'à 10 – 15 kbp. Les fragments plus longs peuvent être purifiés mais le taux de récupération peut être faible. En outre, les fragments de plus de 20 kbp peuvent être endommagés mécaniquement par la centrifugation rapide à travers la membrane. Pour les très grands fragments, envisager l'utilisation de NucleoTrap® ou NucleoTrap®CR (voir informations de commande).

Pour éluer l'ADN, de l'eau avec un pH > 7 est nécessaire pour rétablir l'enveloppe aqueuse autour de l'ADN. Il est fortement recommandé d'**éluer l'ADN avec le tampon d'élution NE** (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5) fourni avec le kit. Toutefois, un tampon TE standard peut également être utilisé pour garantir une meilleure efficacité d'élution. Veuillez noter que l'EDTA dans le tampon TE peut causer des problèmes dans les réactions enzymatiques ultérieures. Ne pas utiliser d'eau désionisée car son pH est généralement trop acide. Le tampon NE peut être dilué avec de l'eau distillée au cas où une concentration en sel plus faible serait nécessaire. Veillez à ce que le pH reste > 7.

Le **volume standard du tampon d'élution est de 15 à 30 µL**, ce qui constitue le meilleur compromis pour une récupération élevée d'ADN et une concentration élevée d'ADN pour les fragments < 1000 pb (Figure 3).

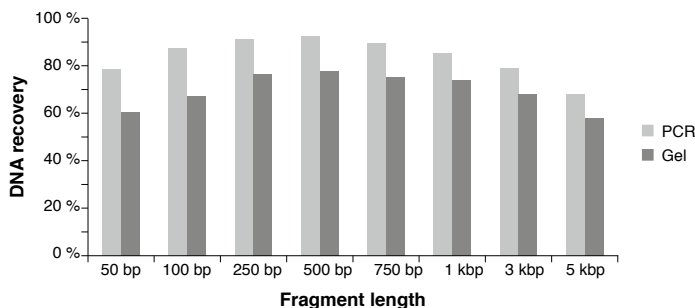


Figure 3 Impact de la taille des fragments sur le rendement final

2 µg de marqueur de taille de 100 pb (Fermentas) ou 2 µg de vecteurs linéarisés de 3 et 5 kb ont été purifiés à partir d'un tampon PCR standard ou d'un gel d'agarose TAE à 1 % de 200 mg. L'ADN a été élué dans 30 µL de tampon d'élution NE.

L'éluion après extraction sur gel est 10 à 20 % moins efficace que l'éluion des produits PCR purifiés. En outre, l'éluion de fragments d'ADN de plusieurs kbp est 10 à 30 % moins efficace que l'éluion de fragments de 500 bp. Pour améliorer la récupération de l'ADN après extraction sur gel et/ou pour les grands fragments d'ADN, les modifications suivantes peuvent être apportées à la procédure d'éluion standard :

- Chauffer le tampon d'éluion à 70 °C et incuber le tampon d'éluion sur la colonne à 70 °C pendant 5 minutes.
- Appliquer le tampon d'éluion sur la colonne et centrifuger une première fois à 30–50 x g pendant 1 min, puis une seconde fois à 11 000 x g pendant 1 min.

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

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'éluion retardé. Plusieurs cycles d'éluion peuvent augmenter considérablement la récupération de l'ADN.

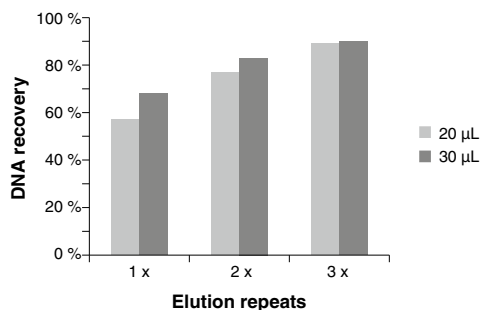


Figure 4 Des étapes d'éluion multiples augmentent la récupération

3 µg d'un fragment de 5 kbp ont été purifiés à partir d'un tampon PCR standard et élués 1, 2 ou 3 fois avec 20 ou 30 µL de tampon d'éluion.

Si des concentrations d'ADN plus élevées sont nécessaires, des volumes d'éluion < 30 µL peuvent être utilisés. Gardez à l'esprit que même si la concentration peut être plus que doublée (figure 5 A), la récupération totale d'ADN sera considérablement réduite pour les volumes < 15 µL (figure 5 B). Pour les grands fragments d'ADN et les extractions sur gel, les pertes peuvent être encore plus prononcées.

