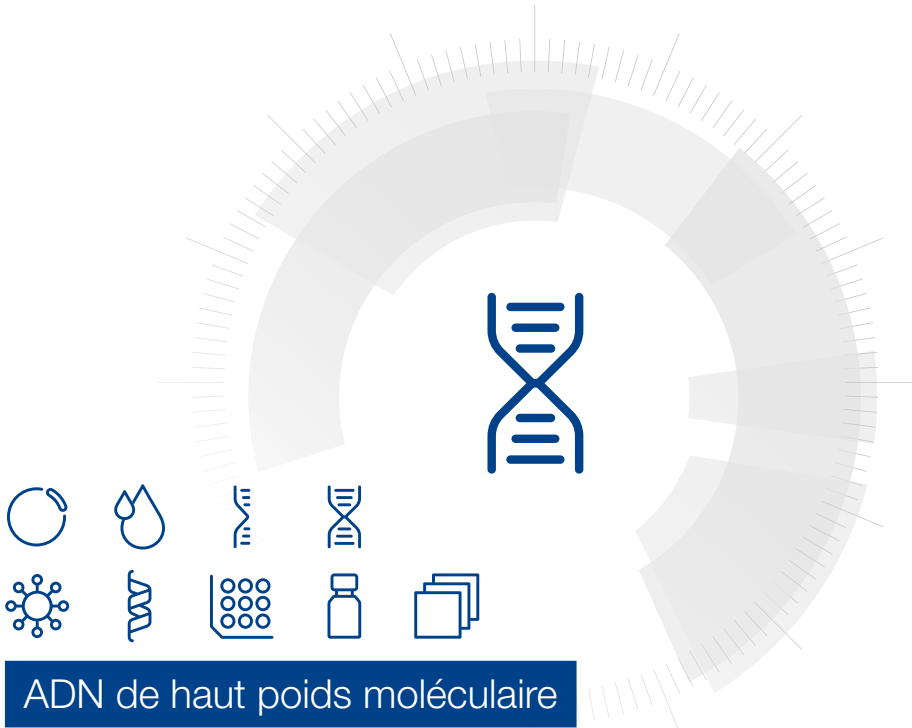


MACHEREY-NAGEL

# Manuel d'utilisation



## ADN de haut poids moléculaire

- NucleoMag® HMW DNA

Février 2024 / Rev. 01

## 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](mailto:info@mn-net.com)

### Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-333  
E-mail: [support@mn-net.com](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto:sales-ch@mn-net.com)

## Sommaire

1	Composition du kit	4
1.1	Composants	4
1.2	Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur	4
1.3	A propos de ce manuel	5
2	Description du kit	6
2.1	Principe général	6
2.2	Généralités sur la manipulation de l'ADN de haut poids moléculaire	7
2.3	Lyse des échantillons	7
2.4	Manipulation des billes magnétiques	11
2.5	Automatisation	11
2.6	Procédure d'éluion	12
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	13
4	Instructions de sécurité	14
4.1	Elimination des déchets	14
5	Protocole de purification de l'ADN de haut poids moléculaire avec le tampon de lyse HM1	15
5.1	Résumé du protocole	15
5.2	Protocole détaillé	18
6	Protocole support pour la lyse d'échantillons avec les tampons HMb et HMc	23
6.1	Protocole détaillé	23
7	Annexes	25
7.1	Guide de résolution des problèmes	25
7.2	Informations de commande	28
7.3	Restrictions d'utilisation / garantie	29

# 1 Composition du kit

## 1.1 Composants

NucleoMag® HMW DNA	
REF	1 × 96 preps 744160.1
NucleoMag® B-Beads	2 × 1.25 mL
Tampon de lyse HM1	75 mL
Tampon de lyse HMb	75 mL
Tampon de précipitation HMc	25 mL
Tampon de fixation HM2	40 mL
Tampon de lavage HM3	100 mL
Tampon de lavage HM4	125 mL
Tampon de rinçage HM5	60 mL
Tampon d'éluion HM6	13 mL
Protéinase K liquide	2 × 1.25 mL
RNase A (lyophilisée)	2 × 100 mg
Notice d'utilisation	1

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

Réactifs:

- Ethanol 70 % (v/v) (éthanol absolu ou non dénaturé)
- *Optionnel: Enzymes lytiques et tampons de réaction associés (par exemple, lyticase, zymolyase, lysozyme, cellulase, chitinase, pectinase, drisérase et autres).*
- *Optionnel: Kit de réparation enzymatique de l'ADN pour réduire la quantité d'ADN endommagé et augmenter la longueur moyenne des lectures pour les séquenceurs de troisième génération.*

Consommables:

- Cônes jetables à embout large (les cônes de pipette avec filtre sont recommandés pour éviter les contaminations croisées)
- Microtubes de 2 mL

Equipements :

- Bloc chauffant, incubateur ou bain-marie, alternativement : Thermomixer approprié tel que Eppendorf ou Starlab Thermomixer
- Microcentrifugeuse pour microtubes de 2 mL, capable d'atteindre 11 000 x g
- Mortier / pilon et de l'azote liquide

Général :

- Équipements de protection individuelle (par exemple, blouse de laboratoire, gants, lunettes)

<b>Produit</b>	<b>REF</b>	<b>Conditionnement</b>
<b>Aimant pour la séparation des billes magnétiques</b> p.e. NucleoMag® SEP Mini (adapté aux tubes de 1,5 et 2 mL)	744901	1

### 1.3 A propos de ce manuel

Nous recommandons vivement la lecture du protocole détaillé aux nouveaux utilisateurs du kit NucleoMag® HMW DNA. Les utilisateurs expérimentés, quant à eux, pourront utiliser le résumé du protocole. Ce dernier est conçu pour un suivi rapide des différentes étapes de la procédure.

Toute la documentation technique est disponible sur notre site internet [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com).

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

## 2 Description du kit

### 2.1 Principe général

Le kit **NucleoMag® HMW DNA** est conçu pour la purification d'ADN de haut poids moléculaire à partir de cellules, de tissus et de matériel végétal. En outre, la compatibilité a été démontrée pour le sang total (EDTA), la salive, les écouvillons buccaux ainsi que les échantillons de bactéries et de levures. La procédure est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques sur des billes paramagnétiques dans des conditions de tampon appropriées. La lyse de l'échantillon est réalisée par digestion enzymatique à l'aide du tampon de lyse HM1 ou HMb et de la protéinase K. Pour la fixation des acides nucléiques aux billes paramagnétiques, le tampon de fixation HM2 et les NucleoMag® B Beads sont ajoutés au lysat clarifié. Après la séparation magnétique, les billes paramagnétiques sont lavées pour éliminer les contaminants et les sels à l'aide des tampons de lavage HM3, HM4 et de l'éthanol à 70 %. L'éthanol résiduel des étapes de lavage est éliminé à l'aide du tampon de rinçage HM5. L'ADN hautement purifié est ensuite élué avec le tampon d'éluion HM6 et peut être utilisé directement pour des applications en aval. Le kit **NucleoMag® HMW DNA** peut être utilisé de manière manuelle ou automatisée sur les robots pipeteurs ainsi que la plupart des séparateurs magnétiques automatisés.

