

**Manuel du protocole de  
purification manuelle  
à utiliser avec**

**prepiT™•L2P**

**DNAGENOTEK™**

**[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)**

Tél. : +1.613.723.5757  
[support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)  
[sales@dnagenotek.com](mailto:sales@dnagenotek.com)

3000 - 500 Palladium Drive  
Ottawa, ON, Canada K2V 1C2

*Échantillons supérieurs  
Performance prouvée*





Le protocole prepIT™-L2P est disponible en plusieurs autres langues sur le site [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

**Assistance technique disponible du lundi au vendredi de 9h à 17h (heure de la côte Est des Etats-Unis) :**

- Numéro vert (Amérique du Nord) : 1.866.813.6354, option 6
- Tous les autres pays : +1.613.723.5757, option 6
- E-mail : [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

Responsable au Royaume-Uni : Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV Bijkhoevelaan 32c,  
2110 Wijnegem, Belgique  
Courriel : [EUAR@novosanis.com](mailto:EUAR@novosanis.com)

 Arazy Group Swiss GmbH  
Bruderholzallee 53, 4059 Bâle, Suisse  
Courriel : [swiss.ar@arazygroup.com](mailto:swiss.ar@arazygroup.com)

Partenaire en Australie : Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000 Australie

## Table des matières

<b>Application/Usage prévu</b>	<b>4</b>
<b>Stabilité en cours d'utilisation</b>	<b>4</b>
<b>Caractéristiques</b>	<b>4</b>
<b>Matériels</b>	<b>4</b>
<b>Avertissements et précautions</b>	<b>4</b>
<b>Restrictions d'emploi du produit</b>	<b>5</b>
<b>Transport de prepIT-L2P</b>	<b>5</b>
<b>Conservation de prepIT-L2P (durée de conservation)</b>	<b>5</b>
<b>Élimination</b>	<b>5</b>
<b>Entretien/réparations</b>	<b>5</b>
<b>Synthèse des caractéristiques de performance</b>	<b>5</b>
<b>Présentations du produit</b>	<b>5</b>
<b>Garanties</b>	<b>6</b>
<b>Dépannage</b>	<b>6</b>
<b>Protocole de laboratoire prepIT pour la purification manuelle d'ADN à partir de :</b>	
<b>500 µl d'échantillon</b>	<b>7</b>
<b>Échantillon entier</b>	<b>11</b>
<b>Quantification de l'ADN</b>	<b>18</b>

## Application/Usage prévu

Pour la purification de l'ADN génomique des kits de prélèvement de salive Oragene™ et ORAcollect™.

## Stabilité en cours d'utilisation

PT-L2P-5 (5 ml) et PT-L2P-45 (45 ml) restent stables pendant 30 mois à température ambiante.

## Caractéristiques

- Procédé chimique optimisé pour une récupération d'ADN maximale à partir d'échantillons oraux prélevés avec les produits des gammes Oragene et ORAcollect.
- A démontré la fiabilité de ses résultats en matière d'ADN de haut poids moléculaire.
- Méthode de purification évolutive en fonction du volume des échantillons.
- Processus pratique avec une assistance technique complète du prélèvement à l'extraction.
- Méthode économique nécessitant un équipement minime.

## Matériels

- PT-L2P-5 (5 ml) et/ou PT-L2P-45 (45 ml)
- Manuel du produit prepIT•L2P

## Avertissements et précautions

- Pour usage en laboratoire uniquement.
- NE PAS avaler le réactif liquide.
- NE PAS utiliser si l'emballage est endommagé ou en cas de bris ou de fuite du sceau du couvercle/bouchon de l'entonnoir.
- NE PAS utiliser prepIT•L2P au-delà de la date limite d'utilisation indiquée sur le flacon du réactif.
- Laver à l'eau si le réactif entre en contact avec les yeux ou la peau. NE PAS avaler.
- Signaler tout incident grave à DNA Genotek et à l'autorité compétente de votre pays.
- Consulter la FDS pour une élimination conforme du réactif non utilisé.
- La fiche de données de sécurité (FDS) est disponible sur le site [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## Restrictions d'emploi du produit

Utiliser uniquement prepIT•L2P conformément aux instructions de ce manuel.

