

MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



ADN génomique des échantillons de fèces



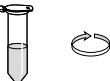


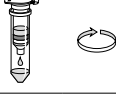
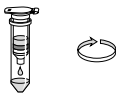
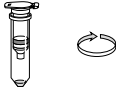

■ NucleoSpin® DNA Stool

Février 2023 / Rev. 04

ADN génomique des échantillons de fèces

Résumé du protocole (Rev. 04)

NucleoSpin® DNA Stool

1 Préparer l'échantillon		MN Bead Tube Type A 180–220 mg d'échantillon 850 µL ST1, Agiter horizontalement 2–3 s												
2 Lyser l'échantillon		70 °C, 5 min Vortexer pendant 10 min à TA vitesse max. sur le MN Bead Tube Holder placé sur un Vortex-Genie® 2												
3 Précipiter les contaminants		13,000 x g, 3 min Transférer 600 µL de surnageants 100 µL ST2 Vortexer 5 s Incuber 5 min, 2–8 °C 13,000 x g, 3 min												
4 Filtrer le lysat		Transférer 550 µL de lysat clarifié sur une colonne NucleoSpin® Inhibitor Removal 13,000 x g, 1 min												
5 Ajuster les conditions de fixation de l'ADN		200 µL ST3 Vortexer 5 s												
6 Fixer l'ADN		Déposer 700 µL d'échantillon sur une colonne NucleoSpin® DNA Stool 13,000 x g, 1 min												
7 Laver la membrane de silice		<table border="0"> <tbody> <tr> <td style="background-color: black; color: white; padding: 2px;">1^{er}</td> <td>600 µL ST3</td> <td>13,000 x g, 1 min</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; color: white; padding: 2px;">2^{ème}</td> <td>550 µL ST4</td> <td>13,000 x g, 1 min</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; color: white; padding: 2px;">3^{ème}</td> <td>700 µL ST5 Vortexer 2 s</td> <td>13,000 x g, 1 min</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; color: white; padding: 2px;">4^{ème}</td> <td>700 µL ST5</td> <td>13,000 x g, 1 min</td> </tr> </tbody> </table>	1^{er}	600 µL ST3	13,000 x g, 1 min	2^{ème}	550 µL ST4	13,000 x g, 1 min	3^{ème}	700 µL ST5 Vortexer 2 s	13,000 x g, 1 min	4^{ème}	700 µL ST5	13,000 x g, 1 min
1^{er}	600 µL ST3	13,000 x g, 1 min												
2^{ème}	550 µL ST4	13,000 x g, 1 min												
3^{ème}	700 µL ST5 Vortexer 2 s	13,000 x g, 1 min												
4^{ème}	700 µL ST5	13,000 x g, 1 min												
8 Sécher la membrane de silice		13,000 x g, 2 min												
9 Eluer l'ADN purifié		30–100 µL SE 13,000 x g, 1 min Vortexer 2 s												

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)
E-mail: info@mn-net.com

Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-333
E-mail: support@mn-net.com

USA

MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)
E-mail: sales-us@mn-net.com

France

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France
Tel.: +33 388 68 22 68
E-mail: sales-fr@mn-net.com

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

Switzerland

MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
E-mail: sales-ch@mn-net.com

Sommaire

1	Composition	4
1.1	Composants des kits	4
1.2	Réactifs, consommables et équipement nécessaires	5
1.3	A propos de ce manuel d'utilisation	5
2	Description du kit	6
2.1	Principe général	6
2.2	Caractéristiques du kit	7
2.3	Quantité d'échantillon	7
2.4	Lyse de l'échantillon	8
2.5	Clarification du lysat et fixation de l'ADN	9
2.6	Procédure de lavage	9
2.7	Procédures d'élution	9
2.8	Estimation du rendement et de la qualité de l'ADN	10
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	11
4	Instructions de sécurité	12
4.1	Élimination des déchets	12
5	Protocole de purification pour les fèces fraîches ou congelées	13
6	Annexes	18
6.1	Guide de résolution des problèmes	18
6.2	Informations de commande	20
6.3	Restrictions d'utilisation / garantie	21
6.4	Versions linguistiques et prédominance	21

