

Nexxo-Prep Bacteria DNA mini

Kit d'extraction d'ADN, par centrifugation sur colonne, pour la purification de l'ADN bactérien à partir de tissus (1 à 10 mg), d'échantillons alimentaires (25 g), d'un culot bactérien (jusqu'à 1.10^9 cellules bactériennes), de tissus inclus en paraffine (FFPE), d'échantillons d'urine et d'eau, ou de pointes de papier.

L'ADN obtenu peut être directement utilisé en PCR, PCR temps réel, amplification isotherme (LAMP), analyses RFLP ou être stocké pour une utilisation ultérieure.

Note : ce kit d'extraction fait appel à un carrier ARN poly A (100 à 1000 bases). L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants (quantité poly A > quantité ADN extrait). Directement après la purification, l'ADN se trouve encore sous forme simple brin. La coloration par un agent intercalant ne sera alors que partiellement effective.

I. Composants du kit

	5 preps	50 preps	250 preps
Tampon d'éluéon	2 ml	30 ml	120 ml
Solution de fixation XT	3 x 1 ml (prêt à l'emploi)	9 ml (volume final 30 ml)	36 ml (volume final 120 ml)
Tampon de resuspension RSB	2 x 2 ml	30 ml	150 ml
Solution de lavage A	15 ml (prêt à l'emploi)	30 ml (volume final 60 ml)	80 ml (volume final 160 ml)
Solution de lavage B	15 ml (prêt à l'emploi)	18 ml (volume final 60 ml)	60 ml (volume final 200 ml)
Kit Filtres de centrifugation GS	5	50	5 x 50
Tubes receveurs GS	5	50	5 x 50
Tubes receveurs 1,5 ml	5	50	5 x 50
Tubes d'extraction	5	50	5 x 50
Notice	1	1	1
Réf. Catalogue	2033.5	2033.50	2033.250

Matériels et instruments non fournis

- ddH₂O
- Éthanol >96 %
- Isopropanol >99.7 % (propanol-2 >99.7 %)
- Octane : optionnel (déparaffinage)
- Microtubes (1.5 ml)
- Bloc chauffant ou bain-marie (95 °C)
- Microcentrifugeuse (11000 xg)
- Centrifugeuse pour tubes 15 - 50 ml : optionnel
- Pipettes et pointes de pipette
- Gants à usage unique

Certains composants de ce kit sont livrés sous forme concentrée et sont à diluer avant utilisation (voir chapitre « Préparation des réactifs et tampons », page 2).

II. Conditions de stockage et durée de validité

L'ensemble des composants de ce kit sont à stocker à température ambiante (15-30 °C).

L'éthanol et l'isopropanol sont des composés volatils. Bien refermer les flacons **Solution de lavage A**, **Solution de lavage B** et **Solution de fixation XT**.

Avant utilisation du kit, vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.

Note : les composants du kit ont une durée de validité minimum de 12 mois (sous réserve de respecter les conditions de stockage).

III. Préparation des réactifs et tampons

1. Kit 5 extractions :

*Remarque : la **Solution de fixation XT**, la **Solution de lavage A** et la **Solution de lavage B** sont fournies prêtes à l'emploi dans le kit 5 extractions.*

2. Kit 50 extractions :

- Ajouter 21 ml de propanol-2 >99.7 % à la **Solution de fixation XT**, mélanger vigoureusement par inversion pendant 1 minute, puis stocker bouchon fermement serré. **Mélanger brièvement (quelques inversions) avant utilisation.**
- Ajouter 30 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage A**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.
- Ajouter 42 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage B**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.

3. Kit 250 extractions :

- Ajouter 84 ml de propanol-2 >99.7 % à la **Solution de fixation XT**, mélanger vigoureusement par inversion pendant 1 minute, puis stocker bouchon fermement serré. **Mélanger brièvement (quelques inversions) avant utilisation.**
- Ajouter 80 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage A**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.
- Ajouter 140 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage B**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.

IV. Protocole 1 : extraction de l'ADN bactérien à partir de cotons-tiges/d'écouvillons

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie (37 °C, 65 °C et 95 °C seront nécessaires)
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 65 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml (non fourni).

