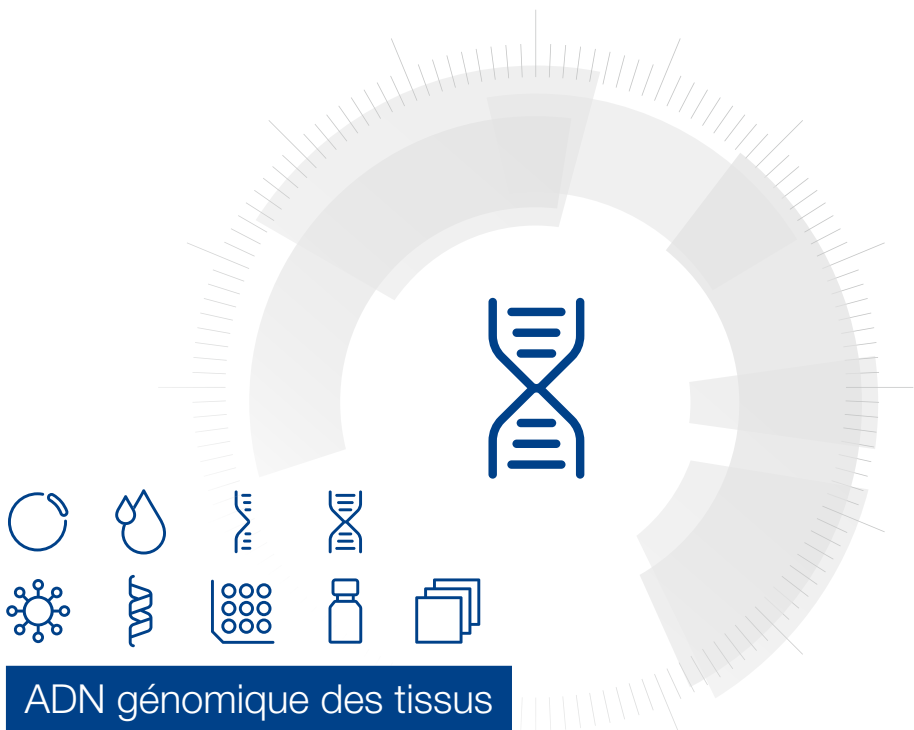


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation














■ NucleoSpin® Tissue

Octobre 2024 / Rev. 21

ADN génomique des tissus

Résumé du protocole (Rev. 21)

NucleoSpin® Tissue		
1	Préparer l'échantillon	Couper 25 mg en petits morceaux
2	Lyse de l'échantillon	 <p>180 µL T1 25 µL Protéinase K 56 °C, 1–3 h</p>
3	Lyse de l'échantillon	 <p>200 µL B3 70 °C, 10 min</p>
4	Ajustement des conditions de fixation	 <p>210 µL 96–100 % d'éthanol</p>
5	Fixation de l'ADN	  <p>Charger les échantillons 11,000 x g, 1 min</p>
6	Lavage de la membrane de silice	  <p>1^{er} lavage 500 µL BW 2^{ème} lavage 600 µL B5</p> <p>1^{er} et 2^{ème} </p> <p>11,000 x g, 1 min</p>
7	Séchage de la membrane de silice	 <p>11,000 x g, 1 min</p>
8	Elution d'ADN très pur	  <p>100 µL BE TA, 1 min 11,000 x g, 1 min</p>

Sommaire

1 Composants	5
1.1 Contenu du kit	5
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	7
2.3 Procédures d'élution	8
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	10
4 Instructions de sécurité	11
4.1 Elimination des déchets	11
5 Protocole standard pour les tissus humains ou animaux et les cellules en culture	12
6 Protocoles additionnels	15
6.1 Protocole additionnel pour les queues de souris ou de rats	15
6.2 Protocole additionnel pour les bactéries	16
6.3 Protocole additionnel pour la levure	17
6.4 Protocole additionnel pour les taches de sang séché (p.e. NucleoCard®s, FTA® cards, Guthrie cards)	18
6.5 Protocole additionnel pour l'ADN génomique et l'ADN viral à partir d'échantillons de sang	19
6.6 Protocole additionnel pour les racines des cheveux	20
6.7 Protocole additionnel pour les tissus inclus en paraffine	21
6.8 Protocole additionnel pour l'ADN génomique provenant des fèces	22
6.9 Protocole additionnel pour l'ADN viral (p.e. CMV) à partir de fèces	23
6.10 Protocole additionnel pour la détection de Mycobacterium tuberculosis ou de Legionella pneumophila dans les expectorations ou les lavages broncho-alvéolaires	25
6.11 Protocole additionnel pour la détection des bactéries EHEC dans les aliments (p.e. lait de vache frais)	26
6.12 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN bactérien (p.e. Chlamydia trachomatis) à partir de cultures, de liquides biologiques ou d'échantillons cliniques.	27
6.13 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN bactérien (p.e. Borrelia burgdorferi) à partir de l'urine	28
6.14 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN viral (p.e. CMV) à partir de l'urine	28
6.16 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN génomique à partir d'écouvillons dentaires	31
6.17 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN génomique à partir d'écouvillons buccaux	32

6.18	Protocole additionnel pour la purification d'ADN génomique à partir du sperme	34
6.19	Protocole additionnel pour la purification d'ADN génomique des cyanobactéries	36
6.20	Utilisation du NucleoSpin [®] Tissue pour la purification d'ADN de Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (MRSA)	37
8	Annexes	43
8.1	Guide de résolution des problèmes	43
8.2	Informations de commande	45
8.3	Restrictions d'utilisation / garantie	47
8.4	Versions linguistiques et prédominance	47

1 Composants

1.1 Contenu du kit

NucleoSpin® Tissue			
REF	10 preps 740952.10	50 preps 740952.50	250 preps 740952.250
Tampon de lyse T1	5 mL	20 mL	100 mL
Tampon de lyse B3	10 mL	15 mL	75 mL
Tampon de lavage BW	6 mL	30 mL	150 mL
Tampon de lavage B5 (concentré)	6 mL	12 mL	50 mL
Tampon d'éluion BE*	13 mL	13 mL	60 mL
Protéinase K (lyophilisée) **	6 mg	30 mg	2 × 75 mg
Tampon de protéinase PB	1,8 mL	1,8 mL	8 mL
Colonnes NucleoSpin® Tissue (anneaux vert clair)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	20	100	500
Manuel d'utilisation	1	1	1

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

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

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

Réactifs

- 96 – 100 % d'éthanol

Consommables

- Tubes de microcentrifugation de 1,5 mL pour la lyse des échantillons et l'élution de l'ADN
- Elimination des déchets cônes jetables

Equipment

- Pipettes manuelles
- Centrifugeuse pour microtubes
- Broyeur Vortex
- Équipement pour le broyage et l'homogénéisation des échantillons
- Équipements de protection individuelle (blouse, gants, lunettes)

Pour les protocoles additionnels (voir paragraphe 6), du matériel supplémentaire peut être nécessaire - voir les protocoles additionnels individuels pour plus d'informations.

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® Tissue** est utilisé pour la première fois. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Le résumé du protocole est conçu pour être utilisé uniquement comme un outil supplémentaire de référence rapide pendant l'exécution de la procédure de purification.

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

Veuillez contacter le service technique pour obtenir des informations sur les modifications apportées au présent manuel d'utilisation par rapport aux révisions précédentes. Note : Le tampon B3 est désormais livré mélangé au préalable.

2 Description du produit

2.1 Principe général

La méthode NucleoSpin® Tissue permet de préparer de l'ADN génomique à partir de tissus, de cellules (p.e., de bactéries) et de nombreuses autres sources. La lyse est réalisée par incubation de l'échantillon dans une solution de protéinase K/SDS. Les conditions appropriées pour la fixation de l'ADN sur la membrane de silice des colonnes **NucleoSpin® Tissue** sont obtenues par l'ajout de sels chaotropiques et d'éthanol au lysat. Le processus de liaison est réversible et spécifique aux acides nucléiques. Les contaminations sont éliminées par un lavage ultérieur avec deux tampons différents. L'ADN génomique pur est finalement élué dans des conditions de faible force ionique dans un tampon d'éluion légèrement alcalin.

2.2 Caractéristiques du kit

- **NucleoSpin® Tissue** est conçu pour la préparation rapide et à petite échelle d'ADN génomique très pur à partir de n'importe quel tissu, cellule, bactérie, levure, échantillon médico-légal, sérum, plasma ou autre fluide corporel. Il convient également à la préparation d'ADN à partir de sang humain ou animal. L'ADN purifié peut être utilisé directement pour la PCR, le Southern blotting ou tout type de réaction enzymatique.
- Le kit permet de purifier jusqu'à 35 µg d'ADN génomique pur avec un rapport A_{260}/A_{280} compris entre 1,7 et 1,9. La **colonne NucleoSpin® Tissue** est capable de fixer jusqu'à 60 µg d'ADN génomique.
- Pour la lyse de certaines souches bactériennes et de levure, des enzymes supplémentaires peuvent être nécessaires, qui ne font pas partie de ce kit. Voir le protocole additionnel correspondant pour plus de détails.

