



Smart D-N-Adem-Kit

A partir de cellules ou tissu animal

(cat #06121)

**Manuel d'utilisateur pour la capture et
l'amplification directe d'ADNg**

- **Culture cellulaire**
- **Cellules buccales**
- **Tissu animal**
- **Echantillon FFPE**

Ademtech
Bioparc BioGalien
27, allée Charles Darwin
33600 PESSAC
France

Tel: +33557020201
Fax +3355702020

Visit our Web site: www.ademtech.com

Smart D-N-Adem-Kit for cultured cells, buccal cells, animal tissues and FFPE samples.

Description générale 4

Smart D-N-Adem-Kit pour cellule ou tissu animal 4

Description du produit	4
Protocole Smart D-N-Adem-Kit	6
■ Procédure Smart D-N-Adem-Kit	6
■ Précautions générales	6
■ Protocole pour l'isolation d'ADNg	7
A partir de culture cellulaire	7
A partir de cellules buccales	7
A partir de tissu animal	8
A partir d'échantillon FFPE	9

Résolution des problèmes 14

Appendix: Détermination de la quantité d'ADN lié aux Smart-Adembeads 15

Garantie 16

Description générale

La technologie de séparation biomagnétique est une technique simple basée sur la séparation de **billes superparamagnétiques** à l'aide d'un champ magnétique. Lorsqu'elles sont ajoutées à un milieu complexe, les particules magnétiques se lient à la cible. Cette interaction est basée sur l'affinité spécifique du ligand à la surface des billes. Le complexe cible-bille résultant peut être retiré de la suspension à l'aide d'un aimant. Les avantages inhérents à la manipulation magnétique permettent un lavage, une séparation et une concentration faciles de la cible sans avoir besoin de centrifugation ou de colonnes.

Les **billes superparamagnétiques** ne présentent des propriétés magnétiques que lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique et ne présentent aucun magnétisme résiduel lorsqu'elles sont retirées de ce champ.

Protocole Smart D-N-Adem-Kit pour cellule et tissu

1. Description du produit

1.1. Description générale

Le Smart D-N-Adem-Kit est un système spécialement conçu pour la capture de l'ADNg et l'amplification directe sur des billes magnétiques. Les Smart-Adembeads ont un polymère spécifique et exclusif à leur surface, conçu pour la capture d'ADN par interactions électrostatiques et compatible avec la PCR directe et la PCR en temps réel sans avoir besoin d'effectuer une étape d'élution.

Les PBMC ou le sang sont mélangés avec le tampon de lyse. Les Smart-Adembeads se lient spécifiquement à l'ADNg. Les protéines et autres contaminants sont ensuite éliminés à l'étape de lavage. L'ADNg purifié lié aux Smart-Adembeads peut être utilisé directement pour les analyses PCR et PCR en temps réel. La procédure Smart D-N-Adem-Kit permet de nettoyer l'ADNg en moins de 10 minutes, étape de lyse incluse. L'isolement de l'ADN est réalisé sans phénol, éthanol, chloroforme et agents chaotropiques ; ainsi, l'ADNg purifié lié aux Smart-Adembeads démontre une amélioration des performances en aval en PCR et en qPCR. Contrairement à d'autres systèmes de purification, aucune élution de l'ADN n'est nécessaire, ce qui permet de maximiser la quantité de matrices disponibles pour la réaction en obtenant une

Smart D-N-Adem-Kit for cultured cells, buccal cells, animal tissues and FFPE samples.

plus grande sensibilité. Cette méthode rend ce kit idéal pour le traitement d'une petite quantité d'échantillons où la récupération maximale de l'ADN est essentielle.

1.2. Capacité du kit

Echantillon	Quantité de matériel de départ	Nb de purifications
Culture cellulaire / Cellules buccales	10- 5x10 ⁵	100 purifications
Tissu animal / FFPE	< 25mg	100 purifications

Table 1: Nb de purifications par quantité de matériel de départ

1.3. Réactifs fournis avec le kit

Le smart D-N-Adem-Kit inclut des réactifs pour réaliser 100 purifications d'ADNg. Les réactifs fournis sont listés ci-dessous.

