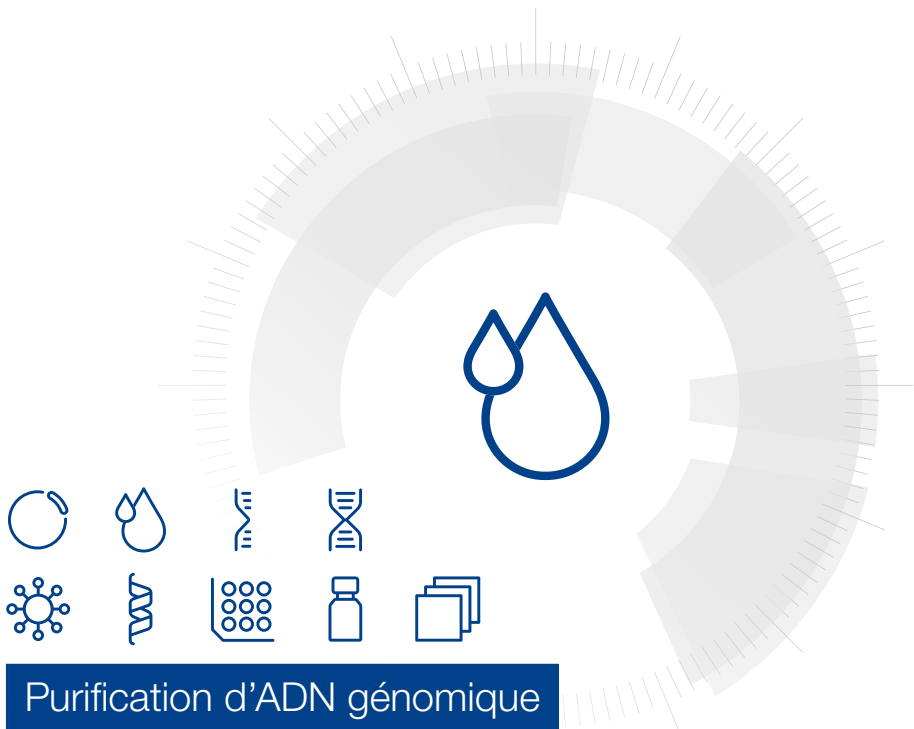


MACHEREY-NAGEL

# Manuel d'utilisation













## Purification d'ADN génomique

- NucleoSpin® gDNA Clean-up

Septembre 2023 / Rev. 05

# Purification d'ADN génomique

## Résumé du protocole (Rev. 05)

| <b>NucleoSpin® gDNA Clean-Up</b>                       |   |   |
|--|---|---|
| <b>1 Ajustement des conditions de fixation des ADN</b> |    | 150 µL d'échantillon<br>+ 450 µL DB<br>Vortexer 5 s<br><br>(Pour les plus petits volumes d'échantillons, ajuster à 150 µL avec de l'eau, pour les plus grands volumes d'échantillons, augmenter proportionnellement le tampon de fixation). |
| <b>2 Fixation des ADN</b>                              |    | Charger l'échantillon sur la colonne NucleoSpin® gDNA Clean-up<br>11,000 x g<br>30 s  |
| <b>3 Lavage de la membrane de silice</b>               |       | + 700 µL DW<br>Vortex 2 s<br><b>1er lavage</b><br>11,000 x g<br>30 s  |
|  |       | + 700 µL DW<br>Vortex 2 s<br><b>2ème lavage</b><br>11,000 x g<br>30 s   |
| <b>4 Séchage de la membrane de silice</b>              |     | 11,000 x g<br>1 min   |
| <b>5 Elution de l'ADN</b>                              |   | 50 µL DE<br>RT<br>1 min<br>11,000 x g<br>30 s<br><br><i>(Optionnel: Répéter l'éluat avec le premier éluat ou 50 µL supplémentaires de tampon DE frais. Utiliser du tampon d'éluat chauffé à 70 °C peut favoriser l'éluat)</i>               |

## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| 1 Composants  | 4  |
| 1.1 Contenu du kit  | 4  |
| 1.2 Réactifs, consommables et équipement nécessaires  | 4  |
| 1.3 À propos de ce manuel   | 4  |
| 2 Description   | 5  |
| 2.1 Principe général  | 5  |
| 2.2 Caractéristiques du kit   | 5  |
| 2.3 Élimination de l'ARN  | 6  |
| 2.4 Interprétation des valeurs de rendement et de pureté évaluées par spectrophotométrie UV-VIS ? | 6  |
| 3 Conditions de stockage et de préparation des réactifs   | 7  |
| 4 Instructions de sécurité  | 8  |
| 4.1 Élimination des déchets   | 8  |
| 5 Protocole NucleoSpin® gDNA Clean-Up   | 9  |
| 6 Annexes   | 11 |
| 6.1 Guide de résolution des problèmes   | 11 |
| 6.2 Informations de commande  | 11 |
| 6.3 Restrictions d'utilisation / garantie   | 12 |
| 6.4 Versions linguistiques et prédominance  | 12 |

# 1 Composants

## 1.1 Contenu du kit

| NucleoSpin® gDNA Clean-up                          |                       |                       |                         |
|--|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| REF  | 10 preps<br>740230.10 | 50 preps<br>740230.50 | 250 preps<br>740230.250 |
| Tampon de fixation DB                              | 25 mL                 | 25 mL                 | 125 mL                  |
| Tampon de lavage DW (concentré)*                   | 6 mL                  | 25 mL                 | 3 × 50 mL               |
| Tampon d'éluion DE**                               | 13 mL                 | 13 mL                 | 30 mL                   |
| Colonnes NucleoSpin® gDNA Clean-up (bagues vertes) | 10                    | 50                    | 250                     |
| Tubes collecteurs (2 mL)                           | 10                    | 50                    | 250                     |
| Manuel d'utilisation                               | 1                     | 1                     | 1                       |

## 1.2 Réactifs, consommables et équipement nécessaires

### Réactifs

- Ethanol 96–100%

### Consommables

- Tubes à centrifuger 1,5 mL
- Cônes de pipette jetables

### Équipement

- Pipettes manuelles
- Centrifugeuse pour microtubes
- Équipement de protection individuelle (par exemple : blouse de laboratoire, gants, lunettes)

## 1.3 À propos de ce manuel

Il est fortement recommandé aux nouveaux utilisateurs du kit **NucleoSpin® gDNA Clean-up** de lire les chapitres détaillés du protocole de ce manuel d'utilisation. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Celui-ci est conçu pour être utilisé uniquement comme un outil supplémentaire permettant un suivi rapide des différentes étapes de la procédure de purification.

Toute la documentation technique est disponible sur Internet à l'adresse suivante : [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com).

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

\*\* Composition du tampon d'éluion DE : 5 mM Tris/HCl, pH 8.5

## 2 Description

### 2.1 Principe général

L'ADN génomique prépurifié, de poids moléculaire particulièrement élevé, et dissous dans l'eau, dans le tampon d'élution ou tout autre tampon de réaction, est tout d'abord mélangé au tampon de fixation DB, puis chargé sur une colonne NucleoSpin® gDNA Clean-up.

Les divers contaminants sont éliminés lors de deux étapes de lavage avec le tampon de lavage DW.

Après une étape de séchage, l'ADN purifié et concentré peut être élué avec le tampon d'élution DE (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5).

### 2.2 Caractéristiques du kit

- Le kit NucleoSpin® gDNA Clean-up est conçu pour la purification rapide de l'ADN génomique de petit et surtout de haut poids moléculaire préalablement extrait. Il est utilisé pour purifier et concentrer l'ADN génomique après des méthodes d'extraction insuffisantes, par exemple à l'aide de Trizol, ou encore après des réactions enzymatiques ou chimiques.
- La procédure n'emploie pas de dénaturants organiques ou d'étapes d'extraction au moyen de chloroforme.
- Toutes les impuretés, telles que le phénol, les enzymes, les sels, les colorants, les marqueurs, les nucléotides, les petits oligonucléotides et même les détergents en forte concentration jusqu'à 5% (comme par exemple du SDS, Triton, Tween, Lauroylsarcosin) sont complètement éliminées.
- Le tampon de fixation DB et le tampon de lavage DW sont spécialement conçus pour permettre la fixation et un lavage très doux afin de maximiser le rendement en ADN de haut poids moléculaire et des fragments d'ADN plus petits (jusqu'à 100 pb).
- L'ADN élué est prêt à être utilisé pour toutes les applications standard telles que la PCR, la restriction par endonucléases, le Southern Blot et le marquage.