1 Composition

1.1 Composants des kits

NucleoSpin® DNA Stool			
REF	10 preps 740472.10	50 preps 740472.50	250 preps 740472.250
Tampon de lyse ST1	20 mL	50 mL	2 × 125 mL
Tampon de lyse ST2	10 mL	10 mL	50 mL
Tampon de fixation ST3	10 mL	60 mL	2 × 125 mL
Tampon de lavage ST4	6 mL	30 mL	2 × 75 mL
Tampon de lavage ST5 (Concentré)*	6 mL	25 mL	1 × 25 mL 1 × 50 mL
Tampon d'élution SE**	13 mL	13 mL	30 mL
MN Bead Tubes Type A	10	50	250
Colonnes NucleoSpin® Inhibitor Removal (Bagues rouges)	10	50	250
Colonnes NucleoSpin® DNA Stool (Bagues vertes)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL, avec bouchons)	10	50	250
Manuel d'utilisation	1	1	1

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

** Composition du tampon d'élution SE: Tris/HCl 5 mM; pH 8.5

1.2 Réactifs, consommables et équipement nécessaires

Réactifs

- Ethanol 96 – 100 %

Consommables

- Tubes 1,5 mL avec bouchons
- Tubes 2,0 mL avec bouchons
- Tubes collecteurs 2 mL sans bouchons (optionnel)
- Cônes jetables

Équipement

- Pipettes manuelles
- Centrifugeuse pour microtubes
- Équipement de protection individuelle (ex: blouse, gants, lunettes de protection)
- Appareil pour le broyage des échantillons:
Le support 'MN Bead Tube Holder' (REF 740469, voir 'Informations de commande', paragraphe 6.2) est recommandé en combinaison d'un Vortex-Genie® 2 pour bénéficier d'une solution économique et efficace pour l'homogénéisation des échantillons de fèces. L'adaptateur 'Vortex Adapter' (MoBio) pour Vortex-Genie® 2 X est également utilisable.

Alternativement, des broyeurs pour tubes de billes peuvent être utilisés (ex: mixer mill MM200, MM300, MM400 (Retsch®)).

L'utilisation d'autres appareils de broyage comme le système FastPrep® (MPBiomedicals), Precellys® (Bertin Technologies), MagNA™ Lyser (Roche), TissueLyser (QIAGEN), Bullet Blender® (Next Advance), Mini-Beadbeater™ (Biospec Products), Speed Mill (Analytik Jena) ou tout autre équipement similaire peut entraîner la destruction des tubes à billes. De tels appareils induisent un stress mécanique important. En fonction du type de tube de broyage et de son contenu (par exemple billes métalliques, volume de liquide, type d'échantillon), et en particulier à haute fréquence d'agitation et/ou si la durée d'agitation est importante, les tubes peuvent être endommagés. Lors de l'utilisation de ces appareils, il est de la responsabilité de l'utilisateur d'effectuer un test préalable de stabilité afin de s'assurer du maintien de l'intégrité des tubes (ex: compatibilité avec l'intensité et la durée d'agitation).

1.3 A propos de ce manuel d'utilisation

Il est fortement recommandé aux nouveaux utilisateurs du kit NucleoSpin® DNA Stool de lire la version détaillée du protocole. Les utilisateurs expérimentés pourront utiliser le résumé du protocole pour un suivi rapide de la succession des étapes de la procédure.

Toute la littérature technique est disponible en ligne: www.mn-net.com.

2 Description du kit

2.1 Principe général

Le kit **NucleoSpin® DNA Stool** est conçu pour l'extraction efficace à la fois de l'ADN génomique microbien et aussi de l'ADN de l'hôte, à partir d'échantillons de fèces fraîches ou congelées.

Le kit contient un tampon de lyse spécifique ST1 qui, utilisé en combinaison avec une étape de chauffe de 5 minutes, constitue une lyse chimique efficace des membranes avant la lyse mécanique avec les tubes de broyage **NucleoSpin® Beads Tubes Type A** (contenant des billes de broyage en céramique) agités dans un dispositif de broyage adéquat (voir 1.2).

Aucune réaction enzymatique comme la digestion par des protéases n'est nécessaire pour l'homogénéisation de l'échantillon.

