

# Nexxo-Prep Blood Genomic DNA mini

Kit d'extraction d'ADN, par centrifugation sur colonne, pour la purification de jusqu'à 10 µg d'ADN génomique à partir de sang de mammifères (max. 200 µl), de sang autre que mammifère (max. 25 µl), de concentré leucoplaquettaire (max. 30 µl) ou de moelle osseuse (max. 20 µl).

L'ADN obtenu peut être directement utilisé dans les applications down stream (PCR, clonage, etc.) ou être stocké pour une utilisation ultérieure.

*Note : ce kit est compatible avec les échantillons sanguins traités à l'EDTA ou au citrate, mais ne convient pas aux échantillons stabilisés à l'héparine.*

## I. Composants du kit

	5 preps	50 preps	250 preps
<b>Protéinase S</b>	2 ml (prêt à l'emploi)	2 ml (prêt à l'emploi)	3 x 2 ml (prêt à l'emploi)
<b>Tampon d'élution</b>	2 ml	15 ml	60 ml
<b>Solution de fixation BM</b>	2 x 1 ml (prêt à l'emploi)	4 ml (volume final 16 ml)	2 x 8 ml (volume final 2 x 32 ml)
<b>Tampon de lyse GLT</b>	2 ml	15 ml	60 ml
<b>Solution de lavage L1</b>	15 ml (prêt à l'emploi)	30 ml (volume final 60 ml)	80 ml (volume final 160 ml)
<b>Solution de lavage S</b>	15 ml (prêt à l'emploi)	2 x 18 ml (volume final 2 x 60 ml)	3 x 45 ml (volume final 3 x 150 ml)
<b>Kit filtres de centrifugation GS</b>	5	50	5 x 50
<b>Tubes receveurs GS</b>	15	3 x 50	15 x 50
<b>Tubes receveurs 1,5 ml</b>	10	2 x 50	10 x 50
<b>Notice</b>	1	1	1
<b>Réf. Catalogue</b>	2031.5	2031.50	2031.250

### **Matériels et instruments non fournis**

- ddH<sub>2</sub>O
- Éthanol >96 %
- Isopropanol >99.7 % (propanol-2 >99.7 %)
- PBS 1X : optionnel
- Microtubes (1.5 ml ou 2.0 ml)
- Bloc chauffant ou bain-marie (56 °C)
- Microcentrifugeuse (min 11100 x g)
- 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 L1**, **Solution de lavage S** et **Solution de fixation BM**.

Avant utilisation du kit, amener l'ensemble des composants à température ambiante et 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 :

- L'ensemble des solutions sont fournies prêtes à l'emploi.

### 2. Kit 50 extractions :

- Ajouter 12 ml de propanol-2 >99.7 % à la **Solution de fixation BM**, 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 L1**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.
- Ajouter 42 ml d'éthanol >96 % à chaque **Solution de lavage S**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.

### 3. Kit 250 extractions :

- Ajouter 24 ml de propanol-2 >99.7 % à chaque **Solution de fixation BM**, 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 L1**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.
- Ajouter 105 ml d'éthanol >96 % à chaque **Solution de lavage S**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.

## IV. Protocole 1 : extraction de l'ADN à partir de 1 à 200 µl de sang de mammifères (par ex. humain) ou de 1 à 30 µl de concentré leuco-plaquettaire

### 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 que l'ensemble des composants sont à température ambiante.  
*Remarque : en cas de présence ou d'apparition de précipités, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.*
- Préchauffer, pour l'étape de lyse, un bloc chauffant à 56 °C.
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 56 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml.  
*Remarque : le tube receveur de 2 ml n'est pas inclus dans le kit.*
- Mélanger la **Solution de fixation BM** avant utilisation (quelques inversions).

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

1	Lyse cellulaire
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Transférer 1 à 200 µl de sang total (ou 1 à 30 µl de concentré leuco plaquettaire) dans un microtube 1.5 ml</li></ul> <p><i>Remarque : pour les volumes inférieurs à 200 µl, compléter à 200 µl avec une solution de tampon PBS 1X ou ddH<sub>2</sub>O</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ajouter 200 µl de <b>Tampon de lyse GLT</b></li><li>• Vortexer 15 sec.</li><li>• Incuber 3 min. sous agitation à 56 °C</li><li>• Ajouter 20 µl de <b>Protéinase S</b></li><li>• Vortexer brièvement</li><li>• Incuber 5 min. sous agitation à 56 °C</li></ul>

