



Mini Kit d'Isolément d'ADN
Bactérien FastPure

NB-54-0014

Sommaire

1/ Description du produit	1
2/ Composants	1
3/ Stockage	1
4/ Applications	1
5/ Matériaux préparés par l'utilisateur	2
6/ Remarques	2
7/ Mécanisme et Flux de Travail	3
8/ Procédure expérimentale	4
8-1/ Prétraitement de l'échantillon	4
8-2/ Purification sur colonne	5
9/ FAQ et Dépannage	6

Mini Kit d'Isolement d'ADN Bactérien FastPure

#Cat: NB-54-0014 Taille: 100rxns

1/ Description du produit

Ce kit est principalement destiné à l'extraction d'ADN génomique à partir de bactéries (Gram-positives ou Gram-négatives) de diverses sources. Le kit est basé sur la technologie de purification par colonne de gel de silice, ce qui élimine le besoin d'extraction utilisant des solvants organiques de type phénol/chloroforme ou une étape de précipitation à l'alcool longue et fastidieuse. Avec ce kit, l'ARN, les protéines, les lipides et autres impuretés inhibitrices peuvent être éliminés dans la plus grande mesure. L'ADN obtenu peut être directement utilisé pour la PCR, la qPCR, la digestion enzymatique et le Southern blot, etc.

2/ Composants

Composants	NB-54-0014 (100 rxns)
Tampon GA	400 ml
Protéinase K	2 ml
RNase A	400 µL
Tampon GB	40 ml
Tampon PB	26 ml
Tampon PW	40 ml
Tampon d'Élution	40 ml
FastPure gDNA Mini Colonnes III	100
Tubes de collecte 2 ml	100

Tampon GA : Fournit un environnement pour l'enzymolyse dans les échantillons.

Protéinase K : Enzymolyse dans les échantillons bactériens.

RNase A : Dégrade l'ARN dans l'échantillon.

Tampon GB : Inactive la Protéinase K et optimise les conditions de liaison.

Tampon PB : Élimine les protéines résiduelles, l'ARN et d'autres impuretés dans l'ADN.

Tampon PW : Élimine les ions salins résiduels dans l'ADN.

Tampon d'Élution : Élue l'ADN de la colonne de centrifugation.

FastPure gDNA Mini Colonnes III : Adsorbe l'ADN génomique.

Tubes de collecte 2 ml : Collectent le filtrat.

3/ Stockage

Conserver entre 15°C et 25°C et expédier à température ambiante

4/ Applications

1.0×10^9 bactéries Gram-positives ou Gram-négatives.

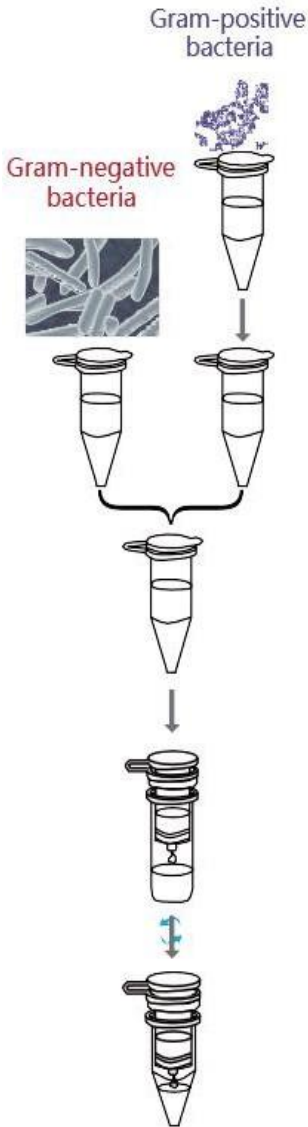
5/ Matériaux préparés par l'utilisateur

Lysozyme (Neo Biotech # NB-54-0014) (pour bactéries Gram-positives), éthanol absolu, tubes à centrifuger de 1,5 ml et bains-marie ou bains métalliques.