**Table 1: Résumé des caractéristiques du kit**

| Paramètre                    | NucleoSpin® gDNA Clean-up          |
|------------------------------|------------------------------------|
| Volume type de l'échantillon | 150 µL de solution d'ADN           |
| Quantité d'ADN               | < 25 µg                            |
| Rendement                    | 80–90 %                            |
| Taille des fragments         | 100 bp – environ. 50 kbp           |
| Capacité de fixation         | 50 µg                              |
| Volume d'élution             | 50–100 µL                          |
| Temps de préparations        | < 15 min/10 preps                  |
| Format                       | Mini colonne à centrifuge          |
| Utilisation                  | Pour la recherche uniquement (RUO) |

## 2.3 Élimination de l'ARN

Les nucléotides et les petits oligonucléotides sont éliminés par l'utilisation de conditions de fixation douces et des étapes de lavage rigoureuses. Pour éliminer complètement la contamination de l'ADNg par de l'ARN, il est recommandé d'ajouter 1 µg de RNase A (voir 'Informations de commande') à 150 µL d'échantillon d'ADNg et d'incuber à température ambiante pendant 5 à 15 minutes.

## 2.4 Interprétation des valeurs de rendement et de pureté évaluées par spectrophotométrie UV-VIS ?

La méthode la plus courante pour déterminer le rendement en ADN est la spectrophotométrie UV-VIS. La concentration d'ADN dans l'éluat final peut être calculée à partir de son maximum d'absorption à 260 nm ( $A_{260}$ ), sachant qu'une absorption  $A_{260} = 1$  correspond à 50 µg/mL d'ADN double brin. Toutefois, ce calcul suppose l'absence de tout autre composé absorbant la lumière UV à 260 nm. Toute contamination par du phénol, de l'ARN, des protéines, des détergents, etc. contribue de manière significative à l'absorption totale à 260 nm, ce qui conduit à une surestimation de la concentration réelle d'ADN.

### Rapport de pureté $A_{260}/A_{230}$

Pour évaluer la fiabilité du rendement déterminé à partir des lectures  $A_{260}$ , le rapport de l'absorption à 260 nm et 230 nm peut être utilisé. Le rapport  $A_{260}/A_{230}$  doit être supérieur à 2,0 pour l'ADN pur et est acceptable jusqu'à des rapports d'environ 1,5. Des valeurs inférieures ou proches de 1,0 indiquent la présence d'importantes quantités d'impuretés et la concentration réelle d'ADN est bien inférieure à sa valeur calculée à partir de la valeur  $A_{260}$ .

### Rapport de pureté $A_{260}/A_{280}$

Un autre indicateur de la pureté de l'ADN est le rapport  $A_{260}/A_{280}$ , qui doit être compris entre 1,8 et 1,9. Les valeurs inférieures à 1,8 indiquent une contamination par les protéines, tandis que les valeurs supérieures indiquent une contamination par l'ARN. Toutefois, ce rapport doit être considéré avec prudence, car les contaminations conjointes par des protéines et de l'ARN peuvent se compenser et aboutir à un rapport  $A_{260}/A_{280}$  parfait.

### Électrophorèse sur gel d'agarose

Idéalement, l'ADN se doit d'être analysé sur un gel d'agarose afin d'évaluer sa qualité en termes de distribution de taille des fragments et pour vérifier la cohérence de la quantification UV-VIS, en particulier si les ratios  $A_{260}/A_{230}$  et  $A_{260}/A_{280}$  ne sont pas optimaux.