Table 1: Résumé des caractéristiques du kit

Paramètres	NucleoSpin® Tissue
Technologie	Technologie membrane de silice
Format	Mini colonne à centrifuger
Échantillon d'articles	< 25 mg de tissu $10^2 - 10^7$ cellules en culture
Rendement typique	20–35 µg
Volume d'éluion	60–100 µL
Temps de préparation	20 min/preps (hors lyse)
Capacité de fixation	60 µg
Utilisation	Réserver à l'usage de la recherche

- **Produit de qualité médico-légale :**

NucleoSpin® Tissue is certified as forensic quality product. Consumables used in forensics need to be treated carefully to prevent DNA contamination. MACHEREY-NAGEL therefore has a stringently controlled production process to avoid DNA contamination of consumables. Further, MACHEREY-NAGEL uses ethylene oxide (EO) treatment to remove amplifiable DNA, which might still be introduced during the manufacturing process. MACHEREY-NAGEL products carrying the forensic quality seal, contain plastic materials that are EO treated. This means, DNA of any kind, which might still be introduced into plastic consumables during the production process, is inactivated by means of the treatment with ethylene oxide, in order to prevent the generation of accidental human profile by PCR amplification. Ethylene oxide treatment has been shown to be the method of choice to prevent DNA profiles due to DNA contamination (Shaw et al. 2008 ; Figure 1).

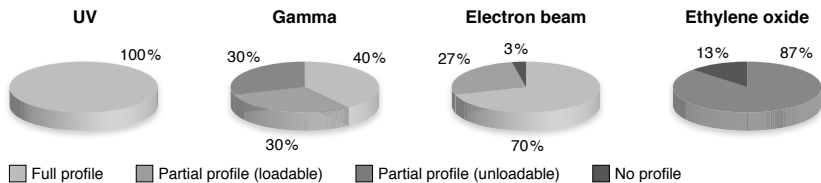


Figure 1 Selon Shaw et al, 2008, Comparaison des effets des techniques de stérilisation sur les profilage d'ADN. Int J Legal Med 122 : 29–33.

2.3 Procédures d'éluion

Outre la méthode standard (taux de récupération d'environ 70 à 90 %), plusieurs modifications sont possibles pour augmenter le rendement et la concentration. Utiliser le tampon d'éluion pour l'une des procédures suivantes :

- **Rendement élevé :** Effectuer deux étapes d'éluion avec le volume indiqué dans le protocole individuel. Environ 90 à 100 % de l'acide nucléique lié peut être élué.
- **Concentration élevée :** Effectuer une étape d'éluion avec 60 % du volume indiqué dans le protocole individuel. La concentration d'ADN sera environ 30 % plus élevée qu'avec l'éluion standard. Le rendement de l'acide nucléique élué sera d'environ 80 %.
- **Rendement et concentration élevés :** Appliquer la moitié du volume de tampon d'éluion comme indiqué dans le protocole individuel, incubé pendant 3 min et centrifuger. Appliquer une deuxième aliquote de tampon d'éluion, incubé et centrifuger à nouveau. Ainsi, environ 85 à 100 % de l'acide nucléique lié est élué dans le volume d'éluion standard à une concentration élevée.
- **Éluion à 70 °C :** Pour certains types d'échantillons, le chauffage du tampon d'éluion à 70 °C augmente le rendement en ADN. .

L'élution peut également être effectuée avec un tampon Tris-EDTA (TE) de pH égal ou supérieur à 8. Cela permet d'accroître la stabilité de l'ADN, en particulier lors d'un stockage à long terme et/ou à usage multiple à 4 °C ou à température ambiante, grâce à l'inhibition des DNases omniprésentes. Cependant, l'EDTA interfère, selon la concentration finale, avec certaines applications en aval. Note : Le tampon d'élution BE (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5) fourni avec le kit ne contient pas d'EDTA.

Pour une performance optimale de l'ADN isolé dans les applications en aval, nous recommandons l'élution avec le tampon d'élution fourni et le stockage, en particulier à long terme, à -20 °C. Les cycles de congélation-décongélation n'auront aucun effet sur la plupart des applications en aval. Les exceptions possibles sont la détection de traces d'ADN ou la PCR à longue portée (p.e., > 10 kbp). Des cycles multiples de congélation-décongélation ou le stockage de l'ADN à 4 °C ou à température ambiante peuvent influencer les sensibilités de détection ou les efficacités de réaction en raison du cisaillement de l'ADN ou de l'adsorption sur les surfaces.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention : Les tampons B3 et BW contiennent du sel chaotropique ! Porter des gants et des lunettes !

ATTENTION : Les tampons B3 et BW 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.
- Au cours du stockage, en particulier à basse température, un précipité blanc peut se former dans le tampon T1 ou B3. Ces précipités peuvent être facilement dissous en incubant le flacon à 50–70 °C avant utilisation.

Avant de débiter une procédure **NucleoSpin® Tissue**, préparer les éléments suivants :

- **Tampon de lavage B5** : ajouter le volume indiqué d'éthanol (96–100 %) au **tampon de lavage B5 concentré**. Marquer l'étiquette du flacon pour indiquer que de l'éthanol a été ajouté. Le tampon de lavage B5 peut être conservé à 15–25 °C pendant au moins un an.
- **Protéinase K** : ajouter le volume indiqué de tampon protéinase PB pour dissoudre la **protéinase K** lyophilisée. La solution de protéinase K est stable à -20 °C pendant au moins 6 mois.

NucleoSpin® Tissue			
	10 preps	50 preps	250 preps
REF	740952.10	740952.50	740952.250
Tampon de lavage B5 (concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol	50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol
Protéinase	6 mg Ajouter 260 µL de tampon protéinase	30 mg Ajouter 1,35 mL de tampon protéinase	2 × 75 mg Ajouter 3,35 mL de tampon pour protéinase dans chaque flacon

4 Instructions de sécurité

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



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans le tampon B3 et le tampon BW peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, ne pas ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

Les déchets générés par le kit **NucleoSpin® Tissue** 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 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 standard pour les tissus humains ou animaux et les cellules en culture

Avant de débuter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Set un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.

1 Préparer l'échantillon

Tissus

Couper 25 mg de tissu humain ou animal en petits morceaux. Placer l'échantillon dans un tube de microcentrifugation (non fourni). Passer à l'étape 2.

Les échantillons difficiles à lyser peuvent être broyés sous azote liquide ou traités dans un homogénéisateur mécanique (Polytron®, Ultra-Turrax®) : Ajouter 25 mg de tissu dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni), ajouter 50–75 µL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et homogénéiser.

Cellules en culture

Remettre en suspension jusqu'à **10⁷ cellules** dans un volume final de **200 µL de tampon T1**. Ajouter **25 µL de solution de protéinase K** et **200 µL de tampon B3**. Vortexer pour mélanger et incuber l'échantillon à 70 °C pendant 10 à 15 min. **Passer à l'étape 4.**

2 Lyse de l'échantillon

Ajouter **180 µL de tampon T1** et **25 µL de solution de protéinase K**. Vortexer pour mélanger. Veiller à ce que les échantillons soient complètement recouverts de solution de lyse.



+180 µL T1
+25 µL
Protéinase K
Mélanger

En cas de procédure sur plusieurs échantillons, la protéinase K et le tampon T1 peuvent être mélangés au préalable, directement avant l'utilisation. Ne pas mélanger le tampon T1 et la protéinase K plus de 10 à 15 min avant de les ajouter à l'échantillon : La protéinase K a tendance à s'autodigérer dans le tampon T1 en l'absence de substrat.

Incuber à **56 °C** jusqu'à obtention d'une lyse complète (**au moins 1 à 3 h**). Vortex de temps en temps pendant l'incubation ou utiliser un incubateur à paritation.



56 °C,
1 – 3 h

ou

56 °C,
pendant une
nuit

Les échantillons peuvent également être incubés pendant la nuit. Si l'ADN sans ARN est crucial pour les applications en aval, une digestion RNase peut être effectuée : Ajouter 20 µL de solution de RNase A (10 mg/mL) (non inclus ; voir les informations de commande) et incubé pendant 5 min supplémentaires à température ambiante.

3 Lyse de l'échantillon

Vortexer les échantillons. **Ajouter 200 µL de tampon B3**, vortexer vigoureusement et incubé à **70 °C** pendant **10 min**. Vortexer brièvement.



+200 µL B3
70 °C,
10 min

Si des particules insolubles sont visibles, centrifuger pendant 5 min à grande vitesse (par exemple, 11 000 × g) et transférer le surnageant dans un nouveau tube de microtubes (non fourni).

4 Ajustement des conditions de fixation

Ajouter **210 µL ethanol (96–100 %)** à l'échantillon et vortexer vigoureusement.