6/Remarques

1. Veuillez ajouter une quantité spécifiée d'éthanol absolu aux tampons PB et PW selon l'étiquette avant la première utilisation
2. Vérifiez la présence de précipités dans les tampons GA et GB avant utilisation. Si des précipités se sont formés, ils peuvent être redissous dans un bain-marie à 37°C et bien mélangés avant utilisation.
3. Pour les échantillons de bactéries Gram-positives, du Lysozyme préparé par l'utilisateur est nécessaire pour le traitement des bactéries. Le Lysozyme doit être utilisé à une concentration finale de 20mg/ml. Le Lysozyme n'est pas fourni avec ce kit mais peut être acheté séparément.
4. Les quantités d'entrée ne doivent pas dépasser la plage d'application, ce qui pourrait entraîner une diminution du rendement en ADN.
5. La force agissant sur une centrifugeuse dépend du rayon d'un rotor particulier. Si une expérience est effectuée de la même manière à chaque fois, la FCR (x g) doit rester constante.
6. Effectuer toutes les étapes à température ambiante (15°C ~ 25°C).

7/Mécanisme et Flux de Travail



- ◇ Collecte des bactéries: Prélever 1 à 5 ml de milieu de culture bactérien (moins de 1.0×10^9 bactéries), centrifuger à 10 000 tr/min ($11,500 \times g$) pendant 1 min, puis jeter le milieu de culture.
- ◇ Prétraitement de l'échantillon: Ajouter 180 μ l de Lysozyme et incuber dans un bain-marie à 37°C pendant 30 min (pour les bactéries Gram-positives). Ajouter 230 μ l de Tampon GA et mélanger par vortexage (pour les bactéries Gram-négatives). Ajouter 20 μ l de Protéinase K et mélanger par vortexage.
- ◇ Ajuster les conditions de liaison: Ajouter 250 μ l de Tampon GB et incuber dans un bain-marie à 70°C pendant 10 min. Ajouter 4 μ l de RNase A et laisser à température ambiante pendant 5 à 15 min (facultatif). Ajouter 180 μ l d'éthanol absolu et mélanger par vortexage.
- ◇ Adsorption: Transférer le mélange dans une FastPure gDNA Mini Colonnes III et centrifuger à 12 000 tr/min ($13,400 \times g$) pendant 1 min.
- ◇ Élimination des résidus protéiques: Ajouter 500 μ l de Tampon PB et centrifuger à 12 000 tr/min ($13,400 \times g$) pendant 1 min.
- ◇ Élimination des résidus d'ions salins: Ajouter 600 μ l de Tampon PW et centrifuger à 12 000 tr/min ($13,400 \times g$) pendant 1 min (répéter une fois).
- ◇ Élimination des résidus d'éthanol: Centrifuger la colonne vide à 12 000 tr/min ($13,400 \times g$) pendant 2 min.
- ◇ Éluion de l'ADN génomique: Ajouter 50 à 100 μ l de Tampon d'Élution et centrifuger à 12 000 tr/min ($13,400 \times g$) pendant 1 min.

8/Procédure expérimentale

8-1/ Prétraitement de l'échantillon

◇ Bactéries Gram-négatives

1. Prélever 1 à 5 ml de milieu de culture bactérien (moins de 1.0×10^9 bactéries), centrifuger à 10,000 tr/min ($11,500 \times g$) pendant 1 min, puis jeter le milieu de culture.
▲ La quantité de bactéries peut être mesurée avec un spectrophotomètre. $1 \text{ OD}_{600} \approx 1.5 \times 10^9$ bactéries.
2. Ajouter 230 μl de Tampon GA et vortexer pour bien resuspendre les bactéries.
3. Ajouter 20 μl de Protéinase K et vortexer pour mélanger.
4. Ajouter 250 μl de Tampon GB, mélanger par vortexage et incubé dans un bain-marie à 70°C pendant 10 min.
▲ L'ajout de Tampon GB peut produire des précipités blancs. Généralement, les précipités disparaîtront pendant le chauffage à 70°C et n'affecteront pas les expériences ultérieures. Si la solution ne devient pas claire, cela signifie que les cellules ne sont pas complètement lysées, et l'ADN extrait peut être insuffisant et impur.
5. (Facultatif) Si les résidus d'ARN affectent considérablement les expériences ultérieures, ajouter 4 μl de RNase A à la solution digérée, vortexer pendant 15 secondes et laisser à température ambiante pendant 5 à 15 min.
6. Passer à la **section 8-2/Purification sur colonne**.