#### 2.1.1 Caractéristiques du kit

##### Résumé des caractéristiques du kit

Paramètre	NucleoMag® HMW DNA
Technologie	Technologie des billes magnétiques
Format	Billes superparamagnétiques hautement réactives
Echantillons	Cellules, tissus et matériel végétal
Quantité d'échantillons (poids humide)	Cellules: jusqu'à $1 \times 10^6$ Tissus: jusqu'à 20 mg Plante: jusqu'à 50 mg Bactéries: jusqu'à 25 mg (Gram négatives), jusqu'à 35 mg (Gram positives) Levure: jusqu'à 50 mg selon l'espèce
Rendement	Varie selon le type et la qualité de l'échantillon
Taille moyenne des fragments	$\geq 50$ kb selon la qualité, la lyse et le traitement de l'échantillon
Volume d'éluion	100 $\mu$ L
Procédure	Manuelle ou automatisée
Temps de préparation	Temps de préparation manuelle 1h pour 24 échantillons, 1,5h pour 48 échantillons. Temps de préparation automatisée: Environ 60 min sur un instrument à barreau magnétique
Utilisation	Uniquement pour la recherche

## 2.2 Généralités sur la manipulation de l'ADN de haut poids moléculaire

L'ADN est facilement cisailé et fragmenté par l'agitation mécanique. Manipuler l'ADN extrait avec des cônes à embouts larges et éviter les forces de cisaillement comme le mélange au vortex ou les pipetages répétés.

Les DNases sont éliminées lors de la préparation. Veiller à utiliser des tubes et des cônes certifiés DNases-free.

En fonction de la procédure de lyse, l'ADN élué peut être endommagé, induisant une longueur moyenne des reads plus faibles dans les réactions de séquençage de molécule unique. L'utilisation d'un kit de réparation de l'ADN peut permettre de diminuer le nombre de coupures et augmenter la longueur moyenne des reads. Consulter les informations du fournisseur du séquenceur pour des informations quant aux kits recommandés.

L'ADN de très haut poids moléculaire va augmenter la viscosité des lysats provenant des échantillons, en particulier lors de l'utilisation d'une lyse enzymatique qui permet d'obtenir des molécules de très haut poids moléculaire. En combinaison avec une quantité d'échantillon plus élevée, cette viscosité peut entraîner des difficultés lors de la remise en suspension du culot de billes magnétiques. Ajouter du tampon HM1 supplémentaire si des difficultés sont observées lors de la remise en suspension. Il est également possible de réduire la quantité d'échantillon à 25–50 % de la quantité maximale, en particulier lorsqu'on teste un échantillon pour la première fois.

## 2.3 Lyse des échantillons

### 2.3.1 Recommandations générales

La méthode de lyse cellulaire la plus douce et la plus recommandée est la lyse enzymatique. Une incubation de l'échantillon dans le tampon de lyse HM1 avec de la protéinase K entraîne la libération de l'ADN dans le mélange de lyse où l'ADN est stabilisé. Indépendamment de la procédure d'homogénéisation et de lyse de l'échantillon choisie, un temps d'incubation d'environ 30 minutes à 56 °C est suffisant pour la plupart des types d'échantillons. **Si nécessaire, le temps d'incubation peut être augmenté jusqu'à une nuit** sans effets négatifs sur l'intégrité et le poids moléculaire de l'ADN. Cela peut s'avérer utile pour les plus gros blocs de tissus solides afin de garantir une lyse complète de l'échantillon. Après la lyse complète, l'ARN résiduel est digéré par la RNase A.

En raison de l'hétérogénéité des échantillons, notamment en ce qui concerne les tissus végétaux, deux systèmes de tampon de lyse sont inclus dans le kit. Le protocole standard utilise le tampon de lyse HM1, basé sur la procédure CTAB déjà établie. De plus, le tampon de lyse HMb à base de SDS est fourni, ce qui va nécessiter une précipitation ultérieure des protéines à l'aide du tampon HMc.

Néanmoins, certains types d'échantillons nécessitent une enzyme lytique plus spécifique (par exemple, le lysozyme pour les bactéries, la zymolyase pour les levures, non fournies dans le kit). Les enzymes mentionnées ci-dessus seront actives dans le tampon de lyse HM1, mais d'autres enzymes peuvent être inactivées. Lors de l'utilisation de ces dernières, il est recommandé d'effectuer un test à petite échelle pour vérifier si l'enzyme est active dans le tampon de lyse HM1, HMb ou si elle nécessite un tampon de réaction spécifique.

**En cas d'utilisation d'une enzyme lytique spécifique**, utiliser le tampon de réaction fourni ou recommandé par le fournisseur de l'enzyme et ajouter le tampon de lyse HM1 et la protéinase K une fois la digestion enzymatique terminée.

Il convient de garder à l'esprit que des concentrations excessives de substrat (c'est-à-dire trop d'échantillon) peuvent réduire la vitesse de la réaction enzymatique. Le rapport optimal entre l'enzyme, le substrat (échantillon) et les cofacteurs nécessaires doit être déterminé de manière empirique ou selon les instructions fournies par le fournisseur de l'enzyme.

Veiller à ce que la surface de contact entre le tampon de réaction et l'échantillon soit aussi élevée que possible et agiter le mélange réactionnel en continu si possible.

Les cellules constituées de parois épaisses, comme les cellules des feuilles de plantes, ne peuvent être complètement lysées par voie enzymatique. Dans ce cas, il est recommandé de broyer l'échantillon en présence d'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Il faut toujours utiliser du matériel préalablement refroidi et ne jamais laisser l'échantillon se décongeler lors de la procédure. Le broyage de l'échantillon à l'aide d'un mortier et d'un pilon en présence d'azote liquide entraîne une distribution de la longueur des fragments en moyenne de 15 kb environ à 150 kb maximum.