+210 µL
d'éthanol
Vortex

Après l'ajout d'éthanol, un précipité filandreux peut devenir visible. Cela n'affectera pas l'extraction de l'ADN. Veillez à charger tout le précipité sur la colonne à l'étape suivante.

5 Fixation de l'ADN

Pour chaque échantillon, placer une colonne **NucleoSpin® Tissue** dans un tube collecteur. Appliquer l'échantillon sur la colonne. Centrifuger pendant **1 min** à **11,000 × g**. Jeter le tube collecteur avec le filtrat et placer la colonne dans un nouveau tube collecteur (fourni).



Charger les
échantillons

Si l'échantillon n'est pas aspiré complètement à travers la matrice, répéter l'étape de centrifugation à 11 000 × g. Jeter le filtrat.



11,000 × g,
1 min

6 Lavage de la membrane de silice**1^{er} lavage**

Ajouter **500 µL de tampon BW**. Centrifuger pendant **1 min** à **11,000 × g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.



+500 µL BW

11,000 × g,
1 min**2^{ème} lavage**

Ajouter **600 µL de tampon B5** à la colonne et centrifuger pendant **1 minute** à **11,000 × g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.



+600 µL B5

11,000 × g,
1 min**7 Séchage de la membrane de silice**

Centrifuger la colonne pendant **1 min** à **11,000 × g**.

L'éthanol résiduel est éliminé au cours de cette étape.

11,000 × g,
1 min**8 Éluion d'ADN très pur**

Placer la colonne NucleoSpin® Tissue dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni) et ajouter **100 µL de tampon BE**. Incuber à température ambiante pendant 1 min. Centrifuger **1 min** à **11,000 × g**.

Pour d'autres procédures d'éluion, voir le chapitre 2.3.



+100 µL BE

TA,
1 min11,000 × g,
1 min

6 Protocoles additionnels

6.1 Protocole additionnel pour les queues de souris ou de rats

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Set un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.
-

1 Préparer l'échantillon

Couper deux morceaux de 0,6 cm de queue de souris et les placer dans un tube à centrifuger de 1,5 mL (non fourni).

Si l'on procède à la transformation de queues de rats, un morceau de 0,6 cm suffit.

2 Lyse de l'échantillon

Ajouter 180 µL de tampon T1 et 25 µL de protéinase K et vortexer. Incuber à 56 °C pendant une nuit ou jusqu'à obtention d'une lyse complète. Le temps de lyse peut être considérablement réduit jusqu'à environ une heure si le tissu est fragmenté mécaniquement (p.e., si le tissu est coupé en très petits morceaux avant la lyse).

Vortexer de temps en temps pendant l'incubation ou utiliser un bain-marie à agitation. Pour éliminer les os ou les poils résiduels, centrifuger pendant 5 min à vitesse élevée (p.e., 11 000 × g). Transférer 200 µL de surnageant dans un nouveau tube.

En cas de procédure sur plusieurs échantillons, la protéinase K et le tampon T1 peuvent être mélangés au préalable directement avant l'utilisation. Ne jamais mélanger le tampon T1 et la protéinase K plus de 10 à 15 min avant de les ajouter à l'échantillon : la protéinase K a tendance à s'autodigérer dans le tampon T1 en l'absence de substrat.

3 Lyse de l'échantillon

Ajouter 200 µL de tampon B3 au lysat et vortexer vigoureusement.

Le tampon B3 et l'éthanol (voir étape 4) peuvent être mélangés au préalable avant d'être ajoutés au lysat.

Fixation de l'ADN

Ajouter 210 µL d'éthanol au lysat et vortexer vigoureusement.

Passez à l'étape 5 du protocole standard (voir paragraphe 5).

6.2 Protocole additionnel pour les bactéries

Avant de débiter la procédure :

Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.

- Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.

1 Préparer l'échantillon

Jusqu'à 1 mL de culture bactérienne peut être utilisé pour la préparation en fonction, par exemple, de la densité de la culture, du milieu de culture et de la souche bactérienne.

Centrifuger jusqu'à **1 mL de culture** pendant **5 min** à **8 000 x g**. Retirer le surnageant.

2 Pré-lyse de l'échantillon

Remettre en suspension le culot dans **180 µL de tampon T1** par pipetages successifs. Ajouter **25 µL de protéinase K**. Vortexer vigoureusement et incubé à 56 °C jusqu'à lyse complète (au moins 1 à 3 h). Vortexer de temps en temps pendant l'incubation ou utiliser un incubateur à agitation.

Les échantillons peuvent également être incubés pendant la nuit.

Si l'ADN sans ARN est crucial pour les applications en aval, une digestion RNase peut être effectuée : ajouter 20 µL de solution de RNase A (20 mg / mL) (non inclus ; voir les informations de commande) et incubé pendant 5 min supplémentaires à température ambiante.

Bactéries difficiles à lyser : certaines souches, en particulier les bactéries Gram-positives, sont plus difficiles à lyser. Dans ce cas, une préincubation avec une enzyme lytique est nécessaire : remettre en suspension les cellules en culot dans 20 mM Tris/HCl ; 2 mM EDTA ; 1 % Triton X-100 ; pH 8 (au lieu du tampon T1) additionné d'une concentration finale de 20 mg/mL de lysozyme ou de 0,2 mg/mL de lysostaphine et incubé pendant 30 à 60 min à 37 °C. Ajouter 25 µL de protéinase K, incubé à 56 °C jusqu'à obtention d'une lyse complète.

Passer à l'étape 3 du protocole standard (voir le paragraphe 5).

6.3 Protocole additionnel pour la levure

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Vérifier que du tampon sorbitol et de la lyticase ou de la zymolase (non fournis avec le kit) sont disponibles pour la prélyse des échantillons.
 - Mettre un incubateur ou un bain-marie à 30 °C et 56 °C.
-

1 Préparer l'échantillon

Récolter **3 mL de culture de levure YPD** ($OD_{600} \leq 10$) par centrifugation pendant **10 min à 5 000 x g**. Laver les cellules une fois avec **1 mL d'EDTA 10 mM, pH 8**. Retirer le surnageant et culotter les cellules par centrifugation (**5 000 x g, 10 min**).

2 Pré-lyse de l'échantillon

Remettre le culot en suspension dans **600 µL de tampon sorbitol** (1,2 M de sorbitol ; 10 mM de CaCl₂ ; 0,1 M de Tris/HCl pH 7,5 ; 35 mM de β-mercaptoéthanol). Ajouter **50 U de lyticase ou de zymolase***. Incuber à **30 °C** pendant **30 min**. Cette étape permet de dégrader la paroi cellulaire de la levure et de créer des sphéroplastes. La formation des sphéroplastes peut être vérifiée au microscope. Centrifuger le mélange pendant **10 min à 2 000 x g**, éliminer le surnageant et remettre en suspension les sphéroplastes en culot dans **180 µL de tampon T1**. Ajouter **25 µL** de solution de **protéinase K** et vortexer vigoureusement. Incuber à **56 °C** jusqu'à obtention d'une lyse complète (au moins 1 à 3 h). Vortexer de temps en temps pendant l'incubation ou utiliser un bain-marie à agitation.

Les échantillons peuvent également être incubés pendant la nuit.

Si l'ADN sans ARN est crucial pour les applications en aval, une digestion RNase peut être effectuée : ajouter 20 µL de solution de RNase A (20 mg / mL) (non inclus ; voir les informations de commande) et incuber pendant 5 min supplémentaires à température ambiante.

Passer à l'étape 3 du protocole standard (voir le paragraphe 5).

* D'autres protocoles utilisent 5 à 200 U de lytique ou de zymolase, selon la qualité ou la marque de l'enzyme. Il peut être nécessaire d'augmenter la concentration enzymatique si les sphéroplastes ne se forment pas.

6.4 Protocole additionnel pour les taches de sang séché (p.e. NucleoCard®s, FTA® cards, Guthrie cards)

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.

1 Préparer l'échantillon

Découper une ou deux **taches de sang séché** aussi précisément que possible. Couper les taches en petits morceaux et les placer dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).

La surface des taches de sang séché doit être comprise entre 15 et 30 mm².

2 Pré-lyse de l'échantillon

Ajouter **180 µL de tampon T1** et mélanger en vortexant. Placer les échantillons dans un bain-marie ou un bloc chauffant et chauffer pendant **10 min à 94 °C**. Laisser l'échantillon refroidir. Ajouter **25 µL** de solution de **protéinase K**. Centrifuger brièvement les échantillons, vortexer et incubé à **56 °C** pendant **1 h**. Vortexer de temps en temps pendant l'incubation ou utiliser un bain-marie d'agitation.

Veiller à ce que les échantillons soient complètement recouverts de tampon de lyse pendant l'incubation.

3 Lyse de l'échantillon

Ajouter **200 µL de tampon B3**, mélanger vigoureusement au vortex et incubé à **56 °C** pendant **10 min**.

Passer à l'étape 4 du protocole standard (voir paragraphe 5).