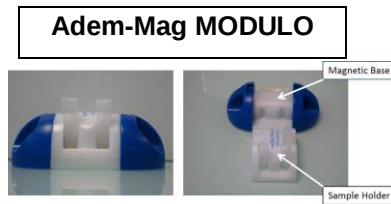
	Quantité	Contenu	Stockage
R1	0.5ml	Smart-Adembeads	+ 4°C
R2	0.1 ml	RNase A (2mg/ml)	+ 4°C
R3	0.5 ml	Proteinase K (10mg/ml)	+ 4°C
R4	15ml	Lysis Buffer	+ 4°C
R5	15 ml	Binding Buffer	+ 4°C
R6	20ml	Washing Buffer	+ 4°C
R7	5 ml	Amplification Buffer	+ 4°C

Table 2: Réactifs fournis avec le kit

Les kits stockés selon les recommandations d'Ademtech sont garantis jusqu'à la date d'expiration. Notez que l'expédition est réalisée à température ambiante ce qui n'affectera pas sa stabilité. Tous les composants du kit ont été préparés dans des conditions sans nucléases et ont été soigneusement testés pour assurer des performances optimales.

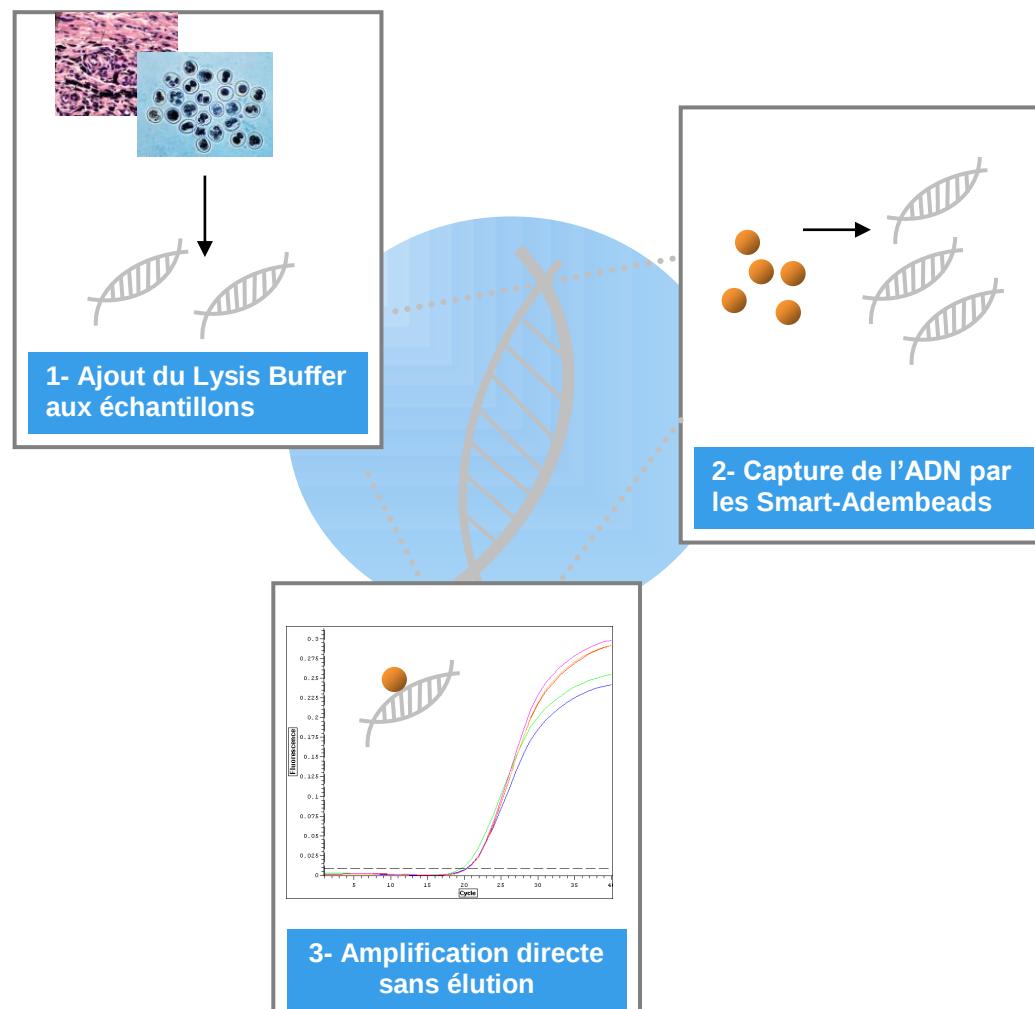
1.4. Matériel nécessaire (en complément du kit)

- Adem-Mag SV (#20101) ou Adem-Mag MODULO (#20105):
- Microtubes (Nuclease free)
- Cônes (Nuclease free)
- Gants stériles



