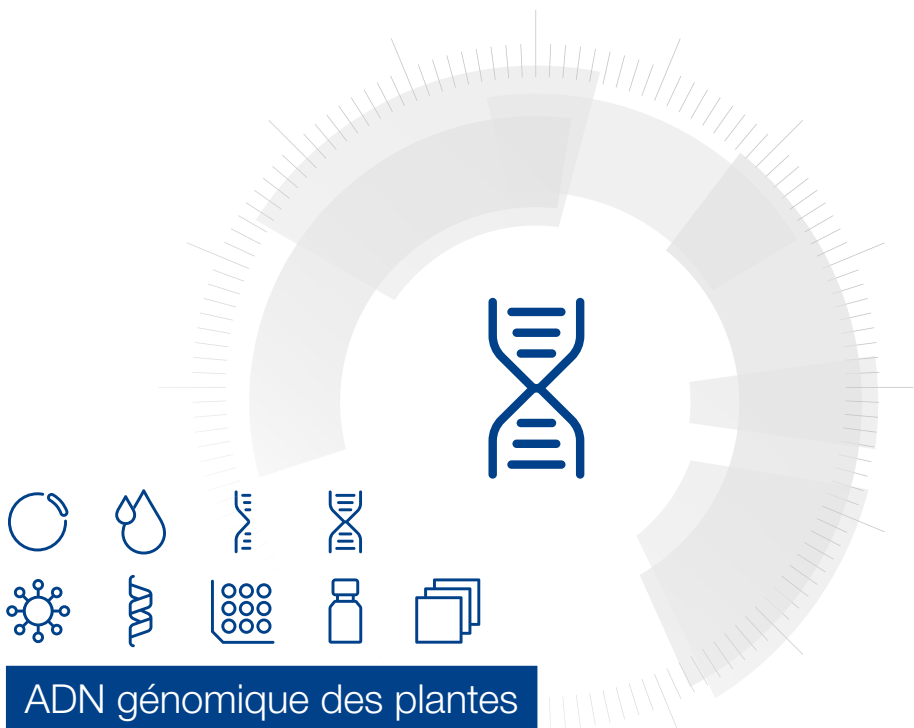


MACHEREY-NAGEL

# Manuel d'utilisation










































- NucleoSpin® Plant II
- NucleoSpin® Plant II Midi
- NucleoSpin® Plant II Maxi

April 2023 / Rev. 14

# ADN génomique des plantes

## Protocol at a glance (Rev.14)

NucleoSpin® Plant II	Mini	Midi	Maxi
<b>1 Homogénéisation des échantillons</b>	 100 mg	 400 mg	 1500 mg
	 400 µL <b>PL1</b> 10 µL RNase A 65 °C, 10 min	 1,7 mL PL1 25 µL RNase A 65 °C, 15 min	 6 mL <b>PL1</b> 100 µL RNase A 65 °C, 20 min
<b>2 Lyse cellulaire</b>	<i>Alternative</i>  300 µL <b>PL2</b> 10 µL RNase A 65 °C, 10 min 75 µL <b>PL3</b> sur glace, 5 min	<i>Alternative</i>  1,5 mL <b>PL2</b> 25 µL RNase A 65 °C, 15 min 200 µL <b>PL3</b> sur glace, 5 min	<i>Alternative</i>  5,3 mL <b>PL2</b> 100 µL RNase A 65 °C, 20 min 700 µL <b>PL3</b> sur glace, 5 min
<b>3 Filtration / Clarification du lysat</b>	  ≥ 11 000 × g, 2 min	  4 500 × g, 10 min	  4 500 × g, 10 min
<b>4 Ajustement des conditions de fixation</b>	450 µL PC	2,3 mL PC	10 mL PC
<b>5 Fixation de l'ADN</b>	  ≥ 11 000 × g, 1 min	  4 500 × g, 2 min	  4 500 × g, 2 min
<b>6 Lavage et séchage de la membrane de silice</b>	 <b>1<sup>er</sup></b> 400 µL PW1  ≥ 11 000 × g, 1 min <b>2<sup>ème</sup></b> 700 µL PW2  ≥ 11 000 × g, 1 min <b>3<sup>ème</sup></b> 200 µL PW2  ≥ 11 000 × g, 2 min	 <b>1<sup>er</sup></b> 1 mL PW1  4 500 × g, 2 min <b>2<sup>ème</sup></b> 3 mL PW2  4 500 × g, 2 min <b>3<sup>ème</sup></b> 1 mL PW2  4 500 × g, 10 min	 <b>1<sup>er</sup></b> 4 mL PW1  4 500 × g, 2 min <b>2<sup>ème</sup></b> 10 mL PW2  4 500 × g, 2 min <b>3<sup>ème</sup></b> 2 mL PW2  4 500 × g, 10 min
<b>7 Elution de l'ADN</b>	  50 µL PE 65 °C, 5 min ≥ 11 000 × g, 1 min Répéter l'étape d'élution	  200 µL PE 65 °C, 5 min 4 500 × g, 2 min Répéter l'étape d'élution	  1000 µL PE 65 °C, 5 min 4 500 × g, 2 min Répéter l'étape d'élution

---

## Sommaire

1 Composants	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur	6
1.3 A propos de ce manuel	6
2 Description du produit	7
2.1 Principe général	7
2.2 Caractéristiques du kit	8
2.3 Stockage des échantillons de plantes	9
2.4 Homogénéisation des échantillons de plantes	9
2.5 Lyse des échantillons de plantes	10
2.6 Procédures d'éluion	13
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	15
4 Instructions de sécurité	17
4.1 Elimination des déchets	17
5 Protocoles NucleoSpin® Plant II	18
5.1 ADN génomique des plantes	18
5.2 ADN génomique de champignons	22
5.3 ADN génomique provenant du sol, du compost, du fumier et des excréments d'animaux	23
6 Protocole NucleoSpin® Plant II Midi	24
7 Protocole NucleoSpin® Plant II Maxi	28
8 Annexes	32
8.1 Guide de résolution des problèmes	32
8.2 Informations de commande	34
8.3 Restrictions d'utilisation / garantie	35

# 1 Composants

## 1.1 Contenu du kit

NucleoSpin® Plant II			
REF	10 preps 740770.10	50 preps 740770.50	250 preps 740770.250
Tampon de lyse PL1	5 mL	25 mL	125 mL
Tampon de lyse PL2	4 mL	20 mL	100 mL
Tampon de précipitation PL3	1 mL	10 mL	25 mL
Tampon de fixation PC	6 mL	30 mL	125 mL
Tampon de lavage PW1	6 mL	30 mL	125 mL
Tampon de lavage PW2 (Concentré)*	6 mL	25 mL	50 mL
Tampon d'éluion PE**	13 mL	13 mL	30 mL
RNase A (lyophilisée)*	1,5 mg	6 mg	2 × 15 mg
Filtres NucleoSpin® Plant (anneaux violets)	10	50	250
Colonnes NucleoSpin® Plant II (anneaux verts)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	20	100	500
Manuel d'utilisation	1	1	1

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

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

## Contenu du kit suite

REF	NucleoSpin® Plant II Midi	NucleoSpin® Plant II Maxi
	20 preps 740771.20	10 preps 740772.10
Tampon de lyse PL1	75 mL	75 mL
Tampon de lyse PL2	60 mL	60 mL
Tampon de précipitation PL3	10 mL	10 mL
Tampon de fixation PC	60 mL	125 mL
Tampon de lavage PW1	30 mL	75 mL
Tampon de lavage PW2 (Concentré)*	25 mL	50 mL
Tampon d'éluion PE**	13 mL	30 mL
RNase A (lyophilisée)*	6 mg	10 mg
Filtres NucleoSpin® Plant Midi / Maxi (plus tubes collecteurs)	20	10
NucleoSpin® Plant II Colonnes Midi / Maxi ( plus tubes collecteurs)	20	10
Tubes collecteurs (15 mL/ 50 mL)	20	10
Manuel d'utilisation	1	1

