

# Nexxo-Prep Tissue DNA mini

Kit d'extraction d'ADN, par centrifugation sur colonne, pour la purification de jusqu'à 50 µg d'ADN total à partir d'échantillons de tissus (max. 40 mg), de queues de rongeurs (max. 1.2 cm), d'insectes, d'échantillons alimentaires d'origine animale, de cellules eucaryotes (max.  $1.10^6$  cellules) ou de cotons-tiges.

L'ADN obtenu peut être directement utilisé dans les applications down stream (PCR, séquençage, digestions de restriction, Southern blots...) ou être stocké pour une utilisation ultérieure.

## I. Composants du kit

	5 preps	50 preps	250 preps
<b>Tampon d'élution</b>	2 ml	30 ml	120 ml
<b>Protéinase S</b>	2 ml	2 x 2 ml	6 x 2 ml
<b>Tampon de lyse RS</b>	2 x 2 ml	30 ml	120 ml
<b>Solution de fixation LSN</b>	2 x 1 ml (prêt à l'emploi)	4 ml (volume final 15 ml)	2 x 9 ml (volume final 2 x 30 ml)
<b>Solution de lavage S</b>	15 ml (prêt à l'emploi)	18 ml (volume final 60 ml)	2 x 45 ml (volume final 2 x 150 ml)
<b>Filtres de centrifugation</b>	5	50	5 x 50
<b>Tubes receveurs 1,5 ml</b>	5	50	5 x 50
<b>Tubes receveurs 2,0 ml</b>	5	50	5 x 50
<b>Notice</b>	1	1	1
<b>Réf. Catalogue</b>	2030.5	2030.50	2030.250

### Matériels et instruments non fournis

- ddH<sub>2</sub>O
- Éthanol >96 %
- Isopropanol >99.7 % (propanol-2 >99.7 %)
- RNase A (10 mg/ ml) : optionnel
- Microtubes (1.5 ml ou 2.0 ml)
- Bloc chauffant ou bain-marie (52 °C)
- Microcentrifugeuse (13500 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 S** et **Solution de fixation LSN**.

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

### 3. Kit 250 extractions :

- Ajouter 21 ml de propanol-2 >99.7 % à chaque **Solution de fixation LSN**, mélanger vigoureusement par inversion pendant 1 minute, puis stocker bouchon fermement serré. **Mélanger brièvement (quelques inversions) avant utilisation.**
- 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 0.5 – 40 mg de tissus, de queues de rongeur (max. 1.2 cm), de biopsies, d'insectes ou d'échantillons alimentaires d'origine animale

### 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.*
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 52 °C. Réchauffer en temps utile la quantité en **Tampon d'éluion** requise (50-200 µl).
  - Mélanger la **Solution de fixation LSN** avant utilisation (quelques inversions).
  - Pour les échantillons de tissus issus du foie, il est recommandé de ne pas utiliser plus de 20 mg d'échantillon.

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

<b>1</b>	<b>Préparation de la matière première</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placer l'échantillon dans un microtube 1.5 ml (non fourni)</li> </ul> <hr/> <p>Un broyage mécanique préliminaire (pilon, ciseau...) augmente le rendement de l'extraction.</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 400 µl de <b>Tampon de lyse RS</b> et 40 µl de <b>Protéinase S</b></li> <li>• Vortexer exhaustivement</li> <li>• Incuber à 52 °C, sous agitation, jusqu'à la lyse complète. Vortexer plusieurs fois si nécessaire</li> </ul> <p><i>Optionnel : une incubation durant la nuit, des matières premières particulièrement récalcitrantes (ex. queues de rongeurs) est possible.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifuger 2 min. à 11000 x g</li> <li>• Transférer le surnageant dans un nouveau microtube 1.5 ml (non fourni)</li> </ul> <p><i>Optionnel : pour éliminer les ARN de l'échantillon. Ajouter 40 µl de RNase A (10 mg/ml), vortexer brièvement puis incuber 5 min. à température ambiante.</i></p>

<b>2</b>	<b>Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 200 µl de <b>Solution de fixation LSN</b></li> <li>• Vortexer 10 sec.</li> <li>• Placer un <b>Filtre de centrifugation</b> dans un <b>Microtube 2.0 ml</b></li> <li>• Transférer la suspension dans le Filtre de centrifugation</li> <li>• Incuber 1 min.</li> <li>• Centrifuger 3 min. à 13500 x g</li> <li>• Jeter le filtrat et replacer le <b>Filtre de centrifugation</b> dans le <b>Tube receveur 2.0 ml</b></li> </ul>

Étapes 3 à 4 →

<b>3</b>	<b>Lavage de l'ADN</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter 550 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</b> dans le <b>Tube receveur 2.0 ml</b></li> <li>• Réitérer 1 X cette étape de lavage-centrifugation</li> <li>• Jeter le filtrat et remplacer le <b>Filtre de centrifugation</b> dans le <b>Tube receveur 2.0 ml</b></li> <li>• Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel du <b>Filtre de centrifugation</b></li> </ul>