## Transport de prepIT•L2P

prepIT•L2P peut être transporté à température ambiante en tant que réactif de laboratoire. Aucune précaution de manutention spéciale n'est requise.

## Conservation de prepIT•L2P (durée de conservation)

Stocker à température ambiante. La durée de conservation de PT-L2P-5 (5 ml) et PT-L2P-45 (45 ml) est de 30 mois lorsque bien fermés et stockés à température ambiante.

## Élimination

Jeter les kits inutilisés, endommagés ou présentant des fuites conformément aux réglementations locales, régionales et nationales en vigueur. À éliminer comme des déchets de laboratoire.

## Entretien/réparations

Sans objet. prepIT•L2P est un réactif - aucun entretien ni réparation requise.

## Synthèse des caractéristiques de performance

prepIT•L2P pour la purification de l'ADN génomique des kits de prélèvement de salive Oragene™ et ORAcollect™ permet de fournir la quantité suffisante d'ADN de haute qualité pour une utilisation dans des applications en aval telles que la PCR, les puces à ADN et le séquençage de nouvelle génération.

## Présentations du produit

prepIT•L2P est disponible en plusieurs volumes, en fonction du nombre de préparations requises. Par exemple :

Numéro de référence du produit	Volume des préparations d'échantillons	Nombre de préparations
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2 000

## Garanties

Les conditions pour tous les produits DNA Genotek sont disponibles dans leur intégralité sur le site <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

## Dépannage

Contactez l'équipe d'assistance technique de DNA Genotek à l'adresse [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com) ou appelez le +1 (613) 723-5757, option 6.

# Protocole de laboratoire prepIT™ pour la purification manuelle d'ADN à partir d'un échantillon de 500 µl

Le protocole suivant par étapes décrit comment purifier l'ADN d'une aliquote de 500 µl d'un échantillon.

## Réactifs fournis

prepIT•L2P (Cat. No. PT-L2P-5 ou PT-L2P-45)

## Matériel et réactifs

- Microcentrifugeuse capable de tourner à 15 000 × g
- Microtubes de 1,5 ml (p. ex., Axygen® Cat. n° MCT-150-C)
- Incubateur à air ou à eau à 50 °C
- Éthanol (95-100 %) à température ambiante
- Éthanol (70 %) à température ambiante
- Tampon de stockage de l'ADN : TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ou solution similaire

## Procédure

Étapes de purification	Remarques
1. Mélanger l'échantillon Oragene/ORACollect en inversant le tube ou en l'agitant doucement quelques secondes.	• Le but est de s'assurer que les échantillons visqueux sont bien mélangés.

Étapes de purification	Remarques
2. Incuber l'échantillon à 50 °C dans un incubateur à eau pendant au moins 1 heure ou dans un incubateur à air pendant au moins 2 heures.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cette étape de traitement à la chaleur est essentielle pour garantir une libération adéquate d'ADN et l'inactivation permanente des nucléases.</li> <li>• Cette étape d'incubation peut être réalisée à n'importe quel moment après le prélèvement de l'échantillon et avant sa purification.</li> <li>• L'échantillon entier doit être incubé dans le tube de prélèvement d'origine avant l'aliquotage pour garantir l'homogénéité de l'échantillon.</li> <li>• L'échantillon peut être incubé à 50 °C pendant une nuit pour plus de commodité.</li> <li>• L'incubateur à air demande plus de temps car la température s'équilibre plus lentement que dans un incubateur à eau.</li> </ul> <p><b>Remarque :</b> L'utilisation d'un incubateur à air est préférable car les tubes Oragene/ORACollect peuvent flotter dans un bain d'eau. Si la seule option est un bain d'eau, s'assurer que la partie du tube contenant l'échantillon reste immergée dans l'eau.</p>
3. Transférer 500 µl de l'échantillon mélangé dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le reste de l'échantillon peut être conservé à température ambiante (15 °C à 25 °C) ou congelé.</li> <li>• Si besoin est, l'échantillon peut être congelé pour conservation dans le tube Oragene/ORACollect à -20 °C ou transféré dans un tube cryogénique pour un stockage à long terme à -80 °C.</li> </ul>
4. Ajouter 20 µl (1/25e du volume) de prepIT-L2P dans le tube de microcentrifugeuse et mélanger au vortex pendant quelques secondes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'échantillon deviendra trouble en raison de la précipitation des impuretés et des inhibiteurs.</li> </ul>