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

\*\* Composition du tampon d'éluion PE : 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 microcentrifugation de 1,5 mL (**NucleoSpin® Plant II**) ou tubes de 15 / 50 mL (**NucleoSpin® Plant II Midi / Maxi**) pour l'élution
- Cônes de pipette jetables

### Équipement

- Pipettes manuelles
- Centrifugeuse pour microtubes (**NucleoSpin® Plant II**) ou centrifugeuse appropriée avec rotors pivotants capable d'atteindre 4 500 × g pour des tubes de 15 mL / 50 mL (**NucleoSpin® Plant II Midi / Maxi**).
- Bloc chauffant ou bain-marie pour l'incubation et le préchauffage du tampon d'élution PE (à 65 °C)
- Équipement pour le broyage et l'homogénéisation des échantillons (voir paragraphe 2.4)
- 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® Plant II / Midi / Maxi** est utilisé pour la première fois. Les utilisateurs expérimentés peuvent cependant 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](http://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

Les échantillons de plantes sont homogénéisés par traitement mécanique. L'ADN peut ensuite être extrait avec des tampons de lyse PL1 ou PL2 contenant des sels chaotropiques, des agents dénaturants et des détergents. Les lysats bruts doivent être clarifiés par centrifugation et/ou filtration à l'aide des **filtres NucleoSpin® Plant** fournis avec les kits afin d'éliminer les polysaccharides, les contaminations et les débris cellulaires résiduels. Le filtrat clarifié est mélangé au tampon de fixation PC pour créer les conditions d'une fixation optimale de l'ADN sur la membrane de silice. Après avoir chargé ce mélange sur la colonne, les contaminants sont éliminés à l'aide des tampons de lavage PW1 et PW2. L'ADN génomique peut enfin être élué avec le tampon d'éluion PE à faible teneur en sel (5 mM Tris/HCl, pH 8,5) ou de l'eau exempte de nucléase et est prêt à être utilisé pour les réactions suivantes.

## 2.2 Caractéristiques du kit

- Les kits **NucleoSpin® Plant II** sont conçus pour l'extraction d'ADN génomique à partir de tissus végétaux à l'aide de deux systèmes de tampons de lyse optimisés basés sur les méthodes CTAB et SDS établies.
- **Les filtres NucleoSpin® Plant** sont inclus pour clarifier facilement les lysats bruts.
- La RNase A est incluse pour éliminer l'ARN et permettre la quantification photométrique de l'ADN génomique pur.
- Le tampon de fixation PC optimisé et le tampon de lavage PW1 chaotropique éliminent complètement les protéines, l'ARN, les métabolites et autres inhibiteurs de la PCR.
- L'ADN élué est prêt à être utilisé pour des réactions ultérieures telles que la PCR, l'analyse de restriction, le Southern Blot, etc.
- Réserver à l'usage de la recherche

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

Paramètres	NucleoSpin® Plant II	NucleoSpin® Plant II Midi	NucleoSpin® Plant II Maxi
Technologie	Technologie membrane de silice	Technologie membrane de silice	Technologie membrane de silice
Format	Mini colonnes à centrifuger	Midi colonnes à centrifuger	Maxi colonnes à centrifuger
Échantillon	Jusqu'à 100 mg de poids humide Jusqu'à 20 mg de poids sec	Jusqu'à 400 mg de poids humide Jusqu'à 80 mg de poids sec	Jusqu'à 1500 mg de poids humide Jusqu'à 300 mg de poids sec
Clarification du lysat	Filtres NucleoSpin® Plant	Filtres NucleoSpin® Plant Midi	Filtres NucleoSpin® Plant Maxi
Taille du fragment	50 pb - environ 50 kbp	50 pb - environ 50 kbp	50 pb - environ 50 kbp
Rendement typique	1–30 µg	10–100 µg	50–300 µg
$A_{260}/A_{280}$	1.8–1.9	1.8–1.9	1.8–1.9
Volume d'élué	2 × 50 µL	200–400 µL	1000–2000 µL
Temps de préparation	30 min/6 preps	90 min/6 preps	90 min/6 preps
Capacité de fixation	50 µg	200 µg	> 500 µg

## 2.3 Stockage des échantillons de plantes

Les échantillons de plantes peuvent être conservés dans de l'éthanol, lyophilisés ou congelés. Le matériel frais peut être conservé à 4 °C pendant un jour, mais doit être congelé à -20 °C pour une conservation plus longue.

## 2.4 Homogénéisation des échantillons de plantes

Les tissus végétaux étant très robustes, la procédure de lyse est plus efficace avec des échantillons bien homogénéisés et réduits en poudre. Les méthodes appropriées comprennent tout type d'homogénéisateurs commerciaux (homogénéisateur à rotor-stator) ou des broyeurs à billes utilisant des billes d'acier ou de verre. Cependant, nous recommandons de broyer avec un mortier et un pilon en présence d'azote liquide pour obtenir des rendements optimaux.

Après homogénéisation et traitement de l'échantillon avec du tampon de lyse, le lysat brut peut être clarifié facilement soit avec des **filtres NucleoSpin® Plant**, soit par centrifugation.

### Méthodes d'homogénéisation des échantillons

- Homogénéisation avec un mortier et un pilon en présence d'azote liquide : Congeler le matériel végétal dans de l'azote liquide et ne pas laisser l'échantillon se décongeler à tout moment pendant l'homogénéisation. Prérefroidir le mortier et le pilon à l'aide d'azote liquide. Broyer soigneusement l'échantillon congelé jusqu'à obtention d'une poudre fine et remplir de temps en temps le mortier avec de l'azote liquide pour maintenir l'échantillon congelé. Utiliser une spatule préalablement refroidie pour transférer l'échantillon dans des tubes préalablement refroidis. S'assurer qu'aucun azote liquide n'est transféré ou que tout l'azote s'est évaporé avant de fermer le tube.
- Billes d'acier VA : Mettre 4–5 billes (diamètre : 7 mm) et le matériel végétal dans un tube en plastique de 15 mL (Falcon), refroidir le tube dans de l'azote liquide et vortexer pendant environ 30 secondes (p.e. avec un Multi Pulse Vortex, Schütt Labortechnik GmbH, [www.schuett-labortechnik.de](http://www.schuett-labortechnik.de)). Répéter la procédure de refroidissement et de vortex jusqu'à ce que l'ensemble du matériel végétal soit broyé en une fine poudre. Refroidir le tube une fois de plus et retirer les billes en les faisant rouler doucement ou en utilisant un aimant. Maintenir le matériel congelé pendant toute la durée de la procédure d'homogénéisation. Ne pas ajouter d'azote dans le tube, car cela entraîne l'agglomération et la perte du matériel végétal attaché aux billes.
- Les homogénéisateurs à rotor-stator ne sont utiles que pour broyer les plantes molles en présence d'un tampon de lyse. Maintenir l'homogénéisateur immergé en permanence pour réduire la formation de mousse.

## 2.5 Lyse des échantillons de plantes

### Augmentation de la quantité des échantillons

Les protocoles standard des kits **NucleoSpin® Plant II / Midi / Maxi** permettent la procédure de 10 à 1500 mg de matériel végétal. Cela permet généralement d'obtenir 1 à 300 µg d'ADN de haute qualité. Cependant, la quantité d'ADN à laquelle on peut s'attendre par mg d'échantillon dépend de la taille et de la ploïdie du génome. Par exemple, 100 mg de blé frais avec un génome hexaploïde ( $1,7 \times 10^{10}$  pb) contiennent 30 µg d'ADN, alors que la même quantité d'*Arabidopsis* avec un génome diploïde plus petit ( $1,9 \times 10^8$  pb) ne donne que 3 µg d'ADN.