<b>4</b>	<b>Élution de l'ADN</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placer le <b>Filtre de centrifugation</b> dans un <b>Tube receveur 1.5 ml</b></li> <li>• Ajouter 200 µl de <b>Tampon d'élution</b> préchauffé à 52 °C</li> <li>• Incuber 3 min. à température ambiante</li> <li>• Centrifuger 1 min. à 11000 x g</li> <li>• L'éluat contient l'ADN prêt à être utilisé</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. 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 courantes, telles que la PCR, le séquençage, les digestions de restriction, les Southern blots, 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. Pour garantir une meilleure stabilité de l'ADN lors d'un stockage long terme, il est*

*préférable de stocker l'ADN dans un tampon Tris-EDTA.*

*Afin d'augmenter le rendement d'une précipitation à l'éthanol, il est recommandé de privilégier un séchage à l'air libre à un appareillage sous vide.*

*L'ADN stocké à -20 °C est soumis à des forces de cisaillement dommageables. Éviter les cycles répétés de congélation décongélation.*

*Remarque : l'élution peut également être réalisée avec ddH<sub>2</sub>O.*

## V. Protocole 2 : extraction de l'ADN à partir de cellules eucaryotes ( $10^5 - 10^6$ )

### 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.*
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 52 °C. Réchauffer en temps utile la quantité en **Tampon d'éluion** requise (50-200 µl).
- Mélanger la **Solution de fixation LSN** avant utilisation (quelques inversions).

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

	Récolte des cellules
1	<p>a) <u>A partir d'une suspension cellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Centrifuger 5 min à 300 x g, la culture cellulaire contenant jusqu'à <math>1.10^6</math> cellules</li><li>• Éliminer délicatement (sans perturber le culot) le surnageant et la totalité du milieu de culture</li><li>• Laver le culot (par ex. au PBS)</li></ul> <p>b) <u>A partir d'une monocouche cellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Détacher les cellules par trypsinisation</li><li>• Transférer les cellules dans un tube à centrifuger 50 ml</li><li>• Centrifuger 5 min à 300 x g</li><li>• Éliminer délicatement (sans perturber le culot) le surnageant et la totalité du milieu de culture</li><li>• Laver le culot (par ex. au PBS)</li></ul>

	Lyse cellulaire
2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ajouter 400 µl de <b>Tampon de lyse RS</b> et 40 µl de <b>Protéinase S</b>, au culot cellulaire préalablement lavé</li><li>• Vortexer exhaustivement</li><li>• Transférer le mélange dans un tube 1.5 ml (non fourni)</li><li>• Incuber à 52 °C, sous agitation, jusqu'à la lyse complète. Vortexer plusieurs fois si nécessaire</li><li>• Centrifuger 2 min. à 11000 x g</li><li>• Transférer le surnageant dans un nouveau microtube 1.5 ml (non fourni)</li></ul> <p><i>Optionnel : pour éliminer les ARN de l'échantillon. Ajouter 40 µl de RNase A (10 mg/ml), vortexer brièvement puis incuber 5 min. à température ambiante.</i></p>

**Continuer avec l'étape 2 (« Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation ») du protocole 1, page 3.**

## VI. Protocole 2 bis : extraction de l'ADN à partir de cellules eucaryotes ( $10^5 - 10^6$ ) apoptotiques

### 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.*
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 52 °C. Réchauffer en temps utile la quantité en **Tampon d'éluion** requise (50-200 µl).
- Mélanger la **Solution de fixation LSN** avant utilisation (quelques inversions).

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

	Récolte des cellules
1	<p>a) <u>A partir d'une suspension cellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Centrifuger 5 min à 300 x g, la culture cellulaire contenant jusqu'à <math>1.10^6</math> cellules</li><li>• Éliminer délicatement (sans perturber le culot) le surnageant et la totalité du milieu de culture</li><li>• Laver le culot (par ex. au PBS)</li></ul> <p>b) <u>A partir d'une monocouche cellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Détacher les cellules par trypsinisation</li><li>• Transférer les cellules dans un tube à centrifuger 50 ml</li><li>• Centrifuger 5 min à 300 x g</li><li>• Éliminer délicatement (sans perturber le culot) le surnageant et la totalité du milieu de culture</li><li>• Laver le culot (par ex. au PBS)</li></ul>

