Biologie moléculaire

MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



Purification d'ADN plasmidique

- NucleoSpin® Plasmid
- NucleoSpin® Plasmid (NoLid)

Novembre 2024 / Rev. 15

DOMINIQUE DUTSCHER

DOMINIQUE DUTSCHER

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valencienner 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

www.mn-net.com

Sommaire

1 Composition 4
1.1 Composants des kits 4
1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur 6
1.3 À propos de ce manuel 6
2 Description 7
2.1 Principe général 7
2.2 Caractéristiques des kits 7
2.3 Croissance des cultures bactériennes 8
2.4 Neutralisation du lysat et LyseControl 10
2.5 Procédures d'élution 10
3 Conditions de stockage et préparation des solutions de travail 11
4 Instructions de sécurité 12
4.1 Élimination des déchets 12
5 Protocoles NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) 13
5.1 Purification de l'ADN plasmidique high copy chez E. coli 13
5.2 Purification de plasmides low copy, de constructions P1 ou de cosmides 15
5.3 Purification de plasmides à partir de bactéries Gram positif 17
5.4 Purification d'ADN plasmidique high copy à l'aide d'un système à vide 18
5.5 Clean-up d'ADN plasmidique 21
6 Annexes 22
6.1 Guide de résolution des problèmes 22
6.2 Informations de commande 25
6.3 Références 25
6.4 Restrictions de l'utilisation / garantie 26
6.5 Versions linguistiques et prédominance 26

DOMINIQUE DUTSCHER

1 Composition

1.1 Composants des kits

	NucleoSpin® Plasmid		
REF	**10 preps 740588.10**	**50 preps 740588.50**	**250 prep. 740588.250**
Tampon de resuspension A1	5 mL	15 mL	75 mL
Tampon de lyse A2	5 mL	15 mL	100 mL
Tampon de neutralisation A3	5 mL	20 mL	100 mL
Tampon de lavage AW	6 mL	30 mL	2 × 75 mL
Tampon de lavage A4 (concentré)*	6 mL	12 mL	2 × 25 mL
Tampon d'élution AE**	13 mL	13 mL	60 mL
RNase A (lyophilisée)*	2,5 mg	6 mg	30 mg
Colonnes NucleoSpin® Plasmid (anneaux blancs)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	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 AE : 5 mM Tris/HCl, pH 8,5

DOMINIQUE DUTSCHER

Composants des kits *suite*

	NucleoSpin® Plasmid (NoLid)		
REF	**10 preps 740499.10**	**50 preps 740499.50**	**250 prep. 740499.250**
Tampon de resuspension A1	5 mL	15 mL	75 mL
Tampon de lyse A2	5 mL	15 mL	100 mL
Tampon de neutralisation A3	5 mL	20 mL	100 mL
Tampon de lavage AW	6 mL	30 mL	2 × 75 mL
Tampon de lavage A4 (concentré)*	6 mL	12 mL	2 × 25 mL
Tampon d'élution AE**	13 mL	13 mL	60 mL
RNase A (lyophilisée)*	2,5 mg	6 mg	30 mg
Colonnes NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (anneaux blancs)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	10	50	250
Manuel d'utilisation	1	1	1

DOMINIQUE DUTSCHER

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

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

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

Réactifs

- 96 – 100 % d'éthanol

Consommables

- Microtubes de 1,5 mL pour la lyse des échantillons et l'élution de l'ADN
- Cônes de pipette jetables

Equipement

- Pipettes manuelles
- Centrifugeuse pour microtubes
- Vortex
- Bloc chauffant (NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) : pour les grandes constructions ou pour le tampon de lavage AW en option)
- Équipements de protection individuelle (blouse, gants, lunettes)

1.3 À propos de ce manuel

Il est fortement recommandé aux nouveaux utilisateurs de lire attentivement le manuel d'utilisation **NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)** avant d'utiliser les kits. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Ce dernier est conçu uniquement pour un suivi rapide des différentes étapes de la procédure.

Toute la documentation technique est disponible sur Internet à l'adresse suivante : ***www.mn-net.com***. Veuillez consulter le site web de MACHEREY-NAGEL pour vérifier que vous utilisez la dernière version du manuel d'utilisation.

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

DOWNLOAD DUTSCHE

2 Description

2.1 Principe général

Avec le kit **NucleoSpin® Plasmid**, les culots de bactéries sont remis en suspension (tampon A1) et l'ADN plasmidique est libéré des cellules *E. coli* par lyse SDS / alcaline (tampon A2). Le tampon A3 neutralise le lysat obtenu et permet de créer les conditions appropriées pour la fixation de l'ADN plasmidique à la membrane de silice de la **colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)**. Les protéines précipitées, l'ADN génomique et les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation. Le surnageant est chargé sur une **colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)**.

Avec le kit **NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid),** les contaminations telles que les sels, les métabolites et les composants cellulaires macromoléculaires solubles sont éliminées par un simple lavage avec le tampon éthanolique A4. L'ADN plasmidique pur est finalement élué dans des conditions de faible force ionique avec le tampon AE légèrement alcalin (5 mM Tris HCl, pH 8,5). En cas d'utilisation de souches hôtes à forte teneur en nucléases, il est recommandé de procéder à une étape de lavage supplémentaire avec le tampon AW préchauffé. Un lavage supplémentaire avec le tampon AW permet également d'augmenter la longueur de lecture des réactions de séquençage automatisé par fluorescence.

