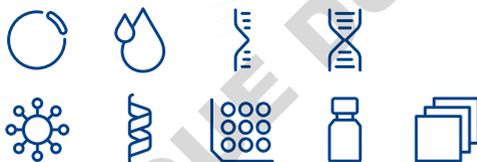


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



Purification de l'ADN plasmidique

- NucleoBond® Xtra Midi
- NucleoBond® Xtra Maxi
- NucleoBond® Xtra Midi Plus
- NucleoBond® Xtra Maxi Plus

Juin 2022 / Rev. 17

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 21 969-270
E-mail: tech-bio@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 et équipement nécessaires	6
2	Caractéristiques des kits	7
3	A propos de ce manuel d'utilisation	8
4	Système de purification NucleoBond® Xtra	10
4.1	Principe général	10
4.2	Colonnes échangeuses d'anions NucleoBond® Xtra	10
4.3	Croissance des cultures bactériennes	11
4.4	Amplification des plasmides low copy au moyen de chloramphénicol	13
4.5	Volume de culture pour les plasmides high copy	13
4.6	Volume de culture pour les plasmides low copy	14
4.7	Neutralisation du lysat et intérêt du réactif LyseControl	15
4.8	Lyse des cellules	15
4.9	Souches difficiles à lyser	16
4.10	Mise en place des colonnes NucleoBond® Xtra	16
4.11	Filtration et chargement du lysat	17
4.12	Lavage de la colonne	18
4.13	Elution et concentration de l'ADN plasmidique	18
4.14	Détermination du rendement et de la qualité de l'ADN	21
4.15	Etapes de pause possible	22
5	Conditions de stockage et préparation des réactifs	22
6	Instructions de sécurité	23
7	Purification de l'ADN plasmidique avec NucleoBond® Xtra	24
7.1	Purification de plasmides High copy (Midi, Maxi)	24
7.2	Purification de plasmides Low copy (Midi, Maxi)	29
7.3	Concentration des éluats NucleoBond® Xtra avec les NucleoBond® Finalizers	32
8	Annexes	34
8.1	Guide de résolution des problèmes	34
8.2	Informations de commande	42
8.3	Restriction d'utilisation / garantie	43

1 Composition

1.1 Composants des kits

Référence	NucleoBond® Xtra Midi			NucleoBond® Xtra Midi Plus	
	10 preps 740410.10	50 preps 740410.50	100 preps 740410.100	10 preps 740412.10	50 preps 740412.50
Tampon RES	100 mL	500 mL	1000 mL	100 mL	500 mL
Tampon LYS	100 mL	500 mL	1000 mL	100 mL	500 mL
Tampon NEU	100 mL	500 mL	1000 mL	100 mL	500 mL
Tampon EQU	200 mL	1000 mL	2 x 1000 mL	200 mL	1000 mL
Tampon WASH	100 mL	500 mL	1000 mL	100 mL	500 mL
Tampon ELU	60 mL	300 mL	600 mL	60 mL	300 mL
RNase A* (lyophilisée)	6 mg	30 mg	60 mg	6 mg	30 mg
Colonnes NucleoBond® Xtra Midi et filtres NucleoBond® Xtra Midi	10	50	100	10	50
NucleoBond® Finalizers	-	-	-	10	50
Seringues 30 mL	-	-	-	10	50
Seringues 1 mL	-	-	-	10	50
Tampon TRIS	-	-	-	13 mL	60 mL
Adaptateurs en plastique (réutilisables)	5	10	10	5	10
Manuel d'utilisation	1	1	1	1	1

* Pour la préparation des réactifs et leurs conditions de stockage, voir le chapitre 5.

1.1 Composants des kits suite

Référence	NucleoBond® Xtra Maxi			NucleoBond® Xtra Maxi Plus	
	10 preps 740414.10	50 preps 740414.50	100 preps 740414.100	10 preps 740416.10	50 preps 740416.50
Tampon RES	150 mL	750 mL	2 x 750 mL	150 mL	750 mL
Tampon LYS	150 mL	750 mL	2 x 750 mL	150 mL	750 mL
Tampon NEU	150 mL	750 mL	2 x 750 mL	150 mL	750 mL
Tampon EQU	500 mL	2 x 1000 mL 500 mL	5 x 1000 mL	500 mL	2 x 1000 mL 500 mL
Tampon WASH	300 mL	1000 mL 500 mL	3 x 1000 mL	300 mL	1000 mL 500 mL
Tampon ELU	180 mL	900 mL	2 x 900 mL	180 mL	900 mL
RNase A* (lyophilisée)	10 mg	50 mg	2 x 50 mg	10 mg	50 mg
Colonnes NucleoBond® Xtra Maxi et filtres NucleoBond® Xtra Maxi	10	50	100	10	50
NucleoBond® Finalizers Large	-	-	-	10	50
Seringues 30 mL	-	-	-	10	50
Seringues 1 mL	-	-	-	10	50
Tampon TRIS	-	-	-	13 mL	60 mL
Adaptateurs en plastique (réutilisables)	5	10	10	5	10
Manuel d'utilisation	1	1	1	1	1

* Pour la préparation des réactifs et leurs conditions de stockage, voir le chapitre 5.

1.2 Réactifs et équipement nécessaires

Réactifs

- Isopropanol (à température ambiante)
- 70 % ethanol (à température ambiante)
- Tampon pour la solubilisation finale de l'ADN purifié, par exemple du tampon TE ou de l'H₂O stérile (inutile avec les kits NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Plus)

Équipement

Équipement standard de microbiologie pour la culture et la collecte des bactéries (exemple : boucle d'inoculation, tubes et Erlenmeyer de culture, incubateur agitant à 37°C, centrifugeuse munie d'un rotor pour tubes ou flacons permettant de culotter les cellules).

- Centrifugeuse réfrigérée capable d'atteindre $\geq 4,500 \times g$ et munie d'un rotor compatible avec les tubes ou flacons utilisés (inutile avec les kits NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Plus)
- Tubes ou contenants appropriés pour les volumes utilisés dans les différents protocoles.
- Portoir pour colonnes 'NucleoBond® Xtra Combi Rack' ('Voir Informations de commandes') ou support équivalent.

2 Caractéristiques des kits

- Les kits **NucleoBond® Xtra** sont conçus pour la purification ultra rapide de plasmides, cosmides, et de très grands vecteurs (constructions P1, BACs, PACs) d'une taille allant de 3 kpb jusqu'à 300 kpb. Pour la préparation des réactifs et leurs conditions de stockage, voir le chapitre 5.
- Les **colonnes NucleoBond® Xtra** sont en polypropylène et contiennent une **résine de silice NucleoBond® Xtra** conditionnée entre deux filtres inertes. Les colonnes sont disponibles en format Midi et Maxi, pour des rendements moyens respectifs de l'ordre de 500 µg et 1000 µg.
- Toutes les **colonnes NucleoBond® Xtra** sont résistantes aux solvants organiques comme les alcools, le chloroforme, le phénol et sont aussi compatibles avec les tampons contenant des agents dénaturants comme le formamide, l'urée, ou des détergents courants comme le Triton X-100 ou le NP-40.
- La résine de silice **NucleoBond® Xtra** est utilisable dans une vaste gamme de pH (pH 2.5–8.5), et peut rester en contact des tampons pendant plusieurs heures sans variation de ses propriétés chromatographiques.
- Les **filtres de la colonne NucleoBond® Xtra** sont des filtres larges spécialement conçus pour s'insérer dans les **colonnes NucleoBond® Xtra**. Les filtres sont fournis déjà placés dans les **colonnes NucleoBond® Xtra** et permettent un gain de temps en rendant concomitantes les étapes de clarification et de chargement du lysat sur la résine des **colonnes NucleoBond® Xtra**. Par ailleurs, l'utilisation des colonnes filtres évite une fastidieuse étape de centrifugation pour la clarification du lysat.
- Les **filtres de la colonne NucleoBond® Xtra** permettent l'élimination totale des précipités, même en cas d'utilisation d'un volume important de lysat, sans colmatage et sans endommagé l'ADN des vecteurs de grande taille comme les PACs ou BACs grâce à une filtration douce permise par le filtre.
- Les kits **NucleoBond® Xtra Midi Plus** et **NucleoBond® Xtra Maxi Plus** contiennent de surcroît, respectivement, les **NucleoBond® Finalizers** et **NucleoBond® Finalizers Large**. Ces outils sont conçus pour le dessalage et la concentration rapides des éluats et sont compatibles avec la plupart des plasmides et cosmides de 2–50 kpb avec un rendement de 40–90 % (dépendant du volume d'éluat utilisé).
- **NucleoBond® Finalizer** est un filtre seringue en polypropylène contenant une membrane de silice spéciale. Le **NucleoBond® Finalizer** possède une capacité de fixation de 500 µg, tandis que le **NucleoBond® Finalizer Large** peut permettre de récupérer jusqu'à 2000 µg d'ADN plasmidique.
- Grâce aux faibles volumes mort des filtres **NucleoBond® Finalizers** l'ADN plasmidique peut être élué avec une concentration allant jusqu'à 3 µg/µL (voir paragraphe 4.13, Tableau 4 et 5 pour des détails concernant l'impact du volume d'éluat sur la concentration).
- Tous les **NucleoBond® Finalizers** sont résistants aux solvants organiques comme les alcools, le chloroforme, le phénol et sont exempts d'endotoxines.

3 A propos de ce manuel d'utilisation

Le chapitre 4 correspond à la description détaillée du système de purification **NucleoBond® Xtra** et contient des informations importantes, relatives à la croissance bactérienne, la lyse cellulaire et les différentes étapes de la procédure de purification. Les chapitres 5 et 6 mentionnent les conditions de stockage des réactifs, les instructions pour leur préparation et les recommandations en terme de sécurité.

Il est fortement recommandé aux nouveaux utilisateurs de lire ces chapitres attentivement avant l'utilisation du kit. Les utilisateurs expérimentés pourront, quant à eux, utiliser directement le protocole de purification (chapitre 7) ou encore le résumé du protocole pour un suivi rapide de l'enchaînement des différentes étapes de la procédure.

Le chapitre 7 comprend les protocoles pour la purification des plasmides high copy et low copy, ainsi que la procédure pour concentrer les éluats des colonnes **NucleoBond® Xtra** avec les **NucleoBond® Finalizer**. Cette partie du protocole est également disponible en anglais sur notre site web www.mn-net.com.

Chaque étape de la procédure de purification est présentée selon l'exemple, ci-dessous, issu du paragraphe 7.1 :

	Midi	Maxi
5 Lyse cellulaire (Tampon LYS)		
<p>! Vérifier l'absence de précipité SDS dans le tampon LYS avant utilisation. Si un précipité blanc est visible, réchauffer le tampon pendant plusieurs minutes à 30–40 °C jusqu'à sa complète dissolution. Laisser le tampon revenir à température ambiante avant utilisation (15–25 °C).</p> <p>Ajouter le tampon LYS à la suspension.</p> <p>Mélanger doucement en retournant le tube 5 fois. Ne pas vortexer, au risque de fragmenter et de contaminer la suspension par de l'ADN chromosomique contenu dans les débris cellulaires.</p> <p>Incuber le mélange à température ambiante pendant 5 min.</p> <p><u>Attention</u> : l'exposition prolongée à des conditions alcalines peut dénaturer et dégrader de manière irréversible l'ADN plasmidique ainsi que libérer de l'ADN chromosomique dans le lysat.</p> <p><u>Note</u> : Augmenter proportionnellement le volume de tampon LYS si une masse cellulaire supérieure aux recommandations est utilisée (voir paragraphe 4.8 pour des informations détaillées sur les conditions optimales de lyse cellulaire).</p>		
	8 mL	12 mL

Si vous effectuez une Midi prep pour purifier de l'ADN plasmidique, vous trouverez les volumes de tampon ou durée d'incubation dans les cadres blancs. Pour une Maxi prep, merci de suivre les indications mentionnées dans les cadres noirs.

Le nom du tampon, les durées d'incubation, les répétitions ou toutes autres étapes importantes de la procédure sont soulignés par l'utilisation de **caractères gras**. Les notes complémentaires ou les étapes optionnelles apparaissent en italiques. Les points d'exclamation indiquent des informations et conseils essentiels pour réussir l'extraction.

Dans l'exemple, ci-dessus, il vous est demandé de vérifier le tampon de lyse LYS avant utilisation, puis de lyser le culot de cellules dans **8 mL de tampon LYS** pour la Midi prep et dans **12 mL** pour la Maxi prep. Suivez scrupuleusement les instructions et prenez connaissance des conseils mentionnés concernant les adaptations du protocole.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

4 Système de purification NucleoBond® Xtra

4.1 Principe général

Les cellules bactériennes sont lysées à l'aide d'une combinaison optimisée de tampons nouvellement conçus et basés sur la méthode de lyse NaOH/SDS de Birnboim et Doly*.