Ainsi, il peut être avantageux de réaliser une procédure avec plus de masse d'échantillon recommandée (jusqu'à 5 fois) pour obtenir un rendement raisonnable d'ADN. Cependant, pour assurer une lyse complète, tous les volumes de tampon de lyse de l'étape 2 du protocole doivent être augmentés proportionnellement et de multiples étapes de chargement sont nécessaires. Des tampons de lyse supplémentaires (PL1, PL2, PL3, RNase) doivent être achetés séparément (voir informations de commande).

### Choix du système optimal de tampons de lyse

Les plantes sont très hétérogènes et contiennent des quantités variables de polyphénols, de composants acides ou de polysaccharides qui peuvent conduire à une extraction moins performante en quantité d'ADN ou dans les applications avalées. C'est pourquoi nous proposons deux tampons de lyse différents pour une procédure optimale, des rendements élevés et une excellente qualité d'ADN avec la plupart des espèces végétales.

Le protocole standard utilise le tampon de lyse PL1, qui est basé sur la procédure CTAB établie. En outre, le tampon de lyse PL2 à base de SDS est également fourni et nécessite une précipitation ultérieure des protéines par l'acétate de potassium (tampon de précipitation PL3). Pour certaines espèces végétales, les tampons de lyse PL1 et PL2 peuvent être utilisés avec des résultats similaires. Cependant, pour la plupart du matériel végétal, l'efficacité de la lyse est différente en raison de la charge négative du SDS et de la charge positive du CTAB.

Le tableau 2 donne un aperçu des données des clients sur différentes espèces de plantes et le système de tampon correspondant qui a été testé avec succès en utilisant le kit NucleoSpin® Plant II. **Important ! Pour une grande variété d'espèces végétales, les deux tampons de lyse permettent d'obtenir de bons résultats.**

Le tableau 2 n'est utilisé que pour une orientation approximative et pour indiquer quel système de tampons a déjà été testé. Afin de trouver les conditions optimales de lyse lors de la première utilisation d'un certain échantillon de plante, il est recommandé d'effectuer des préparations en parallèle d'un lot de matériel broyé de manière homogène avec les deux tampons de lyse.

**Table 2: Espèces végétales testées avec NucleoSpin® Plant II**

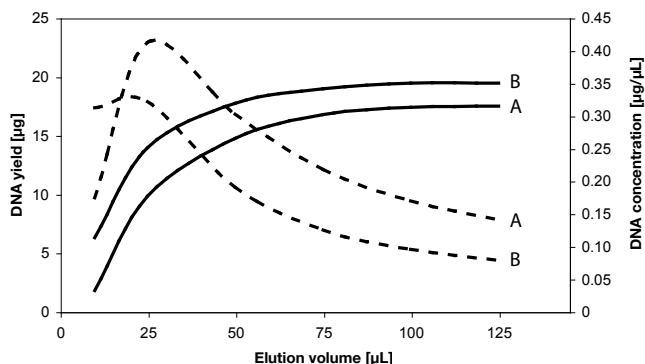
Espèces végétales	Tissu végétal / organe	Tampon de lyse testé avec succès	
		PL1	PL2
<i>Abies alba</i> (sapin)	Aiguille	✓	✓
<i>Acer griseum</i>	Feuille	✓	✓
<i>Amorphophallus titanum</i>	Feuille	✓	Non testé
<i>Apium graveolens</i> (céleri)	Corm	✓	✓
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Feuille	✓	✓
<i>Boreava orientalis</i>	Feuille, échantillon d'herbier	✓	✓
<i>Carex annectens</i>	Feuille	✓	✓
<i>Carex waponahkikensis</i>	Feuille, séchée au gel de silice	✓	✓
<i>Cleisostoma racemiferum</i>	Rachis d'inflorescence, séché sur gel de silice	✓	Non testé
<i>Doritis pulcherrima</i>	Feuille, séchée au gel de silice	✓	Non testé
<i>Eichornia azurea</i>	Feuille	✓	Non testé
<i>Encephalartos natalensis</i>	Feuille	✓	Non testé
<i>Galium aparine</i>	Feuille	✓	✓
<i>Hordeum sp.</i> (orge)	Feuille	✓	✓
<i>Isatis kotschyana</i>	Feuille, échantillon d'herbier	✓	✓
<i>Laurus azorica</i> (laurier)	Feuille	✓	Non testé
<i>Lupinus sp.</i> (lupin)	Feuille	✓	✓
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Tige	✓	✓
<i>Myagrum perfoliatum</i>	Feuille, échantillon d'herbier	✓	✓
<i>Oryza sativa</i> (riz)	Feuille	✓	✓
<i>Persea feru./caerulea</i>	Feuille	✓	Non testé
<i>Pteridium sp.</i>	Feuille	✓	Non testé
<i>Pterocarya fraxinifolia</i>	Feuille	✓	Non testé

**Table 2: Espèces végétales testées avec NucleoSpin® Plant II**

<i>Quercus cerris</i>	Feuille	✓	✓
<i>Quercus frainetto</i>	Feuille	✓	✓
<i>Rosa sp. (rose)</i>	Feuille	✓	✓
<i>Rubus fruticosus (mûre)</i>	Feuille	✓	✓
<i>Sameraria nummularia</i>	Feuille, échantillon d'herbier	✓	✓
<i>Secale sp. (seigle)</i>	Feuille	✓	✓
<i>Stereochilus sp.</i>	Feuille, séchée au gel de silice	✓	Non testé
<i>Tauscheria lasiocarpum</i>	Feuille, échantillon d'herbier	✓	✓
<i>Trachycarpus takil</i>	Feuille	✓	Non testé
<i>Trichoglottis sp.</i>	Feuille, séchée au gel de silice	✓	Non testé
<i>Triticum aestivum (blé)</i>	Feuille	✓	✓
<i>Vigna radiata (haricot mungo)</i>	Racine	✓	✓
<i>Zea mays (maïs)</i>	Feuille	✓	✓
<i>Zea mays (maïs)</i>	Céréales, séchées, broyées grossièrement	✓	✓
Mycélium fongique (non spécifié)		✓	Non testé
Algues vertes (non spécifiées)		✓	Non testé

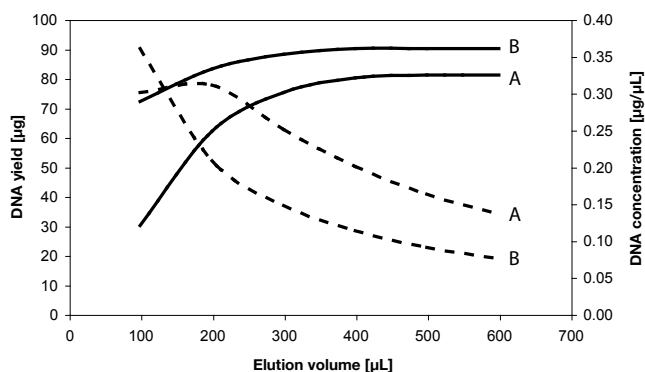
## 2.6 Procédures d'éluion

Les graphiques suivants montrent les rendements d'ADN (ligne continue) et les concentrations d'ADN résultantes (ligne pointillée) en fonction du volume du tampon d'éluion. L'éluion se fait soit en une seule étape d'éluion (A), soit en deux étapes d'éluion successives avec le volume de tampon d'éluion indiqué chacune (B).