2.2 Caractéristiques des kits

- Le kit **NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)** est conçu pour la préparation rapide et à petite échelle d'ADN plasmidique très pur (mini preps).
- Les **colonnes NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)** offrent une capacité de fixation d'ADN très élevée, allant jusqu'à 60 µg. Cela nécessite toutefois des lavages efficaces dont le lavage avec le tampon AW qui est fortement recommandé pour les souches hôtes présentant des niveaux élevés d'endonucléases comme ABLE, HB101 ou JM110.
- L'ADN plasmidique préparé avec **NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)** est adapté à des applications telles que le séquençage automatisé de l'ADN par fluorescence, la PCR ou tout type de réaction enzymatique.
- De plus, les protocoles additionnels permettent la purification de plasmides low copy à partir de volumes de culture plus importants, la purification de plasmides à partir de bactéries Gram-positif et la purification de plasmides à partir de mélanges réactionnels.

DOMINIQUE DUTSCHER

Tableau 1: Résumé des caractéristiques du kit

Paramètres	NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)
Utilisation	Réservée à l'usage de la recherche
Volume de culture	1 – 5 mL (high copy) 6 – 10 mL (low copy)
Rendement typique	< 25 µg (1 – 5 mL de culture) < 45 µg (6 – 10 mL de culture)
Volume d'élution	50 µL
Capacité de fixation	60 µg
Vecteurs	< 25 kbp
Temps de préparation*	20 min / 6 préparations
Format	Mini colonne à centrifuger

2.3 Croissance des cultures bactériennes

Le rendement et la qualité de l'ADN plasmidique dépendent fortement du type de milieu de culture et des antibiotiques utilisés, de la souche bactérienne hôte, du type de plasmide, de sa taille ou du nombre de copies.

Pour la culture de cellules bactériennes contenant des plasmides high copy, nous recommandons le **milieu LB (Luria Bertani)**. La culture cellulaire doit être incubée à 37 °C sous agitation constante (200 – 250 rpm) de préférence 12 – 16 h pendant la nuit. En général, une densité optique de 3 à 6 peut être obtenue. Il est également possible d'utiliser des milieux riches tels que 2 x YT (Yeast / Tryptone), TB (Terrific Broth) ou CircleGrow. Dans ce cas, les bactéries se développent plus rapidement, atteignent la phase stationnaire beaucoup plus tôt que dans le milieu LB (≤ 12 h), et une masse cellulaire plus élevée peut être atteinte. Toutefois, cela ne permet pas nécessairement d'obtenir plus d'ADN plasmidique. La croissance excessive d'une culture peut entraîner un pourcentage plus élevé de mort cellulaire et l'ADN plasmidique obtenu peut être partiellement dégradé ou contaminé par de l'ADN chromosomique. Pour trouver les conditions de culture optimales, le milieu de culture et les durées d'incubation doivent être optimisés pour chaque combinaison plasmide/souche hôte.

Les cultures cellulaires doivent toujours être soumises à une sélection antibiotique afin d'assurer la propagation des plasmides. Sans cette pression sélective, les cellules ont tendance à perdre le plasmide lors de la division cellulaire. Comme les bactéries se développent beaucoup plus rapidement sans plasmide high copy, celles-ci envahissent rapidement la culture et le rendement en plasmides diminue, quelle que soit la masse cellulaire. Le Tableau 2 donne des informations sur les concentrations des antibiotiques couramment utilisés.

REPRODUCTION DUTSCHE

* Temps d'intervention

Tableau 2: Informations sur les antibiotiques selon Maniatis*

Antibiotique	Solution mère (concentration)	Stockage	Concentration de travail
Ampicilline	50 mg/mL dans H_2O	-20 °C	20 – 50 µg/mL
Carbénicilline	50 mg/mL dans H_2O	-20 °C	20 – 60 µg/mL
Chloramphénicol	34 mg/mL dans EtOH	-20 °C	25 – 170 µg/mL
Kanamycine	10 mg/mL dans H_2O	-20 °C	10 – 50 µg/mL
Streptomycine	10 mg/mL dans H_2O	-20 °C	10 – 50 µg/mL
Tétracycline	5 mg/mL dans EtOH	-20 °C	10 – 50 µg/mL

En règle générale, utiliser 5 mL d'une culture pour les colonnes **NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)** comme indiqué dans les caractéristiques du kit.

Toutefois, le volume de culture peut être augmenté si la croissance cellulaire est vraiment faible ou doit être réduit si, par exemple, des milieux de culture très riches ont été utilisés. Se référer au Tableau 3 pour déterminer le volume de culture optimal en fonction de la densité optique à $D0_{600}$.

Tableau 3: Volumes de culture recommandés pour NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)

DO_{600}	1	2	**3**	4	5	6
Volume de culture (high copy)	15 mL	8 mL	**5 mL**	4 mL	3 mL	2 mL
Volume de culture (low copy)**	-	-	**10 mL**	8 mL	6 mL	4 mL

Note : si une trop grande quantité de matériel bactérien est utilisée, les étapes de lyse et de précipitation deviennent inefficaces, ce qui entraîne une diminution du rendement et de la qualité du plasmide ! Si la quantité de cellules à traiter est supérieure à la quantité recommandée, se référer au protocole pour la purification des low copy (paragraphe 5.2).

* Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J : Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring, New York 1982.

** Suivre la procédure pour les plasmides low copy, voir paragraphe 5.2.

DOMINIQUE DUTSCHER

2.4 Neutralisation du lysat et LyseControl

Le mélange du lysat avec le tampon de neutralisation A3 est très important pour une précipitation complète du SDS, des protéines et de l'ADN génomique. Une neutralisation incomplète entraîne une diminution du rendement. Cependant, l'ADN plasmidique libéré est très vulnérable à ce stade et une agitation trop importante ou trop forte peut endommage l'ADN.

Par conséquent, ne pas agiter ni vortexer, mais simplement mélanger par inversion et très doucement jusqu'à ce qu'un précipité cotonneux blanchâtre se soit formé et que le LyseControl bleu du tampon A2 soit devenu incolore dans tout le lysat sans aucune trace de coloration bleue.

2.5 Procédures d'élution

Le volume du tampon d'élution et la méthode peuvent être adaptés afin d'obtenir un rendement et/ou une concentration plus élevés que la méthode standard (taux de récupération d'environ 70 – 90 %) :

- **Rendement plus élevé en général, en particulier pour les grandes constructions :** Chauffer le tampon d'élution à 70 °C, ajouter 50 – 100 µL à la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) et incuber à 70 °C pendant 2 min.
- **Rendement élevé :** Effectuer deux étapes d'élution avec le volume indiqué dans le protocole individuel. Environ 90 à 100 % des acides nucléiques liés peuvent être élués.
- **Concentration élevée :** Effectuer une étape d'élution avec 60 % du volume indiqué dans le protocole individuel. La concentration d'ADN sera plus élevée qu'avec l'élution standard (environ 130 %). Le rendement maximal des acides nucléiques liés est d'environ 80 %.
- **Rendement et concentration élevés :** Appliquer la moitié du volume de tampon d'élution indiqué dans le protocole standard, incuber pendant 3 minutes et centrifuger. Appliquer une deuxième aliquote de tampon d'élution. Incuber et centrifuger à nouveau. Ainsi, environ 85 à 100 % des acides nucléiques liés sont élués dans le volume d'élution standard avec une concentration élevée.

Le tampon d'élution AE (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5) peut être remplacé par du tampon TE ou de l'eau. Toutefois, nous recommandons d'utiliser un tampon faiblement tamponné, légèrement alcalin et ne contenant pas d'EDTA, en particulier si l'ADN plasmidique est destiné à des réactions de séquençage. Si de l'eau est utilisée, le pH doit être vérifié et ajusté à 8,0 – 8,5 car l'eau désionisée présente généralement un pH inférieur à 7. De plus, l'absorption de CO_2 entraîne une diminution du pH des solutions non tamponnées.

TECHNIQUE DUTSCHER

3 Conditions de stockage et préparation des solutions de travail

Attention : Les tampons A3 et AW contiennent du chlorhydrate de guanidine ! Porter des gants et des lunettes de protection !

ATTENTION : Les tampons A3 et AW 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 d'échantillons.

- Tous les composants du kit peuvent être conservés entre 15 et 25 °C et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette de l'emballage.
- Les flacons de tampons doivent toujours être bien fermés, surtout si les tampons sont préchauffés pendant la préparation.
- Le dodécylsulfate de sodium (SDS) contenu dans le tampon A2 peut précipiter s'il est conservé à des températures inférieures à 20 °C. Si un précipité est observé dans le tampon A2, incuber le flacon à 30 – 40 °C pendant plusieurs minutes et bien mélanger.

Avant de commencer le protocole **NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid),** préparer les éléments suivants :

- Ajouter 1 mL de tampon A1 au flacon de RNase A et mélanger au vortex. Transférer la solution dans le flacon de tampon A1 et mélanger soigneusement. Indiquer la date d'ajout de la RNase A sur le flacon. Conserver le tampon A1 contenant la RNase A à 4 °C. La solution sera stable à cette température pendant au moins six mois.
- Ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96 – 100 % au tampon A4.

	NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)		
REF	**10 preps 740588.10 / 740499.10**	**50 preps 740588.50 / 740499.50**	**250 preps 740588.250 / 740499.250**
Tampon de lavage A4 (concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol	2 × 25 mL Ajouter 100 mL d'éthanol dans chaque flacon

DOMINIQUE DUTSCHER

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid),** 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 (les FDS sont disponibles en ligne à l'adresse ***www.mn-net.com/msds***).

ATTENTION : Le chlorhydrate de guanidine dans les tampons A3 et AW 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 liquides issus de la procédure.

Les déchets générés par le kit **NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)** 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 traitement par du tampon de lyse fortement dénaturant, mais elle ne peut être totalement exclue. Par conséquent, les déchets liquides doivent être considérés comme infectieux et doivent être manipulés et éliminés conformément aux règlementations de sécurité locales.