Après équilibration de la **colonne NucleoBond® Xtra** et du **filtre NucleoBond® Xtra**, la totalité du lysat est déposée sur le filtre et clarifié par gravité. Parallèlement, le chargement de la résine de silice de la colonne débute.

L'ADN plasmidique est fixé à la **résine de silice NucleoBond® Xtra**.

Après une procédure de lavage efficace, l'ADN plasmidique est finalement élué, précipité, dessalé et dissout dans un tampon adéquat (ex : tampon faiblement salin ou eau) et prêt à l'emploi pour les applications ultérieures.

! Les colonnes NucleoBond® Xtra ne sont pas compatibles avec les systèmes d'aspiration. L'utilisation des colonnes NucleoBond® Xtra sur une chambre à vide peut induire une perte totale de l'ADN plasmidique.

4.2 Colonnes échangeuses d'anions NucleoBond® Xtra

NucleoBond® Xtra est une résine de silice échangeuse d'anions brevetée, développée par MACHEREY-NAGEL. Elle est dédiée à la purification des différentes classes d'acides nucléiques comme les oligonucléotides, l'ARN et les plasmides.

La **résine de silice NucleoBond® Xtra** est constituée de billes de silice macroporeuses, hydrophiles, fonctionnalisées avec le groupement MAE (méthyl-amino-éthanol). La densité élevée de ces groupes fonctionnels procure une charge positive globale de densité élevée dans des conditions de pH acide permettant aux groupements phosphate de l'ADN plasmidique, chargés négativement, de se fixer avec une grande spécificité (Figure 1).

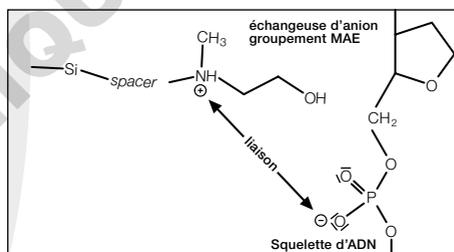


Figure 1 Interaction ionique entre le groupe fonctionnel méthyl-hydroxyéthyl-amino chargé positivement et les groupements phosphate oxygène chargés négativement du squelette de l'ADN.

Contrairement au groupe DEAE (diéthylaminoéthyl) couramment utilisé, le groupe hydroxyl du méthyl-hydroxyéthyl-amino peut être impliqué dans des interactions supplémentaires, de type liaison hydrogène de l'ADN.

* Birnboim, H. C. and Doly, J., (1979) Nucl. Acids Res. 7, 1513–1523

Tous les contaminants, comme les protéines et les ARNs, sont lavés et éliminés de la colonne. La charge positive de la résine est neutralisée par un passage du pH à des conditions légèrement alcalines et l'ADN plasmidique pur est élué en présence d'un tampon fortement concentré en sel.

Les acides nucléiques purifiés peuvent être utilisés pour des applications de biologie moléculaire les plus exigeantes, comme la transfection, la transcription *in vitro*, le séquençage automatique ou manuel, le clonage, l'hybridation et la PCR.

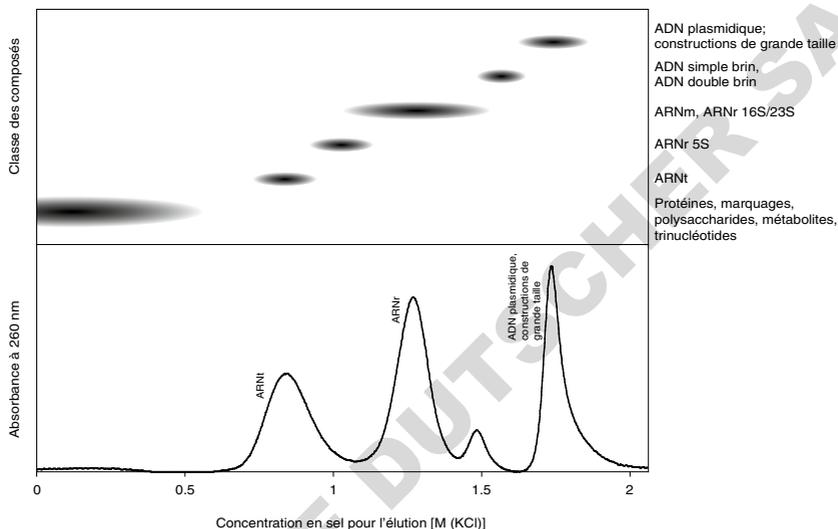


Figure 2 Profil d'éluion de la résine de silice NucleoBond® Xtra à pH 7.0

Plus le nombre d'interactions entre le squelette d'un acide nucléique et la résine chargée positivement est élevé, plus l'éluion est tardive avec des concentrations en sel croissant. Les acides nucléiques de grande taille sont porteurs de plus de charges négatives que les plus petits fragments ainsi que l'ADN double brin plus que l'ARN simple brin.

4.3 Croissance des cultures bactériennes

Le rendement et la qualité de l'ADN plasmidique dépend fortement du **type de milieu de culture** et des antibiotiques utilisés, de la souche bactérienne, du type de plasmide, de sa taille et du nombre de copies par cellules mais aussi des **conditions de culture**.

Pour des plasmides high copy standards, le milieu LB (Luria-Bertani) est recommandé. La culture bactérienne doit être incubé à 37°C sous agitation constante (200-250 rpm), de préférence pendant 12-16 h (une nuit). Utiliser des Erlen d'un volume au moins trois ou quatre fois supérieur au volume de la culture pour obtenir un milieu de culture saturé en oxygène. De plus, des milieux riches comme le 2xYT (Yeast/Tryptone), le TB (Terrific Broth) ou le milieu CircleGrow peuvent être utilisés. Dans ce cas, les bactéries se multiplient plus vite, la phase stationnaire est atteinte plus rapidement que dans le milieu LB (≤ 2 h) et une masse cellulaire plus importante peut être obtenue. Cependant, ceci n'implique pas forcément un rendement d'ADN plasmidique plus élevé. Une culture dont la croissance a

été excessivement prolongée peut contenir une plus grande proportion de cellules mortes ou mourantes, et l'ADN plasmidique résultant peut être partiellement dégradé ou contaminé avec de l'ADN chromosomique. Pour déterminer les conditions de culture optimales, le milieu et la durée d'incubation doivent être adaptés pour chaque combinaison souche bactérienne/plasmide.

Les cultures doivent être soumises à une **pression de sélection** constante grâce à un **antibiotique** pour garantir la propagation des plasmides. Sans cette pression de sélection, les cellules tendent à perdre leur plasmide pendant la division cellulaire. Les bactéries, sans cette charge de plasmides high copy, ont une croissance plus rapide et envahissent la culture impliquant un rendement en ADN plasmidique faible et indépendant de la croissance cellulaire. Le Tableau 1 donne des informations sur les concentrations d'antibiotiques couramment utilisées.

Tableau 1: Informations à propos des antibiotiques selon Maniatis*

Antibiotique	Solution stock (concentration)	Stockage	Concentration utile
Ampicilline	50 mg/mL in H ₂ O	-20 °C	20–60 µg/mL
Chloramphénicol	34 mg/mL in EtOH	-20 °C	25–170 µg/mL
Kanamycine	10 mg/mL in H ₂ O	-20 °C	10–50 µg/mL
Streptomycine	10 mg/mL in H ₂ O	-20 °C	10–50 µg/mL
Tétracycline	5 mg/mL in EtOH	-20 °C	10–50 µg/mL
Carbénicilline	50 mg/mL in H ₂ O	-20 °C	20–60 µg/mL

La **souche de *E. coli*** influence grandement la qualité de l'ADN plasmidique, les souches comme DH5α® ou XL1-Blue produisent habituellement des plasmides surenroulés de haute qualité. D'autres souches, comme par exemple HB101, avec un contenu élevé en endonucléases, peuvent induire une qualité moindre de l'ADN plasmidique et donc impacter les performances pour les réactions ultérieures comme les restrictions enzymatiques ou le séquençage.

Le **type de plasmide**, en particulier en termes de **taille et d'origine de répllication (ori)** a une importance cruciale sur le rendement en ADN. En général, plus le plasmide ou son insert est grand, moins le rendement attendu est important en raison d'un nombre de copie par cellule généralement plus faible. Même un plasmide high copy basé sur une ori ColE1 peut se comporter comme un vecteur low copy s'il contient un insert de grande taille ou défavorable. De plus, l'ori elle-même influence le rendement d'un facteur 10–100. Ainsi, les plasmides basés sur par exemple pBR322 ou pACYC, les cosmides ou les BACs sont maintenus à un nombre de copie par cellule < 20 et même parfois réduit à 1 copie, tandis que les vecteurs basés sur le pUC, pBluescript ou pGEM peuvent être représentés par plusieurs centaines de copies par cellule.

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

Par conséquent, tous les facteurs mentionnés, ci-dessus, doivent être considérés, en particulier si un objectif de rendement d'ADN est fixé. Le volume de culture et la procédure de lyse doivent être ajustés conjointement.

4.4 Amplification des plasmides low copy au moyen de chloramphénicol

Pour accroître drastiquement le nombre de copie par cellule pour les plasmides low copy dérivés de pMB1/colE1, cultiver les cellules jusqu'au milieu ou jusqu'à la fin de la phase logarithmique ($OD_{600} \approx 0.6-2.0$) sous pression sélective avec l'antibiotique approprié. Ajouter ensuite 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de chloramphénicol et poursuivre l'incubation pendant encore 8–12 heures. Le chloramphénicol inhibe la synthèse des protéines de l'hôte et empêche ainsi la réplication du chromosome de l'hôte. La réplication des plasmides, cependant, est indépendante des protéines néo-synthétisées et se poursuit pendant plusieurs heures et ils s'accumulent jusqu'à atteindre 2000–3000 copies par cellule*.

Alternativement, la culture bactérienne peut être soumise à une inhibition partielle de la synthèse des protéines en utilisant de faibles concentrations (10–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de chloramphénicol, induisant une augmentation du rendement ADN d'un facteur 5–10**.

Les deux méthodes ont l'avantage d'augmenter la quantité de plasmides par rapport à la quantité d'ADN génomique, mais ne fonctionnent évidemment qu'avec les plasmides ne portant pas de gène de résistance au chloramphénicol. De plus, la méthode n'est efficace que pour des plasmides low copy soumis à un contrôle rigoureux (ex : pBR322). Tous les plasmides récents high copy (ex : pUC) sont déjà sous contrôle relâché en raison de mutations dans les gènes de contrôle du nombre de copie et donc le traitement chloramphénicol n'améliore pas significativement le nombre de copies par cellule.

4.5 Volume de culture pour les plasmides high copy

En raison de l'influence des milieux de culture (TB, CircleGrow, 2 xYT), les conditions de croissance (agitation, température), la souche bactérienne, le type de plasmide et d'insert etc... la quantité finale de cellules dans les cultures bactériennes peut grandement varier. En règle générale, une culture de *E.coli* avec un litre de LB et une DO_{600} de 1 contient 1×10^{12} cellules et correspond à une masse de culot frais 1.5–1.8 g. Les cultures overnight en milieu LB, en Erlens vigoureusement agitées, atteignent en général une DO_{600} de 3–6. Les cultures en fermenteur peuvent même atteindre une DO_{600} de 10 et plus. Le rendement d'ADN attendu pour un plasmide high copy est d'environ 1 mg par gramme de culot bactérien frais.

Il est donc important d'**ajuster la quantité de masse cellulaire plutôt que le volume de culture** pour optimiser les résultats des purifications. Mais, tandis que la masse de cellules ou de culot cellulaire est fastidieuse à mesurer, cette valeur est remplacée dans ce manuel par le produit mathématique de la densité optique à 600 nm (DO_{600}) et du volume de culture (Vol) – deux variables beaucoup plus aisées à mesurer.

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

** Frenkel L, Bremer H : Increased amplification of plasmids pBR322 and pBR327 by low concentrations of chloramphenicol, DNA (5), 539–544, 1986.

$$\text{DOV} = \text{DO}_{600} \times \text{Vol} [\text{mL}]$$

Noter que pour une détermination correcte de la DO des cultures bactériennes, les échantillons doivent être dilués si la DO_{600} excède 0,5 afin que la mesure soit dans la zone linéaire où la DO_{600} croît proportionnellement à la masse cellulaire. Pour une culture correcte de *E. coli*, une dilution au 1 :10 dans du milieu de culture est recommandé. La DO_{600} mesuré est ensuite multipliée par le facteur de dilution (c'est-à-dire 10 dans notre cas) pour obtenir la valeur théorique DO_{600} . Cette valeur est utilisée dans le Tableau 2 pour déterminer le volume de culture le plus approprié. Le Tableau 2 mentionne les valeurs de DOV et les couples de valeurs DO_{600} / volume de culture correspondants et pouvant être facilement mis en œuvre avec le protocole et les volumes de réactifs de lyse standards. Par exemple, pour une DO_{600} de 6 de culture d'*E. coli*, utiliser 66 mL de culture bactérienne pour une Midi prep ou 200 mL de cette même culture pour une Maxi prep.