◇ Bactéries Gram-positives

1. Prélever 1 à 5 ml de milieu de culture bactérien (moins de 1.0×10^9 bactéries), centrifuger à 10,000 tr/min ($11,500 \times g$) pendant 1 min, puis jeter le milieu de culture.
▲ La quantité des bactéries peut être mesurée avec un spectrophotomètre. $1 \text{ OD}_{600} \approx 1.5 \times 10^9$ bacteria.
2. Ajouter 180 μl de Lysozyme (préparé par l'utilisateur), agiter pour resuspendre les bactéries, et incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 30 min.
▲ La plupart des bactéries nécessitent 30 min de bain-marie pour une rupture complète de la paroi cellulaire, mais certaines bactéries (par exemple, *Staphylococcus aureus*) ont une paroi cellulaire plus épaisse et nécessitent 1 à 2 h de bain-marie. Veuillez ajuster le temps de bain-marie en fonction du type de bactérie.
▲ La poudre sèche de Lysozyme doit être dissoute dans un tampon à une concentration finale de 20 mg/ml pour montrer son activité. Le tampon de travail est préparé avec 20 mM Tris (pH 8.0), 2 mM Na₂-EDTA, et 1.2% Triton X-100.
3. Ajouter 20 μl de Protéinase K et mélanger par vortexage.
4. Ajouter 250 μl de Tampon GB, mélanger par vortexage, et chauffer dans un bain-marie à 70°C pendant 10 min.
▲ L'ajout de Tampon GB peut produire des précipités blancs. Généralement, les précipités disparaîtront pendant le chauffage à 70°C et n'affecteront pas les expériences ultérieures. Si la solution ne devient pas claire, cela signifie que les cellules ne sont pas complètement lysées, et l'ADN extrait peut être insuffisant et impur.
5. (Facultatif) Si les résidus d'ARN affectent considérablement les expériences ultérieures, ajouter 4 μl de RNase A à la solution digérée, vortexer pendant 15 secondes, et laisser à température ambiante pendant 5 à 15 min.
6. Passer à la **section 8-2/Purification sur colonne**.

8-2/Purification sur colonne

1. Ajouter 180 μ l d'éthanol absolu, vortexer pour bien mélanger (des floccules peuvent apparaître) et recueillir le liquide sur le bouchon du tube par une brève centrifugation.
2. Transférer le mélange ci-dessus dans une FastPure gDNA Mini Colonnes III (déjà placée dans un tube de collecte). Centrifuger à 12,000 tr/min (13,400 \times g) pendant 1 min et jeter le filtrat.
3. Ajouter 500 μ l de Tampon PB (vérifier si l'éthanol absolu a été ajouté avant utilisation) à la colonne de centrifugation, centrifuger à 12,000 tr/min (13,400 \times g) pendant 1 min et jeter le filtrat.
4. Ajouter 600 μ l de Tampon PW (vérifier si l'éthanol absolu a été ajouté avant utilisation) à la colonne de centrifugation, centrifuger à 12,000 tr/min (13,400 \times g) pendant 1 min et jeter le filtrat.
5. Répéter l'étape 4.
6. Replacer la colonne de centrifugation dans le tube de collecte et centrifuger la colonne vide à 12,000 tr/min (13,400 \times g) pendant 2 min
 - ▲ Après avoir centrifugé la colonne vide, sécher la colonne à l'air pendant 2 à 5 min pour que l'éthanol résiduel s'évapore complètement.
7. Transférer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube à centrifuger de 1,5 ml (à préparer soi-même) et ajouter 50 à 100 μ l de Tampon d'Élution au centre de la membrane de la colonne de centrifugation sans toucher la colonne. Incuber à température ambiante pendant 2 à 5 min et centrifuger à 12,000 tr/min (13400 \times g) pendant 1 min
 - ▲ Les étapes suivantes peuvent aider à augmenter le rendement en ADN:
 - ▲ Préchauffer le Tampon d'Elution à 55°C avant l'élution.
 - ▲ Répéter l'élution avec du Tampon d'Élution fraîchement prélevé, ce qui augmente le rendement en ADN mais réduit la concentration.
 - ▲ Pour augmenter la concentration d'ADN, recharger l'éluat de la première élution sur la colonne de centrifugation pour une seconde élution.
8. Jeter la colonne de centrifugation et conserver l'ADN extrait à -30 ~ -15°C pour éviter la dégradation.

