

Nexxo-Prep Plasmide mini

Kit d'extraction d'ADN, par centrifugation sur colonne, pour la purification, en moins de 15 minutes, de jusqu'à 20 µg d'ADN plasmidique à partir de 0.5 à 2 ml de culture bactérienne.

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

I. Composants du kit

	10 preps	250 preps
Tampon d'élution P	2 ml	30 ml
Solution de lavage SLB	10 ml (prêt à l'emploi)	40 ml (volume final 200 ml)
Tampon de resuspension	2 x 2 ml	70 ml
Tampon de lyse L	2 x 2 ml	70 ml
Tampon de neutralisation N	2 x 2 ml	70 ml
Filtres de centrifugation	10	5 x 50
Tubes receveurs 1,5 ml	10	5 x 50
Tubes receveurs 2,0 ml	10	5 x 50
Notice	1	1
Réf. Catalogue	2036.10	2036.250

Matériels et instruments non fournis

- Éthanol >96 %
- Microtubes (1.5 ml / 2.0 ml)
- Microcentrifugeuse (12000 - 16000 x g)
- Pipettes et pointes de pipette
- Gants à usage unique
- Lysozyme (uniquement pour le protocole 3)

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 est un composé volatil. Bien refermer le flacon **Solution de lavage SLB**.

Avant utilisation du kit, vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 37 °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 10 extractions :

*Remarque : dans le kit 10 extractions, la **Solution de lavage SLB** est fournie prête à l'emploi.*

2. Kit 250 extractions :

Ajouter 160 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage SLB**, puis stocker bouchon fermement serré.

IV. Protocole 1 : extraction de plasmides à partir de 0.5 à 2.0 ml de culture bactérienne (ex. : *E. coli*)

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 (< 37 °C) jusqu'à disparition du précipité.

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

1	Préparation de la culture bactérienne
	<ul style="list-style-type: none">• Inoculer 1- 5 ml de milieu LB (supplémenté en antibiotique sélectif adéquat), avec une colonie unique• Incuber 12-16 heures à 37 °C sous agitation vigoureuse <p><i>Remarque : ne pas dépasser 16 heures d'incubation.</i></p>

2	Récolte des cellules bactériennes
	<ul style="list-style-type: none">• Transférer 0.5 à 2 ml de culture bactérienne dans un microtube de 1.5 ou 2.0 ml• Centrifuger 1 min. à vitesse maximale (12000 - 16000 x g)• Éliminer la totalité du surnageant, afin que ne reste plus que le culot bactérien

3	Resuspension des cellules bactériennes
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 250 µl de Tampon de resuspension• Vortexer jusqu'à remise en suspension complète du culot bactérien (aucun amas cellulaire ne doit être visible)

4	Lyse cellulaire et neutralisation
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 250 µl de Tampon de lyse L• Fermer le tube et mélanger <u>délicatement</u> par inversion (5 inversions, ne pas vortexer) <p>Attention : l'étape de lyse (↑) ne doit pas durer plus de 5 minutes.</p> <ul style="list-style-type: none">• Ajouter 250 µl de Tampon de neutralisation N• Mélanger par inversion (mélanger <u>doucement</u> mais efficacement, 4 à 6 inversions)• Centrifuger 5 min. à vitesse maximale (12000 - 16000 x g)

Étapes 5 à 7 →

5	Fixation de l'ADN plasmidique au filtre de centrifugation
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer un Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 2.0 ml • Transférer le surnageant clarifié, obtenu à l'étape précédente, dans le filtre de centrifugation • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml

6	Lavage de l'ADN plasmidique
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 750 µl de Solution de lavage SLB au Filtre de centrifugation • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Centrifuger 3 min. à vitesse maximale (12000 - 16000 x g), afin d'éliminer l'éthanol résiduel du Filtre de centrifugation

7	Élution de l'ADN plasmidique
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml, afin de récupérer l'ADN plasmidique • Ajouter 50 à 100 µl de Tampon d'éluion P au centre du Filtre de centrifugation • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g, afin d'éluier l'ADN plasmidique • L'éluat contient l'ADN plasmidique prêt à être utilisé <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN plasmidique peut être élué avec plus ou moins de tampon d'éluion.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'éluion de l'ADN plasmidique successives, avec respectivement 100 µl de tampon d'éluion identique.</i></p>

L'ADN plasmidique ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que la PCR, le séquençage, les digestions enzymatiques, le clonage, etc. ou peut être stocké entre 2 °C et 8 °C.