6.5 Protocole additionnel pour l'ADN génomique et l'ADN viral à partir d'échantillons de sang

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.

1 Préparer l'échantillon

Pas nécessaire

2 Pré-lyse de l'échantillon

Pas nécessaire

3 Lyse de l'échantillon de sang

Pipeter **25 µL de protéinase K** et jusqu'à **200 µL de sang**, de couche leuco-plaquettaire ou d'échantillon de fluide corporel (équilibré à température ambiante) dans des tubes de microcentrifugation de 1,5 mL (non fournis).

Pour les volumes d'échantillons inférieurs à 200 µL, ajouter du PBS pour ajuster le volume à 200 µL. Si vous purifiez des virus ADN, nous vous recommandons de commencer avec 200 µL de sérum ou de plasma. Si des cellules en culture sont utilisées, remettre en suspension jusqu'à 5×10^6 cellules dans un volume final de 200 µL de PBS.

Ajouter **200 µL de tampon B3** aux échantillons et vortexer vigoureusement le mélange (10–20 s).

Incuber les échantillons à **température ambiante** pendant **5 min**. Mélanger.

Incuber les échantillons à **70 °C** pendant **10 à 15 min**.

Le lysat doit devenir brunâtre pendant l'incubation avec le tampon B3. Augmenter le temps d'incubation avec la protéinase K (jusqu'à 30 min) et vortexer une ou deux fois vigoureusement pendant l'incubation en cas de procédure sur des échantillons de sang plus anciens ou coagulés.

4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN

Ajouter **210 µL d'éthanol (96–100 %)** à chaque échantillon et vortexer à nouveau.

5 Fixation de l'ADN

Pour chaque préparation, prendre une **colonne NucleoSpin® Tissue** placée dans un tube collecteur et charger l'échantillon. Centrifuger **1 min à 11 000 x g**. Si les échantillons ne traversent pas complètement la matrice, répéter la centrifugation à une force g plus élevée (< 15 000 x g). Jeter le tube collecteur avec le filtrat et placer la colonne dans un nouveau tube collecteur (fourni).

Procéder à l'étape 6 (Lavage de la membrane de silice) du protocole standard (voir paragraphe 5).

6.6 Protocole additionnel pour les racines des cheveux

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.
-

1 Préparer l'échantillon

Coupez les racines des cheveux de l'échantillon de cheveux (jusqu'à 100) et collectez-les dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL (non fourni).

2 Pré-lyse de l'échantillon

Ajouter **180 µL de tampon T1** aux racines des cheveux et congeler les échantillons dans l'azote liquide. Décongeler les échantillons dans un **bain-marie à 56 °C**. Répétez cette procédure 4 fois. Ajouter 25 µL de solution de protéinase K, mélanger en vortexant et incubé **6–8 h** ou **une nuit à 56 °C**. Utiliser un bain-marie à agitation ou vortexer de temps en temps.

Passer à l'étape 3 du protocole standard (voir le paragraphe 5).

6.7 Protocole additionnel pour les tissus inclus en paraffine

Avant de débiter la procédure :

Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.

Vérifier si du xylène ou du n-octane est disponible.

Mettre un incubateur ou un bain-marie à 37 °C et 56 °C.

1 Préparer l'échantillon

Préparer de petites sections (jusqu'à 25 mg) à partir de blocs de tissus fixés et inclus. Si possible, enlever l'excès de paraffine du bloc avant de le découper. Manipuler les sections avec des pinces ou des cure-dents et placer les échantillons dans des tubes de microcentrifugation.

Ajouter **1 mL de n-octane ou de xylène** dans chaque tube. Vortexer vigoureusement et incubé à température ambiante pendant environ 30 min. Vortexer de temps en temps.

Centrifuger à **11 000 x g** pendant 3 min. Prélever le surnageant à la pipette.

Ajouter **1 mL d'éthanol (96–100 %)** dans chaque tube. Fermer et mélanger en inversant plusieurs fois. Centrifuger à **11 000 x g** pendant **3 min**. Prélever le surnageant à la pipette.

Répéter l'étape de lavage à l'éthanol. Prélever à la pipette la plus grande quantité possible d'éthanol.

Incuber le tube ouvert à **37 °C** jusqu'à évaporation de l'éthanol (~ **15 min**).

Passer à l'étape 2 du protocole standard (voir paragraphe 5).

6.8 Protocole additionnel pour l'ADN génomique provenant des fèces

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Vérifier si le tampon TE est disponible.
- Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.

1 Préparer l'échantillon

Ajouter **250 mg de matières fécales** à 1 mL de tampon TE (10 mM Tris/Cl ; 1 mM EDTA, pH 8). Remettre l'échantillon en suspension par vortex vigoureux (**30 s**).

Centrifuger l'échantillon pendant **15 min** à **4 000 x g**. Jeter le surnageant.

Remettre le culot en suspension dans **0,2 à 1 mL de tampon T1**. Utiliser autant de tampon que nécessaire pour une bonne resuspension de l'échantillon.

Le culot préparé contient, entre autres constituants, des cellules du tube digestif et des bactéries.

Transférer **200 µL** de l'**échantillon remis en suspension** dans un nouveau tube de microcentrifugation.

Procéder à l'ajout de 25 µL de protéinase K à l'étape 2 du protocole standard (voir paragraphe 5).

Les cellules humaines, les cellules bactériennes et les cellules d'agents pathogènes présentes dans les fèces se lysent au cours de l'étape d'incubation à 56 °C avec la protéinase K avec une efficacité différente. Pour la détection de cellules difficiles à lyser (p.e., certaines bactéries et certains parasites), il peut être bénéfique d'effectuer une incubation supplémentaire à une température plus élevée (jusqu'à 95 °C ; 5–10 min). Le rendement en ADN sera souvent plus élevé avec une telle étape d'incubation supplémentaire à haute température. Il convient toutefois de noter que le rapport entre l'ADN humain et l'ADN non humain changera généralement en raison de la libération accrue d'ADN bactérien/pathogène.

6.9 Protocole additionnel pour l'ADN viral (p.e. CMV) à partir de fèces

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Préparer du NaCl à 0,9 %.
 - Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.
-

1 Préparer l'échantillon

Suspendre l'échantillon de fèces dans du **NaCl à 0,9 %** (environ 0,5 g dans 4 mL au maximum).

Centrifuger des aliquotes de l'échantillon de selles pendant **5 min à 800 x g à TA** (par exemple, 4 mL : 4 x 1 mL dans un tube de microtubes de 1,5 mL). Réunir soigneusement le surnageant (ne pas toucher le culot).

Filter le surnageant à travers un filtre stérile de 0,22 – 0,45 µm. Fractionner le filtrat et centrifuger pendant **1 min à 11 000 x g**.

2 Pré-lyse de l'échantillon

Retirer soigneusement le surnageant par décantation. Ajouter **400 µL de tampon T1** et **35 µL de protéinase K** et mélanger en vortexant.

3 Lyse de l'échantillon

Ajouter **400 µL de tampon B3** et mélanger en vortexant. Incuber pendant au moins **30 min à 70 °C**.

4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN

Ajouter **420 µL d'éthanol (96 – 100 %)** et mélanger en vortexant.

5 Fixation de l'ADN

Pour chaque échantillon, placer une **NucleoSpin® Tissue** dans un tube collecteur. Charger successivement la colonne NucleoSpin® Tissue. Centrifuger pendant **1 min à 4 500 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.

Si l'échantillon n'est pas aspiré complètement à travers la matrice, répéter l'étape de centrifugation à 11 000 x g. Jeter le filtrat.

6 Lavage de la membrane de silice

1er lavage

Ajouter **600 µL de tampon BW**. Centrifuger pendant **1 min** à **4 500 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.

2ème lavage

Ajouter **600 µL de tampon B5** à la colonne et centrifuger pendant **1 min** à **4 500 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.

3ème lavage

Ajouter **600 µL de tampon B5** à la colonne et centrifuger pendant **2 min** à **11 000 x g**. Jeter le filtrat.

7 Séchage de la membrane de silice

Placer la NucleoSpin® Tissue dans un nouveau tube collecteur et incuber à couvercle ouvert pendant **1 à 2 min** à **70 °C**.

L'éthanol résiduel est éliminé au cours de cette étape.

8 Éluion d'ADN très pur

Placer la colonne NucleoSpin® Tissue dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni) et ajouter **100 µL de tampon BE**. Incuber avec le couvercle fermé pendant **3–5 min**. Centrifuger pendant **1 min** à **4 500 x g**.

Pour d'autres procédures d'éluion, voir le paragraphe 2.3.

Utiliser 10 µL d'extrait d'ADN pour un mélange réactionnel PCR de 20 µL.

Ajouter un mélange de contrôle d'inhibition (10 µL d'extrait d'ADN contenant de l'ADN humain) et amplifier, par exemple, avec des amorces spécifiques humaines de l'actine, de la β -globine ou d'un autre gène humain.