Les matières insolubles de l'échantillon et les billes en céramique sont ensuite éliminées par une courte centrifugation. Les protéines et inhibiteurs de PCR présents dans l'échantillon de fèces sont précipités par l'ajout du tampon ST2 au cours d'une brève incubation à froid, suivie d'une étape de centrifugation permettant l'élimination des impuretés.

Le surnageant est finalement clarifié lors du passage à travers une colonne **NucleoSpin® Inhibitor Removal**, éliminant totalement les substances issues de l'échantillon et susceptibles d'interférer sur les réactions enzymatiques.

Les conditions de fixation sont créées par ajout du tampon de fixation ST3 au filtrat issu de la colonne **NucleoSpin® Inhibitor Removal** et l'échantillon est ensuite chargé sur la colonne **NucleoSpin® DNA Stool**.

Les contaminants résiduels comme les polysaccharides complexes, les sels biliaires et d'autres inhibiteurs de PCR sont éliminés lors d'une procédure de lavage performante faisant intervenir le tampon de fixation ST3 et les tampons de lavage ST4 et ST5. Après séchage de la membrane, l'ADN purifié prêt à l'emploi est élué dans le tampon d'éluion.

2.2 Caractéristiques du kit

Table 1: Résumé des caractéristiques du kit

Paramètre	NucleoSpin® DNA Stool
Technologie	Technologie membrane de silice
Format	Mini colonne à centrifuger
Nature des échantillons	Fèces (fraîches ou congelés)
Quantité de l'échantillon	180–220 mg*
Rendement	2–10 µg (selon l'échantillon et la méthode de broyage)
Volume d'éluion	30–100 µL
Temps de préparation	60 min/10 preps
Capacité de fixation	50 µg

2.3 Quantité d'échantillon

NucleoSpin® DNA Stool est optimisé pour une quantité de 180–220 mg de fèces humaines. Pour les échantillons animaux, une quantité moindre peut être préférable.

Les échantillons de fèces très sèches, comme celles de lapin ou de souris peuvent absorber le tampon de lyse, induisant un volume insuffisant après la première centrifugation. Dans ce cas, il est recommandé de réduire la quantité d'échantillon à environ 60 – 80 mg et d'augmenter le volume total de lyse à 1 mL. Un mélange 1 :1 de tampon de lyse ST1 et d'eau exempte de nucléases est conseillé pour ces échantillons (voir aussi 2.4 pour des informations détaillées à propos de la quantité d'échantillon et des conditions de lyse).

Pour les échantillons de fèces difficiles, par exemple riches en lipides, polysaccharides ou protéines, une diminution de la prise d'essais peut également s'avérer bénéfique en améliorant l'efficacité de la lyse et la pureté de l'ADN. Il est préférable dans ce cas de débiter l'extraction à partir de 60–80 mg.

Les échantillons d'origine humaine peuvent aussi contenir des matières non digérées (ex: peaux de fruits ou de céréales, graines). Ces particules ne doivent pas être transférées dans les tubes de broyage MN Bead Tubes.

* Pour les échantillons humains utiliser environ 200 mg. Pour les échantillons de provenance animale - selon l'espèce - une quantité moindre peut s'avérer préférable pour des résultats optimaux.

2.4 Lyse de l'échantillon

Une lyse complète de l'échantillon est essentielle pour l'obtention d'un rendement élevé d'ADN et afin d'éliminer les contaminants pendant la procédure de purification sur colonne de silice. Comme les échantillons de fèces contiennent un mélange complexe de résidus alimentaires, de lipides, de protéines, de sels biliaires et de polysaccharides, la lyse chimique effectuée par le tampon ST1 est amplifiée par une étape de chauffage à 70 °C pendant 5 minutes. Cette étape de traitement thermique améliore la lyse et la solubilisation des composants des fèces. Il est nécessaire d'agiter les échantillons horizontalement pendant 2 – 3 secondes après l'ajout du tampon ST1 et avant l'incubation à chaud afin de mélanger l'échantillon et le tampon de lyse (prendre deux tubes de broyage MN Bead Tubes entre le pouce et l'index et agiter vigoureusement pendant 2 – 3 s).