4.1 Élimination des déchets

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

DOMINIQUE DUTSCHER

5 Protocoles NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)

5.1 Purification de l'ADN plasmidique high copy chez E. coli

Avant de commencer la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage A4 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Récolte des cellules bactériennes cultivées

Utiliser **1 à 5 mL** d'une **culture LB** saturée d'***E. coli***, récolter les cellules dans une centrifugeuse de paillasse standard pendant **30 s** à **11 000 × *g***. Jeter le surnageant et éliminer autant de liquide que possible.



11 000 × *g*, 30 s

Note : Pour la purification des plasmides low copy, se référer au paragraphe 5.2.

2 Lyse des cellules

+ 250 µL A1

Resuspendre

Ajouter **250 µL de tampon A1**. Remettre complètement en suspension le culot cellulaire au vortex ou par pipetages successifs. S'assurer qu'il ne reste pas d'amas de cellules avant d'ajouter le tampon A2 !

Attention : Vérifier que le tampon A2 ne contient pas de SDS précipité avant de l'utiliser. Si un précipité blanc est visible, chauffer le tampon pendant plusieurs minutes à 30 – 40 °C jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissous. Mélanger soigneusement et laisser refroidir le tampon jusqu'à température ambiante (18 – 25 °C).



+ 250 µL A2

Mélanger

TA, 5 min

Ajouter **250 µL de tampon A2**. Mélanger doucement en inversant le tube **6 à 8 fois**. Ne pas mélanger au vortex pour éviter le cisaillement de l'ADN génomique. Incuber à **température ambiante jusqu'**à **5 min** ou jusqu'à ce que le lysat soit clair.

+ 300 µL A3

Mélanger

Ajouter **300 µL de tampon A3**. Mélanger soigneusement en inversant le tube **6 à 8 fois** jusqu'à ce que le lysat bleu devienne complètement incolore ! Ne pas mélanger au vortex pour éviter de cisailler l'ADN génomique !

S'assurer de neutraliser complètement le mélange afin de précipiter toutes les protéines et l'ADN chromosomique. Le LyseControl doit devenir complètement incolore sans aucune trace de bleu.

3 Clarification du lysat

Centrifuger pendant **5 min** à **11 000 × *g*** à température ambiante.



11 000 × *g*, 5 – 10 min

Répéter cette étape si le surnageant n'est pas clair !

DOMINIQUE DUTSCHER

4 Fixation de l'ADN

Placer une colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans un tube collecteur (2 mL) et charger maximum 700 µL de surnageant de l'étape 3 sur la colonne. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × *g***. Jeter le filtrat et replacer la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans le tube collecteur.

Répéter cette étape pour charger le lysat restant.



Charger le surnageant

11 000 × *g*, 1 min

5 Lavage de la membrane de silice

Note : Si l'ADN plasmidique est préparé à partir de souches riches en nucléases (par exemple, HB101 ou des souches de la série JM), il ***est fortement recommandé d'****effectuer une étape de lavage supplémentaire avec* ***500 µL de tampon AW, éventuellement préchauffé à 50 °C****, et de centrifuger pendant* ***1 min*** *à* ***11 000 × g*** *avant de procéder avec le tampon A4. Un lavage supplémentaire avec le tampon AW augmente la longueur de lecture des réactions de séquençage de l'ADN et améliore les performances des réactions enzymatiques critiques.*



En option : + 500 µL AW

11 000 × *g*, 1 min

Ajouter **600 µL de tampon A4** (complété par de l'éthanol, voir chapitre 3). Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × *g***. Jeter le filtrat et replacer la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans le tube collecteur **vide.**

+ 600 µL A4

11 000 × *g*, 1 min

6 Séchage de la membrane de silice

Centrifuger pendant **2 min** à **11 000 × *g*** et jeter le tube collecteur.

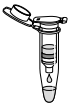
Note : les résidus de tampon de lavage éthanolique résiduel peuvent inhiber les réactions enzymatiques ultérieures.



11 000 × *g*, 2 min

7 Elution de l'ADN

Placer la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans un microtube de 1,5 mL (non fourni) et ajouter **50 µL de tampon AE**. Incuber pendant **1 min** à **température ambiante**. Centrifuger pendant 1 min à **11 000 × *g***.



+ 50 µL AE

TA, 1 min

11 000 × *g*, 1 min

Note : pour des procédures d'élution plus efficaces et des tampons d'élution alternatifs (par exemple, tampon TE ou eau), voir le paragraphe 2.5.

DOMINIQUE DUTSCHER

5.2 Purification de plasmides low copy, de constructions P1 ou de cosmides

Le traitement de volumes de culture plus importants nécessite une augmentation des volumes de tampon de lyse. Les volumes de tampon fournis avec le kit sont calculés uniquement pour la purification de plasmides high copy. Par conséquent, si le protocole low copy doit être utilisé fréquemment, un set de tampons (NucleoSpin® Buffer Set) supplémentaire peut être commandé séparément (voir les informations de commande, paragraphe 6.2).

Avant de commencer la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage A4 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Récolte des cellules bactériennes cultivées

Utiliser **5 à 10 mL** d'une **culture E. coli LB** saturée, puis récolter les cellules dans une microcentrifugeuse de paillasse standard pendant 30 s à **11 000 × *g***. Jeter le surnageant et éliminer autant de liquide que possible.