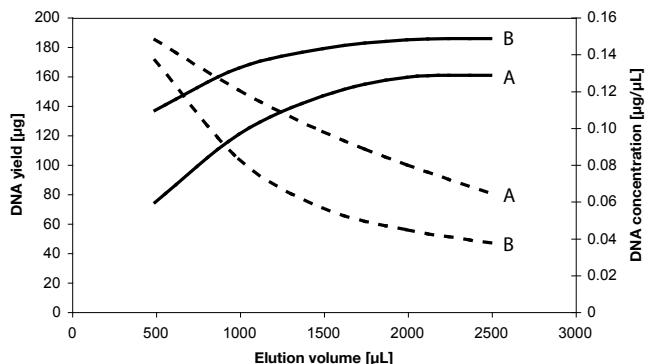
**Figure 1** Profil d'éluion du NucleoSpin® Plant II

L'ADN génomique de 100 mg de feuilles de blé fraîches a été purifié et élué une fois (A) ou deux fois (B) avec 10–125 µL de tampon PE. Le rendement et la concentration résultants sont représentés par des lignes continues et pointillées, respectivement.



**Figure 2** Profil d'éluion du NucleoSpin® Plant II Midi

L'ADN génomique de 400 mg de feuilles de blé fraîches a été purifié et élué une fois (A) ou deux fois (B) avec 100–600 µL de tampon PE. Le rendement et la concentration obtenus sont représentés par des lignes continues et pointillées, respectivement.



**Figure 3 Profil d'élution de NucleoSpin® Plant II Maxi**

L'ADN génomique de 1000 mg de feuilles de blé fraîches a été purifié et élué une fois (A) ou deux fois (B) avec 500–2500 μL de tampon PE. Le rendement et la concentration résultants sont représentés par des lignes continues et pointillées, respectivement.

Une double élution permet généralement d'obtenir plus d'ADN qu'une seule élution avec le même volume total de tampon. Ceci est particulièrement important pour les petits volumes de tampon. Cependant, les grands volumes ou l'élution en deux fois entraînent une concentration d'ADN plus faible.

La procédure d'élution standard est déjà optimisée pour obtenir un rendement de 80 à 90 % en procédant à une double élution à des températures élevées. Toutefois, si des rendements encore plus élevés, une concentration plus importante ou une vitesse maximale sont nécessaires, la procédure d'élution peut être adaptée :

**Table 3: Paramètres d'élution**

Procédure (% du rendement exp.)	NucleoSpin® Plant II	NucleoSpin® Plant II Midi	NucleoSpin® Plant II Maxi
Elution standard (85–90 %)	50 μL + 50 μL 65 °C, 5 min	200 μL + 200 μL 65 °C, 5 min	1000 μL + 1000 μL 65 °C, 5 min
Rendement maximal (95–100 %)	100 μL + 100 μL 65 °C, 5 min	400 μL + 400 μL 65 °C, 5 min	2000 μL + 2000 μL 65 °C, 5 min
Concentration élevée (75 %)	25 μL + 25 μL 65 °C, 5 min	100 μL + 100 μL 65 °C, 5 min	500 μL + 500 μL 65 °C, 5 min
Elution rapide (60–70 %)	100 μL TA/65 °C, 1–5 min	400 μL TA/65 °C, 1–5 min	2000 μL TA/65 °C, 1–5 min

### 3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

**Attention :**

*Les tampons PL1, PL2, PC et PW1 contiennent du chlorhydrate de guanidine et/ou des détergents comme le CTAB ou le SDS ! Porter des gants et des lunettes !*

*ATTENTION : Les tampons PC et PW1 contiennent du chlorhydrate de guanidine 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.*

Tous les composants du kit peuvent être conservés à une température comprise entre 15 et 25 °C et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette du kit.

Avant de débuter une procédure **NucleoSpin® Plant II**, préparer les éléments suivants :

- **Tampon de lyse PL1 / PL2 :** Vérifier s'il y a un précipité de détergent, en particulier après un stockage à des températures inférieures à 20 °C. Si nécessaire, incuber le flacon pendant plusieurs minutes à 30–40 °C et bien mélanger jusqu'à ce que le précipité soit complètement redissous.
- **Tampon de lavage PW2 :** Ajouter le volume d'éthanol (96–100 %) indiqué sur le flacon ou dans le tableau ci-dessous au **tampon PW2 concentré** avant la première utilisation. Marquer l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. Le tampon PW2 est stable à 15–25 °C pendant au moins un an.
- **RNase A :** ajouter à la **RNase A** lyophilisée le volume d'eau indiqué sur le flacon et dans le tableau ci-dessous. Conserver la solution de **RNase A** à 4 °C pendant 3 mois au maximum. Pour une conservation plus longue (jusqu'à 1 an), la solution de RNase A doit être divisée en petites aliquotes et conservée à **-20 °C**.

<b>NucleoSpin® Plant II</b>			
<b>REF</b>	<b>10 preps 740770.10</b>	<b>50 preps 740770.50</b>	<b>250 preps 740770.250</b>
Tampon de lavage PW2 (concentré)	6 mL ajouter 24 mL d' éthanol	25 mL ajouter 100 mL d'éthanol	50 mL ajouter 200 mL d'éthanol
RNase A	1,5 mg dissous dans 150 µL H <sub>2</sub> O	6 mg dissoudre dans 600 µL H <sub>2</sub> O	2 × 15 mg à dissoudre dans 1500 µL H <sub>2</sub> O chacun

	<b>NucleoSpin® Plant II Midi</b>	<b>NucleoSpin® Plant II Maxi</b>
<b>REF</b>	<b>20 preps 740771.20</b>	<b>10 preps 740772.10</b>
Tampon de lavage PW2 (concentré)	25 mL ajouter 100 mL d'éthanol	50 mL ajouter 200 mL d'éthanol
RNase A	6 mg dissoudre dans 600 µL H <sub>2</sub> O	10 mg dissoudre dans 1100 µL H <sub>2</sub> O

## 4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoSpin® Plant II**, portez des vêtements de protection appropriés (p.e. une blouse de laboratoire, des gants jetables et des 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](http://www.mn-net.com/msds)).



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans le tampon PC et le tampon PW1 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 des échantillons.

Les déchets générés par le **NucleoSpin® Plant II** 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 tampon de lyse fortement dénaturant, mais elle ne peut 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 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 NucleoSpin® Plant II

### 5.1 ADN génomique des plantes

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon de lavage PW2 et la RNase A ont été préparés conformément au paragraphe 3.
- Préchauffer le tampon d'éluion PE à 65 °C.

Note : Les kits NucleoSpin® Plant II comprennent deux tampons de lyse différents pour des résultats optimaux avec la plupart des espèces de plantes courantes. Veuillez-vous référer au paragraphe 2.5 pour choisir le système de tampon de lyse optimal pour votre échantillon de plante et pour obtenir des informations sur la façon de traiter encore plus d'échantillons que ce qui est recommandé dans le protocole suivant.

#### 1 Homogénéisation de l'échantillon

Homogénéiser jusqu'à 100 mg de poids humide ou jusqu'à 20 mg de poids sec (lyophilisé) de matériel végétal (pour les méthodes d'homogénéisation, voir le paragraphe 2.4).



Homogénéiser les échantillons

Procéder à la lyse cellulaire en utilisant le **tampon PL1** (étape 2 a) ou alternativement le **tampon PL2** (étape 2 b).

#### 2 a Lyse cellulaire à l'aide du tampon PL1

Transférer la poudre obtenue dans un nouveau tube et ajouter **400 µL de tampon PL1**. Vortexer soigneusement le mélange.



+ 400 µL PL1

+ 10 µL RNase A

65 °C,  
10 min

Note : Si l'échantillon ne peut pas être remis en suspension facilement parce que, par exemple, la poudre de plantes absorbe trop de tampon, il est possible d'ajouter du **tampon PL1**. Note : Les volumes de RNase A (étape 2 a) et de **tampon PC** (étape 4) doivent être augmentés proportionnellement.

Ajouter **10 µL** de solution de **RNase A** et mélanger soigneusement l'échantillon.