2. Protocole Smart D-N-Adem-Kit

2.1. Procédure Smart D-N-Adem-Kit



2.2. Précautions générales

- Le Smart D-N-Adem-Kit ne convient que pour la capture et l'amplification directe de l'ADNg sur billes magnétiques à partir de petites quantités d'échantillons sans avoir besoin d'une étape d'élution.
- L'utilisation de mesures spectrophotométriques (A260/A280 nm) n'est pas recommandée car cette méthode est imprécise pour les faibles quantités d'ADN.
- Avant de commencer la procédure d'extraction, lire attentivement le paragraphe **2.3.6**.
- Avant de commencer la procédure d'extraction, tous les tampons devraient être à température ambiante pour une performance optimale.

2.3. Protocole pour l'isolation d'ADNg à partir de culture cellulaire, de cellules buccales, de tissu animal ou d'échantillon FFPE

2.3.1 Préparation de l'échantillon

Note:

- Le volume de Lysis Buffer doit représenter au moins 3 fois le volume de l'échantillon.
- Le volume de Binding Buffer doit être équivalent au volume de Lysis Buffer.

A partir de culture cellulaire: Un maximum de 5×10^5 cellules peut être utilisé

1. Collecter les cellules et transférer dans un microtube 1.5ml afin de les avoir dans un volume minimum de milieu de culture ou PBS (jusqu'à 1/5 du volume de Lysis Buffer, voir Table 4).
2. Ajouter 50µl à 150µl de Lysis Buffer (voir Table 4).
3. Ajouter 5µl de Proteinase K et 1µl de RNase. Mixer par pipetage (ou vortex) et incubé à température ambiante pendant 5 minutes.
4. Aller au paragraphe **2.3.2**.

A partir de cellules buccales:

a. Ecouvillon sec:

- 1- Ajouter de 200µl à 1ml de PBS 1X à l'écouvillon. Le volume doit permettre l'immersion de l'écouvillon.
- 2- Vortexer pendant 1 minute.
- 3- Centrifuger à vitesse maximum pendant 1 minute.
- 4- Eliminer le surnageant.
- 5- Ajouter 100µl de Lysis Buffer au culot et resuspendre les cellules.
- 6- Ajouter 5 µl de proteinase K et 1µl de RNase
- 7- Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
- 8- Ajouter 5µl de particules (Smart-Adembeads).
- 9- Add 100µl de Binding Buffer et incuber pendant 1 minute à température ambiante.
- 10- Aller au paragraphe **2.3.2.**

b. Ecouvillon de transport:

- 1- Vortexer pendant 1 minute.
- 2- Centrifuger à vitesse maximum pendant 1 minute.
- 3- Compresser l'écouvillon pour récupérer un maximum de volume puis retirer l'écouvillon.
- 4- Centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute.
- 5- Eliminer le surnageant.
- 6- Ajouter 100µl de Lysis Buffer et resuspendre les cellules.
- 7- Ajouter 5 µl de proteinase K et 1µl de RNase.
- 8- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- 9- Ajouter 5µl de particules (Smart Adembeads).
- 10-Ajouter 100µl de Binding Buffer et incuber pendant 1 minute à température ambiante.
- 11- Aller au paragraphe **2.3.2.**

A partir de tissu animal: Un maximum de 25mg peut être utilisé

- 1- Ajouter 100µl de Lysis Buffer et 5µl de Proteinase K dans un microtube 1.5ml. Agiter le tube (ou mixer par pipetage).
- 2- Immerger le tissu frais ou décongelé (<25mg) dans la solution de lyse et incubé pendant 5-10 minutes à température ambiante.

Note: Pour les tissus mous, la dilacération n'est pas nécessaire pour récupérer l'optimum d'ADNg.

- 3- Transférer la solution de lyse dans un nouveau tube 1.5ml.
- 4- Ajouter 1µl de RNase. Agiter le tube (ou mixer par pipetage) et incubé pendant 5 minutes à température ambiante.
- 5- Aller au paragraphe 2.3.2.

A partir de queue de rongeur, oreille et phalange: Un maximum de 0.5cm peut être utilisé

- 1- Ajouter 100µl de Lysis Buffer et 5µl de Proteinase K dans un microtube 1.5ml. Agiter le tube (ou mixer par pipetage).
- 2- Immerger le tissu frais ou décongelé (<0.5cm) dans la solution de lyse et incubé à 65°C pendant 1 heure.
- 3- Homogénéiser par pipetage ou vortex.