Lors du broyage des bactéries à l'aide d'un mortier et d'un pilon en présence d'azote liquide, il faut veiller à ne pas surcharger les billes magnétiques par la suite. Les cellules intactes et une quantité excessive d'échantillon compliquent la remise en suspension des billes magnétiques et peuvent entraîner des puretés et des rendements faibles. Il est préférable de lyser les bactéries et les levures par voie enzymatique.

Le broyage avec des billes peut également être une option pour les **cellules de bactéries** ou de **levures**. La longueur moyenne des fragments peut diminuer avec l'utilisation d'un broyage mécanique des cellules jusqu'à environ 50 kb ou moins, mais le rendement total augmente.

Les appareils à ultrasons ou à haute pression pour la lyse cellulaire entraîne également une diminution de la longueur des fragments et ne sont donc pas recommandés.

## 2.3.2 Lyse de tissus et de cellules

Les cellules ou les tissus solides tels que les échantillons provenant de biopsie peuvent être lysés directement dans le tampon de lyse HM1 sans broyage mécanique. Néanmoins, l'échantillon solide doit être coupé en petits morceaux. Plus les morceaux de tissu sont petits, plus la lyse cellulaire est rapide et moins l'influence des DNases et des radicaux d'oxygène est importante.

## 2.3.3 Lyse d'échantillon de plante

Les cellules végétales (par exemple, les feuilles ou les racines) expriment une paroi cellulaire épaisse qui peut être recouverte de cire ou de lignine. Si aucune enzyme lytique spécialisée n'est disponible, il est recommandé de broyer les cellules à l'aide d'un mortier et d'un pilon sous azote liquide.

Les plantes sont très hétérogènes et contiennent des quantités variables de polyphénols, de composants acides ou de polysaccharides, ce qui peut entraîner une extraction d'ADN

ou des performances sous-optimales dans les applications en aval. C'est pourquoi deux systèmes de tampons de lyse sont inclus dans ce kit. Le protocole standard utilise le tampon de lyse HM1, basé sur la procédure CTAB déjà établie. En outre, le tampon de lyse HMb à base de SDS, qui nécessite une précipitation ultérieure des protéines à l'aide du tampon HMc, est fourni. Pour certaines espèces végétales, les tampons de lyse HM1 et HMb peuvent être utilisés avec des résultats similaires. Cependant, pour la plupart des matériaux végétaux l'efficacité de la lyse est différente en raison de la charge négative du SDS et de la charge positive du CTAB. De plus des agents réducteurs, tels que le TCEP, peuvent être utilisés en complément du tampon HMb. Pour une grande variété d'espèces végétales, le tampon de lyse HM1 donne de bons résultats.

### 2.3.4 Lyse d'échantillon liquide (p.e., échantillons de sang et de salive)

Les échantillons liquides, tels que les échantillons de sang total (EDTA) ou de salive, peuvent être directement soumis à une lyse enzymatique en combinaison avec les tampons de lyse respectifs (par exemple HM1 pour la salive ou BQ1 pour les échantillons de sang total (EDTA)). Par conséquent, 200 µL d'échantillon de sang total EDTA sont combinés avec 25 µL de protéinase K liquide et 200 µL de tampon de lyse BQ1 (REF 740923). Le mélange est ensuite incubé pendant 10 min sous agitation modérée à température ambiante. Procéder ensuite à l'étape 4 (digestion de l'ARN) du protocole détaillé au paragraphe 5.2.

### 2.3.5 Lyse des bactéries

Les échantillons microbiens tels que les bactéries Gram positives et Gram négatives peuvent être difficiles à lyser en raison de la solidité et de la complexité de leur paroi cellulaire. Il est donc recommandé d'utiliser des enzymes spécifiques pour digérer ces parois cellulaires. Les **bactéries**, en particulier les bactéries Gram positives, peuvent être lysées par le **lysozyme**, qui n'est pas inclus dans le kit et doit être fourni par l'utilisateur. **Consulter le protocole fourni par le fabricant ou le vendeur de l'enzyme** ou contacter MACHEREY-NAGEL (support@mn-net.com) en cas de doute sur l'utilisation d'enzymes lytiques spécialisées.

Il est recommandé d'utiliser le lysozyme sous la forme d'une solution mère de 100 mg/ml.

Récolter les bactéries par centrifugation et remettre le culot en suspension (jusqu'à 25 mg pour les bactéries Gram négatives, jusqu'à 35 mg pour les bactéries Gram positives) dans 600 µL de tampon de lyse HM1. Ajouter 25 µL de solution mère de lysozyme (100 mg/ml), mélanger et incubé pendant au moins 30 à 60 min à 37 °C. Ajouter ensuite 25 µL de protéinase K liquide et poursuivre l'incubation à 56 °C.

### 2.3.6 Lyse des levures

Les échantillons de levures peuvent être difficiles à lyser en raison de la structure très complexe et protéique de leurs parois cellulaires. Il est donc recommandé d'utiliser des enzymes spécifiques pour digérer ces parois cellulaires. **Les cellules de levure** peuvent être lysées par la **zymolyase (lyticase)**, qui n'est pas incluse dans le kit et doit être fournie par l'utilisateur. **Consulter le protocole fourni par le fabricant ou le vendeur de l'enzyme** ou contacter MACHEREY-NAGEL (support@mn-net.com) en cas de doute sur l'utilisation d'enzymes lytiques spécialisées.

Il est recommandé d'utiliser la zymolyase sous la forme d'une solution mère de 100 mg/mL.

Récolter la levure par centrifugation et remettre le culot (jusqu'à 30 mg) en suspension dans 600 µL de tampon de lyse HM1. Ajouter 10 µL de zymolyase (50 U), mélanger et incuber pendant au moins 60 à 120 minutes à 37 °C, de préférence sous agitation constante. Ajouter ensuite 25 µL de protéinase K liquide et poursuivre l'incubation à 56 °C.

### 2.3.7 Procédure de lyse alternative

En raison de la grande variété d'échantillons et d'espèces, qui entraînent des quantités variables de polyphénols, de composants acides, de polysaccharides, d'acides gras ou une composition variable des parois cellulaires, deux systèmes de tampons de lyse sont inclus dans ce kit. Le protocole standard utilise le tampon de lyse HM1, basé sur la procédure CTAB établie. De plus, le tampon de lyse HMb, basé sur le SDS, est fourni. Ce tampon de lyse peut être combiné à une précipitation ultérieure des protéines à l'aide du tampon HMc (recommandé pour le matériel végétal si l'on utilise le tampon HMb) ou peut être utilisé seul comme tampon de lyse sans étape de précipitation (par exemple pour les bactéries).