### 3 Conditions de stockage et de préparation des réactifs

*Attention : Le tampon DW contient du chlorhydrate de guanidine. Porter des gants et des lunettes !*

Conditions de stockage :

- Tous les composants du kit doivent être conservés à une température comprise entre 15 et 25 °C et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette sur le kit. Le stockage à des températures inférieures peut entraîner la précipitation des sels. En cas de précipitation, incuber le flacon pendant plusieurs minutes à environ 30–40 °C et mélanger bien jusqu'à ce que le précipité soit dissous.

Avant de commencer la procédure **NucleoSpin® gDNA Clean-up**, préparer les éléments suivants :

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

| NucleoSpin® gDNA Clean-up       |                                    |                                     |   |
|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|
| REF                             | 10 preps<br>740230.10              | 50 preps<br>740230.50               | 250 preps<br>740230.250   |
| Tampon de lavage DW (concentré) | 6 mL<br>Ajouter 14 mL<br>d'éthanol | 25 mL<br>Ajouter 60 mL<br>d'éthanol | 3 × 50 mL<br>Ajouter 110 mL<br>d'éthanol dans<br>chaque bouteille |

## 4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec les kits **NucleoSpin® gDNA Clean-up**, portez des vêtements de protection appropriés (par exemple, une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection). Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité (FDS disponibles en ligne sur [www.mn-net.com/msds](http://www.mn-net.com/msds)).



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans le tampon DB peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, ne pas ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

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

### 4.1 Élimination des déchets

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

## 5 Protocole NucleoSpin® gDNA Clean-Up

### Avant de débiter le protocole

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

#### 1 Créer les conditions de fixation de l'ADN

Ajouter **450 µL de tampon de fixation DB** à **150 µL de solution d'ADN** à purifier.

Mélanger au vortex pendant **5 s**.

Note : si le volume de l'échantillon est inférieur à 150 µL, compléter avec de l'eau jusqu'à 150 µL. Si plus de 150 µL d'échantillon doivent être traités, augmenter le Binding Buffer DB proportionnellement. Plusieurs étapes de chargement peuvent alors être nécessaires à l'étape 2.



**150 µL**  
**échantillon**  
**+ 450 µL DB**  
**Vortex 5 s**

#### 2 Fixer l'ADN

Placer une **colonne NucleoSpin® gDNA Clean-up** dans un tube collecteur (2 mL).

Charger **jusqu'à 700 µL d'échantillon** sur la colonne.

Centrifuger pendant **30 s à 11 000 x g**.

Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur



**Charger**  
**l'échantillon**



**11,000 x g**  
**30 s**

#### 3 Laver la membrane de silice

##### 1er lavage

Déposer **700 µL de tampon DW** sur la colonne NucleoSpin® gDNA-Clean-up.

Refermer puis vortexer la colonne pendant **2 s**, puis centrifuger pendant **30 s à 11 000 x g**.

Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.



**+ 700 µL DW**  
**Vortex 2 s**



**11,000 x g**  
**30 s**

##### 2ème lavage

Déposer **700 µL de tampon DW** sur la colonne NucleoSpin® gDNA-Clean-up.

Refermer puis vortexer la colonne pendant **2 s**, puis centrifuger pendant **30 s à 11 000 x g**.

Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.



**+ 700 µL DW**  
**Vortex 2 s**



**11,000 x g**  
**30 s**

**4 Sécher la membrane de silice**

Centrifuger pendant **1 minute** à **11 000 x g** et jeter le tube collecteur.

Note : des résidus de tampon de lavage contenant de l'éthanol peuvent inhiber les réactions enzymatiques.



**11,000 x g**  
**1 min**

**5 Eluer l'ADN**

Placer la NucleoSpin® gDNA Clean-up dans un nouveau tube 1,5 mL (non fourni).

Déposer **50 µL de tampon DE** sur la colonne.

Ne pas refermer la colonne et incuber pendant **1 minute** à **température ambiante**.

Refermer la colonne et centrifuger pendant **30 s** à **11 000 x g**.

Note : il est possible d'augmenter le rendement ADN en procédant à une deuxième élution. Il faut soit réappliquer le premier éluat sur la colonne, soit déposer 50 µL de nouveau tampon d'élution DE.