Étapes de purification	Remarques
5. Incuber sur glace pendant 10 minutes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Une incubation à température ambiante peut être effectuée mais l'élimination des impuretés sera moins efficace.</li> </ul>
6. Centrifuger à température ambiante pendant 5 minutes à 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Il peut être judicieux de prolonger la période de centrifugation (15 minutes maximum) pour réduire la turbidité (A<sub>320</sub> élevée) de la solution finale d'ADN.</li> </ul>
7. Transférer délicatement le surnageant limpide avec une pipette dans un tube de microcentrifugeuse propre. <b>Jeter le culot contenant des impuretés.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le culot contient des impuretés troubles. Si le tube est perturbé accidentellement, le centrifuger de nouveau.</li> </ul>
8. Ajouter 600 µl d'éthanol à 95-100 % à température ambiante. Mélanger doucement en inversant le tube 10 fois.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mélangé à l'éthanol, l'ADN est précipité. Cela peut se traduire par la formation d'une pelote d'ADN ou une fine précipitation (en fonction de la quantité d'ADN dans l'échantillon).</li> <li>• Même si aucune pelote n'est visible, l'ADN sera récupéré en suivant minutieusement les prochaines étapes.</li> </ul>
9. Laisser reposer l'échantillon à température ambiante pendant 10 minutes pour permettre la précipitation totale de l'ADN.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'incubation à -20 °C est déconseillée car les impuretés peuvent co-précipiter avec l'ADN.</li> </ul>
10. Placer le tube dans la microcentrifugeuse dans un sens identifié. Centrifuger à température ambiante pendant 2 minutes à 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Par exemple, placer chaque tube dans la microcentrifugeuse avec la charnière du bouchon à l'opposé du centre du rotor. Après centrifugation, le culot (même très petit) peut être localisé : il se trouvera à l'extrémité du tube sous la charnière.</li> </ul>
11. Retirer soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette puis le jeter. Veiller à ce que le culot d'ADN ne soit pas perturbé.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ce culot contient l'ADN. La perte du culot entraîne la perte de l'ADN.</li> <li>• Retourner le tube de sorte à placer le culot sur la paroi supérieure permettra d'insérer délicatement l'embout d'une pipette le long de la paroi inférieure pour retirer tout le surnageant.</li> <li>• Le surnageant peut contenir des impuretés ; il faut donc en retirer le plus possible.</li> </ul>

Étapes de purification	Remarques
12. Lavage à l'éthanol : Ajouter délicatement 250 µl d'éthanol à 70 %. Laisser reposer à température ambiante pendant 1 minute. <b>Retirer tout l'éthanol sans perturber le culot.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Il est important d'éliminer tout l'éthanol de l'échantillon. La persistance d'éthanol peut avoir un impact sur le résultat du test.</li> <li>• Une fois l'éthanol à 70 % éliminé, le tube peut être centrifugé en cycle court (pulse) pour éliminer tout résidu d'éthanol.</li> <li>• Ne pas perturber le culot d'ADN ; il est peut être petit voire invisible.</li> <li>• Si le culot se détache, centrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à 15 000 × g.</li> <li>• Le séchage excessif du culot peut freiner la dissolution de l'ADN.</li> </ul>
13. Ajouter 100 µl de solution TE (voir page 1) pour dissoudre le culot d'ADN. Mélanger au vortex pendant 5 secondes minimum.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Si une plus forte concentration d'ADN est souhaitée, utiliser 50 µl de TE.</li> </ul>
14. Pour assurer la réhydratation complète de l'ADN, incubé à température ambiante pendant une nuit, puis mélanger au vortex ou incubé à 50 °C pendant 1 heure avec mélange au vortex de temps à autre.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• De grandes quantités d'ADN de haut poids moléculaire peuvent ralentir la réhydratation (dissolution) complète.</li> <li>• Une réhydratation incomplète de l'ADN peut fausser les estimations de concentration en ADN et causer des erreurs potentielles dans les applications an aval telles que la PCR.</li> </ul>
15. Options de stockage de l'ADN totalement réhydraté : a) Dans le TE à -20 °C pour un stockage à long terme. Diviser en aliquotes si besoin est. b) Dans le TE à 4 °C pendant 2 mois maximum.	