Le tampon HM1 dénature de nombreuses protéines et réduit la vitesse de réaction jusqu'à l'inhibition complète. Néanmoins, la vitesse de réaction s'est avérée suffisamment élevée pour la protéinase K, la RNase A, la zymolyase et le lysozyme dans le tampon HM1. En cas d'utilisation d'une enzyme différente, toujours utiliser un tampon de réaction recommandé pour cette enzyme. Se référer aux recommandations du fabricant ou à la littérature pour la composition du tampon et les rapports nécessaires entre l'échantillon et l'enzyme ainsi que les conditions d'incubation. Ne pas combiner d'autres enzymes avec la protéinase K. Pour éviter la dénaturation ou la dégradation de ces enzymes par les composants du tampon HM1 (détergents, protéinase K), il est recommandé d'effectuer la lyse dans le tampon de réaction fourni ou recommandé par le fabricant avant l'ajout du tampon HM1 et de la protéinase K. Ne pas dépasser un volume total de lyse de 600 µL.

## 2.4 Manipulation des billes magnétiques

### Distribution des billes

Une distribution homogène des billes dans les puits de la plaque de séparation est essentielle pour une bonne reproductibilité. Avant de distribuer les billes, veiller à bien les resuspendre. Agiter le flacon ou placer le sur un vortex brièvement. Le mélange préliminaire des billes magnétiques avec le tampon de fixation permet une distribution plus homogène des billes dans les différents puits de la plaque de séparation. Lors de l'automatisation, une étape de mélange des billes et du tampon de fixation dans les réservoirs avant leur distribution dans les plaques de séparation est recommandée afin de s'assurer que les billes demeurent bien en suspension.

### Resuspension des billes

La remise en suspension des billes magnétiques à chaque étape est essentielle pour une extraction fiable. La remise en suspension peut être réalisée en mélangeant avec la pipette et des cônes à embout large ou à l'aide d'un dispositif d'agitation. L'efficacité de la remise en suspension sur un dispositif d'agitation dépend de la vitesse et du diamètre orbital. Il est recommandé d'utiliser un dispositif d'agitation avec un diamètre orbital d'au moins 2 à 3 mm (par exemple, Eppendorf Thermoshaker). La partie supérieure du NucleoMag® SEP Mini peut être utilisée pour faciliter la remise en suspension des billes magnétiques. Les parties supérieures de deux NucleoMag® SEP Mini peuvent être combinées, ce qui permet d'obtenir une empreinte de plaque de microtitration qui s'adapte aux dispositifs d'agitation de plaques courants. La rotation des tubes de 2 mL avec la partie supérieure du NucleoMag® SEP Mini et l'agitation facilitent une remise en suspension douce des billes.

Lors de l'utilisation d'un agitateur de plaques en combinaison avec une plaque à puits profonds pour les étapes de fixation, de lavage et d'éluion, les réglages de vitesse doivent être soigneusement ajustés pour chaque plaque de séparation et chaque agitateur spécifique afin d'éviter la contamination croisée d'un puits à l'autre.

## 2.5 Automatisation

### Système automatisé de manipulation de liquide

Le kit NucleoMag® HMW DNA peut être automatisé sur diverses plateformes de manipulation de liquides en utilisant des cônes de pipette à embouts larges et le NucleoMag® SEP (MN REF : 744900) en combinaison avec le Square-well Block (MN REF : 740481) et un dispositif d'agitation approprié pour une remise en suspension optimale et douce pendant les étapes de fixation, de lavage et d'éluion. En outre, un bras «gripper» est nécessaire pour une utilisation entièrement automatisée sur les stations de travail de manipulation des liquides. Le bras doit transférer la plaque vers le séparateur magnétique pour la séparation des billes, puis vers le module d'agitation pour la remise en suspension des billes. La remise en suspension complète des billes magnétiques au cours de l'extraction est essentielle pour une performance fiable et doit être vérifiée lors de la validation sur les systèmes de manipulation des liquides. Les billes peuvent également être remises en suspension dans le tampon par un pipetage successif doux à l'aide d'embouts larges.

## Systèmes à barreau magnétique

Le kit NucleoMag<sup>®</sup> HMW DNA peut être automatisé sur des systèmes à barreaux magnétiques tels que l'IsoPure Mini, le MagnetaPure32+ ou le KingFisher<sup>®</sup> en utilisant des consommables compatibles.

Afin de réduire l'impact des forces de cisaillement, des mouvements doux des tiges magnétiques sont recommandés.

Veuillez contacter notre service d'assistance pour obtenir de l'aide concernant l'automatisation de nos kits.

## 2.6 Procédure d'élution

L'ADN purifié peut être élué directement avec le tampon d'élution HM6 fourni (5 mM Tris/HCl, pH 8,5). L'élution peut être effectuée dans un volume  $\geq 100 \mu\text{L}$ . Il est essentiel de recouvrir complètement les billes NucleoMag<sup>®</sup> B Beads avec le tampon d'élution pendant l'étape d'élution. Le volume de tampon d'élution distribué dépend du système de séparation magnétique (par exemple, la position du culot à l'intérieur de la plaque de séparation). Pour une élution efficace, le culot de billes magnétiques doit être complètement remis en suspension dans le tampon d'élution. Pour certains séparateurs magnétiques, des volumes d'élution plus importants peuvent être nécessaires pour couvrir la totalité du culot. Une aspiration lente et douce est recommandée pour éviter que les billes ne soient entraînées dans l'éluat final. En outre, une deuxième séparation magnétique est recommandée pour réduire la présence des billes dans l'éluat.

### 3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

**Attention :** Les tampons HM3 et HM4 contiennent des sels chaotropiques ! Porter des vêtements de protection, des gants et des lunettes !

- Conserver le tampon HM2 à 4 °C dès son arrivée.
- Tous les autres composants du kit NucleoMag® HMW DNA doivent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette de l'emballage.
- Une fois les enzymes ouvertes, il est recommandé de les conserver à 4 °C.
- Tous les tampons sont livrés prêts à l'emploi.

Avant de commencer le protocole NucleoMag® HMW DNA, préparer les éléments suivants :

Tampon de lyse HM1/HMb : Vérifier qu'il n'y ait pas de précipité de détergent, en particulier après un stockage à des températures inférieures à 20 °C. Si nécessaire, incuber les flacons pendant plusieurs minutes à 30–40 °C et bien mélanger jusqu'à ce que le précipité soit complètement redissous.

RNase A : Avant la première utilisation, ajouter 1 mL d'eau à chaque flacon de RNase A lyophilisée. Conserver la RNase A à 4 °C.