Incuber la suspension pendant 10 min à 65 °C.

Note : Pour certaines plantes, il peut être avantageux d'augmenter le temps d'incubation à 30–60 min.

Passez à l'étape 3.

**2 b Lyse cellulaire à l'aide du tampon PL2**

Transférer la poudre obtenue dans un nouveau tube et ajouter **300 µL de tampon PL2**. Vortexer soigneusement le mélange.



+ 300 µL PL2

+ 10 µL RNase A

Note : Si l'échantillon ne peut pas être remis en suspension facilement parce que, par exemple, la poudre de plantes absorbe trop de tampon, il est possible d'ajouter du **tampon PL2**. Note : Les volumes de RNase A, de tampon PL3 (étape 2b) **et de tampon PC** (étape 4) doivent être augmentés proportionnellement.

65 °C,  
10 min

Ajouter **10 µL** de solution de **RNase A** et mélanger soigneusement l'échantillon.

+ 75 µL PL3  
sur glace  
5 min

Incuber la suspension pendant **10 min à 65 °C**.

Note : Pour certaines plantes, il peut être avantageux d'augmenter le temps d'incubation à 30–60 min.

Ajouter **75 µL de tampon PL3**, mélanger soigneusement et incuber pendant 5 minutes sur la glace pour précipiter complètement le SDS.

Passez à l'étape 3.

**3 Filtration / Clarification du lysat brut**

Placer un **filtre NucleoSpin®** (anneau violet) dans un nouveau tube collecteur (2 mL) et charger le lysat sur la colonne. Centrifuger pendant **2 min à 11 000 x g**, recueillir le filtrat clarifié et jeter le filtre NucleoSpin®.



Si tout le liquide n'est pas passé sur le filtre, répéter l'étape de centrifugation.

11 000 x g,  
2 min

Si un culot est visible dans le filtrat, transférer le surnageant clarifié dans un nouveau tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).

*Alternativement, centrifuger le lysat brut pendant 5 min à 11 000 x g et transférer le surnageant dans un nouveau tube ou passer le surnageant pré-clarifié à travers le filtre NucleoSpin® pour éliminer complètement les particules solides.*

**4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN**

Ajouter **450 µL de tampon PC** et mélanger soigneusement en pipettant de haut en bas (5 fois) ou en vortexant.



+ 450 µL PC

**5 Fixation de l'ADN**

Placer une **colonne NucleoSpin® Plant II** (anneau vert) dans un nouveau tube collecteur (2 mL) et charger un maximum de 700 µL de l'échantillon.

**Charger le lysat**

Centrifuger pendant **1 min à 11 000 × g** et jeter le filtrat.

**11 000 × g,  
1 min**

La capacité de chargement maximale de la colonne NucleoSpin® Plant II est de 700 µL. Pour des volumes d'échantillons plus importants, répéter l'étape de chargement.

**6 Lavage et séchage de la membrane de silice****1<sup>er</sup> lavage**

Ajouter **400 µL de tampon PW1** à la colonne NucleoSpin® Plant II. Centrifuger pendant **1 min à 11 000 × g** et jeter le filtrat.

**+ 400 µL PW1****11 000 × g,  
1 min**

Note : Bien que le lavage avec le tampon PW1 augmente la pureté, il peut dans certains cas réduire légèrement le rendement final.

**+ 700 µL PW2****11 000 × g,  
1 min****2<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter **700 µL de tampon PW2** à la colonne NucleoSpin® Plant II. Centrifuger pendant **1 min à 11 000 × g** et jeter le filtrat.

**+ 200 µL PW2****11 000 × g,  
2 min****3<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter à nouveau **200 µL de tampon PW2** à la colonne NucleoSpin® Plant II. Centrifuger pendant **2 min à 11 000 × g** afin d'éliminer le tampon de lavage et de sécher complètement la membrane de silice.

**7 Elution de l'ADN**

Placer la colonne NucleoSpin® Plant II dans un nouveau tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).



+ 50 µL PE  
65 °C,  
5 min

Pipeter **50 µL de tampon PE (65 °C)** sur la membrane. Incuber la colonne NucleoSpin® Plant II pendant 5 min à 65 °C. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × g** pour éluer l'ADN.



**11 000 × g,**  
**1 min**

Répéter cette étape avec **50 µL de tampon PE supplémentaire (65 °C)** et éluer dans le même tube.

+ 50 µL PE  
65 °C,  
5 min

Note : Pour obtenir un rendement maximal ou des concentrations plus élevées, se référer au paragraphe 2.6 pour les procédures d'élution alternatives.

**11 000 × g,**  
**1 min**

*Le tampon d'élution PE ne contient pas d'EDTA. Si une dégradation de l'ADN est observée après le stockage de l'ADN purifié, ajuster l'EDTA dans le tampon PE à 1 mM avant l'élution.*

## 5.2 ADN génomique de champignons

**Attention** : Des réactifs et du matériel supplémentaires sont nécessaires !

- Éthanol (96–100 %)
  - Chloroforme
  - Micro-pistill
  - MN Bead Tubes Type B ou sable de mer
- 

### 1 Homogénéisation de l'échantillon

Laver **50 à 200 mg de mycélium** (poids frais) ou de matériel provenant d'une fructification de macrochampignons dans de l'**éthanol**. Le mycélium peut être obtenu à partir d'une culture liquide ou gratté (avec ou sans agar) à la surface d'un milieu solide.

Recouvrir entièrement l'échantillon d'**éthanol** et mélanger soigneusement. Un court lavage à l'éthanol est suffisant dans la plupart des cas, bien qu'une incubation d'une nuit augmente parfois le rendement en ADN (le stockage à long terme dans l'éthanol est également possible).

Retirer l'éthanol en pipettant et en pressant le mycélium.

---

### 2 Lyse cellulaire

Placer l'échantillon dans des MN Bead Tubes Type B ou dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni) avec 150 mg de **sable de mer** et ajouter **200 µL de Buffer PL1**. Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'un micro-pistil et vortexer régulièrement. Ajouter **100 µL** supplémentaires de **tampon PL1** et continuer à homogénéiser l'échantillon.

Note : Si l'échantillon ne peut pas être manipulé facilement parce que, par exemple, l'échantillon absorbe trop de tampon, il est possible d'ajouter du tampon PL1. Note : Le volume de tampon PC (étape 4) doit être augmenté proportionnellement.

*Optionnel : Si l'échantillon est riche en ARN ou en protéines, nous recommandons d'ajouter **10 µL de RNase A et/ou de protéinase K** (5–10 mg/mL de solution mère, voir Informations commande), respectivement, à la **solution de lyse de PL1** afin de minimiser les contaminants.*

Incuber pendant **10 min à 65 °C**.

*Pour certains champignons, il peut être avantageux d'augmenter le temps d'incubation à 30–60 min.*

Ajouter **100 µL de chloroforme**. Vortexer pendant 10 s et séparer les phases par centrifugation pendant **15 min à 20 000 × g**. Pipeter la couche aqueuse supérieure dans un nouveau tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).

---

Passer au paragraphe 5.1, étape 3.

---

## 5.3 ADN génomique provenant du sol, du compost, du fumier et des excréments d'animaux

**Attention** : Un équipement supplémentaire est nécessaire !

- Broyeur à billes (p.e. Pulverisette 0, Fritsch - Idar-Oberstein) ou mortier / pilon
  - Sable de mer
  - Extraction buffer: 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, 2 % (w/v) CTAB, 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (MW 40,000), pH 8.0
- 

### 1 Homogénéisation de l'échantillon

Peser **5 g de sol** ou **2 g de fumier** dans une boîte de Petri. Ajouter du tampon d'extraction jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement imbibé. Chauffer l'échantillon dans un **four à micro-ondes** (400 W) pendant quelques secondes jusqu'à ce que le tampon d'extraction mousse.