Tableau 2: Volumes de culture recommandés pour des plasmides high copy

NucleoBond® Xtra	Masse de culot frais	DOV rec.	$\text{DO}_{600} =$ 2	$\text{DO}_{600} =$ 4	$\text{DO}_{600} =$ 6	$\text{DO}_{600} =$ 8	$\text{DO}_{600} =$ 10
Midi	0.75 g	400	200 mL	100 mL	66 mL	50 mL	40 mL
Maxi	2.25 g	1200	600 mL	300 mL	200 mL	150 mL	120 mL

4.6 Volume de culture pour les plasmides low copy

Les kits **NucleoBond® Xtra** sont conçus pour l'extraction de plasmides high copy (parfois plusieurs centaines de copies/cellule) ainsi que pour les plasmides low copy (< 20 copies/cellule). Cependant, lors de la purification de plasmides low copy, la masse cellulaire et les volumes de tampons de lyse doivent être augmentés, au moins doublés pour produire assez d'ADN afin d'utiliser la capacité de fixation des colonnes. Le Tableau 3 présente les valeurs DOV et les couples DO_{600} / volume de culture correspondant pour les cultures de bactéries dédiées à la purification de plasmides low copy (pour des informations détaillées sur le calcul $\text{DOV} = \text{DO}_{600} \times \text{Vol.}$, voir le paragraphe 4.5). Par exemple, pour une DO_{600} de 6, collecter 133 mL de culture bactérienne pour une Midi prep et 400 mL pour une Maxi prep.

Tableau 3: Volumes de culture recommandés pour les plasmides low copy

NucleoBond® Xtra	Masse de culot frais	DOV rec.	$\text{DO}_{600} =$ 2	$\text{DO}_{600} =$ 4	$\text{DO}_{600} =$ 6	$\text{DO}_{600} =$ 8	$\text{DO}_{600} =$ 10
Midi	1.5 g	800	400 mL	200 mL	133 mL	100 mL	80 mL
Maxi	4.5 g	2400	1200 mL	600 mL	400 mL	300 mL	240 mL

Pour optimiser les rendements, il est possible d'augmenter le volume de culture et des tampons de lyse (par exemple d'un facteur 3–5). Dans ce cas, des tampons de lyse supplémentaires peuvent être commandés séparément (voir 'Informations de commande'). De plus, la clarification du lysat peut nécessiter une étape de centrifugation plutôt que

l'utilisation des **filtres NucleoBond® Xtra** seules, leur capacité volumique pour recevoir le précipité étant limitée.

Noter que l'amplification au moyen du chloramphénicol peut être envisagée pour augmenter le nombre de copies de plasmides par cellule (voir paragraphe 4.4).

4.7 Neutralisation du lysat et intérêt du réactif LyseControl

Un mélange complet du lysat avec le tampon de neutralisation NEU est d'une importance primordiale pour une précipitation totale du SDS, des protéines et de l'ADN génomique. Une neutralisation incomplète induit des rendements plus faibles, un écoulement gravitaire ralenti et un colmatage possible du filtre **NucleoBond® Xtra**. Cependant, l'ADN plasmidique, en solution à cette étape, est très vulnérable et une agitation excessive ou trop violente endommagerait l'ADN.

Par conséquent, **ne pas vortexer ou agiter** mais **retourner le mélange très doucement** jusqu'à la formation d'un précipité floconneux blanchâtre et d'une décoloration totale du réactif **LyseControl**, sans aucune trace résiduelle de bleu.

4.8 Lyse des cellules

Les bactéries sous forme de culot sont resuspendues dans le tampon RES et lysées lors d'un traitement NaOH/SDS avec le tampon LYS. Dans ces conditions, les protéines ainsi que l'ADN chromosomique et plasmidique sont dénaturées. L'ARN est dégradé par la RNase A préalablement ajoutée au tampon RES. Le tampon de neutralisation NEU, contenant de l'acétate de potassium, est ensuite ajouté au lysat, provoquant la précipitation du SDS sous forme de KDS (dodécyl sulfate de potassium), entraînant les protéines, l'ADN chromosomique et autres débris cellulaires. Le tampon contenant l'acétate de potassium neutralise également les conditions alcalines suite à l'addition de solution NaOH et contribue à la renaturation de l'ADN plasmidique sous sa forme native surenroulée tout en le conservant en solution.

Les volumes de tampons **NucleoBond® Xtra** (selon le protocole standard) sont ajustés pour permettre la lyse optimale des volumes de culture recommandés pour les plasmides high copy selon les recommandations du paragraphe 4.5, Tableau 2. Utiliser une quantité de cellules trop importante peut impacter de manière négative l'efficacité de la lyse, de la précipitation, induire une diminution du rendement et de la pureté. Par conséquent, les volumes de tampons de lyse doivent être adaptés lors de l'utilisation de volumes de culture supérieurs, par exemple, lors de la purification de vecteurs low copy (voir paragraphe 4.6, Tableau 3).

En règle générale, calculer les volumes de réactifs de lyse RES, LYS et NEU nécessaires de la manière suivante :

$$\text{Vol. [mL]} = \text{Volume de culture [mL]} \times \text{OD}_{600} / 50$$

Par exemple, pour un culot bactérien de 200 mL, issu d'une culture de $\text{DO}_{600}=4$ et destinée à la purification de plasmides low copy, les volumes adéquats de tampons RES, LYS, et NEU sont de 16 mL pour chacun. Si des tampons de lyse supplémentaires sont nécessaires, un set de tampons complémentaires incluant les tampons RES, LYS, NEU et la RNase A peut être commandé séparément (voir 'Informations de commande').

En utilisant des volumes adéquats de tampons de lyse, la durée de lyse peut être limitée à 3–4 minutes et ne doit pas excéder 5 minutes. Une exposition prolongée aux conditions alcalines peut dénaturer et dégrader irréversiblement l'ADN plasmidique et conduire au relargage d'ADN chromosomique dans le lysat.

Noter que les volumes de lyse calculer pour les préparations **NucleoBond® Xtra Maxi** ne correspondent pas aux volumes recommandés dans le protocole du fait que la majorité des utilisateurs débute la préparation avec une quantité de cellules très inférieure à la valeur DOV 1200 recommandée. De plus, les 3 x 12 mL du protocole standard permettent l'utilisation très pratique des tubes 50 mL. L'utilisation de plus de tampon de lyse nécessite généralement de diviser l'échantillon.

4.9 Souches difficiles à lyser

Pour la purification de plasmides à partir de bactéries Gram positives ou de souches disposant des parois cellulaires plus résistantes, un traitement initial au lysozyme peut s'avérer bénéfique. Pour cela, suspendre le culot cellulaire dans le tampon RES contenant **2 mg/mL de lysozyme** et incubé à **37 °C pendant 30 minutes**. Poursuivre avec la procédure de lyse selon le protocole standard **NucleoBond® Xtra**.

4.10 Mise en place des colonnes NucleoBond® Xtra

Idéalement, les colonnes **NucleoBond® Xtra Midi** ou **Maxi** seront placées sur un portoir **NucleoBond® Xtra Combi Rack** (voir 'Informations de commande'). Elles sont maintenues soit par le col de la colonne ou en utilisant les adaptateurs circulaires en plastique (réutilisables) inclus dans les kits, permettant d'ajuster la hauteur des colonnes (voir Figure 3). Ces adaptateurs peuvent aussi servir à maintenir les colonnes positionnées sur des tubes ou des Erlen. Le support **NucleoBond® Xtra Combi Rack** peut également être utilisé avec les kits **NucleoBond® PC 100, 500 et 2000**. Noter que les colonnes **NucleoBond® Xtra Midi** sont aussi compatibles avec le support **NucleoBond® Rack Large** (Référence 740563).

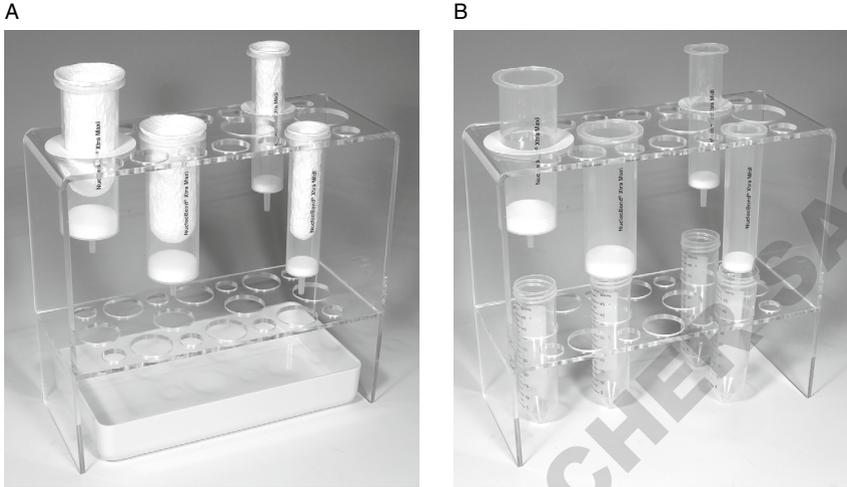
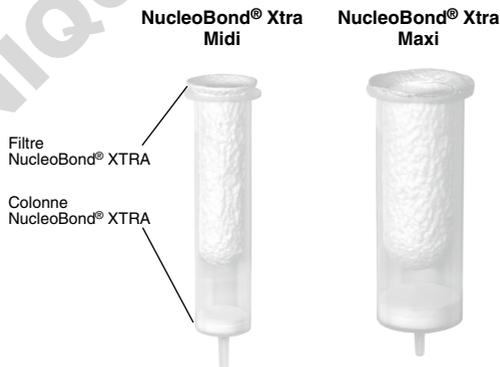


Figure 3 Montage des colonnes NucleoBond® Xtra Midi/Maxi sur le support NucleoBond® Xtra Combi Rack

A : Montage pour les étapes de clarification, de chargement et de lavages. B : montage pour l'éluion.

4.11 Filtration et chargement du lysat

Après la lyse alcaline, l'échantillon doit être débarrassé des débris cellulaires et des précipités pour garantir une pureté et un débit élevés. Ceci est possible en filtrant le lysat sur les filtres **NucleoBond® Xtra**, déjà insérées dans les colonnes **NucleoBond® Xtra**.



Les **filtres NucleoBond® Xtra** sont conçus pour éliminer l'étape de centrifugation après la lyse alcaline. Ces filtres sont pré-imbibés pendant l'équilibration et permettent un gain de temps en effectuant la clarification du lysat bactérien et le chargement de la colonne **NucleoBond® Xtra** simultanément.

En comparaison avec la clarification par centrifugation ou au moyen de filtres seringues, les **filtres NucleoBond® Xtra** empêchent la dégradation des constructions d'ADN de grande taille comme les PACs ou BACs grâce à une filtration douce en profondeur (la filtration intervient aussi bien à la surface comme dans la matrice interne du filtre). Le filtre est conçu à partir d'un matériel spécial permettant une filtration très rapide du lysat. De plus, de très grands volumes de culture peuvent être appliqués sans risque de colmatage. Cet aspect est particulièrement important lors de la purification de plasmides low copy. Cependant, pour une lyse de culot bactérien supérieur aux recommandations (voir paragraphe 4.5, Tableau 2, et paragraphe 4.6, Tableau 3), il peut s'avérer bénéfique de clarifier le lysat par centrifugation plutôt que les filtres fournis avec les colonnes, en raison de leur capacité limitée en volume.

4.12 Lavage de la colonne

La concentration élevée en sels du lysat prévient la fixation des protéines et de l'ARN sur la colonne **NucleoBond® Xtra** (voir paragraphe 4.2, Figure 2). Cependant, pour éliminer toute trace de contaminants et purger le volume mort des filtres **NucleoBond® Xtra**, il est important de laver la colonne et le filtre en deux étapes consécutives.

Appliquer d'abord le **tampon d'équilibration EQU** sur les bords supérieurs évasés du filtre pour laver tout lysat résiduel du filtre sur la colonne. Ne déposer pas seulement le tampon dans le centre du filtre ! Retirer et jeter ensuite le filtre de la colonne ou le faire tomber en retournant la colonne. Il est essentiel de laver la **colonne NucleoBond® Xtra** sans le filtre une seconde fois avec le **tampon WASH**. Cela permet d'assurer un rendement et une pureté plus élevés

4.13 Elution et concentration de l'ADN plasmidique

L'éluion est menée en condition de forte concentration saline et grâce à un saut de pH de 7.0 à 9.0. Dans ces conditions alcalines, la charge positive de la résine échangeuse d'anions est neutralisée et l'ADN plasmidique est relargué. Pour toutes applications, il est nécessaire de précipiter l'ADN, de le dessaler et d'éliminer toute trace d'éthanol, potentiellement inhibiteur de l'activité enzymatique lors des réactions de restrictions ou de séquençage.