11 000 × *g*, 30 s

2 Lyse cellulaire

+ 500 µL A1

Ajouter **500 µL de tampon A1**. Remettre complètement en suspension le culot cellulaire au vortex ou par pipetages successifs. S'assurer qu'il ne reste pas d'amas de cellules avant d'ajouter le tampon A2 !

Resuspendre



+ 500 µL A2

Note : Vérifier que le tampon A2 ne contient pas de SDS précipité avant de l'utiliser. Si un précipité blanc est visible, chauffer le tampon pendant plusieurs minutes à 30 – 40 °C jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissous. Mélanger soigneusement et laisser refroidir le tampon jusqu'à température ambiante (18 – 25 °C).

Mélanger

TA, 5 min

+ 600 µL A3

Ajouter **500 µL de tampon A2**. Mélanger doucement en inversant le tube **6 à 8 fois**. Ne pas mélanger au vortex pour éviter le cisaillement de l'ADN génomique. Incuber à **température ambiante jusqu**'à **5 min** ou jusqu'à ce que le lysat soit clair.

Mélanger

Ajouter **600 µL de tampon A3**. Mélanger soigneusement en inversant le tube **6 à 8 fois** jusqu'à ce que le lysat bleu devienne complètement incolore ! Ne pas mélanger au vortex pour éviter de cisailler l'ADN génomique !

Veiller à neutraliser complètement pour précipiter toutes les protéines et l'ADN chromosomique. Le LyseControl doit devenir complètement incolore sans aucune trace de bleu.

DOMUQUE DUTSCHER

3 Clarification du lysat

Centrifuger pendant **10 min** à **11 000 × *g*** à température ambiante



> 11 000 × *g*, 5 – 10 min

4 Fixation de l'ADN

Placer une colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans un tube collecteur (2 mL) et charger maximum 700 µL de surnageant de l'étape 3 sur la colonne. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × *g***. Jeter le lysat et replacer la colonne NucleoSpin® Plasmid dans le tube collecteur.

Répéter cette étape pour charger le lysat restant.



Charger le surnageant

11 000 × *g*, 1 min

5 Lavage de la membrane de silice

*Note: Ajouter **500 µL de tampon AW, éventuellement préchauffé à 50 °C**, et centrifuger pendant 1 min à **11 000 × g**. Jeter le lysat et replacer la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans le tube collecteur.*

Ajouter **600 µL de tampon A4** (complété par de l'éthanol, voir chapitre 3). Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × *g***. Jeter le filtrat et replacer la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans le tube collecteur vide.



En option : + 500 µL AW

11 000 × *g*, 1 min

+ 600 µL A4

11 000 × *g*, 1 min

6 Séchage de la membrane de silice

Centrifuger pendant **2 min** à **11 000 × *g*** et jeter le tube collecteur.

Note : les résidus de tampon de lavage éthanolique peuvent inhiber les réactions enzymatiques ultérieures.



11 000 × *g*, 2 min

7 Elution de l'ADN

Placer la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans un microtube de 1,5 mL (non fourni) et ajouter **50 µL de tampon AE préchauffé à 70 °C**. Incuber pendant 2 min à **70 °C**. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × *g***.

Note : pour des procédures d'élution plus efficaces et des tampons d'élution alternatifs (par exemple, tampon TE ou eau), voir le paragraphe 2.5.



+ 50 µL AE

TA, 1 min

11 000 × *g*, 1 min

DOMINIQUE DUTSCHER

5.3 Purification de plasmides à partir de bactéries Gram positif

Pour la purification des plasmides à partir de bactéries dont la paroi cellulaire est plus résistante (par exemple, Bacillus, Staphylococcus), il est nécessaire de commencer la procédure de lyse par un traitement enzymatique (par exemple, Lysozyme, Lysostaphine, Mutanolysine) afin de briser les couches de peptidoglycane.

Pour certaines bactéries à Gram positif (par exemple, Bifidobactéria, Corynébactéria), même une préincubation avec du lysozyme peut s'avérer insuffisante et des méthodes de broyage mécanique doivent être utilisées (par exemple, RiboLyser).

Avant de commencer la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage A4 a été préparé conformément au chapitre 3.

1	**Récolte des cellules bactériennes cultivées** Utiliser jusqu'à **5 mL** (NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)) d'une **culture** d'***E. coli en*** **LB** saturée**,** récolter les cellules dans une centrifugeuse de paillasse pendant **30 s** à **11 000 × *g*.** Jeter le surnageant et éliminer autant de liquide que possible.		**11 000 × *g*, 30 s**
2	**Lyse des cellules** Ajouter **250 µL de tampon A1** contenant **10 mg/mL de lysozyme** (non fourni avec le kit). Remettre complètement en suspension le culot cellulaire par vortex ou par pipetages successifs. Veiller à ce qu'aucun amas de cellules ne subsiste dans la suspension !		**+ 250 µL A1** **+ Lysozyme** **Resuspendre**
	Incuber à **37 °C** pendant **10 à 30 min**. Procéder à l'ajout du tampon A2 à l'étape 2 du protocole de purification des plasmides high copy d'E. coli avec NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) (paragraphe 5.1).		**37 °C, 10 – 30 min**

DOWNLOAD DUTSCHER

5.4 Purification d'ADN plasmidique high copy à l'aide d'un système à vide

1 Récolte des cellules bactériennes cultivées

Utiliser 1 à 5 mL d'une culture saturée d'***E. coli*** et récolter les cellules dans une centrifugeuse de paillasse standard pendant **30 s** à **11 000 × *g***. Jeter le surnageant et éliminer autant de liquide que possible.