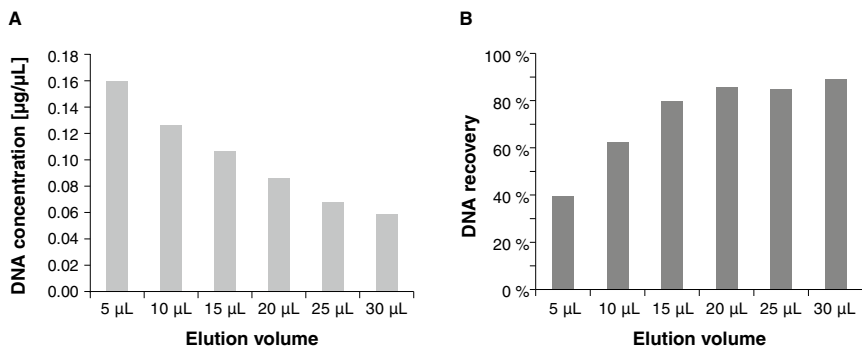


Figure 5 Récupération et concentration de l'ADN en fonction du volume d'élué
 2 µg de marqueur de taille de 100 pb (Fermentas) ont été purifiés à partir du tampon PCR standard et élués avec des volumes croissants.

2.7 Contamination en sel et faible ratio A_{260}/A_{230}

La technologie membrane de silice pour purifier l'ARN ou l'ADN est basée sur la capacité des sels chaotropes à détruire l'enveloppe d'eau autour des acides nucléiques. Deux sels chaotropes couramment utilisés sont le chlorhydrate de guanidine (GuHCl) et le thiocyanate de guanidinium (GuSCN). En solution, ils possèdent tous deux le même cation guanidinium mais des anions différents. Ces anions ne sont pas seulement responsables de leur comportement différent vis-à-vis des acides nucléiques, mais aussi de leurs spectres d'absorption UV différents. Le GuHCl ne présente qu'une absorption minimale < 220 nm, même à une concentration de 1 M, alors que le GuSCN présente déjà une absorption significative < 240 nm (1 mM, figure 6) et même < 260 nm (1 M).

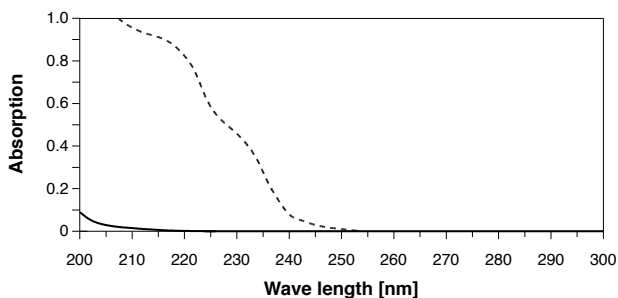


Figure 6 Spectres d'absorption UV de GuHCl 1 mM (ligne continue) et de GuSCN 1 mM (ligne pointillée)

En particulier, la différence d'absorption à 230 nm peut avoir un impact considérable sur le rapport de pureté A_{260}/A_{230} si l'ADN est contaminé par des sels chaotropiques. La présence de GuSCN peut faire passer le rapport de sa valeur idéale de > 2,0 à moins de 1,5, voire 1,0. Le GuHCl ne peut pas être détecté à cette longueur d'onde et n'influence pas le rapport. Cependant, l'effet du GuSCN n'est détectable qu'avec de très petites

quantités d'ADN telles que les rendements typiques des réactions PCR ou des extractions sur gel. La mesure de petites quantités d'ADN dans de petits volumes peut conduire à des rapports d'absorption qui suscitent des inquiétudes quant à la pureté de l'ADN. Toutefois, cet effet ne se produit généralement pas avec des quantités plus importantes d'ADN, car sa propre absorption à 230 nm masque les petites contributions d'une éventuelle contamination.

La concentration de sel chaotrope contaminant est généralement comprise entre 100 μM et 1 mM et n'a pas d'influence négative sur les applications enzymatiques en aval, par exemple la PCR, la restriction ou la ligation. La figure 7 montre l'inhibition de la qPCR par le GuSCN et le GuHCl, démontrant que la PCR ne commence à être inhibée par les sels chaotropiques qu'à partir d'une concentration environ 100 fois plus élevée (40 mM). En outre, elle montre que les deux sels chaotropiques entraînent une inhibition de la PCR à des concentrations élevées.

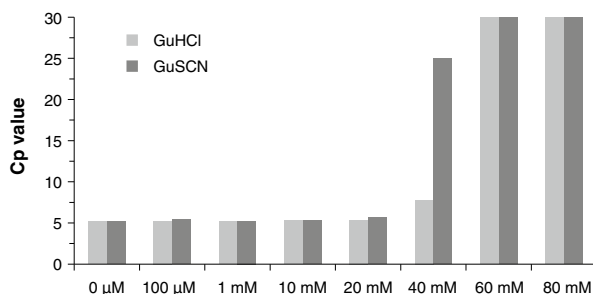


Figure 7 Inhibition de la qPCR par GuHCl (gris clair) et GuSCN (gris foncé)

Un fragment d'ADN de 164 pb a été amplifié à partir de 5 ng de matrice pBS avec le mix DyNAmo Capillary Master (NEB) dans une machine PCR en temps réel Lightcycler (Roche) en présence de 0–80 mM de GuHCl ou de GuSCN.