2	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ajouter 200 µl de <b>Solution de fixation BM</b> (Mélanger brièvement, quelques inversions, avant utilisation)</li><li>• Bien vortexer pendant 15 sec.</li><li>• Transférer le mélange dans le filtre d'un kit <b>Filtre de centrifugation GS</b> (filtre placé dans son tube receveur)</li><li>• Incuber 1 min. à température ambiante</li><li>• Centrifuger 2 min. à 11000 x g</li><li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li><li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau Tube receveur GS</u></li></ul>

Étapes 3 à 6 →

<b>3</b>	<b>Lavage ADN, étape I</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 500 µl de <b>Solution de lavage L1</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau</u> <b>Tube receveur GS</b></li> </ul>

<b>4</b>	<b>Lavage ADN, étape II</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 700 µl de <b>Solution de lavage S</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau</u> <b>Tube receveur GS</b></li> </ul>

<b>5</b>	<b>Lavage ADN, étape III</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 700 µl de <b>Solution de lavage S</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat et replacer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans le <b>Tube receveur GS</b></li> <li>• Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel</li> </ul>

<b>6</b>	<b>Élution de l'ADN</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un nouveau <b>Tube receveur 1.5 ml</b></li> <li>• Ajouter 200 µl de <b>Tampon d'élution</b> préchauffé à 56 °C</li> <li>• Incuber 1 min. à température ambiante</li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le <b>Filtre de centrifugation GS</b> et stocker l'ADN prêt à être utilisé à + 4 °C</li> </ul> <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus (max. 200 µl) ou moins (min. 30 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 courantes, telles que la PCR, les analyses SNP, HLA, les digestions de restriction, le clonage, etc. ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

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

*Remarque : le **Tampon d'élution** ne contient pas d'EDTA.*

## V. Protocole 2 : extraction de l'ADN à partir de 1 à 25 µl d'échantillons sanguins autres que mammifères

### 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 que l'ensemble des composants sont à température ambiante.  
*Remarque : en cas de présence ou d'apparition de précipités, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.*
- Préchauffer, pour l'étape de lyse, un bloc chauffant à 56 °C.
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 56 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml.  
*Remarque : le tube receveur de 2 ml n'est pas inclus dans le kit.*
- Préparer une solution tampon PBS 1X.
- Mélanger la **Solution de fixation BM** avant utilisation (quelques inversions).

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

	Lyse cellulaire
1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Transférer 1 à 25 µl de sang total dans un microtube 1.5 ml</li><li>• <u>Compléter à 200 µl</u> avec une solution de tampon PBS 1X</li><li>• Ajouter 200 µl de <b>Tampon de lyse GLT</b></li><li>• Vortexer 15 sec.</li><li>• Incuber 3 min. sous agitation à 56 °C</li><li>• Ajouter 20 µl de <b>Protéinase S</b></li><li>• Vortexer brièvement</li><li>• Incuber 5 min. sous agitation à 56 °C</li></ul>

	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS
2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ajouter 200 µl de <b>Solution de fixation BM</b> (Mélanger brièvement, quelques inversions, avant utilisation)</li><li>• Bien vortexer pendant 15 sec.</li><li>• Transférer le mélange dans le filtre d'un kit <b>Filtre de centrifugation GS</b> (filtre placé dans son tube receveur)</li><li>• Incuber 1 min. à température ambiante</li><li>• Centrifuger 2 min. à 11000 x g</li><li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li><li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau</u> <b>Tube receveur GS</b></li></ul>

Étapes 3 à 6 →

<b>3</b>	<b>Lavage ADN, étape I</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 500 µl de <b>Solution de lavage L1</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau</u> <b>Tube receveur GS</b></li> </ul>

<b>4</b>	<b>Lavage ADN, étape II</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 700 µl de <b>Solution de lavage S</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau</u> <b>Tube receveur GS</b></li> </ul>

<b>5</b>	<b>Lavage ADN, étape III</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 700 µl de <b>Solution de lavage S</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat et replacer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans le <b>Tube receveur GS</b></li> <li>• Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel</li> </ul>

