

Nexxo-Prep Plant DNA mini

Kit d'extraction d'ADN, par centrifugation sur colonne, pour la purification de jusqu'à 50 µg d'ADN total à partir de végétaux (tige, feuilles, fruits, racines ...) ou de denrées alimentaires d'origine végétale (max. 100 mg).

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

I. Composants du kit

	5 preps	50 preps	250 preps
Protéinase S	2 ml	2 ml	3 x 2 ml
Solution de fixation LSN	2 x 1 ml (prêt à l'emploi)	4 ml (volume final 15 ml)	2 x 9 ml (volume final 2 x 30 ml)
Tampon de lyse CF	2 x 2 ml	30 ml	120 ml
Tampon d'éluion	2 ml	15 ml	60 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)	2 x 45 ml (volume final 2 x 150 ml)
Préfiltres	5	50	5 x 50
Filtres de centrifugation	5	50	5 x 50
Tubes receveurs 1,5 ml	5	50	5 x 50
Tubes receveurs 2,0 ml	10	2 x 50	10 x 50
Notice	1	1	1
Réf. Catalogue	2032.5	2032.50	2032.250

Matériels et instruments non fournis

- ddH₂O
- Éthanol >96 %
- Isopropanol >99.7 % (propanol-2 >99.7 %)
- RNase A (10 mg/ ml) : optionnel
- Microtubes (1.5 ml)
- Bloc chauffant ou bain-marie (65 °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 A**, **Solution de lavage B** 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 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 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 80 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage A**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.
- Ajouter 105 ml d'éthanol >96 % à chaque **Solution de lavage B**, mélanger vigoureusement, puis stocker bouchon fermement serré.

IV. Protocole : extraction de l'ADN à partir de végétaux ou de denrées alimentaires d'origines végétales

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 65 °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 LSN** avant utilisation (quelques inversions).

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

1	Préparation de la matière première
	<ul style="list-style-type: none">• Broyage à l'aide d'un pilon et d'azote liquide de 60 mg de matière première sèche. D'autres équipements de broyage peuvent être utilisés <p><i>Remarque : pour les matériaux végétaux à teneur élevée en eau (ex : fruits), utiliser 120 à 180 mg de matière première.</i></p>

2	Lyse
	<ul style="list-style-type: none">• Transférer la poudre végétale résultante dans un microtube de 1.5 ml• Ajouter 400 µl de Tampon de lyse CF et 20 µl de Protéinase S• Vortexer brièvement• Incuber 30 min. à 65 °C (l'utilisation d'un bloc chauffant avec mode d'agitation continue est recommandée)

3	Filtration de la solution de lyse
	<ul style="list-style-type: none">• Placer un Préfiltre dans un Tube receveur 2.0 ml• Transférer la solution de lyse résultante de l'étape 2 dans le Préfiltre• Centrifuger 1 min. à 11100 x g• Jeter le Préfiltre <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>

Étapes 4 à 7 →

4	Fixation de l'ADN au Filtre de centrifugation
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 200 µl de Solution de fixation LSN à la solution de lyse obtenue à l'étape précédente • Vortexer exhaustivement • Placer un Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 2.0 ml • Transférer le mélange Solution de fixation LSN + solution de lyse dans le Filtre de centrifugation • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11100 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml

5	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 550 µl de Solution de lavage A au Filtre de centrifugation • Centrifuger 1 min. à 11100 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml

6	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 550 µl de Solution de lavage B au Filtre de centrifugation • Centrifuger 1 min. à 11100 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Réitérer 1 X cette étape de lavage-centrifugation • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Centrifuger 4 min à 11100 x g, afin d'éliminer l'éthanol résiduel du Filtre de centrifugation

7	Élution de l'ADN
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml, afin de récupérer l'ADN • Ajouter 100 µl de Tampon d'élution préchauffé à 65 °C • Incuber 3 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min à 11100 x g afin d'éluer l'ADN • Jeter le Filtre de centrifugation et stocker l'ADN prêt à être utilisé 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 courantes, telles que la PCR, le séquençage, les analyses RFLP, les digestions de restriction, le clonage, 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.