Note: La dilacération par pipetage peut améliorer le rendement d'ADNg récupéré à partir des tissus durs (cartilage).

- 4- Transférer la solution de lyse dans un nouveau tube 1.5ml.
- 5- Ajouter 1µl de RNase. Agiter le tube (ou mixer par pipetage) et incubé pendant 5 minutes à température ambiante.
- 6- Aller au paragraphe 2.3.2.

Note:

- Se référer à la Table 3 et Table 4 pour la quantité recommandée de réactifs.
- Pour gagner du temps, un pré-mélange de Lysis Buffer, Proteinase K et RNase peut être préparé puis ajouté

directement à l'échantillon. Attention, la RNase doit être ajouté en dernier pour éviter sa dégradation précoce par la Proteinase K.

D. A partir de tissus FFPE (formaldehyde-fixed, paraffin-embedded)

Échantillon déparaffiné (une alternative peut être de plonger l'échantillon dans les bains des différentes solutions).

Étape de déparaffinisation et de réhydratation de l'échantillon.

- 1- Ajouter 500µl de toluene ou xylene sur la coupe (garder la tranche horizontale).

Le traitement au Toluene retire complètement la paraffine des coupes.



Toluene / Xylene est une substance toxique; ne le manipuler que dans un endroit bien ventilé à l'aide d'un équipement de protection individuelle. Éliminer les déchets de toluène ou de xylène conformément à la réglementation applicable.

- 2- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- 3- Éliminer le toluene par pipetage.
- 4- Répéter les étapes 1 et 2 deux fois additionnels.
- 5- Ajouter 500µl d'éthanol absolu sur la coupe.
L'éthanol élimine le toluene de l'échantillon.
- 6- Incuber 5 minutes à température ambiante .
- 7- Éliminer l'éthanol par pipetage .
- 8- Répéter les étapes 5, 6 et 7.
- 9- Ajouter 500µl d'éthanol 70% sur la coupe.
- 10- Incuber 5 minutes à température ambiante .
- 11- Éliminer l'éthanol 70%.
- 12- Ajouter 500µl d'eau ultrapure (DNase / RNase free).
- 13- Incuber 5 minutes à température ambiante .
- 14- Éliminer l'eau.

Etapes de purification de l'ADNg

- 1- Resuspendre les coupes dans 100 à 150µl de Lysis Buffer et transférer le tissu dans un nouveau tube (Pour une meilleure récupération de tissu, gratter avec un scalpel) (voir Table 4).
- 2- Ajouter 5µl Proteinase K et 1µl RNase.
- 3- Incuber pendant 15 - 30 minutes à température ambiante ou à 65°C (pour une lyse optimale des grosses coupes).
- 4- Ajouter 5µl de Smart-Adembeads.
- 5- Ajouter 100 ou 150µl de Binding Buffer (ce volume doit être équivalent au volume de Lysis Buffer) et incuber pendant 1 minute à température ambiante (voir Table 4).
- 6- Aller au paragraphe **2.3.3**.

Note: L'ADN isolé à partir d'échantillons FFPE est généralement de poids moléculaire inférieur à celui de l'ADN provenant d'échantillons frais ou congelés. Le degré de fragmentation dépend du type et de l'âge de l'échantillon et des conditions utilisées pour la fixation.

2.3.2 Capture de l'ADN

- 1- Ajouter 1µl à 5µl de Smart-Adembeads homogénéisées (voir Table 3 et Table 4).
- 2- Ajouter 50 µl à 150µl de Binding Buffer et homogénéiser par vortex (voir Table 3 et Table 4). Incuber à temperature ambiante pendant 1 minute.

Note:

- Il est important de NE PAS augmenter la durée d'incubation, cela pourrait réduire l'efficacité de capture.
- Pour gagner du temps, un pré-mélange contenant les Smart-Adembeads et le Binding Buffer peut être préparé puis ajouté directement aux lysats.

2.3.3 Lavage des complexes [ADN-Smart-Adembeads]

- 1- Placer le tube sur l'aimant pendant au moins 1 minute ou jusqu'à la clarification du surnageant. Eliminer le surnageant. Retirer le tube de l'aimant et ajouter 100µl de Washing Buffer. Mixer par pipetage.
- 2- Répéter une fois l'étape 1 en utilisant de nouveau 100µl de Washing Buffer.

Note: Lors de l'élimination du surnageant, commencer par pipeter la mousse potentiellement présente.