Le stockage entre -15 °C et -25 °C peut s'avérer dommageable (application de forces de cisaillement) pour un ADN de petite taille tel que l'ADN plasmidique. Les cycles de congélation et décongélation augmentent les risques de détérioration de l'ADN plasmidique.

*Remarque : le **Tampon d'éluion** contient de l'EDTA. L'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O. En l'absence de solution tampon, l'ADN peut se dégrader. Un Stockage à -20 °C de l'ADN, élué avec ddH₂O, est recommandé dans ces conditions.*

V. Protocole 2 : extraction de plasmides à faible nombre de copies et de cosmides, à partir de jusqu'à 10 ml de culture bactérienne

Remarque : ce protocole nécessite une plus grande quantité en tampons. 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 l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 37 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- La dernière étape nécessite, pour les plasmides ou cosmides de plus de 10 kb, un **Tampon d'éluion P** (ou ddH₂O, selon le cas) préchauffer à 70 °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.

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

1	Préparation de la culture bactérienne
	<ul style="list-style-type: none">• Inoculer 1- 10 ml de milieu LB (supplémenté en antibiotique sélectif adéquat), avec une colonie unique• Incuber 12-16 heures à 37 °C sous agitation vigoureuse <p><i>Remarque : ne pas dépasser 16 heures d'incubation.</i></p>

3	Resuspension des cellules bactériennes
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 500 µl de Tampon de resuspension• Vortexer jusqu'à remise en suspension complète du culot bactérien (aucun amas cellulaire ne doit être visible)• Transférer la totalité de la solution dans un microtube 2.0 ml (non fourni)

2	Récolte de la culture bactérienne
	<ul style="list-style-type: none">• Transférer 1 à 10 ml de culture bactérienne dans un tube Falcon 15 ml• Centrifuger 10 min. à 4 °C à 5400 x g• Éliminer la totalité du surnageant, afin que ne reste plus que le culot bactérien

Étapes 4 à 7 →

4	Lyse cellulaire et neutralisation
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Tampon de lyse L • Fermer le tube et mélanger <u>délicatement</u> par inversion (5 inversions, ne pas vortexer)
	<p>Attention : l'étape de lyse (↑) ne doit pas durer plus de 5 minutes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 500 µl de Tampon de neutralisation N • Mélanger par inversion (mélanger <u>doucement</u> mais efficacement, 4 à 6 inversions) • Centrifuger 5 min. à vitesse maximale (12000 - 16000 x g)

5	Fixation de l'ADN plasmidique au filtre de centrifugation
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer un Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 2.0 ml • Transférer 750 µl du surnageant clarifié, obtenu à l'étape précédente, dans le Filtre de centrifugation • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Transférer le restant du surnageant clarifié, obtenu à l'étape 4, dans le Filtre de centrifugation • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml

6	Lavage de l'ADN plasmidique
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 750 µl de Solution de lavage SLB au Filtre de centrifugation • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Centrifuger 3 min. à vitesse maximale (12000 - 16000 x g), afin d'éliminer l'éthanol résiduel du Filtre de centrifugation

7	Élution de l'ADN plasmidique
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml, afin de récupérer l'ADN plasmidique • Ajouter 50 à 100 µl de Tampon d'élution P (*) au centre du Filtre de centrifugation <p>(*) Utiliser un Tampon P chauffé à 70 °C pour les plasmides et cosmides de plus de 10 kb</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g, afin d'éluer l'ADN plasmidique • L'éluat contient l'ADN prêt à être utilisé <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN plasmidique peut être élué avec plus ou moins de tampon d'élution.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'élution de l'ADN plasmidique successives, avec respectivement 100 µl de tampon d'élution identique.</i></p>

L'ADN plasmidique ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que la PCR, le séquençage, les digestions enzymatiques, le clonage, etc. ou peut être stocké entre 2 °C et 8 °C.

Le stockage entre -15 °C et -25 °C peut s'avérer dommageable (application de forces de cisaillement) pour un ADN de petite taille tel que l'ADN plasmidique. Les cycles de congélation et décongélation augmentent les risques de détérioration de l'ADN plasmidique.