Un tampon d'extraction peut être ajouté pour maintenir l'échantillon en suspension.

---

### 2 Lyse cellulaire

Transférer l'échantillon dans un broyeur de billes ou un mortier. Ajouter **0,5 mL de sable de mer** et broyer l'échantillon.

---

### 3 Filtration / Clarification du lysat

Transférer l'échantillon homogénéisé dans un tube à centrifuger (p.e., Sorvall SS34) et centrifuger pendant **10 min à 5 000 x g**. Pipeter **300 µL** du surnageant clarifié dans un nouveau tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).

---

Passer au paragraphe 5.1, étape 3.

---

## 6 Protocole NucleoSpin® Plant II Midi

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon de lavage PW2 et la RNase A ont été préparés conformément au paragraphe 3.
- Préchauffer le tampon d'éluion PE à 65 °C.
- Une centrifugeuse avec un rotor pivotant et des godets appropriés capables d'atteindre 4 500 × g est nécessaire.

Note : les kits NucleoSpin® Plant II Midi comprennent deux tampons de lyse différents pour des résultats optimaux avec la plupart des espèces de plantes. Veuillez-vous référer à la section 2.5 pour choisir le système de tampon de lyse optimal adapté à votre échantillon de plante et pour obtenir des informations si vous souhaitez partir de plus de matériel de départ que ce qui est recommandé dans le protocole suivant.

### 1 Homogénéisation de l'échantillon

Homogénéiser jusqu'à 400 mg de poids humide ou jusqu'à 80 mg de poids sec (lyophilisé) de matériel végétal (pour les méthodes d'homogénéisation, voir le paragraphe 2.4).



**Homogénéiser les échantillons**

Procéder à la lyse cellulaire en utilisant le **tampon PL1** (étape 2 a) ou alternativement le **tampon PL2** (étape 2 b).

### 2 Lyse cellulaire à l'aide du tampon PL1

Transférer la poudre obtenue dans un nouveau tube et ajouter 1,7 mL de tampon PL1. Vortexer soigneusement le mélange.



**+ 1,7 mL de PL1**

Note : Si l'échantillon ne peut pas être remis en suspension facilement parce que, par exemple, la poudre de plante absorbe trop de tampon, il est possible d'ajouter du **tampon PL1**. Note : les volumes de **RNase A** (étape 2 a) et de **tampon PC** (étape 4) doivent être augmentés proportionnellement.

**+ 25 µL RNase A**

**65 °C,  
15 min**

Ajouter **25 µL** de solution de **RNase A** et mélanger soigneusement l'échantillon.

Incuber la suspension pendant **15 min** à **65 °C**.

Note : Pour certaines plantes, il peut être avantageux d'augmenter le temps d'incubation à 30–60 min.

Passer à l'étape 3.

**2 b Lyse cellulaire à l'aide du tampon PL2**

Transférer la poudre obtenue dans un nouveau tube et ajouter **1,5 mL de tampon PL2**. Vortexer soigneusement le mélange.

Note : Si l'échantillon ne peut pas être remis en suspension facilement parce que, par exemple, la poudre de plantes absorbe trop de tampon, il est possible d'ajouter du **tampon PL2**. Note : les volumes de **RNase A**, de **tampon PL3** (étape 2 b) et de **tampon PC** (étape 4) doivent être augmentés proportionnellement.

Ajouter **25 µL** de solution de **RNase A** et mélanger soigneusement l'échantillon.

Incuber la suspension pendant **15 min à 65 °C**.

Note : Pour certaines plantes, il peut être avantageux d'augmenter le temps d'incubation à 30–60 min.

Ajouter **200 µL de tampon PL3**, mélanger soigneusement et incuber pendant **5 min sur la glace** pour précipiter complètement le SDS.

Passer à l'étape 3.



+ 1,5 mL de PL2

+ 25 µL RNase  
A

65 °C,  
15 min

+ 200 µL PL3  
sur glace,  
5 min

**3 Filtration / Clarification du lysat brut**

Transférer le lysat dans un filtre **NucleoSpin® Midi**. Centrifuger pendant **10 min à 4 500 x g**, recueillir le filtrat clarifié et jeter le filtre NucleoSpin® Midi.

Si tout le liquide n'a pas passé le filtre, répéter l'étape de centrifugation.

Si un culot est visible dans le filtrat, transférer le surnageant clarifié dans un nouveau tube de microcentrifugation de 15 mL (non fourni).

*Alternativement, centrifuger le lysat brut pendant 5 min à 4 500 x g et transférer le surnageant dans un nouveau tube ou passer le surnageant pré-clarifié à travers le filtre NucleoSpin® Midi pour éliminer complètement les particules solides.*



4 500 x g,  
10 min

**4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN**

Ajouter **2,3 mL de tampon PC** au lysat clarifié et mélanger immédiatement en vortexant pendant **30 s**.



+ 2,3 mL PC  
Vortex 30 s

**5 Fixation de l'ADN**

Charger l'échantillon sur une **colonne NucleoSpin® Plant II Midi**.

Centrifuger pendant **2 min** à **4 500 × g** et jeter le filtrat.

La capacité de chargement maximale de la colonne NucleoSpin® Plant II Midi est de 5 mL. Pour des volumes d'échantillons plus importants, répéter l'étape de chargement.



**Charger l'échantillon**



**4 500 × g,  
2 min**

**6 Lavage et séchage de la membrane de silice****1<sup>er</sup> lavage**

Ajouter **1 mL de tampon PW1** à la colonne NucleoSpin® Plant II Midi. Centrifuger pendant **2 min** à **4 500 × g** et jeter le filtrat.

Note : Bien que le lavage avec le tampon PW1 augmente la pureté, il peut dans certains cas réduire légèrement le rendement final.



**+ 1 mL PW1**

**4 500 × g,  
2 min**



**+ 3 mL de PW2**

**4 500 × g,  
2 min**

**2<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter **3 mL de tampon PW2** à la colonne NucleoSpin® Plant II Midi. Centrifuger pendant **2 min** à **4 500 × g** et jeter le filtrat.

**+ 1 mL de PW2**

**4 500 × g,  
10 min**

**3<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter à nouveau **1 mL de tampon PW2** à la colonne NucleoSpin® Plant II Midi. Centrifuger pendant **10 min** à **4 500 × g** afin d'éliminer le tampon de lavage et de sécher complètement la membrane de silice.

**7 Elution de l'ADN**

Placer la colonne NucleoSpin® Plant II Midi dans un nouveau tube collecteur (15 mL).

Pipeter **200 µL de tampon PE (65 °C)** sur la membrane. Incuber la colonne NucleoSpin® Plant II Midi pendant **5 min** à **65 °C**. Centrifuger pendant **2 min** à **4 500 x g** pour éluer l'ADN.

Répéter cette étape avec **200 µL de tampon PE additionnel (65 °C)** et éluer dans le même tube.

Note : Pour obtenir un rendement maximal ou des concentrations plus élevées, se référer au paragraphe 2.6 pour les procédures d'élution alternatives.

*Le tampon d'élution PE ne contient pas d'EDTA. Si une dégradation de l'ADN est observée après le stockage de l'ADN purifié, ajuster l'EDTA dans le tampon PE à 1 mM avant l'élution.*



**+ 200 µL PE**  
**65 °C,**  
**5 min**

**4 500 x g,**  
**2 min**



**+ 200 µL PE**  
**65 °C,**  
**5 min**

**4 500 x g,**  
**2 min**

## 7 Protocole NucleoSpin® Plant II Maxi

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon de lavage PW2 et la RNase A ont été préparés conformément au paragraphe 3.
- Préchauffer le tampon d'éluion PE à 65 °C.
- Une centrifugeuse avec un rotor pivotant et des godets appropriés capables d'atteindre 4 500 × g est nécessaire.