6.10 Protocole additionnel pour la détection de *Mycobacterium tuberculosis* ou de *Legionella pneumophila* dans les expectorations ou les lavages broncho-alvéolaires

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.
 - Préparer N-acétyl cystéine / NaOH (2 g de NaOH ; 1,45 g de citrate de sodium ; 0,5 g de N-acétyl cystéine. Ajouter de l'eau à 100 mL).
-

1 Préparer l'échantillon

Ajouter **200 – 500 µL** d'expectoration ou de lavage bronchoalvéolaire à un **volume égal de N-acétylcystéine / NaOH**. Vortexer doucement pour mélanger.

Incuber le mélange pendant **25 min** à **température ambiante** avec agitation.

Ajuster le **volume à 25 mL** avec de **l'eau stérile**.

Centrifuger pendant **30 min** à **4 000 x g**. Jeter le surnageant.

Remettre le culot en suspension dans **0,5 – 1 mL de tampon T1** (en fonction de la viscosité de l'échantillon).

Transférer **200 µL de l'échantillon remis en suspension** dans un nouveau tube de microcentrifugation (non fourni).

Procéder à l'étape 2 du protocole standard, voir paragraphe 5 (ajout de la protéinase K et incubation).

6.11 Protocole additionnel pour la détection des bactéries EHEC dans les aliments (p.e. lait de vache frais)

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Préparer le mTSB et l'acétate de sodium 3,2 M.
 - Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.
-

1 Préparer l'échantillon

Dans un bouteille stérile de 1 litre, ajouter **25 mL de lait** et **225 mL de milieu mTSB préchauffé (37 °C)** (fourni avec Novobiocin). Incuber le mélange dans un bain-marie à agitation pendant **5–6 h** ou toute une nuit à 37 °C.

Préparation du milieu mTSB : 30 g de Tryptic Soy Broth (Gibco), 1,5 g de sels biliaires n° 3 (Oxoid), 1,5 g de KH₂PO₄. Ajouter 900 mL de H₂O. Filtrer le milieu et ajuster le pH à 7,4 avec 2 M NaOH. Ajouter de l'eau jusqu'à 1 litre et autoclaver pendant 15 min à 121 °C.

Centrifuger **100 mL de culture** pendant **40 min** à **6 000 x g**.

Verser doucement le surnageant et remettre le culot en suspension dans 2 mL d'eau stérile. Centrifuger pendant **10 min** à **10 000 x g**.

2 Pré-lyse de l'échantillon

Remettre le culot en suspension dans **180 µL de tampon T1** et ajouter **25 µL** de solution de **protéinase K**.

Suivre le protocole standard, en commençant par l'étape 3 (voir paragraphe 5).

Après élution de l'ADN, procéder à l'étape suivante.

Précipiter l'ADN en ajoutant **20 µL d'acétate de sodium 3,2 M** et **400 µL d'éthanol** à **200 µL d'éluat**. Centrifuger pendant **30 min** à **11 000 x g**. Jeter le surnageant et laver le culot avec **1 mL d'éthanol à 70 %** et le remettre en suspension dans **10 µL d'eau stérile**.

6.12 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN bactérien (p.e. *Chlamydia trachomatis*) à partir de cultures, de liquides biologiques ou d'échantillons cliniques.

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.

1 Préparer l'échantillon

Extraction de l'ADN bactérien à partir de **cultures bactériennes ou de liquides biologiques** : culotter les bactéries par centrifugation pendant **5 min à 13 000 xg** et procéder à l'étape 2 du protocole standard, voir paragraphe 5.

Extraction d'ADN bactérien à partir d'**écouvillons oculaires, nasaux ou pharyngés** : prélever les échantillons, ajouter 2 mL de PBS contenant un fongicide courant et incubé pendant **plusieurs heures à température ambiante**. Culotter les bactéries par centrifugation pendant **5 min à 13 000 x g**. Jeter le surnageant.

Passer à l'étape 2 du protocole standard (voir paragraphe 5).

6.13 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN bactérien (p.e. *Borrelia burgdorferi*) à partir de l'urine

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.
-

1 Préparer l'échantillon

Centrifuger **1 mL d'échantillon d'urine** à **13 000 x g** pendant **30 min**. Jeter le surnageant, ajouter à nouveau **1 mL d'échantillon d'urine** au culot et centrifuger à **13 000 x g** pendant **30 min**. Cette étape peut être répétée jusqu'à trois fois.

L'échantillon doit être frais. Un stockage à une température comprise entre - 20 °C et - 80 °C n'est recommandé que pour quelques jours. Après décongélation, incuber l'échantillon à 40 °C jusqu'à ce que tous les précipités soient dissous. L'urine a tendance à former des précipités lorsqu'elle est conservée à basse température.

Passer à l'étape 2 du protocole standard (voir paragraphe 5).

6.14 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN viral (p.e. *CMV*) à partir de l'urine

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Mettre un incubateur ou un bain-marie à 70 °C.
-

1 Préparer l'échantillon

Centrifuger des aliquotes de l'échantillon d'urine pendant **10 min** à **pleine vitesse** (p.e., 4 mL : 4 x 1 mL dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL). Décanter soigneusement le surnageant.

Si des échantillons d'urine congelés sont utilisés, des précipités peuvent apparaître après la décongélation, qui doivent être dissous avant l'étape de centrifugation. Ceci peut être fait par une étape d'incubation de 30 min à 37–40 °C. Si une solution complète n'est pas obtenue, laisser le précipité sédimenter et passer à l'étape 1 du protocole additionnel en utilisant uniquement le surnageant.

2 Pré-lyse de l'échantillon

Remettre le culot en suspension dans **180 µL de tampon T1** et **25 µL de protéinase K**.

Remettre en suspension le premier culot dans **180 µL de tampon T1** et **25 µL de protéinase K**. Transférer la solution remise en suspension du premier tube dans le deuxième tube et la solution remise en suspension du deuxième tube dans le troisième tube et ainsi de suite. Enfin, passer à l'étape 3.

3 Lyse de l'échantillon

Ajouter **200 µL de tampon B3**, vortexer et incuber au moins pendant **20 min à 70 °C**.

4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN

Ajouter **210 µL d'éthanol (96 – 100 %)** à l'échantillon et vortexer vigoureusement.

5 Fixation de l'ADN

Pour chaque échantillon, placer une **colonne NucleoSpin® Tissue** dans un tube collecteur. Appliquer l'échantillon sur la colonne. Centrifuger pendant **1 min à 4 500 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.

6 Lavage de la membrane de silice

1er lavage

Ajouter **500 µL de tampon BW**. Centrifuger pendant **1 min à 4 500 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.

2ème lavage

Ajouter **600 µL de tampon B5** à la colonne et centrifuger pendant **2 min à 11 000 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.

7 Séchage de la membrane de silice

Incuber à couvercle ouvert pendant **1 à 2 min à 70 °C**.

L'éthanol résiduel est éliminé au cours de cette étape.

8 Éluion d'ADN très pur

Ajouter **70 µL de tampon BE**, fermer le couvercle et incubé pendant **3 à 5 min** supplémentaires. Centrifuger pendant **1 min à 4 500 x g**.

6.15 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN génomique des insectes

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
 - Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.
-

1 Préparer l'échantillon

Homogénéiser au maximum **50 mg d'insectes** sous azote liquide et transférer la poudre dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).

Procéder à l'étape 2 du protocole standard (voir paragraphe 5) en ajoutant la protéinase K.

6.16 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN génomique à partir d'écouvillons dentaires

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.

1 Préparer l'échantillon

Placer les écouvillons (papier, coton, brosses, plastique) dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).

2 Pré-lyse de l'échantillon

Ajouter **180 µL de tampon T1** et **25 µL de protéinase K** à chaque échantillon. Fermer le tube de microcentrifugation et centrifuger brièvement pendant **15 s** à **1 500 x g** afin de submerger complètement le matériau de l'écouvillon. Incuber à température ambiante pendant 5 min. Vortexer vigoureusement le tube pendant **15 s** et centrifuger brièvement pendant **15 s** à **1 500 x g**.

Incuber les tubes à **70 °C** dans un incubateur pendant 10 min. Placer un poids sur le tube afin d'éviter que les bouchons ne s'ouvre. Passer à **95 °C** pendant **5 min**. Centrifuger brièvement pendant **15 s** à **1 500 x g** pour recueillir tout échantillon sur les couvercles. Ouvrir les tubes de microcentrifugation.

Supprimer l'étape d'incubation à 95 °C, en fonction de la souche bactérienne à détecter.

2a Séparer la solution de lyse des écouvillons dentaires

Alternative A :

Transférer l'écouvillon dans un **NucleoSpin® Forensic Filter** (non fourni ; voir informations de commande). Couper la tige de l'écouvillon. Centrifuger le NucleoSpin® Forensic Filter pendant **1 min** à **11 000 x g**. Jeter le NucleoSpin® Forensic Filters. Continuer avec le filtrat.