Note : Pour la purification de plasmides low copy, les volumes de culture et les tampons doivent être adaptés. Se reporter au paragraphe 5.2 du manuel d'utilisation de NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)



1 – 5 mL de culture d'*E. coli*



11 000 × *g*, 30 s

2 Lyse des cellules

Ajouter **250 µL de tampon A1**. **Remettre** complètement **en suspension** le culot cellulaire par vortex ou pipetages successifs. S'assurer qu'il ne reste pas d'amas de cellules avant d'ajouter le tampon A2 !

+ 250 µL A1

Remettre en suspension

Attention : Vérifier que le tampon A2 ne contient pas de précipité de SDS avant de l'utiliser. Si un précipité blanc est visible, chauffer le tampon pendant plusieurs minutes à 30 – 40 °C jusqu'à ce que le précipité soit dissous. Mélanger soigneusement et laisser refroidir le tampon jusqu'à température ambiante (18 – 25 °C).



+ 250 µL A2

MélangerTA, 5 min

Ajouter **250 µL de tampon A2**. **Mélanger doucement** en inversant le tube **6 à 8 fois**. Ne pas vortexer pour éviter le cisaillement de l'ADN génomique. Incuber à **température ambiante** pendant **5 min** maximum ou jusqu'à ce que le lysat soit clair.

+ 350 µL A3

Mélanger

Ajouter **350 µL de tampon A3**. **Mélanger soigneusement** en inversant le tube **jusqu'à ce que le lysat bleu devienne complètement incolore !**

Ne pas vortexer pour éviter le cisaillement de l'ADN génomique !

3 Clarification du lysat

Centrifuger pendant **10 min** à > **11 000 × *g*** à **température ambiante**.



Répéter cette étape si le surnageant n'est pas clair !

11 000 × *g*, 10 min

DOWNLOAD DUTSCHER

4 Fixation de l'ADN



Chargement surnageant

Placer une **colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)** sur un système à vide approprié avec des connexions Luers comme le système NucleoVac 24 Vacuum et **charger jusqu'à 700 µL de surnageant**. Ne pas fermer le capuchon !

Appliquer un vide de **-0,2 à -0,4 bar* (1 min)**.

Lorsque l'échantillon est passé sur la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid), relâcher le vide.

-0.2 à -0.4 bar*, 1 min

Si nécessaire, charger l'échantillon restant et répéter l'opération.

5 Lavage de la membrane de silice



(Optionnel : + 500 µL AW -0.2 à -0.4 bar*, 1 min)

(*Optionnel : Ajouter **500 µL tampon AW**, éventuellement préchauffé à 50 °C, pour éliminer les protéines).*

Appliquer un vide de **-0,2 à -0,4 bar* (1 min)**. Lorsque le tampon est passé sur la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid), relâcher le vide.

+ 600 µL A4

Ajouter **600 µL de tampon A4** (complété par de l'éthanol, voir chapitre 3). Appliquer un vide de **-0,2 à -0,4 bar* (1 min)**.

-0.2 à -0.4 bar*, 1 min

Lorsque le tampon est passé sur la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid), relâcher le vide.

6 Séchage de la membrane de silice



-0.2 à -0.4 bar*, 5 min

Optionnel : séchage sous vide

Appliquer un vide de **-0,4 à -0,6 bar*** pendant **5 min** pour éliminer complètement le tampon A4. Faire fonctionner la pompe à vide en continu. Il est plus important d'obtenir et de maintenir un flux d'air continu que d'atteindre la réduction exacte de la pression atmosphérique mentionnée. Ne pas fermer le capuchon !

Relâcher le vide.



Optionnel 2 : Séchage par centrifugation



11,000 × g, 1 min

Placer la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans un tube collecteur (2 mL). Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × *g*** pour éliminer complètement le tampon A4. S'assurer que la colonne centrifuge n'entre pas en contact avec le filtrat lors de son retrait de la centrifugeuse et du tube collecteur.

Note : L'éthanol résiduel du tampon A4 peut inhiber les réactions enzymatiques ultérieures. L'élimination totale de l'éthanol peut être obtenue en incubant les colonnes pendant 2 – 5 min à 70 °C avant l'élution.

* Réduction de la pression atmosphérique

DOMINIQUE DUTSCHER

7 Elution de l'ADN

Placer la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans un nouveau microtube de 1,5 mL (non fourni).



+ 50 µL AE

TA, 1 min

Ajouter **50 µL tampon AE** et incuber à **température ambiante** (18 – 25 °C) pendant 1 min. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × *g***.



11 000 × *g*, 1 min

DOMINIQUE DUTSCHER

5.5 Clean-up d'ADN plasmidique

Les préparations de plasmides ou de fragments d'ADN provenant d'autres origines que les cellules bactériennes, par exemple de réactions enzymatiques, peuvent être purifiées à l'aide de NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) en omettant l'étape de lyse cellulaire.