La concentration finale de sel chaotrope dans les éluats est trop faible pour avoir des effets négatifs sur les applications en aval. Par conséquent, un faible rapport A_{260} / A_{230} peut être négligé lors de l'utilisation de ce produit.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention : Le tampon NTI contient du sel chaotropique. Porter des gants et des lunettes !

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

Conditions de stockage :

- Le kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** doit être conservé à température ambiante et est stable jusqu'à : voir l'étiquette du kit.

Avant de débiter une procédure de **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up**, préparer les éléments suivants :

- Tampon de lavage NT3** : Ajouter le volume indiqué d'éthanol (96–100 %) au **tampon NT3 concentré**. Marquer l'étiquette du flacon pour indiquer que de l'éthanol a été ajouté. Le tampon de lavage NT3 est stable à 15–25 °C pendant au moins un an.

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up			
REF	10 preps 740609.10	50 preps 740609.50	250 preps 740609.250
Tampon de lavage NT3 (concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	25 mL Ajouter 100 mL d'éthanol	2 × 50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol dans chaque bouteille

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean up**, 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 (FDS) appropriées, disponibles en ligne à l'adresse 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.

4.1 Elimination des déchets

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

5 Protocoles

5.1 Purification des produits PCR

Le protocole suivant convient à la purification de la PCR et pour la concentration de l'ADN et à l'élimination des sels, des enzymes, etc. à partir de réactions enzymatiques (SDS < 0,1 %).

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon de lavage NT3 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Création des conditions de fixation

Pour les très petits volumes d'échantillons < 30 µL, ajuster le volume du mélange réactionnel à 50–100 µL avec de l'eau.



+ 2 vol NTI
pour
1 vol
d'échantillon

Il n'est pas nécessaire d'enlever l'huile minérale.

Mélanger **1 volume d'échantillon** avec **2 volumes de tampon NTI** (p.e., mélanger 100 µL de réaction PCR et 200 µL de tampon NTI).

Note : Pour l'élimination de petits fragments tels que les dimères d'amorces, des dilutions de tampon NTI peuvent être utilisées au lieu de 100 % de tampon NTI. Veuillez vous référer au chapitre 2.3.

2 Fixation de l'ADN

Placer une **colonne de NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** dans un tube collecteur (2 mL) et charger jusqu'à 700 µL d'échantillon.



Charger
l'échantillon

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



11,000 x g
30 s

Charger l'échantillon restant si nécessaire et répéter l'étape de centrifugation.

3 Lavage de la membrane de silice

Ajouter **700 µL de tampon NT3** à la colonne de **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up**. Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 x g**. Jeter le filtrat et remettre la colonne dans le tube collecteur.



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

Recommandé : Répéter l'étape de lavage précédente pour minimiser la contamination de sels chaotropiques et améliorer les valeurs A_{260}/A_{230} (voir le paragraphe 2.7 pour des informations détaillées).



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

4 Séchage de la membrane de silice

Centrifuger pendant **1 min** à **11,000 x g** pour éliminer complètement le tampon NT3. Veiller à ce que la colonne n'entre pas en contact avec le filtrat lors de son retrait de la centrifugeuse et du tube collecteur.



Note : L'éthanol résiduel du tampon NT3 peut inhiber les réactions enzymatiques. L'élimination totale de l'éthanol peut être obtenue en incubant les colonnes pendant 2 à 5 min à 70 °C avant l'éluion.



11,000 x g

1 min

5 Elution de l'ADN

Placer la colonne de NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up dans un nouveau tube de 1,5 mL (non fourni). Ajouter **15–30 µL de tampon NE** et incubé à **température ambiante** (15–25 °C) pendant 1 min. Centrifuger pendant **1 min** à **11,000 x g**.



**+ 15–30 µL
NE**

**TA
1 min**

**11,000 x g
1 min**

Note : La récupération d'ADN de fragments plus importants (> 1000 pb) peut être augmentée par des étapes d'éluion multiples avec du tampon frais, en chauffant à 70 °C et en incubant pendant 5 min. Voir le paragraphe 2.6 pour des informations détaillées

5.2 Extraction d'ADN à partir de gels d'agarose

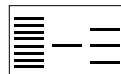
Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon de lavage NT3 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Découpe du fragment d'ADN et solubilisation du fragment de gel

Note : Minimiser le temps d'exposition aux UV pour éviter d'endommager l'ADN. Se référer au paragraphe 2.5 pour plus de conseil sur l'extraction sur gel d'agarose.