Note: The NucleoSpin® Plant II Maxi kits comprennent deux tampons de lyse différents pour des résultats optimaux avec la plupart des espèces de plantes. Veuillez-vous référer à la section 2.5 pour choisir le système de tampon de lyse optimal adapté à votre échantillon de plante et pour obtenir des informations si vous souhaitez partir de plus de matériel de départ que ce qui est recommandé dans le protocole suivant.

### 1 Homogénéisation de l'échantillon

Homogénéiser jusqu'à 1500 mg de poids humide ou jusqu'à 300 mg de poids sec (lyophilisé) de matériel végétal (pour les méthodes d'homogénéisation, voir le paragraphe 2.4).



**Homogénéiser les échantillons**

Procéder à la lyse cellulaire en utilisant le **tampon PL1** (étape 2 a) ou alternativement le **tampon PL2** (étape 2 b).

### 2 Lyse cellulaire à l'aide du tampon PL1

Transférer la poudre obtenue dans un nouveau tube et ajouter **6 mL de tampon PL1**. Vortexer soigneusement le mélange.



**+ 6 mL PL1**

Note : Si l'échantillon ne peut pas être remis en suspension facilement parce que, par exemple, la poudre de plantes absorbe trop de tampon, il est possible d'ajouter du **tampon PL1**. Note : Les volumes de **RNase A** (étape 2 a) et de **tampon PC** (étape 4) doivent être augmentés proportionnellement.

**+ 100 µL RNase A**  
**65 °C,**  
**20 min**

Ajouter **100 µL** de solution de **RNase A** et mélanger soigneusement l'échantillon.

Incuber la suspension pendant **20 min à 65 °C**.

Note : Pour certaines plantes, il peut être avantageux d'augmenter le temps d'incubation à 30–60 min.

Passer à l'étape 3.

**2 b Lyse cellulaire à l'aide du tampon PL2**

Transférer la poudre obtenue dans un nouveau tube et ajouter **5,3 mL de tampon PL2**. Vortexer soigneusement le mélange.

Note : Si l'échantillon ne peut pas être remis en suspension facilement parce que, par exemple, la poudre de plantes absorbe trop de tampon, il est possible d'ajouter du **tampon PL2**. Note : les volumes de **RNase A**, de **tampon PL3** (étape 2 b) et de **tampon PC** (étape 4) doivent être augmentés proportionnellement.

Ajouter **100 µL** de solution de **RNase A** et mélanger soigneusement l'échantillon.

Incuber la suspension pendant **20 min** à **65 °C**.

Note : Pour certaines plantes, il peut être avantageux d'augmenter le temps d'incubation à 30–60 min.

Ajouter **700 µL de tampon PL3**, mélanger soigneusement et incuber pendant **5 min sur la glace** pour précipiter complètement le SDS.

Passer à l'étape 3.



+ 5,3 mL PL2

+ 100 µL RNase  
A

65 °C,  
20 min

+ 700 µL PL3  
sur glace,  
5 min

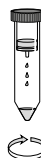
**3 Filtration / Clarification du lysat brut**

Transférer le lysat dans un filtre **NucleoSpin® Maxi**. Centrifuger pendant **10 min** à **4 500 x g**, recueillir le filtrat clarifié et jeter le filtre NucleoSpin® Maxi.

S'il reste du liquide dans le filtre, répéter l'étape de centrifugation.

Si un culot est visible dans le filtrat, transférer le surnageant clarifié dans un nouveau tube de microcentrifugation de 50 mL (non fourni).

*Alternativement, centrifuger le lysat brut pendant 5 min à 4 500 x g et transférer le surnageant dans un nouveau tube ou passer le surnageant pré-clarifié à travers le filtre NucleoSpin® Maxi pour éliminer complètement les particules solides.*



4 500 x g,  
10 min

**4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN**

Ajouter **10 mL de tampon PC** au lysat clarifié et mélanger immédiatement en vortexant pendant **30 s**.



+ 10 mL PC  
Vortex 30 s

**5 Fixation de l'ADN**

Charger l'échantillon sur une **colonne NucleoSpin® Plant II Maxi**.

Centrifuger pendant **2 min** à **4 500 × g** et jeter le filtrat.

La capacité de chargement maximale de la colonne NucleoSpin® Plant II Maxi est de 15 mL. Pour des volumes d'échantillons plus importants, répéter l'étape de chargement.



**Charger l'échantillon**



**4 500 × g,  
2 min**

**6 Lavage et séchage de la membrane de silice****1<sup>er</sup> lavage**

Ajouter **4 mL de tampon PW1** à la colonne NucleoSpin® Plant II Maxi. Centrifuger pendant 2 min à 4 500 × g et jeter le filtrat.

Note : Bien que le lavage avec le tampon PW1 augmente la pureté, il peut dans certains cas réduire légèrement le rendement final.



**+ 4 mL PW1**

**4 500 × g,  
2 min**



**+ 10 mL de PW2**

**4 500 × g,  
2 min**

**2<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter 10 mL de tampon PW2 à la colonne NucleoSpin® Plant II Maxi. Centrifuger pendant **2 min** à **4 500 × g** et jeter le filtrat.

**+ 2 mL de PW2**

**4 500 × g,  
10 min**

**3<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter à nouveau **2 mL de tampon PW2** à la colonne NucleoSpin® Plant II Maxi. Centrifuger pendant **10 min** à **4 500 × g** afin d'éliminer le tampon de lavage et de sécher complètement la membrane de silice.

**7 Elution de l'ADN**

Placer la colonne NucleoSpin® Plant II Maxi dans un nouveau tube collecteur (50 mL).

Pipeter **1000 µL de tampon PE (65 °C)** sur la membrane. Incuber la colonne NucleoSpin® Plant II Maxi pendant **5 min** à **65 °C**. Centrifuger pendant **2 min** à **4 500 x g** pour éluer l'ADN.

Répéter cette étape avec un autre **1000 µL de tampon PE (65 °C)** et éluer dans le même tube.

Note : Pour obtenir un rendement maximal ou des concentrations plus élevées, se référer au paragraphe 2.6 pour les procédures d'élution alternatives.

*Le tampon d'élution PE ne contient pas d'EDTA. Si une dégradation de l'ADN est observée après le stockage de l'ADN purifié, ajuster l'EDTA dans le tampon PE à 1 mM avant l'élution.*