2.3.4 Resuspension des complexes [ADN-Smart-Adembeads]

- 1- Placer le tube sur l'aimant pendant au moins 1 minute ou jusqu'à clarification du surnageant. Eliminer lentement le surnageant.
- 2- Resuspendre les billes dans 10 à 50µl d'Amplification Buffer et mixer par pipetage (voir Table 3 et Table 4).

Note: Une formation d'agrégats due à la capture de l'AND sur les billes peut être observée. Ces agrégats sont facilement resuspendus par pipetage.

- 3- Utiliser la solution finale directement en PCR et Real-Time PCR (voir recommandations dans le paragraphe 2.3.6) et/ou stocker à -20°C (long terme).

2.3.5 Choisir la quantité de départ

Cells number	*10 - 10 ²	10 ² – 25x10 ³	25x10 ³ - 10 ⁵	10 ⁵ – 5x10 ⁵
Lysis Buffer	50µl	50µl	100µl	150µl
Proteinase K	5µl	5µl	5µl	5µl
RNase	1µl	1µl	1µl	1µl
Smart-Adembeads	1µl	5µl	5µl	5µl
Binding Buffer	50µl	50µl	100µl	150µl
Washing Buffer (x2)	100µl	100µl	100µl	100µl
Amplification Buffer	10µl	50µl	50µl	50µl

Table 3: Quantité de tampons pour la préparation d'ADNg à partir de culture cellulaire

*Pour les très petites quantités de départ (moins de 10 cellules), resuspendre les complexes ADN-billes dans 5µl d'Amplification Buffer et l'utilisation de la totalité du volume pour la détection PCR est recommandée.

Tissu animal	Queue, oreille, phalange	Echantillon FFPE	Autre tissu (< 25mg)
Lysis Buffer	100µl	100-150µl	100µl
Proteinase K	5µl	5µl	5µl
RNase	1µl	1µl	1µl
Smart Adembears	2µl	5µl	5µl
Binding Buffer	100µl	100-150µl	100µl
Washing Buffer (x2)	100µl	100µl	100µl
Amplification Buffer	20-50µl	50µl	50µl

Table 4: Quantité de tampons pour la préparation d'ADNg à partir de tissu

2.3.6 Recommandations pour l'amplification directe sur Smart-Adembears

■ Précautions générales pour la PCR

Bien homogénéiser la solution finale (complexes gDNA/Billes dans l'Amplification Buffer).

Ajouter les volumes dans la solution précédente dans le mix PCR (voir dessous).

Réaliser la réaction PCR selon les recommandations du fabricant.

S'assurer que le nombre de cycles est suffisant et que les primers ont été testés et validés pour l'amplification de petites quantités d'ADN.

Nous recommandons d'effectuer d'abord une qPCR longue (50 cycles) au lieu de la qPCR standard (35-40 cycles) Si l'échantillon de départ représente une faible quantité d'ADN, les méthodes d'analyse pour la quantification et la détection doivent être bien adaptées. La «Nested-PCR» peut être utilisée à la place de la PCR standard.

■ Pour la PCR standard:

A partir de cellules ou tissu animal, utiliser 1-5µl de solution finale (complexes ADNg/Billes dans l'Amplification Buffer) est recommandé pour 25 ou 50µl de volume réactionnel de PCR.

■ Pour la détection par Real-Time PCR:

A partir de cellules ou tissu animal, Utiliser 1-5µl de solution finale (complexes ADNg/Billes dans l'Amplification Buffer) est recommandé pour 25 µL de volume réactionnel de PCR ou 1-10µl de solution finale (complexes ADNg/Billes dans l'Amplification Buffer) pour 50µl de volume réactionnel de PCR.

■ **Pour la quantification par Real-Time PCR:**

A partir de cellules, la quantité de matériel de départ ne doit pas excéder 5×10^3 cells. Nous recommandons de diluer l'échantillon de départ dans du PBS ou du milieu de culture. Attention, le volume de départ utilisé ne doit pas excéder 1/5 du volume de Lysis buffer.

Pour quantifier l'ADN, les volumes suivants sont recommandés,

- * utiliser 1-3µl de solution finale (complexes ADNg/Billes dans l'Amplification Buffer) pour 25µl de volume réactionnel de PCR.
- * utiliser 1-5µl de solution finale (complexes ADNg/Billes dans l'Amplification Buffer) pour 50µl de volume réactionnel de PCR.

Résolution des problèmes

Pas ou peu de produits PCR détectés après la PCR ou la qPCR.