A l'aide d'un scalpel propre, prélever le fragment d'ADN sur un gel d'agarose. Éliminez tout excès d'agarose.



! Déterminer le poids du morceau de gel et transférer dans un tube propre.

Pour chaque **100 mg de gel d'agarose < 2 %**, ajouter **200 µL de tampon NTI**.



**+ 200 µL NTI
par 100 mg
de gel**

Pour les gels contenant **> 2 % d'agarose**, doubler le volume de tampon NTI.

Incuber l'échantillon pendant **5 – 10 min à 50 °C**. Vortexer brièvement l'échantillon toutes les 2–3 min jusqu'à ce que le morceau de gel soit **complètement** dissout !

**50 °C
5 – 10 min**

2 Fixation de l'ADN

Placer une **colonne de NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** dans un tube collecteur (2 mL) et charger jusqu'à 700 µL d'échantillon.



**Charger
l'échantillon**

Centrifuger pendant **30 s à 11 000 x g**. Jeter le filtrat et remplacer la colonne dans le tube collecteur.



**11,000 x g
30 s**

Charger l'échantillon restant si nécessaire et répéter l'étape de centrifugation.

3 Lavage de la membrane de silice

Ajouter **700 µL de tampon NT3** à la colonne de **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up**. Centrifuger pendant **30 s** à **11 000 x g**. Jeter le filtrat et remettre la colonne dans le tube collecteur.



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

Recommandé : Répéter l'étape de lavage précédente pour minimiser la contamination de sels chaotropiques et le faible taux d'A₂₆₀/A₂₃₀ (voir le paragraphe 2.7 pour des informations détaillées)



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

4 Séchage de la membrane de silice

Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 x g** pour éliminer complètement le tampon NT3. Veiller à ce que la colonne n'entre pas en contact avec le filtrat lors de son retrait de la centrifugeuse et du tube collecteur.



Note : L'éthanol résiduel du tampon NT3 peut inhiber les réactions enzymatiques. L'élimination totale de l'éthanol peut être obtenue en incubant les colonnes pendant 2 à 5 min à 70 °C avant l'éluion.



11,000 x g
1 min

5 Elution de l'ADN

Placer la colonne de **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** dans un **nouveau** tube de 1,5 mL (non fourni). Ajouter **15–30 µL de tampon NE** et incubé à **température ambiante** (15–25 °C) pendant **1 min**. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 x g**.



+ 15–30 µL
NE
TA
1 min

Note : La récupération d'ADN de fragments plus importants (> 1000 pb) peut être augmentée par des étapes d'éluion multiples avec du tampon frais, en chauffant le tampon à 70 °C et l'incubation pendant 5 min. Voir le paragraphe 2.6 pour des informations détaillées.



11,000 x g
1 min

5.3 Extraction d'ADN à partir de gels de polyacrylamide

Dans les gels de polyacrylamide, les monomères d'acrylamide sont liés de manière covalente lors d'une réaction chimique. Aussi, le gel ne peut pas être dissout comme les gels d'agarose pour récupérer l'ADN contenu.

Les gels de polyacrylamide sont généralement extraits par la méthode "crush and soak", qui consiste à écraser un petit morceau de gel et à l'incuber dans un tampon de diffusion. L'ADN peut alors diffuser passivement hors du gel et est ensuite purifié à partir du tampon de diffusion. Le tampon de diffusion (500 mM d'acétate d'ammonium, pH 8,0, 0,1 % de SDS, 1 mM d'EDTA, 10 mM d'acétate de magnésium) n'est pas fourni avec le kit.

1 Préparer l'échantillon

Exciser le fragment d'ADN à l'aide d'un scalpel ou d'une lame de rasoir avec une quantité minimale de polyacrylamide. Peser le morceau de gel et transférer dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).

**Exciser le
fragment
d'ADN**

2 Ecraser le fragment de gel

Écraser le morceau de gel à l'aide d'une cônes jetables de pipette dont l'extrémité fondue ressemble à un pilon pour tube de microcentrifugeuse. Plus les morceaux sont petits, meilleure est la récupération de l'ADN

Écraser le gel

3 Extraire l'ADN

Ajouter **200 µL de tampon de diffusion** à chaque **100 mg de gel** écrasé. S'assurer que tous les morceaux de gel sont immergés dans le tampon de diffusion.

Incuber pendant **30–60 min à 50 °C** ou **pendant la nuit à 37 °C**.

**50 °C
30–60 min**

ou

**37 °C
pendant la nuit**

4 Éliminer le polyacrylamide

Centrifuger pendant **1 min à 11 000 x g** pour culotter le gel de polyacrylamide et transférer le surnageant dans un nouveau tube (non fourni).