## 4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit NucleoMag® HMW DNA, 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 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 HM3 et le perchlorate de sodium dans le tampon HM4 peuvent former des composés très réactifs lorsqu'ils sont combinés à de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

Les déchets générés par le kit **NucleoMag® HMW DNA** n'ont pas été testés pour 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 et du traitement à la protéinase K, 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 Protocole de purification de l'ADN de haut poids moléculaire avec le tampon de lyse HM1

### 5.1 Résumé du protocole

Lire attentivement le protocole détaillé (paragraphe 5.2) ainsi que le paragraphe 2 avant de commencer la procédure. Ce protocole est conçu pour des séparateurs magnétiques avec des aimants statiques (par exemple, NucleoMag® SEP Mini). Il est recommandé d'utiliser des microtubes de 2 mL au lieu de tubes de 1,5 mL. La purification de l'ADN peut également être effectuée dans une plaque à puits profonds avec des séparateurs magnétiques appropriés (par exemple, Square-well Block et NucleoMag® SEP). Ce protocole est conçu pour une utilisation manuelle.

Pour les exigences matérielles et les consommables supplémentaires, se référer au paragraphe 1.2.

- Avant de commencer la préparation :
- Consulter les paragraphes 2.2 et 2.3 pour plus d'informations sur la quantité de matériel de départ et la préparation de l'échantillon.
- Vérifier si des cônes de pipette à embout large et des microtubes de 2 mL sont utilisés.
- Vérifier la présence de précipités dans le tampon de lyse HM1 conformément au chapitre 3.
- Vérifier si l'éthanol 70 % a été préparé conformément au paragraphe 1.2.
- Prendre des précautions et porter l'équipement de protection nécessaire lorsque vous travaillez avec de l'azote liquide.

<b>1</b>	<b>Préparation et lyse de l'échantillon</b>	<p>Préparer l'échantillon</p> <p>600 µL HM1</p> <p>25 µL de Protéinase K Liquide</p> <p>Mélanger par inversion ou par pipetage</p> <p>56 °C, 30–150 min, agiter avec précaution (p.e. 900 rpm)</p> <p><b>Note :</b> consulter les paragraphes 5.2 et 2.3. pour des recommandations alternatives concernant la lyse.</p>
<b>2</b>	<b>Précipitation des débris</b>	<p>11,000 x g, 1 min</p> <p>Transférer jusqu'à 500 µL dans un nouveau microtube 2 mL</p>

<p><b>3 Digestion des ARN</b></p>	<p>20 µL de RNase</p> <p>Mélanger par inversion ou par pipetage</p> <p>15 min, TA</p> <p>Centrifuger brièvement le tube de 2 mL pour éliminer les gouttes du couvercle.</p>
<p><b>4 Fixation de l'ADN aux billes NucleoMag® B-Beads</b></p>	<p>25 µL NucleoMag® B-Beads</p> <p>400 µL HM2</p> <hr/> <p>Mélanger par pipetages successifs</p> <p>(Optionnel : mélanger par agitation pendant 5 min, 1000 rpm à température ambiante)</p> <p>Note : Une formation de phase peut se produire au cours de cette étape. Selon le type d'échantillon, une remise en suspension complète peut ne pas être possible.</p> <hr/> <p>Retirer le surnageant après 5 min de séparation</p>
<p><b>5 Lavage avec le tampon HM3</b></p>	<p>Retirer le microtube du NucleoMag® SEP Mini</p> <p>900 µL HM3</p> <hr/> <p><b>Resuspendre:</b> Mélanger par pipetages successifs (10 x) (Optionnel : mélanger par agitation pendant 2 min, 1000 rpm à TA)</p> <hr/> <p>Retirer le surnageant après 2 min de séparation</p>
<p><b>6 Lavage avec le tampon HM4</b></p>	<p>Retirer le microtube du NucleoMag® SEP Mini</p> <p>900 µL HM4</p> <hr/> <p><b>Resuspendre:</b> Mélanger par pipetages successifs (10 x) (Optionnel : mélanger par agitation pendant 2 min, 1000 rpm à TA)</p> <hr/> <p>Retirer le surnageant après 2 min de séparation</p>
<p><b>7 1er lavage avec l'EtOH 70 %</b></p>	<p>Retirer le microtube du NucleoMag® SEP Mini</p> <p>900 µL d'EtOH 70 %</p> <hr/> <p><b>Resuspendre:</b> Mélanger par pipetages successifs (10 x) (Optionnel : mélanger par agitation pendant 2 min, 1000 rpm à TA)</p>

		Retirer le surnageant après 2 min de séparation
<b>8</b>	<b>2ième lavage avec l'EtOH 70 %</b>	Retirer le microtube du NucleoMag® SEP Mini 900 µL d'EtOH 70 %  <b>Resuspendre:</b> Mélanger par pipetages successifs (10 x) <i>(Optionnel : mélanger par agitation pendant 2 min, 1000 rpm à TA)</i>
		Retirer le surnageant après 2 min de séparation
	<b>Rinçage des billes</b>	Laisser le microtube sur le NucleoMag® SEP Mini 600 µL HM5  Incuber pour 30–60 sec  Note: Ne pas remettre en suspension les billes dans le tampon HM5
		Retirer le surnageant
<b>9</b>	<b>Elution de l'ADN</b>	Retirer le microtube du NucleoMag® SEP Mini 100 µL HM6  <b>Resuspendre:</b> Mélanger par pipetages successifs (10 x) <i>(Optionnel : mélanger par agitation pendant 2 min, 1000 rpm à TA)</i>  Séparer 2 min et transférer l'ADN dans la plaque d'éluat.  Optionnel : Effectuer une seconde séparation pour éliminer les billes magnétiques résiduelles de l'éluat.

## 5.2 Protocole détaillé

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques dotés d'aimants statiques (par exemple, NucleoMag® SEP Mini). Il est recommandé d'utiliser des microtubes de 2 mL au lieu de tubes de 1,5 mL. La purification de l'ADN peut également être effectuée dans une plaque à puits profonds avec des séparateurs magnétiques appropriés (par exemple, Square-well Block et NucleoMag® SEP). Ce protocole est conçu pour une utilisation manuelle.

Pour les exigences matérielles et les consommables supplémentaires, se référer aux paragraphes 1.2.