Alternative B :

Placer un **NucleoSpin® Filter**(non fourni ; voir les informations de commande) dans un tube collecteur (2 mL). Transférer l'écouvillon (couper la tige de l'écouvillon) et la solution restante sur le NucleoSpin® Filter. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 x g**. Jeter le NucleoSpin® Filter. Continuer avec le filtrat.

Alternative C :

Transférer autant que possible la solution de lysat dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni). Jeter l'écouvillon et continuer avec la solution récupérée.

Passer à l'étape 3 du protocole standard (voir le paragraphe 5).

6.17 Protocole additionnel pour la purification de l'ADN génomique à partir d'écouvillons buccaux

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Vérifier si le PBS est disponible.
- Mettre un incubateur ou un bain-marie à 56 °C.

1 Préparer l'échantillon

Prélever les échantillons avec des écouvillons en coton, en dacron® (Daigger) ou en C.E.P. (Gibco BRL). Gratter fermement l'intérieur de chaque joue à plusieurs reprises et laisser les écouvillons sécher à l'air.

La personne concernée ne doit pas avoir consommé de nourriture ou de boisson dans les 30 min précédant le prélèvement de l'échantillon.

2 Pré-lyse de l'échantillon

Placer le matériau sec des écouvillons dans des tubes de microcentrifugation de 2 mL (non fournis). Ajouter **400–600 µL de PBS** et **25 µL de solution de protéinase K** aux écouvillons.

Le volume de PBS dépend du type d'écouvillon utilisé : pour les écouvillons en coton et en dacron, 400 µL suffisent ; pour les écouvillons en C.E.P., 600 µL sont nécessaires.

Mélanger en vortexant 2 × 5 s et incuber **10 min à 56 °C**.

2a Séparer la solution de lyse des écouvillons buccaux

Alternative A :

Transférer l'écouvillon dans un **NucleoSpin® Forensic Filter** (non fourni ; voir informations de commande). Couper la tige de l'écouvillon. Centrifuger le **NucleoSpin® Forensic Filter** pendant **1 min** à **11 000 x g**. Jeter le **NucleoSpin® Forensic Filters**. Continuer avec le filtrat.

Alternative B :

Placer un **NucleoSpin® Filter** (non fourni ; voir les informations de commande) dans un tube collecteur (2 mL). Transférer l'écouvillon (couper la tige de l'écouvillon) et la solution restante sur le **NucleoSpin® Filter**. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 x g**. Jeter le **NucleoSpin®** Filtre. Continuer avec le filtrat.

Alternative C :

Transférer autant que possible la solution de lysat dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni). Jeter l'écouvillon et continuer avec la solution récupérée.

3 Lyse de l'échantillon

Ajouter **un volume de** tampon **B3** (400 ou 600 µL ; selon le type d'écouvillon / le volume de tampon PBS utilisé) et vortexer vigoureusement. Incuber les échantillons à **70 °C** pendant **10 min**.

Note : En fonction du nombre de préparations, du tampon B3 supplémentaire peut être nécessaire (voir informations de commande).

4 Ajustement des conditions de fixation de l'ADN

Ajouter **un volume d'éthanol à 96–100 %** (400 ou 600 µL, selon le type d'écouvillon) à chaque échantillon et mélanger en vortexant.

5 Fixation de l'ADN

Transférer **600 µL des échantillons** des tubes de microcentrifugation de 2 mL dans les **colonnes NucleoSpin® Tissue**. Centrifuger à **11 000 x g** pendant **1 min**. Si les échantillons ne sont pas passés complètement, répéter la centrifugation. Jeter le filtrat.

Remettre les colonnes dans les tubes collecteurs et répéter l'étape 5 une ou deux fois, selon le volume de lyse.

Lorsque tout le lysat a été appliqué sur les colonnes, jeter le tube collecteur et placer la colonne dans un nouveau tube collecteur. Passer à l'étape 6 du protocole standard (paragraphe 5).

6.18 Protocole additionnel pour la purification d'ADN génomique à partir du sperme

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le **tampon B5** et la **protéinase K** ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Le **tampon d'éluion BE** peut être préchauffé à 70 °C avant l'éluion.

1 Préparer **200 mL de tampon GuEX** (2 mL de solution stérile de chlorhydrate de guanidine 5 M, **2.1 mL de solution Tris-Cl 1 M** (pH 8), **1.05 mL de solution NaCl 2 M**, **4.2 mL de solution EDTA 0.5 M**, **0.2 mL de solution NaOH 1 M**, ajouter de l'eau pour obtenir un volume de 200 mL, le pH doit être compris entre 8 et 8.5).

2 Transférer 20 µL à 60 µL d'échantillon dans un tube à centrifuger de 1,5 mL. Ajouter **950 µL de tampon GuEX** et **50 µL de protéinase K**.

Incuber le mélange pendant **15 minutes** au maximum à **37 °C**.

Centrifuger le mélange pendant **5 minutes à 12 000 × g à température ambiante**. Le culot contient les spermatozoïdes (**échantillon A**) tandis que l'ADN libre des cellules épithéliales et des leucocytes (**échantillon B**) se trouve dans le surnageant.

3 Le surnageant (échantillon B) est prélevé avec précaution et transféré dans un nouveau tube et traité séparément (étape 6).

4 Ajouter 700 µL de tampon GuEX au culot (échantillon A), centrifuger pendant **5 minutes à 12 000 × g** et jeter le surnageant. Répéter cette étape de lavage 2 à 3 fois.

5 Le culot (échantillon A) est remis en suspension dans un minimum de **300 µL de tampon T1**.

6 **Échantillon A** : Ajouter **25 µL** de solution mère de **protéinase K**, mélanger en vortexant et incuber de 60 °C à 65 °C pendant une nuit.

Échantillon B : ajouter **10 µL** de solution mère de **protéinase K**, mélanger en vortexant et incuber entre 60 °C et 65 °C pendant une nuit.

7 Centrifuger les échantillons pendant **5 minutes à 12 000 × g** à température ambiante pour éliminer tout matériel cellulaire insoluble. Procéder avec le surnageant clarifié.

- 8 Échantillon A :** Ajouter **300 µL de tampon B3** et **300 µL d'isopropanol** au surnageant clarifié et appliquer l'échantillon successivement sur la colonne **NucleoSpin® Tissue**. Centrifuger 1 minute à **6 000 x g** (TA). Si l'échantillon n'est pas complètement aspiré à travers la matrice, répéter l'étape de centrifugation.
-

Échantillon B : ajouter **400 µL d'isopropanol** au surnageant clarifié et appliquer l'échantillon successivement sur la **colonne NucleoSpin® Tissue**. Centrifuger 1 minute à **6 000 x g** (TA). Si l'échantillon n'est pas complètement aspiré à travers la matrice, répéter l'étape de centrifugation.

- 9** Ajouter **500 µL de tampon B5** à la colonne de centrifugation et centrifuger **1 minute** à **6 000 x g** à température ambiante. Jeter le filtrat et répéter cette étape de lavage.
-

- 10** Après les deux étapes de lavage avec le **tampon B5**, jeter le filtrat, placer à nouveau la colonne **NucleoSpin® Tissue** dans la centrifugeuse et centrifuger **2 minutes** à **6 000 x g** à température ambiante pour éliminer complètement le **tampon B5**.
-

- 11** Placer la colonne **NucleoSpin® Tissue** dans un tube à centrifuger propre de **1,5 mL** et éluer l'ADN avec **100 µL à 200 µL de tampon BE préchauffé**. Après deux minutes d'incubation, centrifuger pendant **1 minute** à **6 000 x g** à température ambiante.
-

6.19 Protocole additionnel pour la purification d'ADN génomique des cyanobactéries

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le **tampon B5** et la **protéinase K** ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Le **tampon d'éluion BE** peut être préchauffé à 70 °C avant l'éluion.

1 Préparer la quantité requise de **tampon EX**, contenant **50 mM de Tris HCl** (pH 8), **50 mM d'EDTA**, complété par **1 % (v/v) de Triton X-100**, **20 mg/mL de lysozyme** et **12 mg/mL de RNase**.

2 Centrifuger un volume approprié de culture à **pleine vitesse pendant 5 minutes**. La teneur finale en chlorophylle A du culot doit être comprise entre 30 µg et 40 µg.

3 Remettre soigneusement en suspension le culot dans **170 µL de tampon EX** en pipetant de haut en bas. Incuber pendant 30 à 60 minutes à 37 °C en mélangeant doucement.

Note : Le lysat devient clarifié à ce stade.

Ajouter **25 µL de protéinase K** (22 mg/ml) et poursuivre l'incubation à 56 °C pendant 60 minutes. Inverser les échantillons plusieurs fois pour les mélanger pendant l'incubation.

Passer à l'étape 3 du protocole standard.

6.20 Utilisation du NucleoSpin® Tissue pour la purification d'ADN de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA)

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le **tampon B5** et la **protéinase K** ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Le **tampon d'éluion BE** peut être préchauffé à 70 °C avant l'éluion.