## Protocole de laboratoire prepIT pour la purification manuelle d'ADN à partir d'un échantillon entier

**Remarque :** Ce protocole nécessite l'utilisation d'une centrifugeuse (rotor à angle fixe ou à godet oscillant) capable de générer au moins 3 500 × g pour un résultat optimal.

Le protocole suivant par étapes décrit comment purifier l'ADN d'un échantillon entier (volume total de l'échantillon compris entre 1 ml et 4 ml). Les volumes indiqués doivent être ajustés en fonction du volume prélevé actuel.

### Réactifs fournis

prepIT•L2P (Cat. No. PT-L2P-5 ou PT-L2P-45)

### Matériel et réactifs

- Centrifugeuse adaptée pour des tubes de 15 ml et capable de générer au moins 3 500 × g (voir Tableau 2)
- Tubes coniques de 15 ml en polypropylène p. ex., BD Falcon® Cat. n° 352196)
- Microcentrifugeuse capable de tourner à 15 000 × g (facultatif)
- Microtubes de 1,5 ml (p. ex., Axygen® Cat. n° MCT-150-C)
- Incubateur à air ou à eau à 50 °C
- Éthanol (95-100 %) à température ambiante
- Éthanol (70 %) à température ambiante
- Tampon de stockage de l'ADN : TE (10 mm Tris-HCl, 1 mm EDTA, pH 8,0) ou solution similaire

**Facultatif : Vérification avant purification (uniquement applicable pour les échantillons Oragene ; non requise pour les échantillons ORAcollect)**

Peser l'échantillon pour estimer la quantité de salive fournie par le donneur (voir Tableau 1). La quantité de salive prélevée est directement proportionnelle à la quantité d'ADN récupérée. Par exemple, si un donneur a fourni moins de 2 ml de salive, la quantité totale extraite à partir de cet échantillon sera moindre.

**Poids du kit (échantillon non compris)**

Lorsque l'échantillon arrive au laboratoire, nous conseillons de le peser pour savoir si le donneur a fourni la quantité adaptée de salive. La quantité variera d'un donneur à l'autre. Le poids moyen d'un kit vide est indiqué (Tableau 1). Pour calculer la quantité d'échantillon prélevé (en supposant un poids de 1 g/ml), soustraire :

*Poids du kit contenant la salive – Poids du kit, échantillon non compris*

*Quantité d'échantillon prélevée*


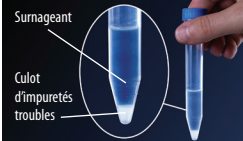
Tableau 1	
Produit n°	Poids du kit, échantillon non compris
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

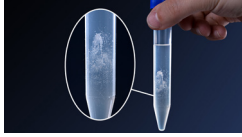
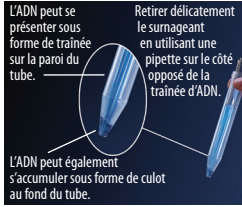
**Procédure**

Étapes de purification	Remarques
1. Mélanger l'échantillon Oragene/ORAcollect en inversant le tube ou en l'agitant doucement quelques secondes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le but est de s'assurer que les échantillons visqueux sont bien mélangés.</li> </ul>
2. Incuber l'échantillon à 50 °C dans un incubateur à eau pendant au moins 1 heure ou dans un incubateur à air pendant au moins 2 heures.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cette étape de traitement à la chaleur est essentielle pour maximiser la quantité d'ADN extraite et garantir l'inactivation permanente des nucléases.</li> <li>L'échantillon peut être incubé à 50 °C pendant une nuit pour plus de commodité.</li> <li>Cette étape d'incubation peut être réalisée à n'importe quel moment après le prélèvement de l'échantillon et avant la purification de l'ADN.</li> <li>L'incubateur à air demande plus de temps car la température s'équilibre plus lentement que dans un incubateur à eau.</li> </ul> <p><b>Remarque :</b> L'utilisation d'un incubateur à air est préférable car les tubes Oragene/ORACollect peuvent flotter dans un bain d'eau. Si la seule option est un bain d'eau, s'assurer que la partie du tube contenant l'échantillon reste immergée dans l'eau.</p>
3. Transférer l'échantillon entier dans un tube de centrifugeuse de 15 ml (Figure 1). Noter le volume de l'échantillon.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le transfert peut se faire soit en versant soit en utilisant une pipette en verre ou en plastique.</li> </ul>



Figure 1 : Avant de passer à l'étape 4, s'assurer que l'échantillon entier a été incubé et transféré dans un nouveau tube de centrifugeuse de 15 ml, tel qu'indiqué.