Tous les éluats **NucleoBond® Xtra** contiennent déjà assez de sels pour une précipitation à l'isopropanol de l'ADN. Par conséquent, la précipitation se réalise avec l'ajout de 0,7 volumes d'isopropanol. Pour éviter la co-précipitation de sels, utiliser uniquement de l'**isopropanol à température ambiante** et ne laisser pas l'éluat d'ADN s'écouler dans l'isopropanol mais **ajouter l'isopropanol à l'éluat final et mélanger immédiatement**.

Ensuite, suivre au choix, soit le protocole de précipitation par centrifugation décrit à la suite du protocole **NucleoBond® Xtra** ou suivre le protocole additionnel mentionné au paragraphe 7.3 concernant l'utilisation des **NucleoBond® Finalizers**, outils éliminant les longues étapes de centrifugation (les **NucleoBond® Finalizers** ne sont recommandés que pour des vecteurs de taille inférieure à 50 kpb).

Les **NucleoBond® Finalizers** sont dédiés à la concentration et au dessalage rapide des plasmides et cosmides contenus dans les éluats obtenus avec les systèmes de purification utilisant la technologie de chromatographie échangeuse d'anions. L'échantillon est précipité à l'isopropanol comme mentionné ci-dessus et déposé sur une membrane de silice spéciale au moyen d'une seringue. Après une étape de lavage à l'éthanol de la membrane, celle-ci est séchée par le passage d'air au travers du filtre. L'éluion de l'ADN pur est ensuite obtenue grâce à un tampon faiblement salin comme le tampon TRIS (Tris/HCl 5 mM, pH 8.5, inclus dans les kits **NucleoBond® Xtra Plus kits**) ou du tampon TE (Tris/HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM). Ne pas utiliser d'eau purifiée à moins que son pH soit mesuré à plus de 7.0

Pour optimiser le rendement, il est recommandé d'effectuer l'étape d'élution deux fois. La première élution est effectuée avec le tampon frais tandis que la seconde est menée en redéposant la première élution sur le **NucleoBond® Finalizer** afin de permettre une solubilisation complète de l'ADN plasmidique.

Le rendement d'ADN dépend du volume de tampon d'élution utilisé. Les volumes élevés permettent un rendement élevé, jusqu'à 90 % mais une concentration plus faible. Les petits volumes d'élution, d'autre part, favorise la concentration au détriment du rendement d'ADN.

Si un petit volume est choisi, veiller à récupérer le maximum du liquide contenu dans la seringue et le **NucleoBond® Finalizer** en pressant fortement de l'air à travers le filtre **NucleoBond® Finalizer** à plusieurs reprises de manière à collecter toutes les gouttelettes et minimiser le volume mort.

Les Figures 4 et 5 illustrent, à titre d'exemple, comment le rendement et la concentration de l'ADN final sont dépendant du volume de tampon d'élution utilisé avec les **NucleoBond® Finalizer** et les **NucleoBond® Finalizer Large**, respectivement.

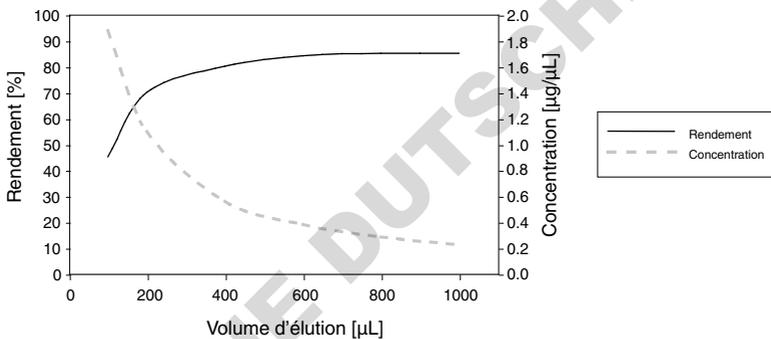


Figure 4 Rendement et concentration finaux d'ADN après utilisation de NucleoBond® Finalizer

Un éluat issu d'une préparation NucleoBond® Xtra Midi et contenant 250 µg d'ADN plasmidique (8 kpb) a été déposé sur un NucleoBond® Finalizer et élué deux fois avec des volumes croissants de tampon TE.

Le **NucleoBond® Finalizer** est conçu pour retenir un maximum de 500 µg d'ADN et il est, par conséquent, idéal en combinaison avec **NucleoBond® Xtra Midi**. Le rendement maximal est obtenu en utilisant un volume > à 600 µL de tampon d'élution. Pour augmenter la concentration, les utilisateurs expérimentés pourront diminuer le volume de tampon d'élution à 400 – 200 µL.

Le Tableau 4 présente les rendements et les concentrations attendus pour différentes quantités d'ADN déposées sur le **NucleoBond® Finalizer**. L'ADN a été élué en deux étapes successives avec des volumes croissants de TE. Merci de consulter ce tableau pour sélectionner un volume de tampon d'élution approprié en fonction de vos besoins et de vos contraintes.

Tableau 4: Rendement et concentration d'ADN avec NucleoBond® Finalizer

		Volume d'éluion					
		100 µL	200 µL	400 µL	600 µL	800 µL	1000 µL
Quantité d'ADN déposée	500 µg	35 %	60 %	70 %	75 %	75 %	75 %
		2.5 µg/µL	2.3 µg/µL	1.2 µg/µL	0.8 µg/µL	0.6 µg/µL	0.5 µg/µL
	250 µg	40 %	65 %	75 %	80 %	80 %	80 %
		1.9 µg/µL	1.1 µg/µL	0.6 µg/µL	0.4 µg/µL	0.3 µg/µL	0.2 µg/µL
	100 µg	45 %	70 %	80 %	85 %	85 %	85 %
		0.7 µg/µL	0.4 µg/µL	0.2 µg/µL	0.1 µg/µL	0.1 µg/µL	0.1 µg/µL
50 µg	30 %	75 %	85 %	90 %	90 %	90 %	
	0.3 µg/µL	0.2 µg/µL	0.1 µg/µL	0.1 µg/µL	0.1 µg/µL	< 0.1 µg/µL	

Rendement d'ADN
Concentration d'ADN

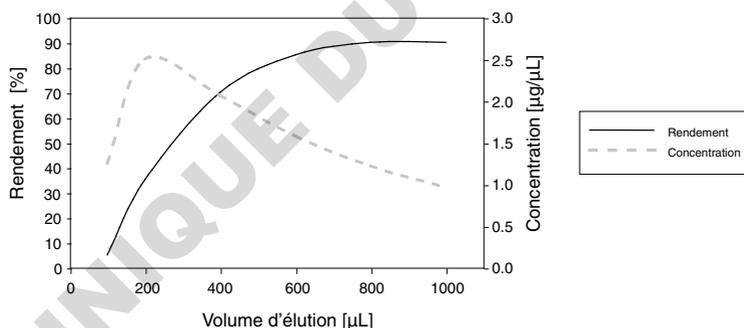


Figure 5 Rendement et concentration finaux d'ADN après utilisation de NucleoBond® Finalizer Large

Un éluat issu d'une préparation NucleoBond® Xtra Maxi et contenant 1000 µg d'ADN plasmidique (8 kpb) a été déposé sur un NucleoBond® Finalizer Large et élué en deux fois avec des volumes croissants de tampon TE.

Les éluats issus des préparations **NucleoBond® Xtra Maxi** sont facilement concentrés avec les **NucleoBond® Finalizer Large** capables de fixer jusqu'à 2000 µg d'ADN plasmidique. Le rendement maximal est obtenu en utilisant un volume > à 800 µL de tampon d'éluion. Pour augmenter la concentration, les utilisateurs expérimentés pourront réduire le volume d'éluion à 600–400 µL.

Le Tableau 5 présente les rendements et concentrations attendus pour différentes quantités d'ADN déposées sur le **NucleoBond® Finalizer Large**. L'ADN a été élué en deux étapes

successives avec des volumes croissants de TE. Merci de consulter ce tableau pour sélectionner un volume de tampon d'éluion approprié en fonction de vos besoins et de vos contraintes.

Tableau 5: Rendement et concentration d'ADN avec NucleoBond® Finalizer Large

		Volume d'éluion					
		100 µL	200 µL	400 µL	600 µL	800 µL	1000 µL
Quantité d'ADN déposée	1500 µg	5 %	30 %	65 %	80 %	85 %	90 %
		1.9 µg/µL	3.2 µg/µL	2.9 µg/µL	2.2 µg/µL	1.7 µg/µL	1.4 µg/µL
1000 µg	5 %	35 %	70 %	85 %	90 %	90 %	
	1.3 µg/µL	2.5 µg/µL	2.1 µg/µL	1.6 µg/µL	1.2 µg/µL	1.0 µg/µL	
500 µg	10 %	40 %	70 %	85 %	90 %	90 %	
	1.3 µg/µL	1.4 µg/µL	1.0 µg/µL	0.8 µg/µL	0.6 µg/µL	0.5 µg/µL	
100 µg	15 %	45 %	70 %	80 %	85 %	90 %	
	0.4 µg/µL	0.3 µg/µL	0.2 µg/µL	0.1 µg/µL	0.1 µg/µL	0.1 µg/µL	

Rendement d'ADN

Concentration d'ADN

4.14 Détermination du rendement et de la qualité de l'ADN

Le **rendement** d'une préparation de plasmides doit être estimé avant et après la précipitation à l'isopropanol afin de mesurer l'efficacité de la procédure de précipitation et de déterminer le volume le plus approprié pour la solubilisation finale du culot d'ADN. Utiliser le tampon d'éluion ELU du kit **NucleoBond® Xtra** comme blanc pour la mesure spectrophotométrique de la quantité d'ADN contenue dans l'éluat.

La **concentration** en acides nucléiques de l'échantillon est calculée à partir de l'absorption à 260 nm, 1 unité (1 cm de trajet optique) équivaut à une concentration de 50 µg d'ADN/mL. Noter que la mesure absolue de l'absorbance doit se situer entre 0,1 et 0,7 pour demeurer dans la partie linéaire de la loi de Beer-Lambert et en déduire une valeur fiable de la concentration d'ADN. Diluer l'échantillon si nécessaire.

La **pureté** de l'ADN plasmidique peut également être vérifiée par spectrophotométrie UV. Un ratio A_{260}/A_{280} de 1,80–1,90 et un ratio A_{260}/A_{230} autour de 2,0 indiquent un ADN plasmidique pur. Un ratio A_{260}/A_{280} au-delà de 2.0 est signe d'une contamination excessive par de l'ARN, tandis qu'un ratio A_{260}/A_{280} inférieur à 1,8 indique une contamination par des protéines.

La **qualité** de l'ADN plasmidique peut être vérifiée en effectuant une migration sur gel à 1 % d'agarose. Cela procure des informations quant à la conformation et l'intégrité structurale de l'ADN plasmidique purifié, par exemple, en offrant la possibilité de vérifier que les prédominances conformationnelles : surenroulée (forme 'ccc', habituellement la bande de

migration la plus rapide), en cercle ouvert (oc) ou même sous forme linéaire (paragraphe 8.1, Figure 6).

4.15 Etapes de pause possible

Les culots bactériens peuvent aisément être stockés plusieurs mois à -20 °C.

Les lysats clarifiés peuvent être conservés sur la glace ou à 4°C pendant plusieurs jours.

Pour une performance optimale, la procédure de purification sur colonne ne doit pas être interrompue. Cependant, les colonnes peuvent être laissées sans surveillance pendant plusieurs heures du fait qu'elle ne sèche pas. Cependant, une faible perte de rendement pourrait être observée.

Les éluats peuvent être stockés pendant plusieurs jours à 4°C. Noter qu'ils devront être équilibrés à température ambiante avant de procéder à la précipitation à l'isopropanol pour éviter la co-précipitation des sels.

5 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Tous les composants du kit peuvent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et sont ainsi stables jusqu'à : voir l'étiquette sur le kit.

Le stockage du tampon LYS en deçà de 20°C peut conduire à la précipitation du SDS contenu. Le cas échéant, incubé le tampon LYS à 30–40 °C pendant plusieurs minutes et mélanger efficacement jusqu'à complète dissolution du précipité. Laisser le tampon revenir à température ambiante avant utilisation.

Avant toute première utilisation d'un kit **NucleoBond® Xtra Midi / Maxi**, préparer les réactifs suivants :

- Dissoudre la RNase A lyophilisée* avec 1 mL de tampon RES. Le port de gants est recommandé. Mélanger en pipétant plusieurs fois jusqu'à ce que la RNase A soit parfaitement dissoute. Transférer la solution de RNase A dans le flacon contenant le tampon RES et mélanger précautionneusement. Noter sur le flacon la date d'ajout de la RNase A. La concentration finale de RNase A est de 60 µg/mL de tampon RES. Stocker le tampon RES contenant la RNase A à 4 °C. La solution est stable à cette température pendant au moins 6 mois.