Alternativement, transférer le mélange dans une **colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** et centrifuger **1 min à 11 000 x g** pour retenir le gel sur la colonne. Conserver le filtrat qui contient l'ADN !

Optionnel : Pour augmenter le rendement final, répéter les étapes 3 et 4 et combiner les deux surnageants ou filtrats.



11,000 x g

1 min

**Transférer le
surnageant**

ou

11,000 x g

1 min



**Conserver le
filtrat**

5 Créer les conditions de fixation de l'ADN

Mélanger **1 volume** d'échantillon avec **2 volumes** de **tampon NTI**. (p.e., 200 µL de tampon de diffusion et 400 µL de Buffer NTI).

De petites quantités de SDS précipité n'influencent pas la purification. Ne pas éliminer le précipité.

Note : Pour obtenir des rendements plus élevés pour les petits fragments < 50 pb, ajouter deux volumes d'éthanol ou utiliser le tampon NTC au lieu du tampon NTI. Le tampon NTC n'est pas fourni avec le kit mais peut être commandé séparément (voir informations de commande).

**+ 2 vol NTI
pour 1 vol
d'échantillon**

**Optionnel :
+ 2 vol ethanol**

or

**+ 2 vol NTC
par 1 vol
d'échantillon**

6 Fixer l'ADN

Passer à l'**étape 2** du protocole de purification de la PCR (paragraphe 5.1).

5.4 Extraction d'ARN à partir de gels d'agarose (tampon NTC)

Non seulement l'ADN mais aussi l'ARN peuvent être extraits des gels d'agarose. Pour lier efficacement les petits ARN monocaténaire, il convient d'utiliser le **tampon de fixation NTC** au lieu du tampon de fixation standard NTL.

Pour séparer l'ARN, il faut réaliser un gel d'ARN standard avec un tampon de chargement d'ARN dénaturant, mais **ne pas utiliser de formaldéhyde ou de glyoxal**. Ces composés non seulement inactivent les RNases et dénaturent l'ARN, mais modifient également l'ARN. En conséquence, le rendement de l'ARN est considérablement réduit et, plus important encore, l'ARN peut ne pas réagir correctement dans les applications enzymatiques en aval, telles que la RT-PCR ou les transcriptions *in vitro*.

Sans formaldéhyde, l'ARN est très sensible aux RNases contaminantes. Utilisez des gants et assurez-vous que tout le matériel est RNase-free, en particulier l'agarose et les tampons. Utilisez une durée de migration la plus courte et une température la plus basse possible (faible voltage en chambre froide). Note : l'ARN peut former des structures secondaires et peut migrer différemment par rapport à des gels d'agarose dénaturants.

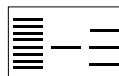
Note : Le tampon NTC doit être commandé séparément (Tampon NTC (125 mL), REF 740654.100, voir 'Informations de commande').

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon de lavage NT3 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Exciser / solubiliser le morceau de gel

Note : Minimiser le temps d'exposition aux UV pour éviter d'endommager l'ARN. Se référer au paragraphe 2.5 pour plus de conseils sur l'extraction sur gel d'agarose.



A l'aide d'un scalpel propre, exciser le fragment d'ARN d'un gel d'agarose. Éliminer tout excès d'agarose



Déterminer le poids du morceau de gel et transférer dans un tube propre.

Pour chaque **100 mg de gel d'agarose < 2 %**, ajouter **200 µL de tampon NTC**.

Pour les gels contenant > 2 % d'agarose, doubler le volume du tampon NTC.

Incuber l'échantillon pendant **5–10 min** à **50 °C**. Vortexer brièvement l'échantillon toutes les 2–3 min jusqu'à ce que le morceau de gel soit **complètement** dissout!

**+ 200 µL NTC
par 100 mg de
gel**

**50 °C
5–10 min**

2 Fixer l'ARN

Passer à l'**étape 2** du protocole d'extraction d'ADN à partir de gels d'agarose (paragraphe 5.2).

5.5 Purification de l'ADN des échantillons contenant du SDS (tampon NTB)

Le tampon NTI, du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, est compatible avec la plupart des détergents utilisés, à l'exception du dodécylsulfate de sodium (SDS). Pour la purification de l'ADN à partir d'échantillons sans SDS, le protocole standard de purification PCR peut être utilisé (voir paragraphe 5.1). Pour la purification de l'ADN à partir de tampons contenant du SDS, par exemple dans des applications telles que l'"immunoprécipitation de la chromatine" (ChIP), le tampon de fixation NTB compatible avec le SDS peut être utilisé.

Note : Le tampon NTB doit être commandé séparément (Tampon NTB (150 mL) REF 740595.150, voir 'Informations de commande').

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon de lavage NT3 a été préparé conformément au chapitre 3.