Pour certains échantillons d'origine animale, par exemple les fèces d'herbivores comme le lapin ou le mouton, l'étape d'incubation à 70 °C peut être omise. L'étape de broyage avec les billes est suffisante pour lyser ces échantillons.

L'étape suivante d'homogénéisation dans les MN Bead Tubes dissout totalement l'échantillon de fèces dans le tampon de lyse et brise les cellules microbiennes. Même les fèces solides et sèches comme celles de souris seront mise en suspension après 10 minutes d'agitation sur un vortex ou dans un broyeur de type Retsch® 300 MM pendant 30–60 secondes à une fréquence de 30/s (les conditions optimales de lyse mécaniques sont à ajuster en fonction de l'appareil utilisé). Les billes de céramique incluses s'avèrent être les plus performantes avec le support MN Bead Tube Holder (REF 740469) placé sur un Vortex-Genie® 2 (Scientific Industries Inc.). Voir le manuel d'utilisation du "MN Bead Tube Holder" pour l'utilisation de cet adaptateur.

Voir les recommandations suivantes pour optimiser les conditions de lyse :

Table 2: Quantité d'échantillon et conditions de lyse recommandées

Echantillon de Fèces	Quantité	Volume de tampon	Traitement thermique
Omnivores et carnivores, ex: humains ou félins (contenu en eau moyen à élevé, parfois visqueux)	180–220 mg	850 µL ST1	Yes
Herbivores, ex: mouton ou lapin (faible teneur en eau, riche en fibres)	60–80 mg	500 µL ST1 plus 500 µL eau*	No
Fèces très solides et sèches, ex : fèces sèches de souris (très faible teneur en eau)	60–70 mg	500 µL ST1 plus 500 µL eau*	Yes

* diluer le tampon ST1 avec de l'eau nucléases-free.

2.5 Clarification du lysat et fixation de l'ADN

Le lysat est clarifié en deux étapes. Lors de la première étape, les contaminants sont précipités par ajout du tampon de lyse ST2 et incubation à 2–8 °C pour potentialiser la précipitation. Afin de permettre un transfert de température efficace pendant cette courte incubation, il est recommandé d'utiliser des racks de tubes pré-refroidis sur la glace pilée dans une boîte en Styrofoam™ ou dans un réfrigérateur.

Une colonne NucleoSpin® Inhibitor Removal est utilisée pour l'élimination finale des contaminants contenus dans le lysat. Après ajout du tampon de fixation ST3 au filtrat de la colonne NucleoSpin® Inhibitor Removal, l'ADN est fixé efficacement à la colonne NucleoSpin® DNA Stool.

2.6 Procédure de lavage

La procédure de lavage effectuée dans le protocole NucleoSpin® DNA Stool est optimisée pour éliminer les contaminants résiduels fixés à la membrane de silice.

Elle débute par un lavage avec le tampon de fixation ST3, suivi d'un second lavage avec le tampon de lavage ST4, contenant également un sel de guanidine.

Le troisième et quatrième lavage sont menés avec le tampon de lavage ST5, faiblement salin. La courte étape de vortex de la colonne NucleoSpin® DNA Stool après le premier lavage avec ST5 a pour but d'éliminer les potentiels contaminants en sels de guanidine déposés sur le plastique de la colonne et le bouchon. Comme le sel de guanidine utilisé possède une absorbance élevée à 230 nm, cette étape permet d'améliorer le ratio A_{260}/A_{230} . La seconde étape de lavage avec ST5 peut être effectuée par centrifugation seule, sans vortex préalable de la colonne.

2.7 Procédures d'élution

Il est possible d'ajuster le volume de tampon d'élution en fonction des applications auxquelles l'ADN purifié sera soumis. En plus de la procédure standard, une augmentation de la concentration est possible en réduisant le volume d'élution de 100 à 30 µL.

Si un volume d'élution inférieur à 100 µL est utilisé pour l'élution, il est important de pipeter le tampon d'élution directement au centre de la membrane de la colonne NucleoSpin® DNA Stool afin de mouiller la membrane totalement.

Incuber la colonne NucleoSpin® DNA Stool pendant 1 minute à température ambiante après le dépôt du tampon d'élution améliore également l'efficacité de l'élution lorsque le volume déposé est inférieur à 100 µL.