*Remarque : le **Tampon d'élution** contient de l'EDTA. L'élution peut également être réalisée avec ddH₂O. En l'absence de solution tampon, l'ADN peut se dégrader. Un Stockage à -20 °C de l'ADN, élué avec ddH₂O, est recommandé dans ces conditions.*

VI. Protocole 3 : extraction de plasmides à partir de 0.5 à 2.0 ml de culture bactérienne Gram +

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 1).
- Vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 37 °C) jusqu'à disparition du précipité.
- Préparer 10 µl de Lysozyme (10 mg/ml ou selon les indications du fabricant) pour l'étape 3 (Resuspension des cellules bactériennes)

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

1	Préparation de la culture bactérienne
	<ul style="list-style-type: none">• Inoculer 1- 5 ml de milieu LB (supplémenté en antibiotique sélectif adéquat), avec une colonie unique• Incuber 12-16 heures à 37 °C sous agitation vigoureuse <p><i>Remarque : ne pas dépasser 16 heures d'incubation</i></p>

2	Récolte de la culture bactérienne
	<ul style="list-style-type: none">• Transférer 0.5 à 2 ml de culture bactérienne dans un microtube de 1.5 ou 2.0 ml• Centrifuger 1 min. à vitesse maximale (12000 - 16000 x g)• Éliminer la totalité du surnageant, afin que ne reste plus que le culot bactérien

3	Resuspension des cellules bactériennes
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 250 µl de Tampon de resuspension• Vortexer jusqu'à remise en suspension complète du culot bactérien (aucun amas cellulaire ne doit être visible)• Ajouter 10 µl de Lysozyme (10 mg/ml ou selon les indications du fabricant)• Vortexer• Incuber 10 min. à 37 °C

Étapes 4 à 7 →

4	Lyse cellulaire et neutralisation
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 250 µl de Tampon de lyse L • Fermer le tube et mélanger <u>délicatement</u> par inversion (5 inversions, ne pas vortexer)
	<p>Attention : l'étape de lyse (↑) ne doit pas durer plus de 5 minutes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 250 µl de Tampon de neutralisation N • Mélanger par inversion (mélanger <u>doucement</u> mais efficacement, 4 à 6 inversions) • Centrifuger 5 min. à vitesse maximale (12000 - 16000 x g)

5	Fixation de l'ADN plasmidique au filtre de centrifugation
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer un Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 2.0 ml • Transférer le surnageant clarifié, obtenu à l'étape précédente, dans le filtre de centrifugation • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml

6	Lavage de l'ADN plasmidique
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 750 µl de Solution de lavage SLB au Filtre de centrifugation • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre de centrifugation dans le Tube receveur 2.0 ml • Centrifuger 3 min. à vitesse maximale (12000 - 16000 x g), afin d'éliminer l'éthanol résiduel du Filtre de centrifugation

7	Élution de l'ADN plasmidique
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre de centrifugation dans un nouveau Tube receveur 1.5 ml, afin de récupérer l'ADN plasmidique • Ajouter 50 à 100 µl de Tampon d'élution P au centre du Filtre de centrifugation • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g, afin d'éluer l'ADN plasmidique • L'éluat contient l'ADN prêt à être utilisé <p><i>Remarque : selon le rendement et la concentration souhaitée, l'ADN plasmidique peut être élué avec plus ou moins de tampon d'élution.</i></p> <p><i>Le meilleur rendement est obtenu en réalisant 2 étapes d'élution de l'ADN plasmidique successives, avec respectivement 100 µl de tampon d'élution identique.</i></p>

L'ADN plasmidique ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que la PCR, le séquençage, les digestions enzymatiques, le clonage, etc. ou peut être stocké entre 2 °C et 8 °C.

Le stockage entre -15 °C et -25 °C peut s'avérer dommageable (application de forces de cisaillement) pour un ADN de petite taille tel que l'ADN plasmidique. Les cycles de congélation et décongélation augmentent les risques de détérioration de l'ADN plasmidique.

*Remarque : le **Tampon d'élution** contient de l'EDTA. L'élution peut également être réalisée avec ddH₂O. En l'absence de solution tampon, l'ADN peut se dégrader. Un Stockage à -20 °C de l'ADN, élué avec ddH₂O, est recommandé dans ces conditions.*