Avant de commencer la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage A4 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Ajustement des conditions de fixation

Ajouter 2 volumes de tampon A3 à 1 volume de solution d'ADN et bien mélanger au vortex.

(Par exemple, ajouter 200 µL de tampon A3 à 100 µL de mélange de réaction enzymatique).



+ 2 vol A3

Mélanger

2 Fixation de l'ADN

Placer une colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans un tube collecteur (2 mL) et charger le mélange sur la colonne. Centrifuger pendant **1 min** à **11 000 × *g***. Jeter le filtrat et remettre la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) dans le tube collecteur.

Note : la capacité de chargement maximale de la colonne NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) est de 700 µL. Répéter la procédure si des volumes plus importants doivent être traités.



Charger le mélange

Procéder à l'étape de lavage 5 du protocole de purification des plasmides high copy d'E. coli avec NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) (paragraphe 5.1).



11 000 × *g*, 1 min

DOWNLOAD DUTSCHER

6 Annexes

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problèmes	Causes possibles et suggestions
Lyse incomplète des cellules bactériennes	*Resuspension incomplète du culot cellulaire* • Il est essentiel que le culot cellulaire soit complètement remis en suspension avant la lyse. Aucun amas de cellules ne doit être visible avant l'ajout du tampon A2. *Précipitation du SDS dans le tampon A2* • Le SDS dans le tampon A2 peut précipiter lors du stockage. Si un précipité se forme, incuber le tampon A2 à 30 – 40 °C pendant 5 minutes et bien mélanger. *Trop de cellules bactériennes utilisées* • Nous recommandons le milieu LB comme milieu de croissance optimal. Lors de l'utilisation de milieux très riches comme le TB (terrific broth), la densité cellulaire des cultures peut devenir trop élevée.
Faible rendement en plasmides	*Lyse incomplète des cellules bactériennes* • Voir «Causes possibles et suggestions» ci-dessus. *Précipitation insuffisante du SDS et des débris cellulaires* • La précipitation du SDS et des débris cellulaires sera légèrement plus efficace si la centrifugation est effectuée à 4 °C plutôt qu'à température ambiante. *Pas d'antibiotiques ou des quantités insuffisantes d'antibiotiques utilisés pendant la culture* • Les cellules portant le plasmide d'intérêt peuvent être envahies par des cellules non transformées si une quantité inappropriée d'antibiotique est utilisée. Ajouter des quantités appropriées de solutions mères fraîchement préparées à tous les milieux, qu'ils soient solides ou liquides. *Culture bactérienne trop ancienne* • Ne pas incuber les cultures pendant plus de 16 heures à 37 °C sous agitation. Nous recommandons le milieu LB comme milieu de croissance optimal ; lors de l'utilisation de milieux très riches comme le TB (terrific broth), le temps de culture doit être réduit à < 12 h. *Conditions d'élution suboptimales* • Si possible, utiliser un tampon d'élution légèrement alcalin comme le tampon AE (5 M Tris / HCl, pH 8,5). Si de l'eau exempte de nucléase est utilisée, vérifier le pH de l'eau. L'efficacité de l'élution diminue considérablement avec les tampons dont le pH est inférieur à 7.

DOMINIQUE DUTSCHER

Problèmes	Causes possibles et suggestions
Faible rendement en plasmides *(suite)*	*Le plasmide utilisé n'est pas un high copy* • Si l'on utilise des plasmides low copy (par exemple, des plasmides portant l'ori P15A, des cosmides ou des constructions P1), les volumes de culture doivent être portés à au moins 5 mL.
Aucun rendement en plasmide	*Mauvaise préparation des réactifs* • Ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96 – 100 % au tampon A4 concentré et mélanger soigneusement (voir chapitre 3). *Utilisation de souches riches en nucléases* • En particulier lorsque vous travaillez avec des souches riches en nucléases, conserver les préparations de plasmides sur de la glace ou congelées afin d'éviter la dégradation de l'ADN. • Si l'on utilise des souches riches en nucléases comme E. coli HB101 ou des souches de la série JM, veiller à effectuer l'étape facultative de lavage AW (étape 5 ; paragraphe 5.1). L'élimination optimale des endonucléases peut être obtenue en incubant la membrane avec du tampon AW préchauffé (50 °C) pendant 2 min avant la centrifugation. *Stockage inapproprié de l'ADN plasmidique* • Quantifier l'ADN directement après la préparation, par exemple par électrophorèse sur gel d'agarose. Conserver l'ADN plasmidique dissous dans l'eau à < -18 °C ou à < +5 °C lorsqu'il est dissous dans le tampon AE ou le tampon TE.
Faible qualité des plasmides	*ADN plasmidique dégradé* • La suspension cellulaire a été incubée avec le tampon de lyse alcaline A2 pendant plus de 5 min. *Contamination de l'ADN génomique* • Le lysat cellulaire a été vortexé ou mélangé trop vigoureusement après l'ajout du tampon A2. L'ADN génomique a été cisaillé et donc libéré. *Formation d'un smear de plasmides sur un gel d'agarose* • En particulier lorsque vous travaillez avec des souches riches en nucléases, conserver les préparations de plasmides sur de la glace ou congelées afin d'éviter la dégradation de l'ADN. • Si l'on utilise des souches riches en nucléases comme E. coli HB101 ou des souches de la série JM, veiller à effectuer l'étape facultative de lavage AW (étape 5 ; paragraphe 5.1). L'élimination optimale des endonucléases peut être obtenue en incubant la membrane avec du tampon AW préchauffé (50 °C) pendant 2 min avant la centrifugation.