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

Selon les caractéristiques des bactéries, utilisez l'étape 1 (Gram +) ou 1 bis (Gram -)

	Lyse des bactéries Gram +
1	<ul style="list-style-type: none">• Placer l'écouvillon dans un Tube d'extraction• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB• Mélanger en remuant l'écouvillon• Couper la tige de l'écouvillon et fermer le Tube d'extraction• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 37 °C• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C (allonger le temps d'incubation de 2 min. si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est plus long) <p><i>Remarque : si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est de plus de 7 min. augmenter le temps d'incubation de plus de 2 min.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Ôter délicatement l'écouvillon en le pressant/essorant contre la paroi du Tube d'extraction• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Continuer avec l'étape 2 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

	Lyse des bactéries Gram -
1 bis	<ul style="list-style-type: none">• Placer l'écouvillon dans un Tube d'extraction• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB• Mélanger en remuant l'écouvillon• Couper la tige de l'écouvillon et fermer le Tube d'extraction• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C• Ôter délicatement l'écouvillon en le pressant/essorant contre la paroi du Tube d'extraction• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Continuer avec l'étape 2 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

Étapes 2 à 5 →

2	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Solution de fixation XT • Vortexer brièvement • Transférer le mélange dans un kit Filtre de centrifugation GS (placé dans son tube receveur) • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le tube receveur

3	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Solution de lavage A • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et le <u>tube receveur</u> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un <u>nouveau Tube receveur GS</u>

4	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage B • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

5	Elution de l'ADN bactérien
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 100 – 200 µl de Tampon d'éluion préchauffé à 65 °C • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Stocker l'éluat contenant l'ADN bactérien à +4 °C <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus (max. 200 µl) ou moins (min. 50 µl) de tampon d'éluion.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'éluion de l'ADN successives, avec des quantités de tampons d'éluion identiques (ex. 2 x 100 µl).</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream telles que la PCR, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme (LAMP), les analyses RFLP ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Attention ! : l'extraction de l'ADN se fait en présence d'un **carriér ARN** poly A. L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O

V. Protocole 2 : extraction de l'ADN bactérien à partir d'un culot bactérien

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie (37 °C, 65 °C et 95 °C seront nécessaires)
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 65 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml (non fourni).

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

Selon les caractéristiques des bactéries, utilisez l'étape 1 (Gram +) ou 1 bis (Gram -)

	Lyse des bactéries Gram +
1	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB au culot bactérien• Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en consécutif)• Transférer la suspension dans un Tube d'extraction• Vortexer brièvement• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 37 °C• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C (allonger le temps d'incubation de 2 min. si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est plus long)• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est de plus de 7 min. augmenter le temps d'incubation de plus de 2 min.</i></p> <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Continuer avec l'étape 2 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

	Lyse des bactéries Gram -
1 bis	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB au culot bactérien• Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en consécutif)• Transférer la suspension dans un Tube d'extraction• Vortexer brièvement• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Continuer avec l'étape 2 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

Étapes 2 à 5 →

2	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Solution de fixation XT • Vortexer brièvement • Transférer le mélange dans un kit Filtre de centrifugation GS (placé dans son tube receveur) • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le tube receveur

3	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Solution de lavage A • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et le <u>tube receveur</u> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un <u>nouveau Tube receveur GS</u>

4	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage B • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

5	Elution de l'ADN bactérien
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 100 – 200 µl de Tampon d'éluion préchauffé à 65 °C • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Stocker l'éluat contenant l'ADN bactérien à +4 °C <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus (max. 200 µl) ou moins (min. 50 µl) de tampon d'éluion.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'éluion de l'ADN successives, avec des quantités de tampons d'éluion identiques (ex. 2 x 100 µl).</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream telles que la PCR, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme (LAMP), les analyses RFLP ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Attention ! : l'extraction de l'ADN se fait en présence d'un **carriér ARN** poly A. L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O

VI. Protocole 3 : extraction de l'ADN bactérien à partir d'échantillons alimentaires

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préparer un milieu de culture approprié à la croissance des bactéries considérées
- Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie (37 °C, 65 °C et 95 °C seront nécessaires)
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 65 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml (non fourni)

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

	Préparation de l'échantillon alimentaire
1	<ul style="list-style-type: none">• Prendre 25 g d'échantillon alimentaire• Homogénéiser l'échantillon• Ajouter 225 ml de milieu de culture approprié (ex. : milieu Fraser ...)• Mettre en culture le temps approprié (ex. : 24 heures)• Transférer 1 ml du milieu de culture dans un microtube• Centrifuger 3 min. à 11000 x g• Enlever délicatement la totalité du surnageant, afin que ne reste plus que le culot• Continuer avec l'étape 2, pour les bactéries Gram +, ou avec l'étape 2 bis, pour les bactéries Gram -