<b>6</b>	<b>Élution de l'ADN</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un nouveau <b>Tube receveur 1.5 ml</b></li> <li>• Ajouter 200 µl de <b>Tampon d'élution</b> préchauffé à 56 °C</li> <li>• Incuber 1 min. à température ambiante</li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le <b>Filtre de centrifugation GS</b> et stocker l'ADN prêt à être utilisé à + 4 °C</li> </ul> <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus (max. 200 µl) ou moins (min. 30 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 courantes, telles que la PCR, les analyses SNP, les digestions de restriction, le clonage, etc. ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

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

*Remarque : le **Tampon d'élution** ne contient pas d'EDTA.*

## VI. Protocole 3 : extraction de l'ADN à partir d'échantillons de moelle osseuse

### 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 que l'ensemble des composants sont à température ambiante.  
*Remarque : en cas de présence ou d'apparition de précipités, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.*
- Préchauffer, pour l'étape de lyse, un bloc chauffant à 56 °C.
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 56 °C. Réchauffer en temps utile la quantité requise dans un tube receveur de 2 ml.  
*Remarque : le tube receveur de 2 ml n'est pas inclus dans le kit.*
- Préparer une solution tampon PBS 1X.
- Mélanger la **Solution de fixation BM** avant utilisation (quelques inversions).

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

Selon les caractéristiques de l'échantillon, commencez par l'étape 1 ou 1 bis.

1	Préparation de la moelle osseuse sèche
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humidifier la matière sèche avec une goutte de PBS</li> <li>• Mettre 180 µl de PBS dans un tube receveur 1.5 ml (non fourni)</li> <li>• Gratter la matière sèche humidifiée, dans le tube receveur</li> </ul> <p><i>Remarque : utilisez le bord d'une lame propre, pour gratter la matière sèche</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mettre la matière en suspension à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer en conséquent)</li> <li>• Passer directement à l'étape 2 « <b>Lyse cellulaire</b> »</li> </ul>

1 bis	Préparation de la moelle osseuse fraîche
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mettre 1 à 20 µl de moelle osseuse dans un tube receveur 1.5 ml (non fourni)</li> <li>• Passer directement à l'étape 2 « <b>Lyse cellulaire</b> »</li> </ul>

2	Lyse cellulaire
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compléter à 200 µl avec une solution de tampon PBS 1X</li> <li>• Ajouter 200 µl de <b>Tampon de lyse GLT</b></li> <li>• Vortexer 15 sec.</li> <li>• Incuber 3 min. sous agitation à 56 °C</li> <li>• Ajouter 20 µl de <b>Protéinase S</b></li> <li>• Vortexer brièvement (10 sec.)</li> <li>• Incuber 5 min. sous agitation à 56 °C</li> </ul>

Étapes 3 à 7 →

<b>3</b>	<b>Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation GS</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 200 µl de <b>Solution de fixation BM</b> (Mélanger brièvement, quelques inversions, avant utilisation)</li> <li>• Bien vortexer pendant 15 sec.</li> <li>• Transférer le mélange dans le filtre d'un kit <b>Filtre de centrifugation GS</b> (filtre placé dans son tube receveur)</li> <li>• Incuber 1 min. à température ambiante</li> <li>• Centrifuger 2 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau</u> <b>Tube receveur GS</b></li> </ul>

<b>4</b>	<b>Lavage ADN, étape I</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 500 µl de <b>Solution de lavage L1</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau</u> <b>Tube receveur GS</b></li> </ul>

<b>5</b>	<b>Lavage ADN, étape II</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 700 µl de <b>Solution de lavage S</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u></li> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un <u>nouveau</u> <b>Tube receveur GS</b></li> </ul>

<b>6</b>	<b>Lavage ADN, étape III</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 700 µl de <b>Solution de lavage S</b></li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le filtrat et remplacer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans le <b>Tube receveur GS</b></li> <li>• Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel</li> </ul>

<b>7</b>	<b>Élution de l'ADN</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation GS</b> dans un nouveau <b>Tube receveur 1.5 ml</b></li> <li>• Ajouter 200 µl de <b>Tampon d'élution</b> préchauffé à 56 °C</li> <li>• Incuber 1 min. à température ambiante</li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• Jeter le <b>Filtre de centrifugation GS</b> et stocker l'ADN prêt à être utilisé à + 4 °C</li> </ul> <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN peut être élué avec plus (max. 200 µl) ou moins (min. 30 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 courantes, telles que la PCR, les analyses SNP, HLA, les digestions de restriction, le clonage, etc. ou peut être stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines.

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

*Remarque : le **Tampon d'élution** ne contient pas d'EDTA.*