9/FAQ and Troubleshooting

FAQ	Cause	Solution
Colmatage des FastPure gDNA Colonnes III	1. Trop d'échantillon	Réduire la quantité d'échantillon à moins de 1.0×10^9 bactéries.
	2. Substances non digérées dans la solution digérée	Si la solution résultant de la digestion de l'échantillon contient des matières particulaires visibles, centrifuger la solution à 12,000 rpm (13,400 x g) pendant 3 min pour éliminer les substances non digérées.
Pas d'ADN extrait ou faible rendement en ADN	1. Trop peu d'échantillon	Déterminer la quantité de bactéries en fonction de la situation de la culture bactérienne. Certaines bactéries ont une concentration plus faible après culture, de sorte que leur quantité d'utilisation peut être augmentée de manière appropriée.
	2. Rupture incomplète de la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives	Augmenter la quantité de Lysozyme ou prolonger le temps de digestion enzymatique si nécessaire.
	3. Perte partielle ou complète d'activité de la Protéinase K due à un stockage inapproprié.	Vérifier les conditions de stockage de la Protéinase K ou utiliser une nouvelle Protéinase K pour la digestion.
	4. Problèmes de tampon d'élution	Veillez éluer avec le Tampon d'Élution. Si de l'eau ddH ₂ O ou un autre tampon d'élution est utilisé, assurez-vous que son pH est compris entre 7,0 et 8,5.
	5. Éluion incomplète	Ajouter le tampon d'élution au centre de la membrane d'adsorption et augmenter le volume et le nombre d'élutions.
	6. Tampon PB/PW non supplémenté en éthanol absolu	Ajouter les volumes appropriés d'éthanol absolu comme indiqué sur l'étiquette du flacon de réactif.
Faible pureté de l'ADN	1. Lyse incomplète de l'échantillon	Il est possible que l'échantillon et le tampon GB n'aient pas été suffisamment homogénéisés. Réalisez une nouvelle extraction en veillant à mélanger soigneusement l'échantillon avec le tampon GB. Diminuez la quantité d'échantillon si celle-ci est excessive.
	2. Contamination protéique et ARN	Ne pas avoir utilisé le Tampon PB pour laver la colonne de centrifugation ou l'avoir utilisé avec la vitesse de centrifugation correcte. S'assurer qu'il n'y a pratiquement pas de précipités dans le surnageant avant de le charger sur la colonne de centrifugation. La colonne doit être lavée avec le Tampon PB conformément aux Instructions d'Utilisation, et cette étape ne peut être omise.
	3. Contamination ionique	Ne pas avoir lavé la colonne de centrifugation avec le Tampon PW ou ne l'avoir lavée qu'une seule fois. Laver la colonne deux fois avec le Tampon PW comme indiqué pour éliminer les ions résiduels dans la mesure du possible.
	4. Contamination par l'éthanol	La centrifugation de la colonne vide après lavage avec le tampon PW a été omise. Veuillez effectuer la centrifugation de la colonne vide conformément au protocole d'utilisation.