Selon les caractéristiques des bactéries, utilisez l'étape 2 (Gram +) ou 2 bis (Gram -)

	Lyse des bactéries Gram +
2	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB au culot bactérien• Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en conséquent)• Transférer la suspension dans un Tube d'extraction• Vortexer brièvement• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 37 °C• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C (allonger le temps d'incubation de 2 min. si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est plus long)• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est de plus de 7 min. augmenter le temps d'incubation de plus de 2 min.</i></p> <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Continuer avec l'étape 3 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

Étapes 2 bis à 6 →

2 bis	Lyse des bactéries Gram -
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB au culot bactérien • Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en conséquent) • Transférer la suspension dans un Tube d'extraction • Vortexer brièvement • Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C • Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Continuer avec l'étape 3 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

3	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Solution de fixation XT • Vortexer brièvement • Transférer le mélange dans un kit Filtre de centrifugation GS (placé dans son tube receveur) • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation GS dans le tube receveur

4	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Solution de lavage A • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

5	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage B • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation GS dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

6	Elution de l'ADN bactérien
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 100 – 200 µl de Tampon d'élution préchauffé à 65 °C • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Stocker l'éluat contenant l'ADN bactérien à +4 °C <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus (max. 200 µl) ou moins (min. 50 µl) de tampon d'élution.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'élution de l'ADN successives, avec des quantités de tampons d'élution identiques (ex. 2 x 100 µl).</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream telles que la PCR, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme (LAMP), les analyses RFLP ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Attention ! : l'extraction de l'ADN se fait en présence d'un **carriér ARN** poly A. L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants.

Remarque : l'élution peut également être réalisée avec ddH₂O

VII. Protocole 4 : extraction de l'ADN bactérien à partir de pointes de papier

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie (37 °C, 65 °C et 95 °C seront nécessaires)
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 65 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml (non fourni).

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

1	Lyse des bactéries
	<ul style="list-style-type: none">• Placer la pointe de papier dans un Tube d'extraction• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB• Vortexer brièvement• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 37 °C• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C (allonger le temps d'incubation de 2 min. si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est plus long)• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est de plus de 7 min. augmenter le temps d'incubation de plus de 2 min.</i></p> <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Centrifuger 1 min. à vitesse maximale• Transférer la totalité du surnageant dans un microtube 1.5 ml (non fourni). <p><i>Remarque : ne pas transférer le culot (la pointe de papier)</i></p>

2	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 400 µl de Solution de fixation XT au tube contenant le surnageant• Vortexer brièvement• Transférer le mélange dans un kit Filtre de centrifugation GS (placé dans son tube receveur)• Incuber 1 min. à température ambiante• Centrifuger 2 min. à 11000 x g• Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le tube receveur

3	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 500 µl de Solution de lavage A• Centrifuger 1 min. à 11000 x g• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u>• Placer le Filtre de centrifugation GS dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

Étapes 4 à 5 →

4	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage B • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

5	Elution de l'ADN bactérien
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 200 µl de Tampon d'éluion préchauffé à 65 °C <p><i>Remarque : augmenter de 200 µl la quantité en Tampon d'éluion, si 3 à 4 pointes de papier ont été utilisées.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Stocker l'éluat contenant l'ADN bactérien à +4 °C <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus ou moins (min. 50 µl) de tampon d'éluion.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'éluion de l'ADN successives, avec des quantités de tampons d'éluion identiques.</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream telles que la PCR, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme (LAMP), les analyses RFLP ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Attention ! : l'extraction de l'ADN se fait en présence d'un **carrièr ARN** poly A. L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O

VIII. Protocole 5 : extraction de l'ADN bactérien à partir de tissus de biopsie (1 à 10 mg)

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie (56 °C et 95 °C seront nécessaires)
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 65 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml (non fourni).

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

	Lyse du tissu
1	<ul style="list-style-type: none">• Transférer 1 à 10 mg de tissu dans un Tube d'extraction• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB• Vortexer brièvement (bouchon fermé)• Incuber, dans un bloc chauffant, sous agitation 30 à 60 min. à 56 °C <p><i>Remarque : prolonger le temps d'incubation si la lyse est incomplète</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Centrifuger 1 min. à vitesse maximale• Transférer la totalité du surnageant dans un microtube 1.5 ml (non fourni). <p><i>Remarque : ne pas transférer le culot</i></p>