* La référence 740414.100 contient 2 x 50 mg de RNase A. Veiller à bien dissoudre la RNase A des deux flacons, avec 1 mL de tampon RES pour chacun et transférer les solutions dans le flacon de tampon RES.

6 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoBond® Xtra**, 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 sur www.mn-net.com/msds).



Les déchets générés par le kit **NucleoBond® Xtra** 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.

6.1 Élimination des déchets

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

7 Purification de l'ADN plasmidique avec NucleoBond® Xtra

Le paragraphe suivant décrit les protocoles pour la purification de plasmides high copy et low copy ainsi que la procédure pour concentrer les éluats NucleoBond® Xtra avec les NucleoBond® Finalizers.

7.1 Purification de plasmides High copy (Midi, Maxi)

	Midi	Maxi
1 Préparation d'une préculture		
	Inoculer une préculture de 3–5 mL de milieu LB avec une seule colonie prélevée sur une boîte de culture fraîchement striée. Veiller à ce que la boîte et le milieu de culture contiennent bien l'antibiotique approprié pour la pression de sélection nécessaire à la propagation du plasmide d'intérêt (voir paragraphe 4.3 pour plus d'informations). Agiter à 37°C et ~ 300 rpm pendant ~ 8h.	
2 Préparation d'une culture overnight		
	Inoculer une culture pendant la nuit en diluant la préculture au 1/1000 dans les volumes mentionnés de milieu LB contenant également l'antibiotique de sélection adéquat. Faire pousser la culture toute la nuit à 37 °C et ~ 300 rpm pendant 12–16 h.	
	100 mL	300 mL
3 Collecter les bactéries		
	Mesurer la DO ₆₀₀ de la culture et déterminer le volume de culture recommandé.	
	V [mL] = 400 / DO₆₀₀	V [mL] = 1200 / DO₆₀₀
	Culotter les cellules par centrifugation à 4,500–6,000 x g pendant ≥ 10 min à 4 °C et jeter la totalité du surnageant.	
	<i>Note : Les conditions optimales de lyse sont déterminées par un ratio unique entre les volumes des tampons RES, LYS, NEU et la masse cellulaire utilisée. Voir le paragraphe 4.5 pour des recommandations concernant le volume optimal de culture à partir duquel les bactéries doivent être collectées pour des plasmides high copy et le paragraphe 4.6 pour des recommandations pour les plasmides low copy. Lire le paragraphe 4.5 attentivement car une quantité excessive de cellules induira des rendements réduits. Les volumes de culture recommandés ci-dessous sont calculés pour un DO₆₀₀ finale de 4.</i>	

Midi

Maxi

4 Resuspension (Tampon RES)

Resuspendre complètement le culot bactérien dans le **tampon de resuspension RES + RNase A** en pipétant les cellules plusieurs fois ou en vortexant.

Pour une lyse efficace, il est important qu'aucun agrégat de cellules ne subsiste dans la suspension.

Note : Augmenter proportionnellement le volume de tampon RES si une masse cellulaire supérieure aux recommandations est utilisée (voir le paragraphe 4.8 pour des informations sur les conditions optimales de lyse et le paragraphe 4.9 pour les souches difficiles à lyser).

8 mL

12 mL

5 Lyse cellulaire (Tampon LYS)

- ❗ **Vérifier l'absence de précipité de SDS dans le tampon LYS avant utilisation.**
Si un précipité blanc est visible, réchauffer le tampon pendant plusieurs minutes à 30–40 °C jusqu'à sa complète dissolution. Laisser le tampon revenir à température ambiante avant utilisation.

Ajouter le **tampon LYS** à la suspension.

Mélanger doucement en **retournant** le tube **5 fois**. **Ne pas vortexer**, au risque de fragmenter et de contaminer la suspension par de l'ADN chromosomique contenu dans les débris cellulaires.

Incuber le mélange à température ambiante pendant **5 min**.

Attention : une exposition prolongée aux conditions alcalines peut dénaturer et dégrader irréversiblement l'ADN plasmidique et libérer de l'ADN chromosomique contaminant dans le lysat.

Note : Augmenter proportionnellement le volume de tampon LYS si une masse cellulaire supérieure aux recommandations est utilisée (voir paragraphe 4.8 pour des informations sur les conditions optimales de lyse).

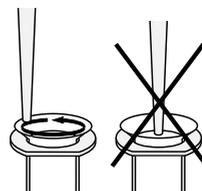
8 mL

12 mL

6 Equilibrer la colonne NucleoBond® Xtra avec son filtre avec le tampon d'équilibration EQU.

Déposer le tampon sur les bords supérieurs évasés du filtre comme indiqué sur le schéma et veiller à imprégner la totalité du filtre.

Laisser la colonne se vider par gravité. La colonne ne sèche pas.



12 mL

25 mL

Midi

Maxi

7 Neutralisation (Tampon NEU)

- ! Ajouter le **tampon de neutralisation NEU** à la suspension et mélanger immédiatement le lysat en **retournant** doucement le tube **jusqu'à disparition complète de la coloration bleue ! Ne pas vortexer.**

La flasque ou le tube utilisé pour cette étape ne doit pas être rempli à plus de deux tiers pour permettre un mélange homogène. Veiller à neutraliser la totalité du lysat pour précipiter toutes les protéines et l'ADN chromosomique. La consistance du lysat doit passer de visqueuse à une suspension plus fluide, homogène de flocculat blanchâtre. De plus, le réactif LyseControl doit être totalement décoloré sans aucune trace résiduelle de bleu.

Procéder immédiatement à l'étape 8. **Une incubation du lysat n'est pas nécessaire.**

Note : Augmenter proportionnellement le volume de tampon NEU si une masse cellulaire supérieure aux recommandations est utilisée (voir paragraphe 4.8 pour des informations sur les conditions optimales de lyse).

8 mL

12 mL

8 Clarification et chargement du lysat

- ! Veiller à déposer une suspension homogène du précipité en **retournant le tube 3 fois** avant le chargement sur le filtre NucleoBond® Xtra préalablement équilibré pour éviter le colmatage du filtre.

Le lysat est simultanément clarifié et chargé sur la résine. Recharger le lysat si un volume supérieur à la capacité volumique du filtre est à procéder. Permettre à la colonne de se vider par écoulement gravitaire.

Alternative : le précipité peut être éliminé par centrifugation à $\geq 5,000 \times g$ pendant au moins 10 min, par exemple si la masse cellulaire utilisée est plus du double de la quantité recommandée. Si le surnageant contient encore des matières en suspension, transférer le dans un nouveau tube et répéter la centrifugation, de préférence à vitesse supérieure ou bien déposer le lysat sur le filtre NucleoBond® Xtra équilibrée.

Cette étape de clarification est extrêmement importante car des résidus de précipité pourrait induire le colmatage de la colonne **NucleoBond® Xtra**. Pour charger la colonne, déposer le lysat clair sur le filtre équilibré ou enlever le filtre inutilisé au préalable. Laisser la colonne se vider par écoulement gravitaire.

Note : Vous pouvez conserver tout ou partie des filtrats pour des analyses ultérieures (voir paragraphe 8.1).

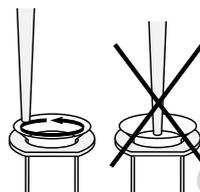
Midi

Maxi

9 1er lavage : Filtre et colonne (Tampon EQU)

Laver le filtre NucleoBond® Xtra et la colonne **NucleoBond® Xtra** avec le **tampon d'équilibrage EQU**.

Déposer le tampon sur les bords supérieurs évasés du filtre et veiller à l'imprégner complètement pour que le lysat contenu dans le filtre s'écoule dans la colonne. Omettre cette étape ou déposer le tampon directement au centre du filtre peut réduire le rendement d'ADN plasmidique.



5 mL

15 mL

10 Elimination du filtre

Retirer le filtre **NucleoBond® Xtra** ou laisser le tomber en retournant la colonne.

**11 2nd lavage : Colonne uniquement (tampon WASH)**

Laver la colonne **NucleoBond® Xtra** avec le tampon WASH. Il est important d'enlever le filtre avant de déposer le tampon de lavage pour optimiser la pureté de l'ADN.



8 mL

25 mL

12 Elution (tampon ELU)

Eluer l'ADN plasmidique avec le tampon d'éluion ELU. Collecter l'éluat dans un tube à centrifuger 15 mL ou 50 mL (non fourni).

Note : Préchauffer le tampon ELU à 50 °C avant de procéder à l'éluion peut améliorer le rendement pour les constructions de grande taille comme les BACs.

Optionnel : Déterminer le rendement en ADN plasmidique par spectrophotométrie UV afin d'ajuster la concentration d'ADN à l'étape 15 et évaluer le rendement de l'étape de précipitation.

5 mL

15 mL

Midi

Maxi

! NucleoBond® Xtra Midi / Maxi Plus :

- Poursuivre avec l'**étape 13** pour le protocole de centrifugation après la précipitation à l'isopropanol ou continuer avec le **paragraphe 7.3** pour la concentration et le dessalage avec **NucleoBond® Finalizer (NucleoBond® Xtra Midi Plus)** ou **NucleoBond® Finalizer Large (NucleoBond® Xtra Maxi Plus)**.

13 Précipitation

Ajouter l'isopropanol à température ambiante pour précipiter l'ADN plasmidique élué.

Vortexer efficacement !

Centrifuger à $\geq 4,500 \times g$ pendant $\geq 15 \text{ min}$ à \leq température ambiante, de préférence à $15,000 \times g$ pendant 30 min et à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Jeter précautionneusement le surnageant.

3.5 mL

10.5 mL

14 Lavage et séchage

Ajouter de l'éthanol 70 % à température ambiante sur le culot.

2 mL

14 mL

Centrifuger à $\geq 4,500 \times g$, de préférence $\geq 15,000 \times g$ pendant 5 min à température ambiante.

Éliminer complètement l'éthanol avec un cône. Laisser sécher le culot à l'air libre à température ambiante.

Note : l'ADN plasmidique peut être difficile à solubiliser en cas de séchage excessif.

10–15 min

15–30 min

15 Solubilisation de l'ADN

Dissoudre le culot d'ADN dans le volume adéquat de tampon TE ou d'H₂O. Selon le type de tube à centrifuger utilisé, dissoudre en pipetant de manière répéter ou en faisant tourner le tube pendant 10–60 min (agitateur 3D) contenant un volume suffisant de tampon.

Déterminer le rendement d'ADN plasmidique par spectrophotométrie UV. Vérifier l'intégrité de l'ADN plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose (voir paragraphe 4.14).

7.2 Purification de plasmides Low copy (Midi, Maxi)

Les volumes de tampons de lyse fournis dans le kit sont calculés pour la purification de plasmides high copy. Par conséquent, des tampons supplémentaires doivent être commandés séparément en cas de purifications répétées de plasmides low copy (voir 'Informations de commande').

	Midi	Maxi
1 Préparation d'une préculture		
	Inoculer une préculture de 3–5 mL de milieu LB avec une seule colonie prélevée sur une boîte de culture fraîchement stérilisée. Veiller à ce que la boîte et le milieu de culture contiennent bien l'antibiotique approprié pour la pression de sélection nécessaire à la propagation du plasmide d'intérêt (voir paragraphe 4.3 pour plus d'informations). Agiter à 37°C et ~ 300 rpm pendant ~ 8 h.	
2 Préparation d'une culture overnight		
	<p>! <i>Note</i> : pour utiliser l'entière capacité de fixation des colonnes NucleoBond® Xtra, il est important de produire suffisamment d'ADN plasmidique. Pour le protocole standard de purification de plasmides low copy, les volumes de culture sont doublés par rapport à la procédure recommandée pour les plasmides high copy. Cependant, en raison d'un contenu en plasmides 10–100 fois plus faibles, ceci peut demeurer insuffisant. Si vous souhaitez optimiser vos rendements en plasmides low copy, augmenter le volume de culture d'un facteur 3-5. Les volumes de culture recommandés ci-dessous sont calculés pour une DO₆₀₀ finale de culture d'environ 4 (voir paragraphe 4.6 pour plus d'informations).</p> <p>Inoculer une culture overnight en diluant la préculture au 1/1000 dans les volumes mentionnés de milieu LB contenant également l'antibiotique de sélection adéquat. Faire pousser la culture pendant une nuit à 37 °C et ~ 300 rpm pendant 12–16h.</p>	
	200 mL	600 mL
3 Collecter des bactéries		
	Mesurer la DO ₆₀₀ de la culture bactérienne et déterminer le volume de culture recommandé.	
	$V \text{ [mL]} = \frac{800}{DO_{600}}$	$V \text{ [mL]} = \frac{2400}{DO_{600}}$
	Culotter les cellules par centrifugation à 4,500–6,000 x g pendant ≥ 10 min à 4 °C et jeter la totalité du surnageant.	
	<p><i>Note</i> : Il est bien entendu possible d'utiliser des volumes de culture supérieurs, par exemple afin d'obtenir un rendement plus élevé de plasmides low copy (voir paragraphe 4.6 pour plus d'informations). Dans ce cas, augmenter proportionnellement les volumes de tampons RES, LYS et NEU aux étapes 4, 5 et 7. Des tampons de lyse complémentaires peuvent être commandés séparément (voir 'Informations de commande' pour le set de tampons NucleoBond® Xtra Buffer Set I, au paragraphe 8.2). Utiliser la centrifugation pour la clarification plutôt que les filtres NucleoBond® Xtra.</p>	

Midi

Maxi

4 Resuspension (Tampon RES)

Resuspendre complètement le culot cellulaire dans le **tampon de resuspension RES + RNase A** en pipetant les cellules de manière répétée ou en vortexant.