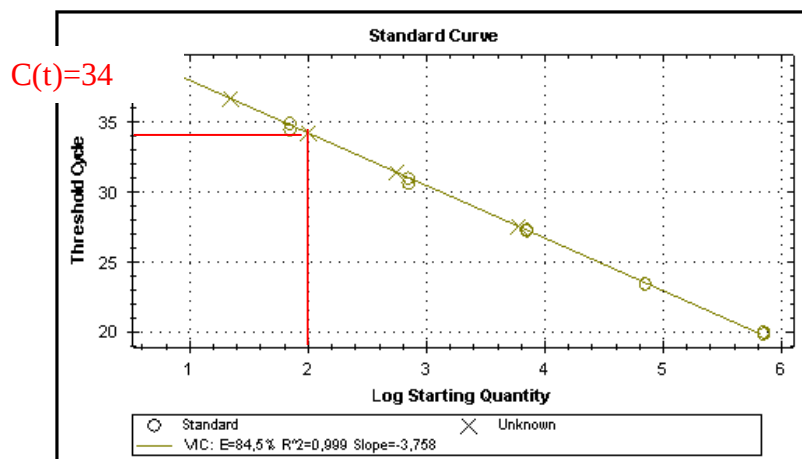
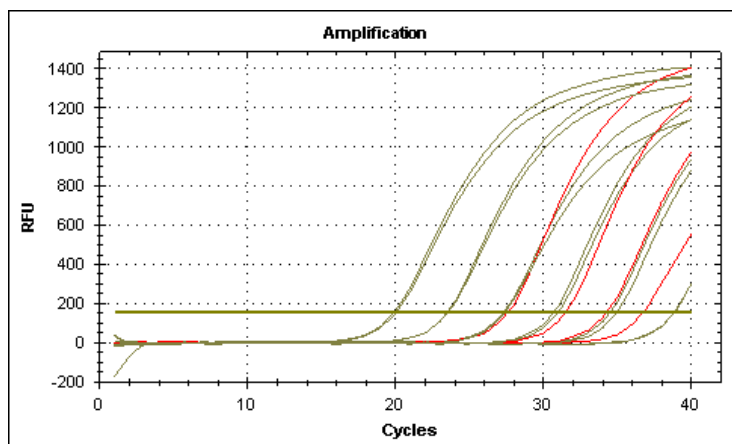
- **Dégradation de l'ADN:** Le procédé doit être réalisé dans un environnement sans nuclease.
- **Optimiser l'étape de lyse:** A partir de PBMC, la durée d'incubation peut être augmenté de 5 à 10 minutes additionnelles.
- **Optimiser l'étape de lavage:** A partir de sang total, les billes doivent être correctement resuspendues dans le Washing Buffer afin d'éliminer l'hémoglobine qui est un inhibiteur de PCR.
- **Trop de complexes ADNg/Billes utilisés comme base de PCR:** Diminuer le volume de la solution finale (complexes ADNg/Billes dans l'Amplification Buffer) qui est utilisé pour la réaction de PCR.
- **Optimiser les paramètres de la PCR ou de la qPCR:**
 - Pour de meilleurs résultats, la première étape de PCR (dénaturation initiale) peut être augmentée de 3 à 5 minutes.
 - Les paramètres d'optimisation incluent le design des primers, leur concentration, le design de la sonde et sa concentration.
 - Pour de meilleurs résultats, les amplicons produits devraient être inférieur à 150 bp.
 - Augmenter le nombre de cycles PCR.
 - Déterminer la température d'appariement optimum pour les primers lors des cycles PCR.

- Pour des amplicons de grandes tailles, une DNA polymerase adéquate est recommandée.

Appendix: Détermination de la quantité d'ADN liée aux Smart-Adembeads

- La mesure par UV spectrometrique (A260/A280 nm) n'est pas recommandée. Cette méthode est imprécise pour les faibles concentrations d'ADN.
- Real-Time PCR est l'approche la plus appropriée et précise pour déterminer les quantités d'ADN. **Utiliser une courbe étalon** préparée à partir d'une dilution en série d'un échantillon de référence. Préparer une dilution standard d'ADN génomique de référence.

Note: Idéalement une courbe étalon est constituée de 4 points, et chaque point déterminé en duplicat.



Garantie

Les produits sont garantis à l'acheteur original uniquement pour être conformes à la qualité et au contenu indiqués sur le flacon et les étiquettes extérieures pendant la durée de conservation indiquée.