	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
2	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 400 µl de Solution de fixation XT au tube contenant le surnageant• Vortexer brièvement• Transférer le mélange dans un kit Filtre de centrifugation GS (placé dans son tube receveur)• Incuber 1 min. à température ambiante• Centrifuger 2 min. à 11000 x g• Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le tube receveur

	Lavage ADN, étape I
3	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 500 µl de Solution de lavage A• Centrifuger 1 min. à 11000 x g• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u>• Placer le Filtre de centrifugation GS dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

Étapes 4 à 5 →

Lavage ADN, étape II	
4	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage B • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

Elution de l'ADN bactérien	
5	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 80 - 120 µl de Tampon d'éluion préchauffé à 65 °C • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Stocker l'éluat contenant l'ADN bactérien à +4 °C <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus ou moins (min. 50 µl) de tampon d'éluion.</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream telles que la PCR, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme (LAMP), les analyses RFLP ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Attention ! : l'extraction de l'ADN se fait en présence d'un **carrier ARN** poly A. L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O

IX. Protocole 6 : extraction de l'ADN bactérien à partir de tissus inclus en paraffine

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie (56 °C et 95 °C seront nécessaires)
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 65 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml (non fourni).
- La première étape nécessite de l'octane et de l'éthanol >96 %.

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

1	Déparaffinage
	<ul style="list-style-type: none">• Transférer l'échantillon dans un microtube 1.5 ml (non fourni)• Ajouter 1 ml d'octane• Vortexer délicatement jusqu'à ce que la paraffine se dissolve et que le tissu prenne une apparence transparente (la paraffine garde une couleur blanche)• Centrifuger 2 min. à vitesse maximale• Enlever délicatement le surnageant <p><i>Remarque : s'il reste des traces de paraffine, centrifuger à nouveau et enlever délicatement le surnageant.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Ajouter 0.5 ml d'éthanol >96 % au culot• Mélanger vigoureusement• Centrifuger brièvement• Retirer l'éthanol à l'aide d'une pipette• Incuber le microtube 1.5 ml ouvert à 56 °C, afin de laisser s'évaporer l'éthanol résiduel
2	Lyse du tissu
	<ul style="list-style-type: none">• Transférer le tissu déparaffiné dans un Tube d'extraction• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB• Vortexer brièvement (bouchon fermé)• Incuber, dans un bloc chauffant, sous agitation 30 à 60 min. à 56 °C <p><i>Remarque : prolonger le temps d'incubation si la lyse est incomplète</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Centrifuger 1 min. à vitesse maximale• Transférer la totalité du surnageant dans un microtube 1.5 ml (non fourni). <p><i>Remarque : ne pas transférer le culot</i></p>

Étapes 3 à 6 →

3	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Solution de fixation XT au tube contenant le surnageant • Vortexer brièvement • Transférer le mélange dans un kit Filtre de centrifugation GS (placé dans son tube receveur) • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation GS dans le tube receveur

4	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Solution de lavage A • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et le <u>tube receveur</u> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

5	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage B • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation GS dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

6	Elution de l'ADN bactérien
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 80 - 120 µl de Tampon d'éluion préchauffé à 65 °C • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Stocker l'éluat contenant l'ADN bactérien à +4 °C <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus ou moins (min. 50 µl) de tampon d'éluion.</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream telles que la PCR, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme (LAMP), les analyses RFLP ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Attention ! : l'extraction de l'ADN se fait en présence d'un **carriér ARN** poly A. L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O

X. Protocole 7 : extraction de l'ADN bactérien à partir d'échantillons d'urine

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie (37 °C, 65 °C et 95 °C seront nécessaires)
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 65 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml (non fourni).

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

	Préparation de l'échantillon d'urine
1	<ul style="list-style-type: none">• Transférer 15 – 50 ml de l'échantillon d'urine dans un tube approprié• Centrifuger 15 min. à 1300 x g• Décanter délicatement le surnageant, sans perturber le culot (sédiment)• Resuspendre le culot dans 3 ml de PBS 1 X• Centrifuge 5 min. à 1300 x g• Décanter <u>délicatement</u>, par inversion, le surnageant, et laisser le tube quelques minutes dans cette position, afin d'éliminer la totalité du surnageant• Continuer avec l'étape 2, pour les bactéries Gram +, ou avec l'étape 2 bis, pour les bactéries Gram -

Selon les caractéristiques des bactéries, utilisez l'étape 2 (Gram +) ou 2 bis (Gram -)