7 Création des conditions de fixation des ADN

Mélanger **1 volume d'échantillon** avec **5 volumes de tampon NTB** (p.e., 100 µL de mélange réactionnel avec 500 µL de tampon NTB).



+ 5 vol NTB
par 1 vol
d'échantillon

Note : Si le SDS commence à précipiter, ajouter 1 volume d'isopropanol ou réchauffer l'échantillon à 20–30 °C.

8 Fixation de l'ADN

Passer à l'**étape 2** du protocole d'extraction d'ADN à partir de gels d'agarose (paragraphe 5.2).

5.6 Purification de l'ADN simple brin (tampon NTC)

Le tampon NTI, issu du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, est capable de fixer l'ADN simple brin (ssDNA) > 150 bases. Les oligonucléotides plus courts, en particulier les amorces, sont complètement éliminés. Si vous devez purifier des courts fragments d'ADN simple brin vous pouvez utiliser le tampon de fixation supplémentaire NTC (voir figure 8).

Note : Le tampon NTC doit être commandé séparément (125 mL de tampon NTC, REF 740654.100, voir informations de commande).

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon de lavage NT3 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Création des conditions de fixation de l'ADN

Mélanger **1 volume d'échantillon** avec **2 volumes de tampon NTC** (p.e., 100 µL de mélange de réaction PCR et 200 µL de tampon NTC).



**+ 2 vol NTC
par 1 vol
d'échantillon**

Si votre échantillon contient de grandes quantités de détergents ou d'autres substances critiques, doublez le volume du tampon NTC.

2 Fixation de l'ADN

Passer à l'**étape 2** du protocole d'extraction d'ADN à partir de gels d'agarose (paragraphe 5.2).

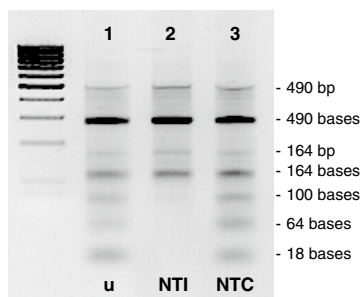


Figure 8 Purification de l'ADN ds et de l'ADN ss à l'aide des tampons NTI et NTC

Les fragments PCR, amplifiés à l'aide d'une amorce phosphorylée et d'une amorce déphosphorylée, ont été partiellement digérés avec la λ -Exonucléase pour obtenir de l'ADN simple brin. Les échantillons ont été purifiés à l'aide des tampons de fixation NTI et NTC et analysés sur un gel d'agarose TAE à 1 %. L'ADN double brin résiduel est visible sous forme de faibles bandes. L'ADN simple brin correspondant migre légèrement plus vite en raison de la formation d'une structure secondaire. Par rapport à l'ADN initial (u, piste 1), le tampon NTI élimine l'ADN ss < 150 bases (NTI, piste 2), tandis que le tampon NTC conduit à une récupération totale même des oligonucléotides d'amorce (NTC, piste 3).

5.7 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up avec l'utilisation d'un système à vide

Le protocole suivant convient pour l'extraction d'ADN à partir de gels d'agarose, pour la purification de produits PCR ainsi que pour la concentration d'ADN et l'élimination des sels, des enzymes, etc., des réactions enzymatiques (SDS < 0,1 %). Au lieu d'utiliser la force centrifuge, le traitement des échantillons est effectué sous vide, ce qui élimine la nécessité de retirer et de vider les tubes collecteurs après chaque étape de fixation et de lavage.

Nous recommandons la chambre à vide 'NucleoVac 24 Vacuum Manifold' pour l'utilisation des colonnes NucleoSpin® par aspiration (voir 'informations de commande'). Cependant, d'autres systèmes de chambre à vide similaires sont également utilisables.

1 Ajuster les conditions de fixation de l'ADN ou exciser / solubiliser le morceau de gel

Veillez suivre l'étape 1 du protocole standard pour l'échantillon à traiter.

2 Fixation de l'ADN

Placer une **colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** sur un système de chambre à vide approprié avec des connexions Luer comme le NucleoVac 24 Vacuum Manifold et charger jusqu'à 700 µL d'échantillon. Ne pas fermer la colonne!

Appliquer un vide de **-0,2 à -0,4 bar* (1 min)**.

Lorsque l'échantillon est passé à travers la membrane de la colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, rompre le vide.

Si nécessaire, charger l'échantillon restant et répéter l'opération.



+ Charger l'échantillon

-0.2 à -0.4 bar*

1 min

3 Lavage de la membrane de silice

Ajouter **700 µL de tampon NT3** à la colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Ne pas fermer la colonne !

Appliquer un vide de **-0,2 à -0,4 bar* (1 min)**.

Lorsque l'échantillon est passé au travers de la colonne **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up**, relâcher le vide.