Avant de commencer la préparation :

- Consulter les paragraphes 2.2 et 2.3 pour plus d'informations sur la quantité de matériel de départ et la préparation du matériel d'échantillonnage.
- Vérifier si des cônes de pipette à embout large et des microtubes de 2 mL sont disponibles.
- Vérifier la présence de précipités dans le tampon de lyse HM1 conformément au paragraphe 3.
- Vérifier si l'éthanol à 70 % a été préparé conformément au paragraphe 1.2.
- Porter l'équipement de sécurité nécessaire pour travailler avec de l'azote liquide.

---

### 1 Préparation des échantillons

- Cellules : Récolter jusqu'à  $1 \times 10^6$  cellules cultivées dans un tube de 2 mL (non fourni).
  - Tissu solide : Couper le tissu solide en petits morceaux et transférer jusqu'à 20 mg dans un tube de 2 mL (non fourni).
  - Tissu végétal : Homogénéiser environ 20 à 50 mg de matériel végétal et les transférer dans un tube de 2 mL.
  - Bactéries : Récolter jusqu'à 25 mg (poids humide) de bactéries Gram négatives ou jusqu'à 35 mg (poids humide) de bactéries Gram positives dans un tube de 2 mL.
  - Levures : Récolter jusqu'à 30 mg (poids humide) de cellules de levure dans un tube de 2 mL.
-

## 2 Lyse de l'échantillon

Ajouter **600 µL de tampon de lyse HM1** à l'échantillon dans le tube de 2 mL et le remettre doucement en suspension si nécessaire.

Ajouter 25 µL de protéinase K liquide, mélanger par agitation douce ou par inversion et incuber pendant 30 à 150 min à 56 °C. Suivre les recommandations ci-dessous pour les différents types d'échantillons :

- Cellules : 60 min
- Tissu solide : 150 min
- Tissu végétal : 30 min
- Bactéries : Incuber pendant au moins 30 min avec 25 µL de lysozyme (solution mère de 100 mg/ml) à 37 °C avant d'ajouter la protéinase K liquide. Ajouter la protéinase K liquide et incuber pendant 30 min à 56 °C.
- Levure : Incuber pendant au moins 60 min avec 10 µL de zymolyase (50 U) à 37 °C avant d'ajouter la protéinase K liquide. Ajouter la protéinase K liquide et incuber pendant 30 min à 56 °C.

*Une agitation continue et modérée (p.e. 900 rpm) du lysat est souhaitable, mais pas forcément nécessaire. Mélanger les lysats par inversion ou rotation lente de temps en temps.*

Note : Voir la paragraphe 2.2 pour plus d'informations sur la quantité de matériel de départ et la procédure de lyse recommandée.

---

## 3 Précipitation des débris

Centrifuger pendant for **1 min** at **11,000 x g**.

**Transférer** avec précaution jusqu'à 500 µL dans un nouveau microtube de 2 mL (non fourni).

Note : Transférer autant de lysat que possible dans le tube de 2 mL. Éviter de transférer du matériel provenant du culot ou du matériel qui flotte à la surface du lysat. Les fibres ou les enveloppes présentes dans le surnageant peuvent obstruer l'embout de la pipette. Aspirer le surnageant lentement et avec précaution.

---

## 4 Digestion des ARN

Ajouter **20 µL de RNase A** à chaque échantillon et mélanger en retournant le tube plusieurs fois.

Incuber pendant 15 min à température ambiante.

**Centrifuger brièvement le tube de 2 mL pour éliminer les gouttes des couvercles (centrifugation courte uniquement).**

---

## 5 Fixation de l'ADN sur les billes NucleoMag® B Beads

Ajouter **25 µL de billes NucleoMag® B-Beads** et **400 µL de tampon de fixation HM2**. Mélanger par pipetages successifs 10 fois à l'aide de cônes de pipettes à embout large et incubé pendant 5 min à température ambiante.

Note : Remettre en suspension les billes NucleoMag® B-Beads avant de les utiliser. Vortexer le flacon de stockage jusqu'à ce qu'une suspension homogène soit formée.

Note : La viscosité élevée du tampon HM2 peut entraîner la formation d'une phase. En fonction du type et de la quantité d'échantillon, une remise en suspension complète des billes peut ne pas être possible pendant toute la durée de l'incubation.

Pipeter doucement afin d'éviter la formation de mousse. En cas d'utilisation de pipettes électroniques, n'utiliser que 40 % du volume total comme volume de mélange.

Alternativement, remettre en suspension les billes en agitant pendant **5 min** à 1000 rpm en utilisant les deux parties supérieures du NucleoMag® SEP Mini (voir paragraphe 2.4).

**Note : consulter le paragraphe 2.4 pour les recommandations concernant la remise en suspension des billes.**

Placer les tubes de 2 mL dans le séparateur magnétique NucleoMag® SEP Mini ou déplacer la partie supérieure du NucleoMag® SEP Mini contenant les échantillons de l'agitateur sur la base du séparateur.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi du tube en plaçant le tube de 2 mL sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP Mini. Attendre au moins 5 min jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

Note : Ne pas perturber les billes sur l'aimant lors de l'aspiration du surnageant. Les billes sur l'aimant ne sont parfois pas visibles à cette étape. Prélever le surnageant du côté opposé du tube.

---

## 6 Lavage avec le tampon HM3

Retirer la partie supérieure du NucleoMag® SEP de la base du support magnétique.

Ajouter **900 µL de tampon HM3 directement sur** le culot de billes magnétiques et remettre les billes en suspension par pipetage répété 10 fois à l'aide de cônes de pipettes à embout large.

Il est également possible de remettre les billes en suspension par agitation pendant 2 min à 1000 rpm.

Séparer les billes magnétiques en plaçant la partie supérieure sur la base du support NucleoMag® SEP Mini. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 7 Lavage avec le tampon HM4

Retirer la partie supérieure du NucleoMag® SEP Mini de la base du support magnétique.

Ajouter **900 µL de tampon HM4 directement sur** le culot de billes magnétiques et remettre les billes en suspension par pipetages successifs 10 fois à l'aide de cônes de pipette à embout large.

Il est également possible de remettre les billes en suspension en les agitant pendant 2 min à 1000 rpm.

Séparer les billes magnétiques en plaçant la partie supérieure sur la base du support NucleoMag® SEP Mini. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 8 1<sup>er</sup> lavage avec de l'éthanol à 70 %

Retirer la partie supérieure du NucleoMag® SEP Mini de la base du support magnétique.

Ajouter **900 µL de tampon à 70 % d'éthanol directement sur** le culot de billes magnétiques et remettre les billes en suspension par pipetages successifs 10 fois à l'aide de cônes de pipette à embout large.

Il est également possible de remettre les billes en suspension en les agitant pendant 2 min à 1000 rpm.