Étapes de purification	Remarques
<p>4. Ajouter 1/25e du volume de prepiT-L2P et mélanger au vortex pendant quelques secondes (Figure 2).</p>  <p><i>Figure 2 : Après l'ajout de PT-L2P et l'incubation sur glace pendant 10 minutes, l'échantillon ne sera plus limpide mais plutôt trouble.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exemple : 160 µl de prepiT-L2P pour un échantillon de 4 ml.</li> <li>L'échantillon deviendra trouble en raison de la précipitation des impuretés et des inhibiteurs.</li> </ul>
<p>5. Incuber sur glace pendant 10 minutes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Une incubation à température ambiante peut être effectuée mais l'élimination des impuretés sera moins efficace.</li> </ul>
<p>6. Centrifuger à température ambiante pendant 10 minutes à la vitesse maximale. 3 500 x g minimum.</p>  <p><i>Figure 3 : Après la centrifugation, il y aura une accumulation de matières troubles au fond du tube. Le surnageant devrait être clairement limpide.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Une force centrifuge plus élevée minimise la quantité de matières troubles transportées dans l'ADN purifié (Figure 3). Avant de continuer, vérifier auprès du fabricant que les tubes de centrifugeuse de 15 ml résistent à la force centrifuge.</li> <li>Il peut être judicieux de prolonger la période de centrifugation (20 minutes maximum) pour réduire la turbidité (<math>A_{320}</math> élevée) de la solution finale d'ADN.</li> </ul>
<p>7. Transférer délicatement le surnageant limpide à l'aide d'une pipette dans un nouveau tube de centrifugeuse de 15 ml. <b>Jeter le culot.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laisser une petite quantité de surnageant dans le tube pour éviter de perturber le culot.</li> <li>Le culot contient des impuretés troubles. Si le tube est perturbé accidentellement, le centrifuger de nouveau.</li> </ul>

Étapes de purification	Remarques
<p>8. Ajouter 1,2 fois le volume d'éthanol à 95-100 % à température ambiante au surnageant limpide. Mélanger doucement en inversant le tube 10 fois.</p>  <p><i>Figure 4 : Après l'ajout d'éthanol, l'ADN précipite, ce qui peut éventuellement créer une pelote visible.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mélangé à l'éthanol, l'ADN est précipité.</li> <li>L'ADN précipité peut se présenter sous la forme d'une pelote d'ADN (Figure 4) ou d'une fine précipitation (en fonction de la quantité d'ADN dans l'échantillon).</li> </ul>
<p>9. Laisser reposer l'échantillon à température ambiante pendant 10 minutes pour permettre la précipitation totale de l'ADN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'incubation à -20 °C est déconseillée car les impuretés peuvent co-précipiter avec l'ADN.</li> </ul>
<p>10. Centrifuger à température ambiante pendant 10 minutes à la vitesse maximale. 3 500 x g minimum.</p>	
<p>11. Retirer soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette en verre ou en plastique, puis le jeter. Veiller à ce que le culot d'ADN ne soit pas perturbé.</p>  <p><i>Figure 5 : Gratter délicatement l'intérieur du tube avec la pointe d'une pipette peut révéler la présence d'une traînée d'ADN.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le surnageant peut contenir des impuretés ; il faut donc en retirer le plus possible.</li> <li>L'ADN précipité apparaît au fond du tube sous forme de culot et peut former une traînée le long de la paroi du tube (Figure 5).</li> <li>La traînée d'ADN peut être située sur le côté du tube opposé par rapport au centre de la centrifugeuse.</li> <li>La traînée peut être localisée par un test de « grattage ». La présence d'une traînée d'ADN peut être vérifiée en grattant l'intérieur du tube avec la pointe d'une pipette. Une traînée peut être visible (Figure 5).</li> </ul>