-
- 1 Vortexer vigoureusement les écouillons dans le milieu de Stuart pendant **1 minute** pour libérer toutes les cellules bactériennes. Retirer l'écouvillon et centrifuger l'échantillon pendant **5 minutes** à **8 000 x g**. Retirer et jeter le surnageant.
-
- 2 Remettre en suspension le culot dans **160 µL d'EDTA 50 mM** (pH 8) par pipetages successifs. Pour une lyse efficace, ajouter **20 µL de 10 mg/ml de lysozyme** et **20 µL de 10 mg/ml de lysostaphine**. Vortexer vigoureusement et incuber pendant 40 à 60 minutes à 37 °C. Vortexer de temps en temps.
-
- 3 **200 µL de tampon B3**, vortexer vigoureusement et incuber à **70 °C** pendant **10 minutes**. Vortexer brièvement. Passer à l'étape 4 du protocole standard.
-

7 Références concernant les protocoles additionnels

Protocoles additionnels	Références
Queues de souris et de rats	<ul style="list-style-type: none"> Colvin, S. et al., 341 repeats is not enough for methylation in a new fragile X mouse model. <i>eNeuro</i> 2022, 9 (5), ENEURO.0142–22.2022. https://doi.org/10.1523/eneuro.0142–22.2022. Mimouni, N. E. H. et al., Fertilization, but not post-implantation development, can occur in the absence of sperm and oocyte Beta1 integrin in mice. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> 2022, 23 (22), 13812. https://doi.org/10.3390/ijms232213812.
Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> Garcia-Fernandez, A. et al., Producing <i>Escherichia coli</i> Sequence Type 167 High-Risk Clone. <i>mSphere</i> 2020, 5 (2). https://doi.org/10.1128/msphere.00269–20. Kempf, F et al., Genome Sequences of Two Bovine Mastitis-Causing <i>Escherichia coli</i> Strains. <i>Genome Announcements</i> 2015, 3 (2). https://doi.org/10.1128/genomea.00259–15.
Levure	<ul style="list-style-type: none"> Dzanaeva, L. S. et al., Riboflavin overproduction on lignocellulose hydrolysate by the engineered yeast <i>Candida famata</i>. <i>FEMS Yeast Research</i> 2024. https://doi.org/10.1093/femsyr/foae020. Dmytruk, K. V. et al., Efficient production of bacterial antibiotics aminoriboflavin and roseoflavin in eukaryotic microorganisms, yeasts. <i>Microbial Cell Factories</i> 2023, 22 (1). https://doi.org/10.1186/s12934-023-02129–8.
Tâches de sang séché	<ul style="list-style-type: none"> Glapa-Nowak, A. et al., Leukocyte Telomere Length Is Not Reduced in Children and Adults with Cystic Fibrosis but Associates with Clinical Characteristics—A Cross-Sectional Study. <i>Journal of Clinical Medicine</i> 2021, 10 (4), 590. https://doi.org/10.3390/jcm10040590. Tadesse, H. et al., Epidemiological Survey on Tick-Borne Pathogens with Zoonotic Potential in Dog Populations of Southern Ethiopia. <i>Tropical Medicine and Infectious Disease</i> 2023, 8 (2), 102. https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020102.

Protocoles additionnels	Références
ADN génomique et ARN viral d'échantillon de sang	<ul style="list-style-type: none">• Godler, D. E. et al., Detection of skewed X-chromosome inactivation in Fragile X syndrome and X chromosome aneuploidy using quantitative melt analysis. <i>Expert Reviews in Molecular Medicine</i> 2015, 17. https://doi.org/10.1017/erm.2015.11.• Costantini, D. et al., Physiological costs of infection : herpesvirus replication is linked to blood oxidative stress in equids. <i>Scientific Reports</i> 2018, 8 (1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-28688-0.
Racines des cheveux	<ul style="list-style-type: none">• Lippold, S. et al., Whole mitochondrial genome sequencing of domestic horses reveals incorporation of extensive wild horse diversity during domestication. <i>BMC Evolutionary Biology</i> 2011, 11 (1), 328. https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-328.• Van Den Hoven, R. et al., Putative regulation mechanism for the MSTN gene by a CpG island generated by the SINE marker Ins227bp. <i>BMC Veterinary Research</i> 2015, 11 (1). https://doi.org/10.1186/s12917-015-0428-3.
Tissu inclus en paraffine	<ul style="list-style-type: none">• Campo, I. et al., A large kindred of pulmonary fibrosis associated with a novel ABCA3 gene variant. <i>Respiratory Research</i> 2014, 15 (1). https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-43.• Grbavac, L. et al., Comprehensive Diagnosis, Treatment, and Outcome of <i>Taenia crassiceps</i> Cysticercosis in a Ring-Tailed Lemur (<i>Lemur catta</i>) from a Croatian Zoo : No Longer Unusual? <i>Pathogens</i> 2024, 13 (4), 283. https://doi.org/10.3390/pathogens13040283.
ADN génomique des fèces	<ul style="list-style-type: none">• Fernández-Soto, P. et al., A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Early Detection of <i>Schistosoma mansoni</i> in Stool Samples : A Diagnostic Approach in a Murine Model. <i>PLoS Neglected Tropical Diseases</i> 2014, 8 (9), e3126. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003126.• Fernández-Soto, P. et al., A. Strong-LAMP : A LAMP Assay for Strongyloides spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. <i>PLoS Neglected Tropical Diseases</i> 2016, 10 (7), e0004836. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004836.

Protocoles additionnels**Références**

ADN Viral (ex., CMV) dans les fécès

- Balboni, A. et al., Canine circovirus and Canine adenovirus type 1 and 2 in dogs with parvoviral enteritis. *Veterinary Research Communications* 2021, 46 (1), 223–232. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09850-y>.

Détection de *Mycobacterium tuberculosis* ou de *Legionella pneumophila* dans les expectorations ou le lavage broncho-alvéolaire

- Doughty, E. L. et al., Culture-independent detection and characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. africanum* in sputum samples using shotgun metagenomics on a benchtop sequencer. *PeerJ* 2014, 2, e585. <https://doi.org/10.7717/peerj.585>.

Détection des bactéries EHEC dans les aliments

- Galia, W. et al., Strand-specific transcriptomes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in response to interactions with ground beef microbiota : interactions between microorganisms in raw meat. *BMC Genomics* 2017, 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3957-2>.

Purification de l'ADN bactérien

- Jalkh, A. P. et al., *Chlamydia trachomatis* in human immunodeficiency virus-infected men treated at a referral hospital for sexually transmitted diseases in the Amazonas, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2013, 18 (2), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.06.007>.

Purification de l'ADN bactérien (p.e. *Borrelia burgdorferi*) à partir de l'urine

- Mazlina, M. et al., Pathological changes and bacteriological assessments in the urinary tract of pregnant goats experimentally infected with *Brucella melitensis*. *BMC Veterinary Research* 2018, 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1533-x>.

Purification de l'ADN viral (p.e. CMV) à partir de l'urine

- Balboni, A. et al., Integrated Use of Molecular Techniques to Detect and Genetically Characterise DNA Viruses in Italian Wolves (*Canis lupus italicus*). *Animals* 2021, 11 (8), 2198. <https://doi.org/10.3390/ani11082198>.

Protocoles additionnels

Références

-
- | | |
|--|---|
| Purification de l'ADN génomique d'insectes | <ul style="list-style-type: none">• Pittermannová, P. et al., Wild Small Mammals and Ticks in Zoos—Reservoir of Agents with Zoonotic Potential? <i>Pathogens</i> 2021, 10 (6), 777. https://doi.org/10.3390/pathogens10060777.• Kranzfelder, P. et al., Trace DNA from insect skins : a comparison of five extraction protocols and direct PCR on chironomid pupal exuviae. <i>Molecular Ecology Resources</i> 2015, 16 (1), 353–363. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12446. |
| Purification de l'ADN génomique à partir d'écouvillons dentaires | <ul style="list-style-type: none">• Frerejacques, M. et al., Human Skin Bacterial Community Response to Probiotic (<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938) Introduction. <i>Microorganisms</i> 2020, 8 (8), 1223. https://doi.org/10.3390/microorganisms8081223. |
| Purification de l'ADN génomique à partir d'écouvillons buccaux | <ul style="list-style-type: none">• Eipel, M. et al., Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. <i>Aging</i> 2016, 8 (5), 1034–1048. https://doi.org/10.18632/aging.100972. |
| Purification de l'ADN génomique à partir du sperme | <ul style="list-style-type: none">• Bongiorno, S. et al., Identification of a short region on chromosome 6 affecting direct calving ease in piedmontese cattle breed. <i>PLoS ONE</i> 2012, 7 (12), e50137. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050137.• Capra, E. et al., Epigenetic analysis of high and low motile sperm populations reveals methylation variation in satellite regions within the pericentromeric position and in genes functionally related to sperm DNA organization and maintenance in <i>Bos taurus</i>. <i>BMC Genomics</i> 2019, 20 (1). https://doi.org/10.1186/s12864-019-6317-6. |
| Purification de l'ADN génomique de cyanobactéries | <ul style="list-style-type: none">• Walter, J. M. et al., Occurrence of Harmful Cyanobacteria in Drinking Water from a Severely Drought-Impacted Semi-arid Region. <i>Frontiers in Microbiology</i> 2018, 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00176.• Grubišić, M. et al., Bioprospecting of Microalgae Isolated from the Adriatic Sea : Characterization of Biomass, Pigment, Lipid and Fatty Acid Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activity. <i>Molecules</i> 2022, 27 (4), 1248. https://doi.org/10.3390/molecules27041248. |

Protocoles additionnels

Références

Purification
de l'ADN de
*Staphylococcus
aureus* résistant
à la méthicilline
(SARM)

- Kwon, S.-J. et al., Quantitative PCR for Etiologic Diagnosis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia in Intensive care unit. *Tuberculosis & Respiratory Diseases* 2012, 72 (3), 293.
<https://doi.org/10.4046/trd.2012.72.3.293>.
- Conrad, C. C. et al., Zoonotic fecal pathogens and antimicrobial resistance in Canadian petting zoos. *Microorganisms* 2018, 6 (3), 70.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms6030070>.