*L'augmentation de la température du tampon d'élution à 70 °C peut encore augmenter l'efficacité de l'élution.*



**+ 50 µL DE**  
**RT**  
**1 min**



**11,000 x g**  
**1 min**

## 6 Annexes

### 6.1 Guide de résolution des problèmes

| Problème                      | Cause possible et suggestions  |
|-------------------------------|--|
| Rendement d'ADN faible ou nul | <p><i>Mauvaise utilisation ou préparation des réactifs</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Toujours distribuer exactement les volumes de tampon indiqués dans le protocole !</li> <li>• Toujours suivre scrupuleusement les instructions données en ce qui concerne l'ordre et le mode de mélange (agitation, vortex, etc.).</li> <li>• Ajouter le volume indiqué d'éthanol (96 – 100 %) au tampon de lavage DW concentré et mélanger soigneusement (voir chapitre 5 pour plus d'informations).</li> <li>• Garder les flacons bien fermés afin d'éviter l'évaporation ou la contamination des solutions.</li> </ul> |
|                               | <p><i>Contamination par de l'éthanol ou des sels</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Veiller à sécher complètement la membrane de silice de la colonne NucleoSpin® gDNA Clean-up avant l'élution afin d'éviter la contamination par de l'éthanol provenant du tampon DW.</li> <li>• Vérifier que le tampon DW a été équilibré à la température ambiante avant utilisation. Le lavage à des températures plus basses diminue l'efficacité de l'élimination des sels.</li> </ul>  |

### 6.2 Informations de commande

| Produit                      | REF                    | Conditionnement     |
|------------------------------|------------------------|---------------------|
| NucleoSpin® gDNA Clean-Up    | 740230.10 / .50 / .250 | 10 / 50 / 250 preps |
| NucleoSpin® gDNA Clean-up XS | 740904.10 / .50 / .250 | 10 / 50 / 250 preps |
| RNase A (lyophilisée)        | 740505.50              | 50 mg               |
|                              | 740505                 | 100 mg              |
| Tubes collecteurs (2 mL)     | 740600                 | 1000                |

Visitez le site [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) pour obtenir des informations plus détaillées sur le produit.

### **6.3 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.

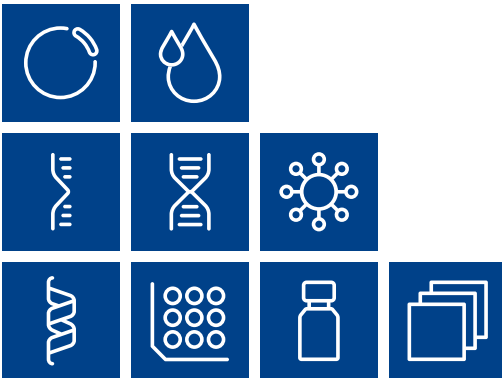
Les produits et leur application sont susceptibles de modifications. Par conséquent, veuillez contacter notre Equipe Service Technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur local pour obtenir des informations scientifiques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

Dernière mise à jour : 08/2022, Rev. 04

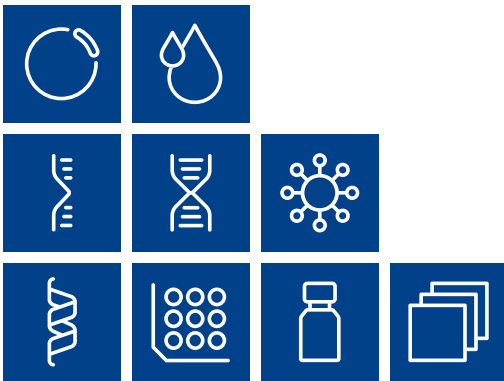
Veuillez contacter :  
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG  
Tel. : +49 24 21 969-333  
support@mn-net.com

### **6.4 Versions linguistiques et prédominance**

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



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



**MACHEREY-NAGEL**

[www.mn-net.com](http://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](mailto:info@mn-net.com)

CH +41 62 388 55 00 [sales-ch@mn-net.com](mailto:sales-ch@mn-net.com)

FR +33 388 68 22 68 [sales-fr@mn-net.com](mailto:sales-fr@mn-net.com)

US +1 888 321 62 24 [sales-us@mn-net.com](mailto:sales-us@mn-net.com)