DOMINIQUE DUTSCHER

Problèmes	Causes possibles et suggestions
Performance suboptimale de l'ADN plasmidique dans les réactions enzymatiques	*Contamination par l'éthanol* • Veiller à centrifuger ≥ 1 min à 11&g à l'étape 6 afin d'obtenir une élimination complète du tampon éthanolique A4. *Elution de l'ADN plasmidique avec le tampon TE* • L'EDTA peut inhiber les réactions de séquençage. Repurifier l'ADN plasmidique et l'éluer avec du tampon AE ou de l'eau. L'ADN plasmidique élué peut également être précipité avec de l'éthanol et redissous dans le tampon AE ou dans l'eau. *Pas de lavage additionnel avec le tampon AW* • Un lavage additionnel avec 500 µL de tampon AW avant le lavage avec le tampon éthanolique A4 augmente la longueur de lecture des réactions de séquençage. *Pas assez d'ADN utilisé pour la réaction de séquençage* • Quantifier l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose avant de mettre en place les réactions de séquençage. *ADN plasmidique préparé à partir de trop de cellules* • Ne pas utiliser plus de 3 mL d'une culture d'E. coli saturée si l'on prépare de l'ADN plasmidique pour un séquençage automatisé par fluorescence.

DOMINIQUE DUTSCHER

6.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® Plasmid	740588.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250 preps
NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	740499.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250 preps
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	740727.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250 preps
NucleoSpin® Buffer Set (pour la purification de plasmides low copy)	740953	1
Tampon A1 (sans RNase A)	740911.1	1 L
Tampon A2 (sans LyseControl)	740912.1	1 L
Tampon A3	740913.1	1 L
Tampon A4 (concentré) (pour 125 mL de tampon A4)	740914	25 mL
Tampon A4 (concentré) (pour 1 L de Buffer A4)	740914.1	200 mL
Tampon AW	740916.1	1 L
Tampon AE	740917.1	1 L
RNase A (lyophilisée)	740505 740505.50	100 mg 50 mg
Tubes collecteurs (2 mL)	740600	1000

6.3 Références

Birnboim, H.C., et J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7** : 1513 – 1523.

Vogelstein B. et D. Gillespie. 1979. Purification preparative et analytique de l'ADN à partir de l'agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76** : 615 – 619.

DOMINIQUE DUTSCHER

6.4 Restrictions de l'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@mn-net.com

6.5 Versions linguistiques et prédominance

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

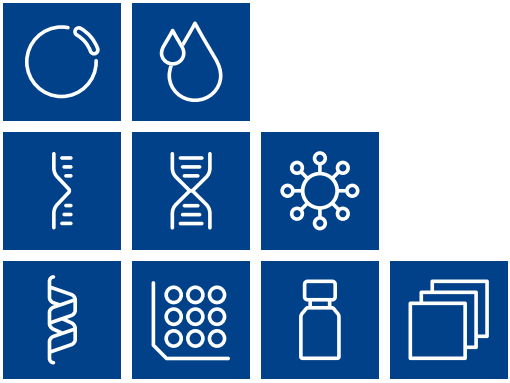
DOMINIQUE DUTSCHER

Marques déposées :

NucleoSpin® est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG

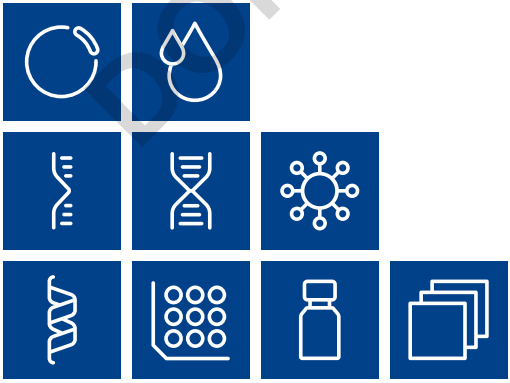
Tous les noms et dénominations utilisés peuvent être des marques, des marques déposées ou des marques enregistrées par leurs propriétaires respectifs, même s'ils ne sont pas des dénominations spéciales. La mention de produits et de marques n'est qu'une information (c'est-à-dire qu'elle ne porte pas atteinte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

DOMINIQUE DUTSCHER



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

DOMINIQUE DUTSCHER



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL

TÜVRheinland CERTIFIED
Management System
EN ISO 13485:2016
ISO 9001:2015
www.tuv.com
ID 0000056401

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germany
DE +49 24 21 969-0 info@mn-net.com
FR +33 388 68 22 68 sales-fr@mn-net.com
CH +41 62 388 55 00 sales-ch@mn-net.com
US +1 888 321 62 24 sales-us@mn-net.com