+ 700 µL NT3
-0.2 à -0.4 bar*

1 min

* Réduction de la pression atmosphérique

4 Optionnel : Répéter l'étape du lavage

Répéter l'étape de lavage précédente pour minimiser la contamination de sels chaotropiques et améliorer les valeurs A_{260}/A_{230} (voir le paragraphe 2.7 du manuel NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up).



+ 700 µL NT3
-0.2 à -0.4 bar*

1 min

5 Séchage de la membrane de silice

Optionnel : séchage par aspiration

Appliquer un vide de **-0,4 à -0,6 bar*** pendant **5 min** pour éliminer complètement le **tampon NT3**. Faire fonctionner la pompe à vide en continu. Il est plus important d'obtenir et de maintenir un flux d'air continu que d'atteindre la réduction précise de la pression atmosphérique mentionnée. Ne pas fermer la colonne !

Relâcher le vide.



-0.4 à -0.6 bar*

5 min

Optionnel 2 : Séchage par centrifugation

Placer la colonne NucleoSpin® Gel et PCR Clean-up dans un tube collecteur (2 mL). Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 x g** pour éliminer complètement le tampon NT3. S'assurer que la colonne n'entre pas en contact avec le filtrat lors de son retrait de la centrifugeuse et du tube collecteur.



11,000 x g

1 min



Note : L'éthanol résiduel du tampon NT3 peut inhiber les réactions enzymatiques. L'élimination totale de l'éthanol peut être obtenue en incubant les colonnes pendant 2 à 5 min à 70 °C avant l'éluion.

6 Elution de l'ADN

Placer la colonne de **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up** dans un nouveau tube de 1,5 mL (non fourni). Ajouter **15–30 µL de tampon NE** et incuber à température ambiante (18–25 °C) pendant **1 min**. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 x g**.



+ 15–30 µL NE

AT

1 min

Note : la récupération d'ADN de fragments plus importants (> 1000 pb) peut être améliorée par des étapes d'éluion multiples avec du tampon NE frais (réduction de la concentration), ou en rechargeant les éluats pour une deuxième étape d'éluion, ainsi que par des temps d'incubation plus longs à des températures élevées (p.e., 70 °C).



11,000 x g

1 min

* Réduction de la pression atmosphérique

6 Annexes

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
Dissolution incomplète du morceau de gel	<i>Durée et température</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Vérifier la température d'incubation et le volume du tampon NTI. Augmenter le temps d'incubation. Vortexer toutes les 2 min et vérifier l'intégrité du morceau de gel. Les très grands morceaux de gel peuvent être écrasés avant l'ajout du tampon NTI pour raccourcir le temps de fusion.
Faible rendement d'ADN	<i>Réactifs mal préparés</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96–100 % au tampon NT3 concentré et bien mélanger avant utilisation.
	<i>Dissolution incomplète du gel</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Augmenter le temps ou ajouter encore deux volumes de tampon NTI et vortexer le tube toutes les 2 minutes pendant l'incubation à 50 °C. Les petits morceaux de gel sont à peine visibles et contiennent de l'ADN qui sera perdu pour la purification. 	<i>Séchage insuffisant de la membrane de silice NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuger 5 min à 11 000 x g ou incuber la colonne pendant 2 à 5 min à 70 °C avant l'élution pour éliminer complètement le tampon NT3 éthanolique. Les contaminations éthanoliques sont également indiquées par des problèmes de chargement du gel (les échantillons flottent hors des fentes du gel). Retirer délicatement la colonne et le tube collecteur de la centrifugeuse et éviter tout contact de la colonne avec le filtrat. 	<i>Élution incomplète</i>
<ul style="list-style-type: none"> • En particulier pour les grandes quantités d'ADN (> 5 µg), les longs fragments d'ADN (> 1000 pb), ou après une extraction sur gel, effectuer plusieurs étapes d'élution avec un tampon frais, chauffer à 70 °C et incuber pendant 5 min. Voir le paragraphe 2.6 pour des informations détaillées 	

Problème **Causes possibles et suggestions**

Apparition de bandes supplémentaires sur le gel d'agarose après extraction du gel

L'ADN a été dénaturé pendant la purification

- Si de l'eau est utilisée pour l'éluion ou si de l'agarose à faible teneur en ions est utilisé pour l'électrophorèse sur gel d'agarose, la formation d'ADN dénaturé (simple brin) peut être favorisée. Pour ré-hybrider l'ADN, ajouter tous les composants de la réaction enzymatique à effectuer en omettant l'enzyme. Incuber à 95 °C pendant 2 min et laisser le mélange refroidir lentement jusqu'à la température ambiante (à cette étape, l'ADN se ré-hybride). Ajouter l'enzyme et poursuivre l'application en aval.
- Utilisez un tampon frais et effectuez l'électrophorèse à faible voltage pour abaisser la température. Une température élevée peut favoriser la dénaturation de l'ADN pendant l'électrophorèse