L'obligation d'Ademtech et le recours exclusif de l'acheteur dans le cadre de cette garantie se limitent soit au remplacement, aux frais d'Ademtech, de tout produit présentant un défaut de fabrication et renvoyé à Ademtech, transport prépayé, soit, au choix d'Ademtech, au remboursement du prix d'achat.

Les réclamations pour les marchandises endommagées pendant le transport doivent être soumises au transporteur.



Smart D-N-Adem-Kit

For cells and animal tissues

(cat #06121)

**Instruction manual for
gDNA capture and direct amplification**

- **Cultured cells**
- **Buccal cells**
- **Animal Tissues**
- **FFPE Samples**

Ademtech
Bioparc BioGalien
27, allée Charles Darwin
33600 PESSAC
France

Tel: +33557020201
Fax +3355702020

Visit our Web site: www.ademtech.com

Smart D-N-Adem-Kit for cultured cells, buccal cells, animal tissues and FFPE samples.

Table of contents

General Overview **4**

Smart D-N-Adem-Kit for Cells and Animal Tissues **4**

Product Description	4
Smart D-N-Adem-Kit Protocol	6
■ Smart D-N-Adem-Kit procedure	6
■ General Guidelines	6
■ Protocol for gDNA isolation from cells and tissues	7
A. From cultured cells	7
B. From buccal cells	7
C. From animal tissues	8
D. From FFPE samples	9

Troubleshooting **14**

Appendix: Determination of the yield of DNA bound on Smart-Adembeads **15**

Warranty **16**

General Overview

Biomagnetic separation technology is a simple technique based on the separation of **superparamagnetic beads** using a magnetic field. When added to a complex medium, the magnetic particles will bind to the target. This interaction is based on the specific affinity of the ligand to the surface of the beads. The resulting target-bead complex can be removed from the suspension using a magnet. The inherent benefits of magnetic handling allow for easy washing, separation and concentration of the target without any need of centrifugation or columns.

Superparamagnetic beads exhibit magnetic properties only when placed within a magnetic field and show no residual magnetism when removed from this field.

Smart D-N-Adem-Kit for Cells and Tissues

2. Product Description

2.4. General Description

The Smart D-N-Adem-Kit is a new system which is specially designed for the capture of gDNA and direct amplification on magnetic beads. Smart-Adembeads have a specific and proprietary polymer on their surface, designed for DNA capture by electrostatic interactions and compatible with direct PCR and Real-Time PCR without the need to perform an elution step.

Animal tissues or cells are mixed with the Lysis Buffer. Smart-Adembeads bind specifically to the gDNA. Proteins and other contaminants are then eliminated in the washing step. The purified gDNA bound to the Smart-Adembeads can be used directly for PCR and Real-Time PCR analyses. The Smart D-N-Adem-Kit procedure allows cleaning gDNA in less than 10 minutes, lysis step included. DNA isolation is achieved without phenol, ethanol, chloroform and ionic chaotropes; thus the purified gDNA bound to the Smart-Adembeads demonstrates improved downstream performance in PCR and qPCR. Unlike other purification systems, no elution of the DNA is required, making it possible to maximize the amount of templates available for the reaction achieving greater sensitivity. This method makes this Kit ideal for processing small amount of samples where maximum DNA recovery is critical.

2.5. Kit capacities

Sample	Amount of starting material	Number of isolation
Cultured cells / buccal cells	10- 5x10 ⁵	100 isolations
Animal Tissues / FFPE samples	Up to 25mg	100 isolations

Table 1: Number of isolation per amount of starting material

2.6. Reagents provided with the kit

The smart D-N-Adem-Kit includes reagents for performing 100 gDNA isolations. The provided reagents are listed below.

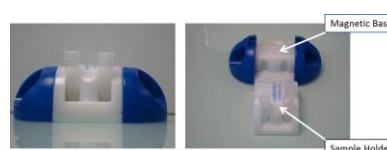
	Amount	Component	Storage
R1	0.5ml	Smart-Adembeads	+ 4°C
R2	0.1 ml	RNase A (2mg/ml)	+ 4°C
R3	0.5 ml	Proteinase K (10mg/ml)	+ 4°C
R4	15ml	Lysis Buffer	+ 4°C
R5	15 ml	Binding Buffer	+ 4°C
R6	20ml	Washing Buffer	+ 4°C
R7	5 ml	Amplification Buffer	+ 4°C

Table 2: Reagents provided with the kit

Properly stored Kits are guaranteed until the expiration date. Note that the shipping is realized at room temperature which will not affect its stability. All the components of the kit have been prepared under nucleases free conditions and have been thoroughly tested to ensure optimal performance.