Si l'élution est menée dans un volume de 30 µL, le rendement peut être amélioré en rechargeant le tampon d'élution sur la colonne. Après une première élution, pipeter les 30 µL et les déposer une nouvelle fois sur la membrane de la colonne

NucleoSpin® DNA Stool et centrifuger à nouveau pendant 1 minute à 13,000 x g.

2.8 Estimation du rendement et de la qualité de l'ADN

La méthode la plus couramment utilisée pour quantifier l'ADN est la spectrophotométrie UV-VIS. La concentration de l'ADN dans la fraction finale éluée peut être déduite à partir de l'absorption maximale à 260 nm (A_{260}). Cependant, cette mesure implique l'absence de contaminants susceptibles de contribuer significativement à l'absorption totale à 260 nm, pouvant donc induire à une surestimation de la concentration en ADN.

Ratio de pureté A_{260}/A_{280}

Le principal indicateur de pureté est le ratio A_{260}/A_{280} , qui doit se situer entre 1,7 et 1,9. Des valeurs inférieures à 1,7 indiquent une contamination en protéines.

Ratio de pureté A_{260}/A_{230}

Un autre indicateur de pureté de l'ADN est le ratio d'absorption à 260 nm et 230 nm. A_{260}/A_{230} doit excéder 2,0 pour indiquer la pureté de l'ADN et est acceptable jusqu'à environ 1,5. Des ratios autour de 1,0 indiquent des impuretés dans la fraction d'ADN éluée, pouvant être de différentes natures, plusieurs composants absorbant à ces longueurs d'onde.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention: les tampons ST3 et ST4 contiennent du thiocyanate de guanidine et du chlorhydrate de guanidine, respectivement. Porter des gants et des lunettes de protection !

Conditions de stockage :

- Tous les composants doivent être stockés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette du kit. Le stockage à des températures inférieures peut induire la précipitation de sels. Le cas échéant, incuber les flacons pendant quelques minutes à environ 30–40 °C et mélanger jusqu'à dissolution totale des précipités.

Avant de débiter la procédure **NucleoSpin® DNA Stool**, préparer :

- **Tampon de lavage ST5** : Ajouter le volume indiqué d'éthanol (96–100 %) dans le flacon de tampon ST5 concentré. Indiquer sur le flacon que l'éthanol a bien été ajouté. Le tampon ST5 est stable à température ambiante (15–25 °C) pendant au moins 1 an.

NucleoSpin® DNA Stool			
REF	10 preps 740472.10	50 preps 740472.50	250 preps 740472.250
Tampon ST5 (Concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	25 mL Ajouter 100 mL d'éthanol	25 mL Ajouter 100 mL d'éthanol 50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoSpin® DNA Stool**, 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).



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans le tampon ST4 et le thiocyanate de guanidinium dans le tampon ST3 peuvent former des composés hautement réactifs lorsqu'ils sont combinés avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets liquides issus de la procédure.

Les déchets générés par le kit **NucleoSpin® DNA Stool** 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 pour les fèces fraîches ou congelées

Avant de débiter la préparation:

- Vérifier l'absence de précipités dans le tampon de lyse ST1 en incubant le tampon 30–40 °C pendant 10 minutes en agitant le flacon toutes les 2 minutes.
- Régler un bloc chauffant à 70 °C pour l'étape initiale d'incubation.
- Placer un rack de tubes dans une boîte de Styrofoam™ contenant de la glace pilée ou dans un réfrigérateur pour l'étape de précipitation des contaminants à 2–8 °C.

Il est recommandé de porter une blouse, des lunettes de protection et des gants pendant toute la procédure.

1 Préparer l'échantillon

Voir les paragraphes 2.3 et 2.4 pour plus d'informations concernant la quantité d'échantillon et la procédure de lyse recommandée pour les échantillons de fèces en fonction de l'espèce.



**180–220 mg
d'échantillon**
+ 850 µL ST1

Transférer **180–220 mg** de **fèces humaines** dans un tube de broyage **MN Bead Tube Type A**.