Étapes de purification	Remarques
<p>12. Lavage à l'éthanol :</p> <p>Ajouter délicatement 1 ml d'éthanol à 70 % dans le tube sans perturber la trainée ou le culot. Laisser reposer à température ambiante pendant 1 minute. <b>Agiter délicatement par rotation et retirer tout l'éthanol sans perturber le culot ou la trainée.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Il est important d'éliminer tout l'éthanol de l'échantillon. La persistance d'éthanol peut avoir un impact sur le résultat du test.</b></li> <li>• Ne pas perturber le culot ou la trainée d'ADN.</li> <li>• Une brève centrifugation (moins d'une minute) peut être effectuée pour faciliter l'élimination totale du surnageant.</li> <li>• Si le culot se détache à la suite de l'étape de lavage à l'éthanol, centrifuger l'échantillon 5 minutes à la vitesse maximale. <math>3\ 500 \times g</math> minimum.</li> </ul>
<p>13. Pour les échantillons Oragene, réhydrater l'ADN en ajoutant 0,2-1,0 ml de solution TE et en mélangeant l'échantillon au vortex pendant 30 secondes.</p> <p>Pour les échantillons ORAcollect, réhydrater l'ADN en ajoutant 0,2 ml de solution TE et en mélangeant l'échantillon au vortex pendant 30 secondes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Si une plus forte concentration d'ADN est souhaitée, il est possible de réduire le volume de TE. Un minimum de 200 µl de solution TE doit être utilisé.</li> <li>• Un séchage excessif du culot (&gt; 10 minutes) et l'emploi de moins de 500 µl de solution TE peut freiner la réhydratation (dissolution) de l'ADN et réduire la quantité extraite ou compliquer sa quantification.</li> <li>• L'ADN précipité apparaît au fond du tube sous forme de culot et peut former une trainée le long de la paroi du tube.</li> <li>• Pour garantir une récupération d'ADN maximale, l'échantillon doit être mélangé au vortex après l'ajout du solvant d'ADN (solution TE). Le mélange au vortex permettra de garantir la récupération de la trainée d'ADN le long de la paroi du tube (Figure 6).</li> <li>• Le mélange au vortex ne cisailera pas l'ADN.</li> </ul>



**Figure 6 :** Mélanger l'échantillon au vortex pendant 30 secondes permettra de récupérer la trainée d'ADN sur la paroi du tube. L'ADN conservera un poids moléculaire élevé.

Étapes de purification	Remarques
<p>14. Pour assurer la réhydratation complète de l'ADN, incubé à température ambiante pendant une nuit, puis mélanger au vortex ou incubé à 50 °C pendant 1 heure avec mélange au vortex de temps à autre.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Une réhydratation incomplète de l'ADN peut fausser les estimations de concentration en ADN et causer des erreurs potentielles dans les applications en aval telles que la PCR.</li> </ul>
<p>15. Transférer l'ADN réhydraté dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml pour le stockage.</p>	
<p>Étape facultative :</p> <p>a) Centrifuger l'ADN réhydraté à température ambiante pendant 15 minutes à <math>15\ 000 \times g</math>.</p> <p>b) Transférer le surnageant dans un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml sans perturber le culot.</p>	<p>Remarque : le culot contient des matières insolubles et troubles.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pour maximiser l'extraction d'ADN, s'assurer que l'ADN a été totalement réhydraté (étape 14) avant de réaliser cette étape de centrifugation.</li> <li>• Cette étape de centrifugation permet d'éliminer les matières troubles résiduelles de l'échantillon d'ADN.</li> <li>• Veiller à ne pas perturber le culot lors du transfert du surnageant limpide dans un nouveau tube.</li> </ul>
<p>16. Options de stockage de l'ADN totalement réhydraté :</p> <p>a) Dans le TE à -20 °C pour un stockage à long terme. Diviser en aliquotes si besoin est.</p> <p>b) Dans le TE à 4 °C pendant 2 mois maximum.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La congélation de l'ADN purifié dans un tampon TE peut provoquer la précipitation de l'ADN. Lors de la décongélation de l'ADN purifié, suivre minutieusement les instructions de réhydratation de l'étape 14.</li> </ul>

## Quantification de l'ADN

### Par fluorescence

Les analyses par marqueurs fluorescents sont plus précises que l'absorbance à 260 nm pour quantifier la quantité d'ADN double brin (ADNdb) dans un échantillon d'ADN. Nous recommandons l'utilisation de kits commercialisés tels que le Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) ou le QuantiFluor™ dsDNA System (Promega). L'ADN doit parfois être dilué au 1/50e max. avec une solution TE avant d'être utilisé pour l'analyse de quantification.