Séparer les billes magnétiques en plaçant la partie supérieure sur la base du support NucleoMag® SEP Mini. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

**9 2<sup>ème</sup> lavage avec de l'éthanol à 70 %**

Retirer la partie supérieure du NucleoMag® SEP Mini de la base du support magnétique.

Ajouter **900 µL de tampon à 70 % d'éthanol directement** sur le culot de billes magnétiques et remettre les billes en suspension par pipetage répété 10 fois à l'aide de cônes de pipette à embout large.

Il est également possible de remettre les billes en suspension en les agitant pendant 2 min à 1000 rpm.

Séparer les billes magnétiques en plaçant la partie supérieure sur la base du support magnétique NucleoMag® SEP Mini. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

Note : Retirer tout le surnageant. Utiliser un cône de pipette de faible volume pour éliminer les traces d'éthanol à 70 %.

---

**10 Rincer les billes magnétiques**

Laisser la partie supérieure du NucleoMag® SEP Mini sur la base du support magnétique.

Ajouter délicatement **600 µL de HM5** sur la paroi opposée du culot de billes magnétiques et incubé pendant 45 à 60 s tout en laissant les billes sur l'aimant. Aspirer et jeter le surnageant.

**Note : Ne pas remettre les billes en suspension dans le tampon HM5.**

**Il est également possible de sécher les billes magnétiques à l'air** (avec le bouchon du tube ouvert) pendant **10 à 15 min** à température ambiante.

---

**11 Éluion de l'ADN**

Retirer la partie supérieure du NucleoMag® SEP Mini de la base du support magnétique.

Ajouter le volume désiré de **tampon d'éluion HM6 (100–200 µL) directement sur** le culot de billes magnétiques et remettre les billes en suspension par pipetages successifs 10 fois à l'aide de cônes de pipettes à embouts large et incubé pendant 5–10 min à température ambiante.

Il est également possible de remettre les billes en suspension par agitation pendant 5 min à 1000 rpm.

Séparer les billes magnétiques en plaçant la partie supérieure sur la base du support magnétique NucleoMag® SEP Mini. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Transférer le surnageant contenant l'ADN purifié dans un nouveau tube.

---

## 6 Protocole support pour la lyse d'échantillons avec les tampons HMb et HMc

### 6.1 Protocole détaillé

Ce protocole est conçu pour une procédure de lyse alternative utilisant les tampons de lyse HMb et HMc. Pour plus d'informations, se référer au paragraphe 2.3.

- Consulter les paragraphes 2.2 et 2.3 pour plus d'informations sur la quantité de matériel de départ et la préparation des échantillons.
  - Vérifier la présence de précipités dans le tampon de lyse HMb conformément au chapitre 3.
- 

#### 1 Préparation de l'échantillon

Préparer l'échantillon conformément à l'étape 1 du protocole détaillé au paragraphe 5.2.

Ajouter **480 µL de tampon de lyse HMb à l'échantillon dans un tube de 2 mL et remettre doucement en suspension l'échantillon si nécessaire.**

Ajouter 25 µL de protéinase K liquide, mélanger par agitation douce ou par inversion et incuber pendant 30 à 150 min à 56 °C.

Tissu végétal : 30 min

Bactéries : Incuber pendant au moins 30 min avec 25 µL de lysozyme (solution mère de 100 mg/ml) à 37 °C avant d'ajouter la protéinase K liquide. Ajouter la protéinase K liquide et incuber pendant 30 min à 56 °C.

Levures : Incuber pendant au moins 60 min avec 10 µL de zymolyase (50 U) à 37 °C avant d'ajouter la protéinase K liquide. Ajouter la protéinase K liquide et incuber pendant 30 min à 56 °C.

Une agitation continue et modérée (par exemple à 900 rpm) du lysat est souhaitable, mais pas forcément nécessaire. Mélanger les lysats par inversion ou rotation lente de temps en temps.

Note : Voir le paragraphe 2.2 pour plus d'informations sur la quantité de matériel de départ et la procédure de lyse recommandée.

---

#### 2 Précipitation des contaminants

Ajouter 120 µL de tampon HMc à chaque échantillon, mélanger en retournant les tubes 3 fois ou **agiter pendant 5 min à température ambiante.**

Incuber pendant 5 min à 2–8 °C (de préférence sur de la glace).

Note : L'omission de l'étape de précipitation peut être bénéfique pour certains types d'échantillons, tels que les bactéries Gram positives. Dans ce cas, procéder à l'étape de centrifugation afin d'éliminer les débris résiduels.

Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g.

---

### 3 Transfert du lysat

Transférer **jusqu'à 500 µL de lysat dans un nouveau tube** et passer à l'étape 3 du protocole détaillé au paragraphe 5.2.

Note : Éviter de transférer du matériel provenant du culot ou du matériel qui flotte à la surface du lysat. Les fibres ou les enveloppes présentes dans le surnageant peuvent obstruer l'embout de la pipette. Aspirer le surnageant lentement et avec précaution.

### 4 Passer à l'étape 4 (digestion de l'ARN) du protocole détaillé au paragraphe 5.2

---

## 7 Annexes

### 7.1 Guide de résolution des problèmes

Problèmes	Causes possible and suggestions
Rendement faible en ADN	<p><i>Libération insuffisante des acides nucléiques pendant la lyse</i></p> <ul data-bbox="352 352 956 427" style="list-style-type: none"> <li>• Pour obtenir des rendements plus élevés d'acides nucléiques, prolonger le temps d'incubation de la lyse à la protéinase K (jusqu'à une nuit entière).</li> </ul>
	<p><i>Précipités dans le tampon HM1 ou HMB</i></p> <ul data-bbox="352 491 969 595" style="list-style-type: none"> <li>• Vérifier l'absence de précipités dans les tampons HM1 ou HMB avant utilisation. Incuber les flacons pendant plusieurs minutes à 30–40 °C et bien mélanger jusqu'à ce que le précipité soit complètement redissous.</li> </ul>
	<p><i>L'échantillon contient trop d'ARN</i></p> <ul data-bbox="352 659 969 707" style="list-style-type: none"> <li>• Prolonger la digestion à la RNase jusqu'à 30 min et incuber à 37 °C. En cas d'échec, augmenter la quantité de RNase.</li> </ul>
	<ul data-bbox="352 727 770 750" style="list-style-type: none"> <li>• Volume de tampon d'éluion insuffisant</li> </ul>
	<ul data-bbox="352 770 969 818" style="list-style-type: none"> <li>• Les billes doivent être totalement recouvertes par le tampon d'éluion. Utiliser au moins 100 µL de tampon d'éluion.</li> </ul>
	<p><i>Performance insuffisante du tampon d'éluion</i></p> <ul data-bbox="352 882 969 962" style="list-style-type: none"> <li>• Les tampons doivent être éliminés totalement après chaque séparation magnétique. Les tampons résiduels diminuent l'efficacité des lavages et de l'éluion.</li> </ul>
<p><i>Aspiration d'une partie des billes présents sur l'aimant</i></p> <ul data-bbox="352 1026 969 1098" style="list-style-type: none"> <li>• Ne pas perturber les billes sur l'aimant lors de l'aspiration du surnageant, en particulier lorsque le culot de billes n'est pas visible dans le lysat.</li> </ul>	
<p><i>Aspiration et perte de billes</i></p> <ul data-bbox="352 1161 969 1209" style="list-style-type: none"> <li>• Le temps de séparation magnétique est trop court ou la vitesse d'aspiration est trop élevée.</li> </ul>	