**Agiter
horizontalement
2–3 s**

Important: Ne pas surcharger le tube de billes, ceci pourrait réduire le rendement et la pureté de l'ADN obtenu. Il est recommandé d'utiliser une balance appropriée pour mesurer la masse de l'échantillon.

Ajouter **850 µL de tampon ST1**.

Note: pour les échantillons très secs ou fibreux de fèces animales, il est recommandé d'augmenter le volume total de lyse à 1 mL en ajoutant 0.5 mL de tampon ST1 et 0.5 mL d'eau nucléases-free, les fèces absorbant une partie du volume de lyse.

Fermer le tube MN Bead Tube et **agiter** horizontalement pendant **2–3 secondes** pour mélanger l'échantillon de fèces et le tampon de lyse avant de le placer dans le bloc chauffant.

2 Lyse de l'échantillon

Voir le paragraphe 2.4 pour plus d'information concernant les conditions recommandées pour la lyse et l'homogénéisation selon la nature des échantillons.



70 °C, 5 min

Incuber le MN Bead Tubes pendant 5 min à 70 °C.

Note: Pour certains échantillons d'origine animale contenant principalement des fibres, par exemple les fèces d'herbivores comme le lapin ou le mouton, l'incubation à 70 °C peut être omise. L'étape de lyse mécanique avec les billes est suffisante (voir le paragraphe 2.4 pour plus d'informations).

Agiter le MN Bead Tube dans le support MN Bead Tube Holder placé sur un Vortex-Genie® 2. Vortexer les échantillons à vitesse maximale pendant 10 min à température ambiante.

**Agiter
TA, 10 min**

D'autres appareils de broyage sont également utilisables (voir 1.2)

3 Précipiter les contaminants

Centrifuger pendant **3 min à 13,000 x g**.



13,000 x g, 3 min

Transférer 600 µL de surnageant dans un nouveau tube **2 mL avec bouchon** (non fourni).



**Transférer
600 µL de
surnageant**

Note: si le volume disponible est moindre transférer le maximum dans le tube 2 mL. Eviter le transfert de matières du culot ou flottantes. Les fibres ou résidus de peaux peuvent colmater le cône. Aspirer le surnageant lentement et précautionneusement.



**+ 100 µL ST2
Vortexer 5 s**

Ajouter **100 µL de tampon ST2**, fermer le tube et vortexer pendant **5 s**.

2–8 °C, 5 min

Incuber **5 min à 2–8 °C**.



13,000 x g, 3 min

Centrifuger pendant **3 min à 13,000 x g**.

4 Filtrer le lysat

Placer une colonne **NucleoSpin® Inhibitor Removal** (bague rouge) dans un tube collecteur (2 mL, avec bouchon).



Transférer
550 µL de lysat
clarifié

En évitant le culot, transférer **550 µL de lysat clarifié** sur la colonne NucleoSpin® Inhibitor Removal.

Note: si seul un volume moindre est récupérable, transférer le maximum dans la colonne. Éviter de transférer sur la colonne des matières provenant du culot ou flottant au-dessus du lysat.



13,000 x g,
1 min

Centrifuger pendant **1 min à 13,000 x g.**

Jeter la colonne NucleoSpin® Inhibitor Removal.

Note: si un culot est visible dans le filtrat, transférer le surnageant clair dans un nouveau tube 2 mL (non fourni).

5 Créer les conditions de fixation

Ajouter **200 µL de tampon ST3** et fermer le tube.



+ 200 µL ST3
Vortexer 5 s

Vortexer pendant **5 s**

6 Fixer l'ADN

Placer une colonne **NucleoSpin® DNA Stool** (bague verte) dans le tube collecteur (2 mL).



Déposer 700 µL
d'échantillon

Déposer 700 µL d'échantillon sur la colonne.



13,000 x g,
1 min

Centrifuger pendant **1 min à 13,000 x g.**

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

7 Laver la membrane de silice

1er Lavage

Ajouter **600 µL de tampon ST3** à la colonne NucleoSpin® DNA Stool.

Centrifuger pendant **1 min à 13,000 x g**.

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



+ 600 µL ST3

**13,000 x g,
1 min**

2ème Lavage

Ajouter **550 µL de tampon ST4** à la colonne NucleoSpin® DNA Stool.