Pour une lyse efficace, il est important qu'aucun agrégat de bactéries ne subsiste dans la suspension.

Note : Augmenter proportionnellement le volume de tampon RES si une masse cellulaire supérieure aux recommandations est utilisée (voir paragraphe 4.8 pour des informations sur les conditions optimales de lyse et le paragraphe 4.9 concernant les souches difficiles à lyser).

16 mL

24 mL

5 Lyse cellulaire (Tampon LYS)

! **Vérifier l'absence de précipité de SDS dans le tampon LYS avant utilisation.** Si un précipité blanc est visible, réchauffer le tampon LYS pendant plusieurs minutes à 30–40 °C jusqu'à sa complète dissolution. Laisser le tampon revenir à température ambiante avant utilisation.

Ajouter le **tampon LYS** à la suspension.

Note : Augmenter proportionnellement le volume de tampon LYS si une masse cellulaire supérieure aux recommandations est utilisée (voir paragraphe 4.8 pour des informations sur les conditions optimales de lyse).

16 mL

24 mL

Mélanger doucement en **retournant** le tube **5 fois**. **Ne pas vortexer**, ceci induirait une fragmentation et un relargage de l'ADN chromosomique depuis les débris cellulaires qui contaminerait la suspension.

Incuber le mélange à température ambiante pendant **5 min**.

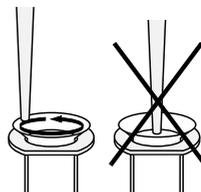
Attention : une exposition prolongée aux conditions alcalines peut dénaturer et dégrader irréversiblement l'ADN plasmidique et libérer de l'ADN chromosomique contaminant dans le lysat.

6 Equilibration (Tampon EQU)

Equilibrer la **colonne NucleoBond® Xtra** avec son filtre avec le **tampon d'équilibration EQU**.

Déposer le tampon sur les bords supérieurs évasés du filtre comme indiquer sur le schéma et veiller à imprégner la totalité du filtre.

Laisser la colonne se vider par gravité. La colonne ne sèche pas.



Midi	Maxi
12 mL	25 mL

7 Neutralisation (Tampon NEU)

Ajouter le **tampon de neutralisation NEU** à la suspension et mélanger immédiatement le lysat en **retournant** doucement le tube **jusqu'à disparition complète de la coloration bleue ! Ne pas vortexer.**

! La flasque ou le tube utilisé pour cette étape ne doit être rempli à plus de deux tiers pour permettre un mélange homogène. Veiller à neutraliser la totalité du lysat pour précipiter toutes les protéines et l'ADN chromosomique. La consistance du lysat doit passer de visqueuse à une suspension plus fluide, homogène de flocculat blanchâtre. De plus, le réactif LyseControl doit être totalement décoloré sans aucune trace résiduelle de bleu.

Note : Augmenter proportionnellement le volume de tampon NEU si la masse cellulaire utilisée est supérieure aux recommandations du protocole standard (voir paragraphe 4.8 pour des informations sur les conditions optimales de lyse).

16 mL	24 mL
-------	-------

Poursuivre avec l'étape 8 du protocole standard pour la purification des plasmides high copy (paragraphe 7.1) si les volumes de tampons de lyse n'ont pas été significativement augmentés.

Autrement, il est préférable de centrifuger d'abord le précipité afin d'éviter le colmatage du filtre NucleoBond® Xtra.

7.3 Concentration des éluats NucleoBond® Xtra avec les NucleoBond® Finalizers

Note : L'utilisation des NucleoBond® Finalizers est recommandée uniquement pour les vecteurs de taille inférieure à 50 kpb.

Midi – NucleoBond®
Finalizer

Maxi – NucleoBond®
Finalizer Large

1 Précipitation

Note : Vérifier par spectrophotométrie la concentration de l'ADN dans les éluats avant la précipitation. Ceci permet de choisir ensuite le volume d'éluat le plus approprié à l'étape 5 et permet d'évaluer le rendement de l'étape de concentration.

Ajouter **0,7 volumes d'isopropanol à température ambiante** (non fourni). Vortexer efficacement et laisser le mélange incuber pendant **2 minutes**.

(Exemple : pour 5 mL d'éluat **NucleoBond® Xtra Midi** ajouter 3.5 mL d'isopropanol, pour 15 mL d'éluat **NucleoBond® Xtra Maxi**, ajouter **10.5 mL** d'isopropanol)

3.5 mL pour
5 mL d'éluat

10.5 mL pour
15 mL d'éluat

2 Chargement du filtre seringue

Enlever le piston d'une **seringue 30 mL** et connecter un **NucleoBond® Finalizer** en sortie. Déposer le mélange de précipitation dans la seringue, insérer le piston, maintenir en position verticale et presser le mélange **doucement** à travers le **NucleoBond® Finalizer** (le mélange doit traverser le **NucleoBond® Finalizer** au goutte à goutte). Jeter le filtrat.

3 Lavage

Déconnecter le **NucleoBond® Finalizer** de la seringue, retirer le piston et reconnecter le **NucleoBond® Finalizer**.

Déposer l'**éthanol 70 %** (non fourni) dans la seringue, insérer le piston, maintenir la seringue en position verticale et presser **doucement** l'éthanol à travers le **NucleoBond® Finalizer**. Jeter le filtrat.

2 mL

4 mL

Midi – NucleoBond®
FinalizerMaxi – NucleoBond®
Finalizer Large**4 Séchage**

Déconnecter le **NucleoBond® Finalizer** de la seringue, retirer le piston et reconnecter le **NucleoBond® Finalizer**. Presser l'air à travers le **NucleoBond® Finalizer** aussi fortement que possible tout en **touchant un papier absorbant** avec l'embout du **NucleoBond® Finalizer** pour absorber l'éthanol.

Répéter cette étape le nombre de fois mentionnées ci-dessous jusqu'à **ce que plus l'éthanol** ne sorte plus du **NucleoBond® Finalizer**.

Note : Une nouvelle seringue peut être utilisée pour accélérer la procédure de séchage (non incluse).

≥ 6 fois, jusqu'au séchage total

≥ 6 fois, jusqu'au séchage total

Optional : vous pouvez incuber le NucleoBond® Finalizer pendant 10 minutes à 80 °C pour minimiser la contamination en éthanol. Cependant, le rendement final peut s'avérer négativement impacté par un séchage excessif de l'ADN.

5 Elution (tampon TRIS)

Enlever le **NucleoBond® Finalizer** de la seringue 30 mL, retirer le piston d'une **seringue 1 mL** et y connecter le **NucleoBond® Finalizer**.

Note : Voir le paragraphe 4.13, Tableau 4(Midi) ou 5 (Maxi) pour déterminer le volume de tampon d'éluion le plus approprié.

Déposer le volume adéquat de **tampon de dissolution TRIS** (Tris/HCl 5 mM, pH 8.5) ou de tampon TE dans la seringue (voir paragraphe 4.13). Ne pas utiliser d'eau purifier à moins que son pH soit au-delà de pH 7.0. Placer la sortie du **NucleoBond® Finalizer** verticalement au-dessus d'un tube neuf (non fourni) **éluer l'ADN plasmidique très doucement**, goutte après goutte, en insérant le piston.

200 – 800 µL

400 – 1000 µL

Déconnecter le **NucleoBond® Finalizer** de la seringue, retirer le piston et reconnecter le **NucleoBond® Finalizer**.

Transférer le premier éluat dans la seringue et éluer une seconde fois dans le même tube collecteur.

Déposer la totalité du premier éluat

Déposer la totalité du premier éluat

En cas de rendement attendu très élevé (> 400 µg pour NucleoBond® Xtra Midi ; > 1000 µg pour NucleoBond® Xtra Maxi), le rendement final peut être amélioré par une troisième éluion.

Déconnecter le **NucleoBond® Finalizer** de la seringue, retirer le piston pour aspirer de l'air, reconnecter le **NucleoBond® Finalizer** et **presser de l'air pour forcer le maximum d'éluat à sortir du filtre**.

Déterminer le rendement d'ADN plasmidique par spectrophotométrie UV et confirmer l'intégrité de l'ADN plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose (voir paragraphe 4.14).

8 Annexes

8.1 Guide de résolution des problèmes

Si vous rencontrez des problèmes de rendement ou de pureté de l'ADN plasmidique obtenu, il est recommandé de vérifier quelle étape de la procédure peut être en cause.

Premièrement, vérifier la croissance de la culture bactérienne (DO_{600}) et la présence d'un antibiotique approprié (Tableau 1, paragraphe 4.3). **Deuxièmement**, des aliquotes de lysat clarifié, de filtrat, des lavages (tampon EQU et tampon WASH) et des éluats peuvent être conservés pour une analyse ultérieure par électrophorèse sur gel d'agarose.

Voir le Tableau 6 pour connaître les volumes à prélever pour chaque fraction, de manière à obtenir environ 5 μg d'ADN plasmidique, en considérant que 250 et 1000 μg d'ADN ont été déposés respectivement sur une colonne **NucleoBond® Xtra Midi** ou **Max**. Précipiter les acides nucléiques en ajoutant 0,7 volumes d'isopropanol, centrifuger, laver le culot à l'éthanol 70 %, centrifuger à nouveau, éliminer le surnageant, sécher à l'air pendant 10 minutes, dissoudre l'ADN dans 100 μL de tampon TE (pH 8.0) et déposer 20 μL sur un gel d'agarose à 1 %.

Tableau 6: Volumes des fractions NucleoBond® Xtra à conserver pour analyse

Echantillon	Etape de la purification	Volume required [μL]	
		Midi	Maxi
I	Lysat clarifié (issu de l'étape 8)	500	200
II	Filtrat (après l'étape 8)	500	200
III	Filtrat des lavages (après les étapes 9 et 11)	250	200
IV	Eluat (après l'étape 12)	100	100

Les exemples de gel (Figure 6) vous aideront à cibler votre problématique et à répondre aux questions du paragraphe suivant plus rapidement et efficacement.

Ce gel est un exemple montrant les bandes dominantes d'ADN plasmidique qui ne doivent être présentes que dans l'éluat final et le lysat clarifié, prouvant la production de plasmides dans votre culture (ligne 1). Cependant, de l'ADN plasmidique retrouvé dans la fraction de filtrat issue des lavages signifierait un problème d'utilisation du mauvais tampon ou de tampon altéré (exemple : problème de pH, composants précipités, évaporation de liquide lié à un mauvais stockage).

L'ARN peut être visualisé sous forme de bande diffuse en bas du gel dans les fractions de lysat et de filtrat obtenu à l'issue de l'étape de fixation de l'ADN (lignes 1 et 2). Il peut aussi se retrouver dans la fraction correspondant aux lavages mais il doit être absent de l'éluat final.

L'ADN génomique ne devrait pas être visible. Dans le cas contraire, il apparaîtrait dans les puits du gel ou juste en dessous et serait symptomatique de conditions de lyse trop drastiques.

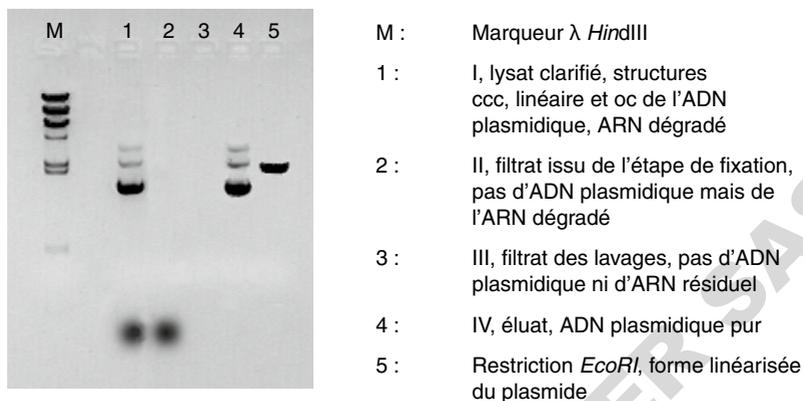


Figure 6 Exemple de contrôle analytique des différentes fractions issues de la procédure NucleoBond® Xtra Midi Plasmide : pUC18, souche bactérienne : E. coli DH5 α ®.
Après précipitation, 20 μ L de chaque fraction ont été analysés sur gel d'agarose à 1 %. Des quantités équivalentes d'ADN plasmidique sont visibles avant (ligne 1) et après la purification avec NucleoBond® Xtra Midi (ligne 4), démontrant un rendement > 90 %.