	Lyse des bactéries Gram +
2	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB au culot• Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en consécutif)• Transférer la suspension dans un Tube d'extraction• Vortexer brièvement• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 37 °C• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C (allonger le temps d'incubation de 2 min. si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est plus long)• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est de plus de 7 min. augmenter le temps d'incubation de plus de 2 min.</i></p> <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Continuer avec l'étape 3 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

Étapes 2 bis à 6 →

2 bis	Lyse des bactéries Gram -
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB au culot • Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en conséquent) • Transférer la suspension dans un Tube d'extraction • Vortexer brièvement • Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C • Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Continuer avec l'étape 3 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

3	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Solution de fixation XT • Vortexer brièvement • Transférer le mélange dans un kit Filtre de centrifugation GS (placé dans son tube receveur) • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation GS dans le tube receveur

4	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Solution de lavage A • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

5	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage B • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation GS dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

6	Elution de l'ADN bactérien
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 100 µl de Tampon d'élution préchauffé à 65 °C • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Stocker l'éluat contenant l'ADN bactérien à +4 °C <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus (max. 200 µl) ou moins (min. 50 µl) de tampon d'élution.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'élution de l'ADN successives, avec des quantités de tampons d'élution identiques.</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream telles que la PCR, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme (LAMP), les analyses RFLP ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Attention ! : l'extraction de l'ADN se fait en présence d'un **carriér ARN** poly A. L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants.

Remarque : l'élution peut également être réalisée avec ddH₂O

XI. Protocole 8 : extraction de l'ADN bactérien à partir d'échantillons d'eau (plus d'1 litre)

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie (37 °C, 65 °C et 95 °C seront nécessaires)
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 65 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml (non fourni).

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

1	Préparation de l'échantillon d'eau
	<ul style="list-style-type: none">• Concentré l'échantillon d'eau (ex. 1 litre) selon les méthodes usuelles (filtration, centrifugation ...)• Centrifuger, dans un tube 50 ml, afin d'obtenir un culot• Décanter délicatement le surnageant, sans perturber le culot (sédiment)• Resuspendre le culot dans 10 ml de PBS 1 X• Centrifuge 5 min. à 1300 x g• Décanter <u>délicatement</u>, par inversion, le surnageant, et laisser le tube quelques minutes dans cette position, afin d'éliminer la totalité du surnageant• Continuer avec l'étape 2, pour les bactéries Gram +, ou avec l'étape 2 bis, pour les bactéries Gram -

Selon les caractéristiques des bactéries, utilisez l'étape 2 (Gram +) ou 2 bis (Gram -)

2	Lyse des bactéries Gram +
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB au culot• Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en conséquent)• Transférer la suspension dans un Tube d'extraction• Vortexer brièvement• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 37 °C• Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C (allonger le temps d'incubation de 2 min. si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est plus long)• Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : si le temps de passage de 37 °C à 65 °C est de plus de 7 min. augmenter le temps d'incubation de plus de 2 min.</i></p> <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Continuer avec l'étape 3 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

Étapes 2 bis à 6 →

2 bis	Lyse des bactéries Gram -
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Tampon de resuspension RSB au culot • Remettre le culot en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en conséquent) • Transférer la suspension dans un Tube d'extraction • Vortexer brièvement • Incuber, dans un bloc chauffant, 10 min. à 65 °C • Incuber, dans un bloc chauffant, 5 à 10 min. à 95 °C <p><i>Remarque : réaliser les incubations sous agitation continue augmente l'efficacité de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Continuer avec l'étape 3 « Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS »

3	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 400 µl de Solution de fixation XT • Vortexer brièvement • Transférer le mélange dans un kit Filtre de centrifugation GS (placé dans son tube receveur) • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le tube receveur

4	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Solution de lavage A • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et le tube receveur • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

5	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage B • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation GS dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

6	Elution de l'ADN bactérien
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation GS dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml • Ajouter 100 µl de Tampon d'élution préchauffé à 65 °C • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Stocker l'éluat contenant l'ADN bactérien à +4 °C <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus (max. 200 µl) ou moins (min. 50 µl) de tampon d'élution.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'élution de l'ADN successives, avec des quantités de tampons d'élution identiques.</i></p>

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream telles que la PCR, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme (LAMP), les analyses RFLP ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

Pour un stockage sur un plus long terme, stocker l'ADN à -20 °C.

Attention ! : l'extraction de l'ADN se fait en présence d'un **carriér ARN** poly A. L'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse capillaire ne donneront des résultats concluants.

Remarque : l'élution peut également être réalisée avec ddH₂O