	Lyse cellulaire
2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ajouter 400 µl de <b>Tampon de lyse RS</b> et 40 µl de <b>Protéinase S</b>, au culot cellulaire préalablement lavé</li><li>• Vortexer exhaustivement</li><li>• Transférer le mélange dans un tube 1.5 ml (non fourni)</li><li>• Incuber 15 min. à 52 °C, sous agitation, jusqu'à la lyse complète. Vortexer plusieurs fois si nécessaire</li><li>• Centrifuger 2 min. à 11000 x g</li><li>• Transférer le surnageant dans un nouveau microtube 1.5 ml (non fourni)</li></ul> <p><i>Optionnel : pour éliminer les ARN de l'échantillon. Ajouter 40 µl de RNase A (10 mg/ml), vortexer brièvement puis incuber 5 min. à température ambiante.</i></p>

**Continuer avec l'étape 2 (« Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation ») du protocole 1, page 3.**

## VII. Protocole 3 : extraction de l'ADN à partir de cotons-tiges/d'écouvillons

*Remarque : ce protocole nécessite une plus grande quantité en **Tampon de lyse RS** et **Solution de fixation LSN**. L'utilisation de ce protocole réduit le nombre d'extractions de ce kit.*

### 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.*
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 52 °C. Réchauffer en temps utile la quantité en **Tampon d'éluion** requise (50-200 µl).
- La première étape nécessite de chauffer l'échantillon à 65 °C. Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie.
- Mélanger la **Solution de fixation LSN** avant utilisation (quelques inversions).

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

1	Préparation de l'échantillon
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Transférer 600 µl de <b>Tampon de lyse RS</b> et 40 µl de <b>Protéinase S</b> dans un microtube 1.5 ml</li><li>• Placer le coton-tige/l'écouvillon dans le microtube 1.5 ml</li></ul> <p><i>Remarque : si le coton-tige a été placé dans un milieu de transport. Centrifuger au préalable 1 min. à vitesse maximale. Jeter le surnageant, tout en conservant le coton-tige. Remettre le culot en suspension en ajoutant le <b>Tampon de lyse RS</b> et la <b>Protéinase S</b> au tube contenant le coton-tige.</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Incuber 15 min. à 65 °C, sous agitation</li><li>• Essorer délicatement le coton-tige contre la paroi du microtube, puis jeter le coton-tige</li></ul>

2	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ajouter 300 µl de <b>Solution de fixation LSN</b></li><li>• Mélanger exhaustivement</li><li>• Placer un <b>Filtre de centrifugation</b> dans un <b>Microtube 2.0 ml</b></li><li>• Transférer le mélange (<b>Solution de fixation LSN</b> + résultat de l'étape 1) dans le <b>Filtre de centrifugation</b></li><li>• Incuber 1 min. à température ambiante</li><li>• Centrifuger 3 min. à 13500 x g</li><li>• Jeter le filtrat et remplacer le <b>Filtre de centrifugation</b> dans le <b>Tube receveur 2.0 ml</b></li></ul>

**Continuer avec l'étape 3 (« Lavage de l'ADN ») du protocole 1, page 4.**

## VIII. Protocole 3 bis : extraction de l'ADN par rinçage, à partir de cotons-tiges/d'écouvillons

*Remarque : ce protocole nécessite une plus grande quantité en **Tampon de lyse RS** et **Solution de fixation LSN**. L'utilisation de ce protocole réduit le nombre d'extractions de ce kit.*

### 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.*
- Mélanger la **Solution de fixation LSN** avant utilisation (quelques inversions).
- La dernière étape nécessite un **Tampon d'éluion** chauffer à une température de 52 °C. Réchauffer en temps utile la quantité en **Tampon d'éluion** requise (50-200 µl).
- La première étape nécessite de chauffer l'échantillon à 65 °C. Préchauffer un bloc chauffant ou bain-marie.
- La première étape nécessite un **Tampon de lyse RS** refroidi à 4 °C.

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

1	Préparation de l'échantillon
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Rincer l'écouvillon dans un tube (non fourni), avec 600 µl de <b>Tampon de lyse RS</b> refroidi à 4 °C</li><li>• Essorer délicatement puis retirer l'écouvillon</li><li>• Transférer la solution résultante dans un Microtube 1.5 ml (fourni)</li><li>• Ajouter 40 µl de <b>Protéinase S</b></li><li>• Incuber 15 min. à 65 °C, sous agitation</li></ul>

2	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ajouter 300 µl de <b>Solution de fixation LSN</b></li><li>• Mélanger exhaustivement</li><li>• Placer un <b>Filtre de centrifugation</b> dans un <b>Microtube 2.0 ml</b></li><li>• Transférer le mélange (<b>Solution de fixation LSN</b> + résultat de l'étape 1) dans le <b>Filtre de centrifugation</b></li><li>• Incuber 1 min. à température ambiante</li><li>• Centrifuger 2 min. à 11000 x g</li><li>• Jeter le filtrat et replacer le <b>Filtre de centrifugation</b> dans le <b>Tube receveur 2.0 ml</b></li></ul>

Continuer avec l'étape 3 (« Lavage de l'ADN ») du protocole 1, page 4.