**Problèmes**

**Causes possible and suggestions**

---

Faible pureté / Performance suboptimale de l'ADN dans les applications avals	<p><i>Procédure de lavage insuffisante</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Utiliser uniquement les combinaisons appropriées de séparateur et de tube, par exemple un microtube de 2 mL en combinaison avec le NucleoMag® SEP Mini.</li><li>• S'assurer que les billes sont remises en suspension de façon presque complète pendant la procédure de lavage.</li></ul> <p><i>Contamination par de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Veiller à éliminer l'éthanol provenant des étapes de lavage, l'éthanol résiduel impactant négativement les applications avals.</li></ul> <p><i>Évaporation de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fermer hermétiquement les flacons de tampons, éviter l'évaporation de l'éthanol des flacons de tampons ainsi que des tampons remplis dans les réservoirs. Ne pas réutiliser les tampons des réservoirs.</li></ul>
Faible intégrité de l'ADN	<p><i>Stockage des échantillons</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Utiliser des échantillons aussi frais que possible. Congeler dans l'azote liquide et conserver la congélation en permanence si l'acquisition et la préparation de l'échantillon ne peuvent être effectuées en temps voulu.</li><li>• Ne pas laisser décongeler les échantillons congelés. Utiliser du matériel pré-réfrigéré pour peser l'échantillon.</li><li>• Ajouter le tampon HM1 et la protéinase K liquide le plus rapidement possible à l'échantillon.</li><li>• Utiliser toujours du matériel tel que des cônes de pipette et des microtubes à centrifuger certifiés DNase-free.</li><li>• En cas d'utilisation d'un tampon de remise en suspension fourni par le client, prendre les mesures appropriées pour éviter l'introduction de DNases.</li></ul> <p><i>Pipetage excessif</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Éviter les étapes de pipetage excessives et brutales. Utiliser des cônes de pipette à embout large.</li></ul>

---

**Problèmes**

**Causes possible and suggestions**

---

Perte de billes	<i>Temps de séparation magnétique trop court</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>Augmenter le temps de séparation pour permettre aux billes d'être complètement attirées par les aimants avant d'aspirer le liquide du puits.</li></ul>
	<i>Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'éluat)</i> <ul style="list-style-type: none"><li>Une vitesse d'aspiration élevée au cours de l'étape d'éluat peut entraîner une perte des billes. Réduire la vitesse d'aspiration pour l'étape d'éluat.</li></ul>
Lyse enzymatique inefficace des échantillons microbiens	<i>Viscosité élevée de l'éluat</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>L'ADN de haut poids moléculaire augmente la viscosité des solutions, ce qui accroît le risque de contamination par des billes. Répéter la séparation magnétique après la première étape d'éluat et transférer l'éluat dans un nouveau tube.</li></ul>
	<i>Tampon de réaction inapproprié</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>Utiliser uniquement le tampon de réaction recommandé par le fournisseur de l'enzyme. Ne pas effectuer de digestion enzymatique dans le tampon de lyse HM1 car les composants du tampon interfèrent avec l'activité enzymatique.</li></ul>
	<i>La paroi cellulaire n'est pas sensible à l'enzyme sélectionnée</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>Vérifier que l'organisme qui vous intéresse peut être lysé efficacement avec l'enzyme que vous utilisez.</li></ul>
	<i>Enzyme inactive</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>Vérifier que l'enzyme n'est pas périmée et qu'elle a été conservée conformément aux recommandations du fournisseur.</li></ul>
	<i>Protocole de digestion enzymatique inapproprié</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>Utiliser le protocole suggéré par le fournisseur de l'enzyme.</li></ul>
	<i>Trop de matériel de départ</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>La vitesse de réaction des enzymes dépend de la concentration en substrat. Si la concentration en substrat est trop élevée (trop d'échantillon), la vitesse de réaction diminue.</li><li>L'ADN de haut poids moléculaire libéré contribue à la viscosité de l'échantillon. Si la viscosité de l'échantillon est trop élevée, l'efficacité de la lyse diminue car la distribution des enzymes ne sera pas homogène.</li></ul>

---

## 7.2 Informations de commande

<b>Produit</b>	<b>REF</b>	<b>Conditionnement</b>
NucleoMag® HMW DNA	744160.1	1 × 96 preps
NucleoMag® SEP Mini	744901	1
NucleoMag® SEP	744900	1
Blocs 96 puits carrés 'Square-well Blocks'	740481	4
	740481.24	24
Tampon BQ1	740923	125 mL

Visitez notre site web [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) pour des informations détaillées.

### 7.3 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

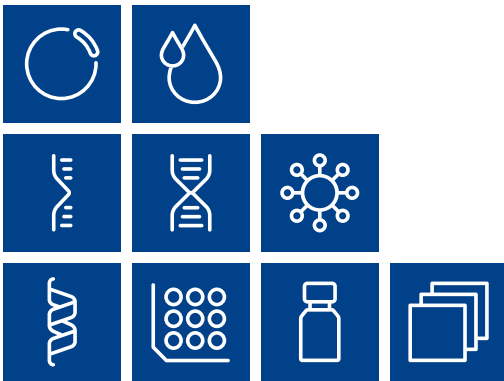
Veuillez contacter :  
MACHEREYNAGEL -GmbH & Co. KG  
+49 24 21 969-333  
support@mnet.com

---

Marques déposées :

NucleoMag<sup>®</sup> sont des marques déposées de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG  
KingFisher<sup>®</sup> est une marque déposée de Thermo Fisher Scientific

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



**MACHERY-NAGEL**

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

MACHERY-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)