### Par absorbance

Si vous choisissez de quantifier l'ADN par absorbance, nous vous recommandons de traiter d'abord l'échantillon purifié par RNase pour synthétiser l'ARN contaminant, puis d'éliminer les fragments d'ARN par précipitation de l'ADN à l'éthanol. Un protocole détaillé est décrit dans le document « PD-PR-040, RNA removal by double-RNase digestion » (*Élimination de l'ARN par synthèse double RNase*).<sup>1</sup> Veuillez noter que l'ADN d'un échantillon oral contient généralement bien plus d'ARN que dans des échantillons sanguins. Assurez-vous que l'ADN précipité à l'alcool est totalement dissout avant de lire l'absorbance.

**Facteur de conversion :** Une absorbance de 1,0 à 260 nm correspond à une concentration de 50 ng/μl (50 μg/ml) pour de l'ADNdb pur.

Vérifiez que les valeurs d'absorbance sont comprises dans la fourchette linéaire du spectrophotomètre. Rediluez et remesurez les échantillons dont les valeurs sont en dehors de cette fourchette. Consultez le manuel de votre appareil pour plus d'informations.

### Références

<sup>1</sup> RNA removal by double-RNase digestion. PD-PR-040. DNA Genotek.

### Méthode

1. Diluer une aliquote de 10 μl d'ADN purifié traité par RNase dans 90 μl de TE (dilution 1/10). Mélanger doucement en agitant la pipette de haut en bas. Attendre que les bulles disparaissent.
2. Utiliser le TE dans la cellule (vide) de référence.
3. Mesurer l'absorbance à 320 nm, 280 nm et 260 nm.
4. Calculer les valeurs  $A_{280}$  et  $A_{260}$  corrigées en soustrayant l'absorbance à 320 nm ( $A_{320}$ ) aux valeurs  $A_{280}$  et  $A_{260}$ .
5. Concentration d'ADN en ng/μl = valeur  $A_{260}$  corrigée  $\times$  10 (facteur de dilution)  $\times$  50 (facteur de conversion).
6. Rapport  $A_{260}/A_{280}$  : divisez la valeur  $A_{260}$  corrigée par la valeur  $A_{280}$  corrigée.

### Exemple

1. Supposons que  $A_{320} = 0,025$ ,  $A_{280} = 0,175$  et  $A_{260} = 0,295$
2. La concentration en ADN de l'échantillon non dilué sera la suivante :  
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$  [facteur de dilution]  $\times$  50 [facteur de conversion]  
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$   
 $= 0,270 \times 10 \times 50$   
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ou  $135 \mu\text{g}/\text{ml}$
3. Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  corrigé sera alors égal à :  
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$   
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$   
 $= 0,270 \div 0,150$   
 $= 1,80$

Oragene•DNA et ORACollect•DNA ne sont pas commercialisés aux États-Unis.












Oragene•DISCOVER est destiné à la recherche uniquement et ne doit pas être utilisé dans des procédures de diagnostic.

Certains produits DNA Genotek peuvent ne pas être disponibles dans toutes les régions géographiques.

Oragene, prepIT, ORACollect et DNA Genotek sont des marques déposées de DNA Genotek Inc. Toutes les autres marques et tous les autres noms mentionnés ici sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

Tous les protocoles, livres blancs et notes d'application de DNA Genotek sont disponibles dans la section support de notre site web à l'adresse [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

### Légende :

	Dispositif médical pour diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Marquage CE
	Fabricant
	Consulter la notice
	Représentant agréé en Europe
	Représentant agréé en Suisse
	Numéro de lot
	Identifiant unique du dispositif
	Stabilité en cours d'utilisation
	Instructions de conservation
15 °C / 30 °C	
59 °F / 86 °F	

Brevet ([www.dnagenotek.com/legalnotices](http://www.dnagenotek.com/legalnotices))

PD-HB-00025 (FR - French) Issue 1/2022-09

© 2022 DNA Genotek Inc., une filiale d'OraSure Technologies Inc., tous droits réservés

**DNAGENOTEK™**

[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)