8 Annexes

8.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
Rendement d'ADN nul ou faible	<p><i>Lyse incomplète</i></p> <ul style="list-style-type: none"> L'échantillon n'a pas été complètement homogénéisé et mélangé avec le tampon T1 / protéinase K. Le mélange doit être vigoureusement vortexé immédiatement après l'ajout du tampon T1. Diminution de l'activité de la protéinase K : Conserver la protéinase K dissoute à - 20 °C pendant 6 mois. <p><i>Réactifs mal utilisés</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Préparer le tampon B5 et la solution de protéinase K selon les instructions (voir chapitre 3). Ajouter de l'éthanol aux lysats avant de les charger sur les colonnes.
	<p><i>Elution sous-optimale de l'ADN de la colonne</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Pour certains types d'échantillons, préchauffer le tampon BE à 70 °C avant l'élution. Appliquer le tampon BE directement au centre de la membrane de silice. L'efficacité de l'élution diminue considérablement si l'élution est effectuée avec des tampons dont le pH est inférieur à 7,0. Utiliser des tampons d'élution légèrement alcalins comme le tampon BE (pH 8,5). En particulier lorsque l'on s'attend à des rendements élevés à partir de grandes quantités de matériel, nous recommandons l'élution avec 200 µL de tampon BE et l'incubation des colonnes fermées dans un incubateur à 70 °C pendant 5 min avant la centrifugation.
Mauvaise qualité de l'ADN	<p><i>Lyse incomplète</i></p> <ul style="list-style-type: none"> L'échantillon n'a pas été complètement homogénéisé et mélangé avec le tampon T1 / protéinase K. Le mélange doit être vigoureusement vortexé immédiatement après l'ajout du tampon T1. Diminution de l'activité de la protéinase K : Conserver la protéinase K dissoute à - 20 °C pendant 6 mois.

Problème	Causes possibles et suggestions
Mauvaise qualité de l'ADN (suite)	<i>Réactifs mal utilisés</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Préparer le tampon B5 et la solution de protéinase K selon les instructions (voir chapitre 3). Ajouter de l'éthanol aux lysats avant de les charger sur les colonnes.
	<i>ARN dans l'échantillon</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Si l'on souhaite obtenir un ADN exempt d'ARN, ajouter 20 µL de solution de RNase A (10 mg / mL ; non fournie avec le kit) avant l'ajout du tampon B3 et incubé à 37 °C pendant 5 min.
Colonnes bouchées	<i>Trop d'échantillons utilisés</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Ne pas utiliser plus d'échantillon que la quantité recommandée (25 mg pour la plupart des types de tissus). Si du matériel insoluble comme des os ou des cheveux reste dans le lysat, centrifuger les débris et transférer le surnageant clarifié dans un nouveau tube de microcentrifugation avant de procéder à l'ajout du tampon B3 et de l'éthanol. L'utilisation du filtre NucleoSpin® avant le chargement de la colonne permet d'éviter le colmatage de la colonne.
	<i>Lyse incomplète</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • L'échantillon n'est pas complètement homogénéisé et mélangé avec le tampon T1/protéinase K. Le mélange doit être vigoureusement vortexé immédiatement après l'ajout du tampon T1. • Diminution de l'activité de la protéinase K : Conserver la protéinase K dissoute à -20 °C pendant 6 mois.
	<i>Réactifs mal utilisés</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Préparer le tampon B5 et la solution de protéinase K selon les instructions (voir chapitre 3). Ajouter de l'éthanol aux lysats avant de les charger sur les colonnes.
Performance sous-optimale de l'ADN génomique dans les réactions enzymatiques	<i>Élimination de l'éthanol ou du sel</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Veiller à centrifuger ≥ 1 min à 11 000 x g afin d'éliminer la totalité du tampon éthanolique B5 avant d'éluer l'ADN. Si, pour une raison quelconque, le niveau de Buffer B5 a atteint la sortie de la colonne après séchage, répéter la centrifugation. • Ne pas refroidir le tampon B5 avant de l'utiliser. Un tampon froid n'éliminera pas efficacement le sel. Équilibrer le tampon B5 à la température ambiante avant de l'utiliser.

Problème	Causes possibles et suggestions
----------	---------------------------------

Performance sous-optimale de l'ADN génomique dans les réactions enzymatiques (<i>suite</i>)	<i>Contamination de l'ADN par des substances inhibitrices</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Ne pas éluer l'ADN avec le tampon TE. L'EDTA peut inhiber les réactions enzymatiques. Repurifier l'ADN et l'éluer dans le tampon BE. • Si le rapport A_{260}/A_{280} de l'éluat est inférieur à 1,6, répéter la procédure de purification : Ajouter 1 volume de tampon B3 plus 1 volume d'éthanol (96 – 100 %) à l'éluat. Charger le mélange sur une colonne NucleoSpin® Tissue Column et procéder à l'étape 5 du protocole standard (voir paragraphe 5).

8.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® Tissue	740952.10/.50/.250	10/50/250 preps
NucleoSpin® Tissue XS	740901.10/.50/.250	10/50/250 preps
NucleoSpin® DNA RapidLyse	740100.10/.50/.250	10/50/250 preps
NucleoSpin® Blood	740951.10/.50/.250	10/50/250 preps
Tampon T1	740940.25	50 mL
Tampon B3	740920	100 mL
Concentré de tampon B5 (pour 100 mL de tampon B5)	740921	20 mL
Tampon BW	740922	100 mL
Protéinase K	740506	100 mg
RNase A	740505.50 740505	50 mg 100 mg
NucleoSpin® Microbial DNA	740235.10/.50	10/50 preps
NucleoSpin® DNA FFPE XS	740980.10/.50/.250	10/50/250 pièces
NucleoSpin® Forensic Filters	740988.10/.50/.250	10/50/250 pièces
NucleoSpin® Forensic Filters (en vrac)	740988.50B/.250B/1000B	50/250/1000 pièces
Collection Tubes (2 mL)	740600	1000

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® Filters	740606	50
NucleoCard®	740403.10/.100	10/100 cartes

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

8.3 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.

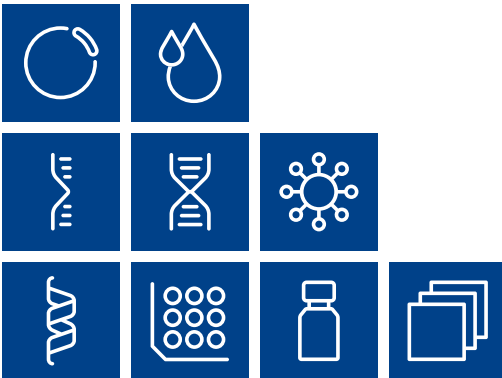
La responsabilité pour tous les dommages éventuels survenant en lien avec nos produits est limitée au strict minimum, comme indiqué dans les conditions générales de vente de MACHEREY-NAGEL, dans leur dernière version, disponibles sur le site internet de la société. MACHEREY-NAGEL n'assume aucune autre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

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

8.4 Versions linguistiques et prédominance

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



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

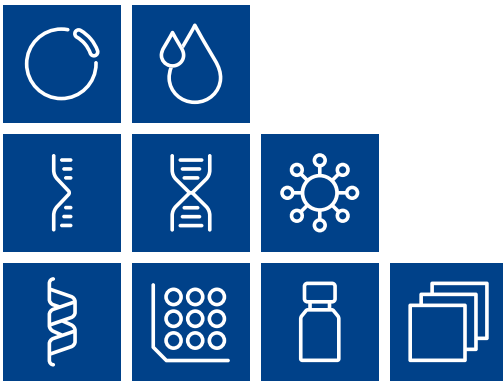
Viral RNA and DNA

Protein

High throughput

Accessories

Auxiliary tools



MACHEREY-NAGEL

www.mn-net.com

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

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

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

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

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