Centrifuger pendant **1 min à 13,000 x g**.

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



+ 550 µL ST4

**13,000 x g,
1 min**

3ème Lavage

Ajouter **700 µL de tampon ST5** à la colonne NucleoSpin® DNA Stool.

Refermer la colonne et **vortexer pendant 2 s**.
Centrifuger pendant **1 min à 13,000 x g**.

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



+ 700 µL ST5

Vortexer 2 s

**13,000 x g,
1 min**

4ème Lavage

Ajouter **700 µL de tampon ST5** à la colonne NucleoSpin® DNA Stool.

Centrifuger pendant **1 min à 13,000 x g**.

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



+ 700 µL ST5

**13,000 x g,
1 min**

Note: le même tube collecteur est réutilisé pendant les lavages pour réduire les déchets. Sinon, des tubes collecteurs supplémentaires sont disponibles séparément. Voir 6.2 'Informations de commande'.

8 Sécher la membrane de silice

Centrifuger pendant **2 min à 13,000 x g**.

Note: si, pour quelque raison, la colonne NucleoSpin® DNA Stool est entrée en contact avec le filtrat après l'étape de séchage, jeter le filtrat et centrifuger de nouveau.



**13,000 x g,
2 min**

9 Eluer l'ADN

Placer la colonne **NucleoSpin® DNA Stool** dans un **nouveau tube 1.5 mL** (non fourni).



30–100 µL SE

Ajouter **30 µL** (pour une concentration maximale), **50 µL** (compromis rendement/concentration), ou **100 µL** (pour un rendement maximal) de tampon **SE** dans la colonne.

Note: si le volume d'élution utilisé est inférieur, le rendement peut être amélioré en suivant les recommandations du 2.7.

Fermer la colonne et centrifuger pendant une **1 min** à **13,000 x g**.



**13,000 x g,
1 min**

Jeter la colonne NucleoSpin® DNA Stool.

Vortex 2 s

Vortexer chaque tube d'élution pendant **2 s**.

6 Annexes

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
Rendement faible ou nul	<i>Conditions de lyse suboptimales</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Quantité d'échantillon excessive déposée dans le tube de broyage MN Bead Tube. Manque d'espace vide empêche le mouvement nécessaire des billes pour une efficacité de broyage optimale. Utiliser une moindre quantité d'échantillon (voir paragraphes 2.3 et 2.4 pour plus d'informations).
	<i>Broyage et/ou homogénéisation insuffisants</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Agitation insuffisante des tubes de broyage MN Bead Tube, ou de trop courte durée. Augmenter la durée d'agitation ou la fréquence d'agitation ou utiliser un autre appareil (voir paragraphe 2.4 pour plus d'informations).
	<i>Mauvaise utilisation ou conservation des réactifs</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Distribuer toujours les volumes exacts recommandés dans le protocole ! Suivre les instructions concernant les méthodes de mélange (agitation, vortex etc.).
	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter le volume indiqué d'éthanol (96 – 100 %) au tampon de lavage ST5 fourni sous forme concentrée et mélanger précautionneusement (voir paragraphe 3 pour plus d'informations). Stocker les kits à température ambiante. Le stockage à des températures inférieures peut induire la précipitation de sels. Vérifier l'absence de précipité blanc dans le tampon de lyse ST1. En cas de précipité visible, incuber le flacon pendant 10 min à 30 – 40 °C et agiter toutes les 2 minutes jusqu'à dissolution complète du précipité. Conserver les flacons bien clos pour éviter l'évaporation et les contaminations potentielles.
	<i>Mauvaise conservation des échantillons de fèces</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Les échantillons de fèces doivent être stockés à 2 – 8 °C après collecte. Si l'ADN n'est pas extrait le même jour, congeler les échantillons à -20 °C. Ils devront être décongelés à température ambiante immédiatement avant l'extraction ou laissés une nuit dans un bac de Styrofoam™ rempli de glace pilée.

Problème

Causes possibles et suggestions

ADN dégradé

Broyage mécanique excessivement violent

- Réduire l'intensité ou la durée d'incubation pendant l'étape de lyse mécanique.
-

Performance suboptimale de l'ADN dans les applications

Rendement d'ADN surestimé

- Si l'ADN n'est pas totalement exempt de contaminants, la quantification UV-VIS basée sur la mesure de A_{260} n'est pas fiable en raison de la contribution des contaminants à l'absorption à 260 nm.