**+ 1000 µL PE**  
**65 °C,**  
**5 min**

**4 500 x g,**  
**2 min**



**+ 1000 µL PE**  
**65 °C,**  
**5 min**

**4 500 x g,**  
**2 min**

## 8 Annexes

### 8.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
Rendement d'ADN faible	<p><i>L'homogénéisation du matériel végétal n'était pas suffisante</i></p> <ul data-bbox="314 349 960 564" style="list-style-type: none"> <li>• Pour la plupart des espèces, nous recommandons de broyer avec des billes d'acier ou un mortier et un pilon (voir paragraphe 2.4). Pour le broyage de la paroi cellulaire, il est important d'homogénéiser soigneusement le matériel végétal jusqu'à ce que l'échantillon soit broyé en une fine poudre.</li> <li>• Au lieu d'être congelé dans l'azote liquide, l'échantillon peut également être lyophilisé et facilement broyé à une température comprise entre 15 et 25 °C.</li> </ul>
	<p><i>Utilisation d'un tampon de lyse sous-optimal</i></p> <ul data-bbox="314 625 960 724" style="list-style-type: none"> <li>• Les efficacités de lyse du tampon PL1 (CTAB) et du tampon PL2 (SDS) sont différentes et dépendent de l'espèce végétale. Essayez les deux tampons dans une purification en parallèle pour trouver le meilleur système de détergent pour lyser votre matériel végétal.</li> </ul>
	<p><i>Le volume du tampon de lyse utilisé n'est pas optimal.</i></p> <ul data-bbox="314 785 981 908" style="list-style-type: none"> <li>• La lyse cellulaire peut être insuffisante et une trop grande quantité d'ADN peut être perdue lors de la clarification du lysat si, par exemple, le matériel sec absorbe trop de tampon de lyse. Utilisez plus de tampon de lyse et augmentez proportionnellement le volume de tampon de fixation PC.</li> </ul>
	<p><i>Le volume du tampon de fixation utilisé n'était pas optimal.</i></p> <ul data-bbox="314 968 969 1018" style="list-style-type: none"> <li>• Augmenter le tampon de fixation PC proportionnellement si plus de tampon de fixation a été utilisé.</li> </ul>
	<p><i>L'extraction de l'ADN du matériel végétal pendant la lyse a été insuffisante</i></p> <ul data-bbox="314 1078 958 1128" style="list-style-type: none"> <li>• Augmenter le temps d'incubation dans le tampon de lyse (jusqu'à une nuit).</li> </ul>
	<p><i>Elution sous-optimale</i></p> <ul data-bbox="314 1189 960 1374" style="list-style-type: none"> <li>• L'ADN peut être élué dans des volumes plus importants ou en répétant l'étape d'élution jusqu'à trois fois. Incuber la colonne NucleoSpin® Plant II avec le tampon d'élution à 65 °C pendant au moins 5 minutes.</li> <li>• Vérifier également le pH du tampon d'élution, qui doit être compris entre 8,0 et 8,5. Pour garantir un pH correct, utiliser le tampon d'élution PE fourni (5 mM Tris/HCl, pH 8,5).</li> </ul>

Problème	Causes possibles et suggestions
Colmatage du filtre NucleoSpin® ou la colonne NucleoSpin® Plant II	<p data-bbox="314 209 981 256"><i>L'échantillon était trop visqueux en raison d'une trop grande quantité d'échantillon ou présence de matière solide lors du transfert sur colonne.</i></p> <ul data-bbox="314 277 981 496" style="list-style-type: none"><li data-bbox="314 277 981 325">• Centrifuger de grandes quantités d'échantillons avant de les charger sur le filtre NucleoSpin® ou le filtre Midi / Maxi.</li><li data-bbox="314 346 981 416">• S'assurer que le lysat clarifié est absolument exempt de matières remises en suspension avant de le charger sur la colonne NucleoSpin® Plant II ou Plant II Midi / Maxi.</li><li data-bbox="314 437 981 456">• Augmenter la vitesse et la durée de la centrifugation.</li><li data-bbox="314 477 981 496">• Utiliser plus de tampon de lyse PL1 ou PL2.</li></ul>
L'ADN est dégradé	<p data-bbox="314 544 689 563"><i>L'échantillon est contaminé par la DNase</i></p> <ul data-bbox="314 584 768 603" style="list-style-type: none"><li data-bbox="314 584 768 603">• Ajuster le tampon d'élution PE à 1 mM EDTA.</li></ul> <p data-bbox="314 624 645 643"><i>Vitesse de centrifugation trop élevée</i></p> <ul data-bbox="314 663 981 711" style="list-style-type: none"><li data-bbox="314 663 981 711">• Centrifuger à une vitesse maximale de 11 000 × g. Des vitesses plus élevées peuvent entraîner un cisaillement de l'ADN.</li></ul>
La qualité de l'ADN est faible	<p data-bbox="314 735 678 754"><i>Le tampon d'élution contient de l'EDTA.</i></p> <ul data-bbox="314 775 981 823" style="list-style-type: none"><li data-bbox="314 775 981 823">• L'EDTA peut perturber les réactions ultérieures. Utiliser de l'eau ou le tampon d'élution PE fourni (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5) pour l'élution.</li></ul> <p data-bbox="314 844 527 863"><i>Élimination de l'éthanol</i></p> <ul data-bbox="314 884 981 959" style="list-style-type: none"><li data-bbox="314 884 981 959">• S'assurer que les deux dernières étapes de lavage ont été effectuées avec le tampon de lavage PW2 et que la membrane a été séchée conformément au protocole.</li></ul>

## 8.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® Plant II	740770.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250 preps
NucleoSpin® Plant II Midi	740771.20	20 preps
NucleoSpin® Plant II Maxi	740772.10	10 preps
Tampon PL1	740918	125 mL
Set de tampons PL2 / PL3 (100 mL de tampon PL2 + 25 mL de tampon PL3)	740919	1 sets
Tampon PC	740937	125 mL
Tampon PW1	740938	125 mL
Tampon PW2 concentré (pour 250 mL de tampon PW2)	740939	50 mL
RNase A	740505.50 740505	50 mg 100 mg
Protéinase K	740506	100 mg
Filtres NucleoSpin® Plant (pour la filtration des homogénats cellulaires)	740606	50
Tubes collecteurs (2 mL)	740600	1000
MN Bead TubesType A	740786.50	50
MN Bead TubesType B	740812.50	50
MN Bead TubesType C	740813.50	50
MN Bead TubesType D	740814.50	50
MN Bead TubesType E	740815.50	50
MN Bead TubesType F	740816.50	50
MN Bead TubesType G	740817.50	50
MN Bead Tube Holder	740469	1

### 8.3 Restrictions d'utilisation / garantie

Tous les produits MACHEREY-NAGEL sont conçus pour l'usage auquel ils sont destinés. Ils ne sont pas destinés à être utilisés à d'autres fins. La description de l'utilisation prévue des produits se trouve dans les notices originales des produits MACHEREY-NAGEL. Avant d'utiliser nos produits, veuillez respecter les instructions d'utilisation et les consignes de sécurité de la fiche de données de sécurité respective du produit.

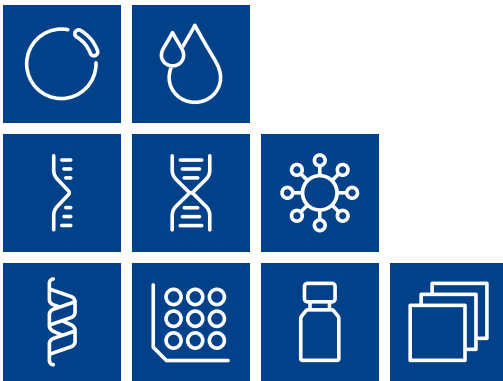
Ce produit MACHEREY-NAGEL est accompagné d'une documentation indiquant les spécifications et autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit qu'il répond aux spécifications indiquées. La garantie fournie est limitée aux spécifications des données et aux descriptions figurant dans la documentation originale de MACHEREY-NAGEL. Aucune autre déclaration ou représentation, écrite ou orale, par les employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL, à l'exception des déclarations écrites signées par un responsable dûment autorisé de MACHEREY-NAGEL, n'est autorisée. Le consommateur ne doit pas s'y fier et elles ne font pas partie d'un contrat de vente ou de cette garantie.

La responsabilité pour tous les dommages éventuels survenus en rapport avec nos produits est limitée au strict minimum, comme indiqué dans les conditions générales de vente de MACHEREY-NAGEL dans leur dernière édition, qui peuvent être consultées sur le site Web de l'entreprise. MACHEREY-NAGEL n'assume aucune autre garantie.

Les produits et leurs applications sont susceptibles d'être modifiés. Par conséquent, veuillez contacter notre équipe de service technique pour obtenir les dernières informations sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre distributeur local pour obtenir des informations scientifiques générales. Les descriptions figurant dans la documentation de MACHEREY-NAGEL sont fournies à titre d'information uniquement.

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

Veuillez contacter :  
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG  
Tél : +49 (0) 24 21-969-333  
support@mnnet.com



# 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)