Performances suboptimales de l'ADN pour les réactions de séquençage, de restriction ou de ligation

Contamination par de l'éthanol

- Avant l'éluion, centrifuger 5 min à 11 000 x *g* ou incuber la colonne pendant 5 – 10 min à 70 °C pour éliminer complètement le tampon NT3 éthanolique. Les contaminations éthanoliques sont également indiquées par des problèmes de chargement du gel (les échantillons flottent hors des puits du gel). Sortir délicatement la colonne et le tube collecteur de la centrifugeuse et éviter le contact de la colonne avec le filtrat.
- Utilisez soit une marque différente d'éthanol pour reconstituer le tampon NT3, soit de l'éthanol qui n'est pas dénaturé. Les composants dénaturants peuvent ne pas s'évaporer aussi rapidement que l'éthanol et se retrouver concentrés dans l'éluat, inhibant des enzymes comme la ligase.

Contamination par des sels chaotropiques

- Effectuer l'étape de lavage optionnelle.
 - En outre, 250 µL de NT3 peuvent être chargés avant l'étape de séchage. (Note : Le volume de tampon NT3 inclus dans le kit n'est pas suffisant pour cette modification pour toutes les préparations mais peut être commandé séparément, voir les informations de commande).
-

Problème	Causes possibles et suggestions
Performances suboptimales de l'ADN pour les réactions de séquençage, de restriction ou de ligation (suite)	<p><i>Elution de l'ADN avec des tampons autres que le tampon NE, par exemple le tampon TE (Tris/EDTA)</i></p> <ul style="list-style-type: none">• L'EDTA peut inhiber les réactions de séquençage. Dans ce cas, il est recommandé de re-purifier l'ADN et de l'éluer dans le tampon NE ou dans l'eau. <p><i>Pas assez d'ADN utilisé pour la réaction de séquençage</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Quantifier l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose avant la préparation des réactions de séquençage.
Analyse problématique au NanoDrop® ou au Bioanalyzer	<p><i>Contamination par des particules de silice</i></p> <ul style="list-style-type: none">• La technologie du spectrophotomètre NanoDrop® est très sensible aux particules présentes dans l'échantillon. Pour culotter les particules de silice, centrifuger > 2 min à 11 000 x g et prélever le surnageant pour une utilisation ultérieure.
Faible rapport A_{260}/A_{230}	<p><i>Contamination par des sels chaotropiques</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Se référer au Guide de résolution des problèmes "Performance suboptimale de l'ADN dans les réactions de séquençage, de restriction ou de ligation. Contamination par des sels chaotropiques" et voir le paragraphe 2.7 pour des informations détaillées.

6.2 Informations de commande

Produit	REF	Pack of
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	740609.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS	740611.10/.50/.250	10/50/250
Tampon NT1	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
Chambre à vide NucleoVac 24	740299	1
NucleoVac Mini Adapter	740297.100	100
NucleoVac Valves	740298.24	24
NucleoTrap®	740584.10/.50/.250	10/50/250
NucleoTraP®CR	740587.10/.50/.250	10/50/250

Visiter www.mn-net.com pour plus d'informations sur nos produits.

6.3 Références

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

6.4 Restriction 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

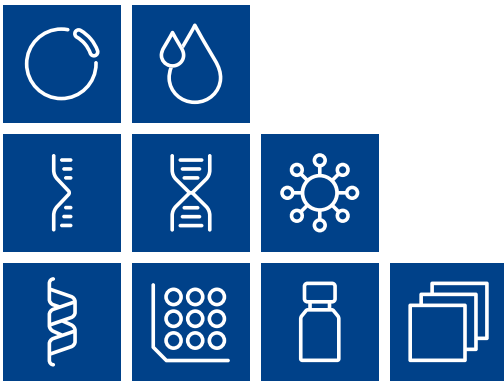
6.5 Versions linguistiques et prédominance

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

Marques déposées :

NanoDrop® est une marque déposée de NanoDrop Technologies, Inc.
NucleoSpin® est une marque déposée de MACHEREYNAGEL -GmbH & Co. KG
Rotti® est une marque déposée de Carl Roth GmbH & Co. KG

Tous les noms et dénominations utilisés peuvent être des marques, des marques déposées ou des marques enregistrées de leur propriétaire respectif - même s'il ne s'agit pas d'une dénomination spéciale. La mention de produits et de marques n'est qu'une forme d'information (c'est-à-dire qu'elle ne porte pas atteinte aux marques et ne peut être considérée comme une forme de recommandation ou d'évaluation). En ce qui concerne ces produits ou services, nous ne pouvons donner aucune garantie quant au choix, à l'efficacité ou au fonctionnement.



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