Contamination par de l'éthanol ou des sels

- Veiller à bien sécher la membrane de silice de la colonne NucleoSpin® DNA Stool avant l'éluion pour éviter la contamination de l'ADN par de l'éthanol du tampon de lavage ST5.
- Vérifier que le tampon ST5 est bien à température ambiante avant utilisation. Le lavage avec le tampon à températures inférieures diminue l'efficacité de dessalage du tampon.

Contamination par des inhibiteurs de PCR

- La pureté de l'ADN peut être améliorée en diminuant la quantité d'échantillon initial (voir paragraphe 2.3 pour plus d'informations).
 - Suivre scrupuleusement les instructions concernant les différentes étapes de lavages.
 - Diluer l'ADN à 1 :10 pour réduire la concentration en inhibiteur.
-

6.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® DNA Stool	740472.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250 preps
MN Bead Tube Holder	740469	1
NucleoSpin® DNA Insect	740470.10 / .50	10 / 50 preps
NucleoSpin® Microbial DNA	740235.10 / .50	10 / 50 preps
NucleoSpin® Soil	740780.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250 preps
MN Bead Tubes Type A (billes céramique 0.6–0.8 mm ; recommandé pour les fèces, sols, sédiments)	740786.50	50
MN Bead Tubes Type B (billes en verre 40–400 µm ; recommandé pour les bactéries)	740812.50	50
MN Bead Tubes Type C (Corindon 1–3 mm ; recommandé pour les levures)	740813.50	50
MN Bead Tubes Type D (billes en métal 3 mm ; recommandé pour les insectes)	740814.50	50
MN Bead Tubes Type E (billes en verre 40–400 µm et billes en métal 3 mm ; recommandé pour les bactéries difficiles à lyser à l'intérieur des insectes et tissus)	740815.50	50
MN Bead Tubes Type F (corindon 1–3 mm + billes en métal 3 mm ; à utiliser uniquement avec le support MN Bead Tube Holder !)	740816.50	50
Tubes collecteur (2 mL)	740600	1000

Visitez www.mn-net.com pour des informations plus détaillées sur les produits.

6.3 Restrictions d'utilisation / garantie

Tous les produits MACHEREY-NAGEL sont conçus uniquement pour l'usage auquel ils sont destinés. Ils ne sont pas destinés à être utilisés pour un autre usage. La description de l'usage prévu des produits est disponible dans les notices originales des produits MACHEREY-NAGEL. Avant d'utiliser nos produits, veuillez lire attentivement le mode d'emploi et les consignes de sécurité figurant dans la Fiche de Données de Sécurité du produit.

Ce produit MACHEREY-NAGEL comporte une documentation énonçant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La garantie fournie est limitée aux spécifications et descriptions des données indiquées dans la documentation originale MACHEREY-NAGEL.

Aucune autre déclaration, verbale ou écrite, par des employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL n'est autorisée, à l'exception des déclarations écrites signées par un représentant dûment habilité de MACHEREY-NAGEL. Le client ne doit pas s'y fier et elles ne font pas partie d'un contrat de vente ou de la présente garantie.

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

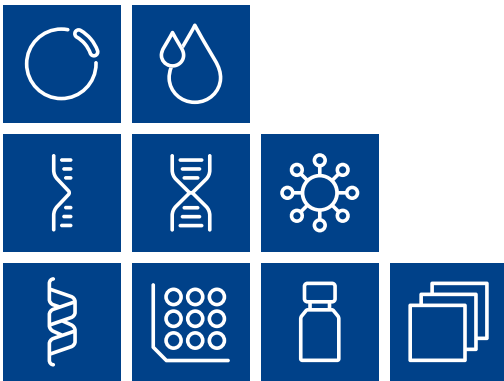
Les produits et leur application sont susceptibles de modifications. Par conséquent, veuillez contacter notre Equipe Service Technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur local pour obtenir des informations scientifiques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

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

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

6.4 Versions linguistiques et prédominance

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



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