Problème **Cause possible et suggestions**

Pas d'amplification du plasmide

- Vérifier le contenu en plasmides du lysat clarifié (voir Figure 6). Utiliser des colonies fraîches pour inoculer le milieu et ajouter un antibiotique de sélection frais sur les boîtes et milieux de culture.
- Estimer le contenu en plasmides avant d'effectuer la purification d'une culture overnight au moyen de minipreps rapides comme NucleoSpin® Plasmid ou NucleoSpin® Plasmid EasyPure.

Lyse alcaline inefficace

- Quantité de masse cellulaire excessive. Voir les paragraphes 4.5–4.8 à propos des volumes de culture et de réactifs de lyse recommandés. Vérifier la quantité de plasmides présents dans le lysat clarifié (voir Figure 6).
- Vérifier l'absence de précipité de SDS dans le tampon LYS avant utilisation, en particulier en cas de stockage en deçà de 20°C. Si nécessaire, incuber le flacon plusieurs minutes à 30–40 °C et mélanger bien jusqu'à complète dissolution du SDS.

Présence de SDS ou autres précipités dans l'échantillon

Rendement
faible ou nul

- Déposer le lysat sur le filtre NucleoBond® Xtra inséré dans la colonne NucleoBond® Xtra. Cette filtration permet d'éliminer totalement les précipités de SDS. L'incubation des lysats clarifiés pendant une période plus longue peut induire la formation de nouveaux précipités. Si des précipités sont visibles, il est recommandé de filtrer et centrifuger de nouveau le lysat avant de le déposer sur la colonne NucleoBond® Xtra.

Échantillon / lysat trop visqueux

- Masse cellulaire utilisée excessive. Voir les paragraphes 4.5–4.8 à propos des volumes de culture et de réactifs de lyse recommandés.
- Veiller à mélanger efficacement après la neutralisation pour précipiter totalement le SDS et l'ADN chromosomique. Sinon, l'efficacité de la filtration et le débit d'écoulement diminueront, ainsi que le rendement car le SDS empêche l'ADN de se fixer sur la colonne.

pH ou concentration en sel des tampons trop élevés

- Vérifier le contenu en ADN plasmidique dans les fractions de lavage (voir Figure 6). Conserver tous les flacons bien clos. Vérifier et ajuster le pH des tampons EQU (pH 6.5), WASH (pH 7.0), et ELU (pH 9.0) et corriger avec du HCl ou NaOH si nécessaire.
-

Problème	Cause possible et suggestions
Filtre NucleoBond® Xtra colmaté au cours de la filtration	<p data-bbox="300 209 572 231"><i>Volume de culture trop élevé</i></p> <ul data-bbox="300 252 975 300" style="list-style-type: none"> • Voir les paragraphes 4.5–4.8 à propos des volumes de culture et de l'utilisation de grands volumes de tampon de lyse. <p data-bbox="300 316 975 338"><i>Précipité insuffisamment resuspendu avant l'étape de fixation de l'ADN.</i></p> <ul data-bbox="300 359 936 406" style="list-style-type: none"> • Retourner le tube contenant le lysat au moins 3 fois avant de le déposer dans le filtre. <p data-bbox="300 422 527 445"><i>Précipitation incomplète</i></p> <ul data-bbox="300 466 936 515" style="list-style-type: none"> • Veiller à bien mélanger après la neutralisation pour précipiter la totalité du SDS et de l'ADN chromosomique.
Colonne NucleoBond® Xtra colmatée ou écoulement très lent	<p data-bbox="300 536 538 558"><i>Echantillon trop visqueux</i></p> <ul data-bbox="300 579 975 847" style="list-style-type: none"> • NE PAS essayer de purifier l'ADN à partir d'un lysat préparé à partir d'un volume de culture supérieur aux recommandations mais avec les volumes de réactifs de lyse du protocole. Une lyse incomplète peut non seulement colmater les colonnes, mais aussi induire des rendements significativement réduits. Voir les paragraphes 4.5 et 4.6 pour des recommandations à propos des volumes de culture et le paragraphe 4.8 pour l'ajustement des volumes de tampons de lyse. • Veiller à bien mélanger après la neutralisation pour précipiter la totalité du SDS et de l'ADN chromosomique. <p data-bbox="300 863 602 885"><i>Clarification incomplète du lysat</i></p> <ul data-bbox="300 906 975 1023" style="list-style-type: none"> • Utiliser le filtre NucleoBond® Xtra ou centrifuger à plus haute vitesse ou pendant plus longtemps. • Précipité formé pendant le stockage. Clarifier de nouveau le lysat avant le dépôt sur la colonne.
Contamination par de l'ADN génomique	<p data-bbox="300 1043 482 1066"><i>Lyse trop drastique</i></p> <ul data-bbox="300 1086 947 1134" style="list-style-type: none"> • Veiller à ne pas prolonger la lyse avec le tampon LYS au-delà de 5 min. <p data-bbox="300 1150 826 1173"><i>Lysat mélangé trop violemment ou vortexé après la lyse</i></p> <ul data-bbox="300 1193 964 1313" style="list-style-type: none"> • Retourner le tube seulement 5 fois. Ne pas vortexer après ajout du tampon LYS. • Utiliser des tubes de plus grand volume ou réduire le volume de culture afin de permettre un mélange plus efficace et aisé.

Problème **Cause possible et suggestions**

Contamination de l'ADN plasmidique par l'ARN	<p><i>Inefficacité de la digestion par la RNase</i></p> <ul style="list-style-type: none">• La RNase n'a pas été ajoutée dans le tampon RES ou le tampon a été mal conservé. Ajouter à nouveau de la RNase dans le tampon RES. Voir le paragraphe 8.2 pour les 'informations de commande'. <p><i>pH ou concentration en sels trop faible du tampon de lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Vérifier la présence d'ARN dans les fractions de lavage (voir Figure 6). Conserver tous les flacons bien clos. Vérifier le pH des tampons EQU (pH 6.5) et WASH (pH 7.0) et ajuster avec HCl ou NaOH si nécessaire.• Augmenter la stringence du tampon de lavage WASH en ajustant son pH à 7.5. <p><i>Étape de lavage avec le tampon WASH insuffisante</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Doubler ou tripler le lavage avec le tampon WASH. Le tampon WASH est disponible séparément (voir 'Informations de commande').
Pureté faible ($A_{260}/A_{280} < 1.8$)	<p><i>Le filtre NucleoBond® Xtra n'a pas été éliminé avant le second lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Le contenu en protéines est trop élevé en raison de l'inefficacité du lavage. Enlever le filtre NucleoBond® Xtra avant d'effectuer le second lavage avec le tampon WASH. <p><i>Le tampon WASH a été utilisé à la place du tampon EQU pour le premier lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Le tampon EQU doit être utilisé pour laver le filtre NucleoBond® Xtra pour éviter le relargage de SDS. <p><i>Quantité minimale d'ADN chargée sur la colonne</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Un excès de sites de fixation libres nécessite des lavages plus importants - doubler l'étape de lavage avec le tampon WASH.• Réduire le temps de lyse à < 5 min.

Problème	Cause possible et suggestions
Absence de culot d'acides nucléiques après la précipitation	<i>Perte du culot</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Manipuler le précipité avec soin. Décanter la solution précautionneusement. Déterminer le rendement dans le tampon ELU afin de déterminer la quantité d'ADN plasmidique attendue après la précipitation.
	<i>L'ADN plasmidique est étalé sur les parois du tube</i>
Culot d'acides nucléiques opaque ou blanc plutôt que clair et vitreux	<ul style="list-style-type: none"> Dissoudre l'ADN dans un volume suffisant de tampon en faisant tourner le tube sur lui-même pendant au moins 30 min.
	<i>Problème de précipitation des acides nucléiques</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier la nature et le volume de solvant utilisé. Veiller à utiliser au moins 0.7 volume d'isopropanol et mélanger efficacement. Centrifuger à une vitesse supérieure et pendant plus longtemps.
Le culot d'acides nucléiques ne se resuspend pas dans le tampon	<i>Co-précipitation de sels</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier la pureté de l'isopropanol et effectuer la précipitation à température ambiante mais centrifuger à 4 °C. Ne laisser pas l'éluat tomber directement de la colonne dans l'isopropanol mais ajouter le à l'éluat et mélanger immédiatement. Essayer de resuspendre le culot dans le tampon WASH et recharger la même colonne NucleoBond® Xtra. Laver la colonne plusieurs fois avec le tampon WASH avant de charger.
	<i>Séchage excessif du culot</i>
Le culot d'acides nucléiques ne se resuspend pas dans le tampon	<ul style="list-style-type: none"> Essayer de le dissoudre à température supérieure pendant plus longtemps (ex : 2 h à 37 °C ou une nuit TA), de préférence sous agitation constante (agitateur 3 D).
	<i>Co-précipitation de sels ou résidus d'alcool</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Laver de nouveau le culot avec de l'éthanol 70 % ou augmenter le volume de tampon de dissolution.
Le culot d'acides nucléiques ne se resuspend pas dans le tampon	<i>Particules insolubles dans l'ADN dissout</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Centrifuger la solution d'ADN pour culotter les particules insolubles et transférer le surnageant dans un nouveau tube. Les particules insolubles n'affectent pas la qualité de l'ADN. Sinon les particules insolubles peuvent facilement être éliminées avec les NucleoBond® Finalizer (NucleoBond® Xtra Midi) ou les NucleoBond® Finalizer Large (NucleoBond® Xtra Maxi).

Problème **Cause possible et suggestions**

Rendement faible ou nul dans la fraction éluée de la colonne NucleoBond® Xtra

- Voir le chapitre 'Guide de résolution des problèmes' "rendement faible ou nul".

Volume mort trop important

- Si la concentration d'ADN plasmidique est la priorité, l'éluion peut devoir être effectuée dans un petit volume. Naturellement, une partie de l'éluat est perdue dans la seringue et le filtre seringue NucleoBond® Finalizer. Pour minimiser ces pertes lors de la seconde éluion, essayer de récupérer la moindre goutte sortant du NucleoBond® Finalizer, par exemple en tapotant le NucleoBond® Finalizer et la seringue sur la paillasse. Ensuite, remplir la seringue d'air et presser fortement pour expulser les gouttelettes résiduelles du NucleoBond® Finalizer. Répéter plusieurs fois cette étape. Cette procédure peut demander un certain entraînement. Le volume mort considéré comme acceptable pour les NucleoBond® Finalizer est de 30 µL et de 60 µL pour les NucleoBond® Finalizer et les NucleoBond® Finalizer Large respectivement.

Volume d'éluion trop faible

Rendement
faible ou
nul après
utilisation du
NucleoBond®
Finalizer

- Comme les volumes morts sont de l'ordre de 30 µL (NucleoBond® Finalizer) et 60 µL (NucleoBond® Finalizer Large), les volumes d'éluion minimaux sont de l'ordre de 200 µL (NucleoBond® Finalizer) et 400 µL (NucleoBond® Finalizer Large). Par ailleurs, des volumes inférieurs sont insuffisants pour imprégner la totalité de la membrane et induisent une perte de rendement significative. Voir le paragraphe 4.13, Tableau 4 et 5 pour estimer le rendement attendu en fonction du volume de tampon d'éluion utilisé.

Eluion trop rapide

- L'ADN plasmidique nécessite un certain temps pour se dissoudre. Eluer très doucement, au goutte à goutte. Répéter l'étape d'éluion en redéposant le premier éluat.

Omission de la seconde éluion

- Répéter la procédure d'éluion une fois avec le premier éluat est crucial pour des rendements optimaux. Eluer une troisième fois ne présente pas d'avantage.

Taille des plasmides

- L'efficacité de précipitation est quasiment indépendante de la taille des plasmides, mais l'éluion à partir des NucleoBond® Finalizers est d'autant plus difficile que les vecteurs sont de grande taille. Si vous vous confrontez à de faibles rendements avec des constructions de grande taille comme des cosmides, essayer de chauffer le NucleoBond® Finalizer, les seringues, et le tampon d'éluion à 70 °C.

Problème **Cause possible et suggestions**

Faible concentration d'ADN après utilisation du NucleoBond® Finalizer	<p><i>Faible rendement global</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Voir le chapitre 'Guide de résolution des problèmes "Rendement d'ADN plasmidique faible ou nul" et réduire le volume de tampon d'éluat. Voir le paragraphe 4.13, Tableaux 4 et 5 pour estimer les concentrations d'ADN attendues. <p><i>Tampon d'éluat frais utilisé pour la seconde étape d'éluat</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • La seconde étape d'éluat est cruciale pour optimiser la concentration d'ADN, mais doit s'effectuer avec l'éluat issue de la première étape d'éluat. <p><i>Quantité d'ADN chargée insuffisante</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Etant donné le volume minimal d'éluat de 200 µL (NucleoBond® Finalizer) ou 400 µL (NucleoBond® Finalizer Large) lié au format de la membrane et à la nécessité d'imprégner la totalité de celle-ci, une quantité minimale d'ADN déposée est nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée. Si possible, combiner plusieurs précipités sur le même filtre, le rendement d'éluat et la concentration de l'ADN augmentant significativement avec la quantité d'ADN déposée.
Faible taux de récupération avec l'utilisation du Finalizer	<p><i>Temps de dissolution trop court</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Selon la quantité totale de plasmide précipité, le temps de remise complète en suspension peut prendre un certain temps. Ce temps de remise en suspension pour une récupération optimale peut s'avérer trop court, si le tampon de dissolution est passé trop rapidement sur la membrane du Finalizer. Si une récupération élevée est nécessaire, il est recommandé d'incuber le plasmide précipité avec le tampon de dissolution durant l'étape d'éluat. Par conséquent, éviter de faire passer le tampon d'éluat à travers le Finalizer en une seule fois, et privilégier une incubation du tampon de dissolution de 5 min à température ambiante sur la membrane dès l'apparition de la première goutte avant de terminer l'étape d'éluat. Rechargez l'éluat sur le Finalizer et répétez la procédure au moins une fois. Les recommandations générales doivent être appliquées : faire passer lentement le tampon de dissolution à travers la membrane, augmenter le volume d'éluat pour obtenir une récupération plus élevée et minimiser le volume mort en faisant passer de l'air à travers le Finalizer.

Problème Cause possible et suggestions

L'ADN plasmidique n'est pas performant dans les applications ultérieures	<i>ADN plasmidique contaminé avec de l'ADN chromosomique ou de l'ARN</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Voir les conseils ci-dessus.
	<i>ADN plasmidique contaminé avec de l'éthanol</i>
	<ul style="list-style-type: none"> L'ADN plasmidique n'a pas été séché complètement avant dissolution. Précipiter à nouveau l'ADN avec 1/10^{ième} volume de NaAc 3M, pH 5.0 et 0.7 volumes d'isopropanol. Effectuer la procédure de précipitation indiquée dans ce manuel et sécher le culot d'ADN totalement.
	<i>ADN dégradé</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Veiller à ce que tout l'équipement du laboratoire (pipettes, centrifugeuse, tubes, etc.) soit propre et exempt de nucléases. Ne pas lyser l'échantillon dans le tampon LYS pendant plus de 5 minutes.
	<i>L'ADN est irréversiblement dénaturé</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Un plasmide dénaturé peut être visualiser par une bande migrant sur gel d'agarose légèrement plus vite que la forme surenroulée. Ne pas prolongée la lyse au-delà de 5 minutes avant ajout du tampon NEU.

8.2 Informations de commande

Produit	Référence MN	Conditionnement
NucleoBond® Xtra Midi	740410.10/.50/.100	10/50/100 preps
NucleoBond® Xtra Midi Plus (NucleoBond® Finalizers inclus)	740412.10/.50	10/50 preps
NucleoBond® Xtra Maxi	740414.10/.50/.100	10/50/100 preps
NucleoBond® Xtra Maxi Plus (NucleoBond® Finalizers Large inclus)	740416.10/.50	10/50 preps
NucleoBond® Xtra Combi Rack	740415	1
NucleoBond® Xtra Buffer Set I (Tampon RES, LYS (avec LyseControl), NEU, RNase A ; utilisable uniquement avec les kits NucleoBond® Xtra kits ; pour 12 Xtra Maxi et 18 Xtra Midi))	740417	1
Tampon RES	740363.1000	1000 mL

Produit	Référence MN	Conditionnement
Tampon EQU	740317.1000	1000 mL
Tampon WASH	740375.1000	1000 mL
Tampon ELU	740316.600	600 mL
NucleoBond® Finalizer (pour les kits NucleoBond® Xtra Midi, Midi EF, NucleoBond® PC 100, PC 500, PC 500 EF)	740519.20	20 filtres 2 jeux de seringues
NucleoBond® Finalizer Plus (pour les kits NucleoBond® Xtra Midi, Midi EF, NucleoBond® PC 100, PC 500, PC 500 EF)	740520.20	20 filtres 20 jeux de seringues
NucleoBond® Finalizer Large (pour les kits NucleoBond® Xtra Midi, Midi EF, NucleoBond® PC 100, PC 500, PC 500 EF)	740418.20	20 filtres 'Large' 2 jeux de seringues
NucleoBond® Finalizer Large Plus (pour les kits NucleoBond® Xtra Maxi, Maxi EF, NucleoBond® PC 2000, PC 2000 EF)	740419.20	20 filtres 'Large' 20 jeux de seringues
RNase A (lyophilisée)	740505.50 740505	50 mg 100 mg

Visitez www.mn-net.com pour plus d'informations concernant nos produits.

8.3 Restriction d'utilisation / garantie

Les kits **NucleoBond® Xtra** Midi / Maxi ont été développés, conçus et vendus **UNIQUEMENT À DES FINS DE RECHERCHE**, à l'exception, toutefois, de toute autre fonction du produit qui est expressément décrite dans les notices originales des produits MACHEREY-NAGEL.

Les produits MACHEREY-NAGEL sont destinés à une utilisation **GÉNÉRALE** en **LABORATOIRE UNIQUEMENT** ! Les produits MACHEREY-NAGEL sont **EXCLUSIVEMENT** destinés à un **PERSONNEL QUALIFIÉ** ! Lorsqu'ils manipulent des produits MACHEREY-NAGEL, les utilisateurs doivent toujours porter des **VÊTEMENTS DE PROTECTION** adéquats. Pour des informations détaillées, veuillez-vous référer à la fiche de données de sécurité du produit ! Les produits MACHEREY-NAGEL doivent être utilisés exclusivement dans un **ENVIRONNEMENT DE TEST ADÉQUAT**. MACHEREY-NAGEL décline toute responsabilité pour les dommages dus à une utilisation incorrecte de ses produits dans tous autres domaines d'application. L'application sur le corps humain est **STRICTEMENT INTERDITE**. L'utilisateur est responsable de tous les dommages résultant d'une telle application.

Les produits de purification d'ADN/ARN/PROTÉINES de MACHEREY-NAGEL conviennent UNIQUEMENT aux UTILISATIONS IN VITRO !

SEULS les produits MACHEREY-NAGEL portant la mention « IVD » peuvent également être utilisés pour le diagnostic IN VITRO. Veuillez prêter attention à l'emballage du produit. La mention « IVD » doit figurer expressément sur l'emballage des produits de diagnostic IN VITRO.

S'IL N'Y A PAS LA MENTION « IVD », LE PRODUIT NE PEUT PAS ÊTRE UTILISÉ POUR LE DIAGNOSTIC IN-VITRO !

TOUS LES AUTRES PRODUITS NE PORTANT PAS LA MENTION « IVD » NE SONT PAS ADAPTÉS À UN USAGE CLINIQUE (Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, À UN USAGE DIAGNOSTIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET/OU PRONOSTIQUE).

Aucune revendication ni déclaration n'est prévue concernant son utilisation pour identifier un organisme spécifique ou pour un usage clinique (y compris, mais sans s'y limiter, à des fins diagnostiques, pronostiques, thérapeutiques ou dans les banques du sang). Il incombe plutôt à l'utilisateur ou – dans tous les cas de revente des produits – au revendeur de contrôler et de veiller à ce que les produits de purification d'ADN/ARN/protéines de MACHEREY-NAGEL soient utilisés pour une application bien définie et spécifique.

MACHEREY-NAGEL est responsable uniquement des spécifications et des performances des produits MN conformément aux spécifications de contrôle qualité interne, de la documentation du produit et du matériel de marketing.

Ce produit MACHEREY-NAGEL est livré avec une documentation précisant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La seule obligation de MACHEREY-NAGEL et le seul recours du client se limitent au remplacement gratuit des produits qui n'offriraient pas les performances garanties. Il est également fait référence aux conditions générales de MACHEREY-NAGEL, qui sont imprimées sur la liste tarifaire et dont un exemplaire sera remis sur simple demande.

MACHEREY-NAGEL ne saurait être tenu responsable : des dommages ou défauts se produisant pendant le transport et la manipulation (hors assurance expédition du client), ou par suite d'un accident ou d'une utilisation impropre ou anormale du présent produit ; des défauts des produits ou des composants non fabriqués par MACHEREY-NAGEL ; ni des dommages résultant de tels produits et composants de fabricants autres que MACHEREY-NAGEL ; pour lesquels il n'existe aucune garantie.

MACHEREY-NAGEL n'accorde aucune autre garantie d'aucune sorte, et DÉCLINE ET EXCLUT SPÉCIFIQUEMENT TOUTE AUTRE GARANTIE DE TOUTE SORTE OU NATURE QUE CE SOIT, DIRECTEMENT OU INDIRECTEMENT, EXPRESSE OU IMPLICITE, Y COMPRIS, SANS S'Y LIMITER, RELATIVE AU CARACTÈRE APPROPRIÉ, À LA REPRODUCTIBILITÉ, LA DURABILITÉ, L'ADAPTATION À UN BUT OU UN USAGE PARTICULIER, LA QUALITÉ MARCHANDE, L'ÉTAT OU TOUT AUTRE SUJET EN CE QUI CONCERNE LES PRODUITS MACHEREY-NAGEL.

MACHEREY-NAGEL ne saurait en aucun cas être tenue pour responsable en cas de réclamations pour tout autre dommage, qu'il soit direct, indirect, fortuit, compensatoire, prévisible, consécutif ou particulier (y compris, mais sans s'y limiter, la perte d'utilisation, de revenus ou de profits), que ce soit sur la base d'une garantie, d'un contrat, d'un délit civil (y compris la négligence) ou d'une responsabilité stricte découlant de la vente ou du défaut d'exécution d'un produit MACHEREY-NAGEL conformément aux spécifications énoncées.

La garantie est exclusive et MACHEREY-NAGEL ne donne aucune autre garantie expresse ou implicite.

La garantie fournie dans le présent document et les données, spécifications et descriptions de ce produit MACHEREY-NAGEL figurant dans les catalogues publiés et la documentation sur le produit de MACHEREY-NAGEL sont les seules représentations de MACHEREY-NAGEL concernant le produit et la garantie. Aucune autre déclaration ou représentation, écrite ou orale, par des employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL, à l'exception des déclarations écrites signées par un agent dûment agréé par MACHEREY-NAGEL, n'est autorisée ; le client ne doit pas se fier à de telles déclarations ou représentations, lesquelles ne font pas partie du contrat de vente ou de la présente garantie.

Les allégations relatives au produit sont susceptibles d'être modifiées. Nous vous invitons par conséquent à contacter notre service d'assistance technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur habituel, pour obtenir des informations scientifiques à caractère général. Les applications mentionnées dans la documentation fournie par MACHEREY-NAGEL le sont uniquement à titre informatif. MACHEREY-NAGEL ne garantit pas que toutes les applications ont été testées dans les laboratoires de MACHEREY-NAGEL, avec les produits MACHEREY-NAGEL. MACHEREY-NAGEL ne garantit en aucun cas le caractère correct de ces applications.

Dernière mise à jour : 07/2010, Rév. 03

Veuillez contacter :
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Tél. : +49 (0) 24 21 969 270
e-mail : TECH-BIO@mn-net.com

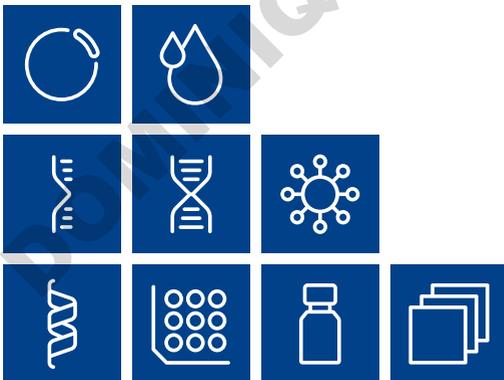
Marques déposées :

DH5 α [®] est une marque déposée par Life Technologies, Inc.

NucleoSpin[®] est une marque déposée par MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG

NucleoBond[®] est une marque déposée par MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG.

BIOPHARMA BIOTECHNIQUE DUTSCHER SAS



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



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

DE	Tel.: +49 24 21 969-0	info@mn-net.com
CH	Tel.: +41 62 388 55 00	sales-ch@mn-net.com
FR	Tel.: +33 388 68 22 68	sales-fr@mn-net.com
US	Tel.: +1 888 321 62 24	sales-us@mn-net.com