2.7. Required equipment (not supplied as part of the kit)

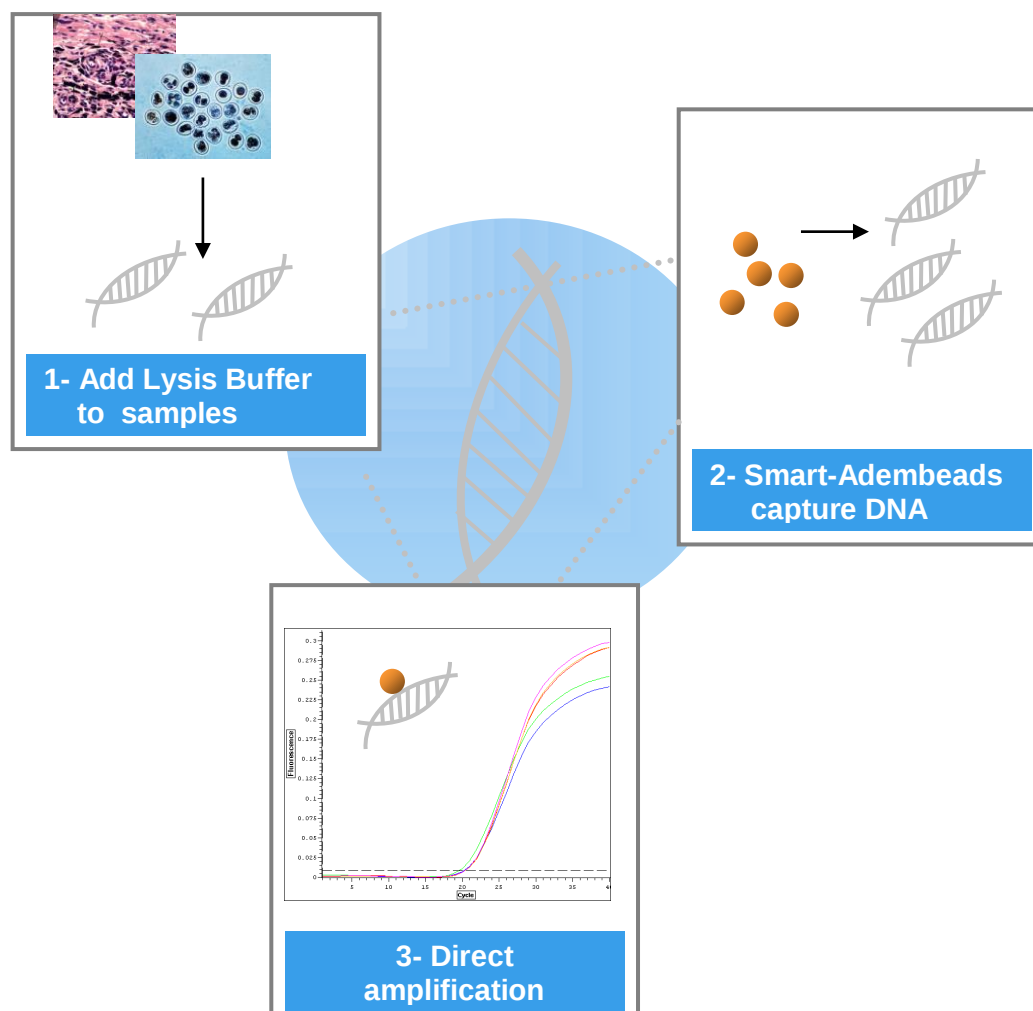
- Adem-Mag SV (#20101) or Adem-Mag MODULO (#20105):
- Nuclease free microtubes
- Nuclease free tips
- Disposable glove



Adem-Mag MODULO

3. Smart D-N-Adem-Kit Protocol

3.1. *Smart D-N-Adem-Kit procedure*



3.2. *General Guidelines*

- The Smart D-N-Adem-Kit is suitable only for capture and direct amplification of gDNA on magnetic beads from small amounts of samples without the need for an elution step.
- Using UV spectrophotometric measurements (A260/A280 nm), is not recommended as this method is inaccurate for low DNA.
- Before starting the gDNA extraction procedure, carefully read the paragraph **2.3.6**.
- Before starting the gDNA extraction procedure all buffers should be at room temperature to attain optimal performances.

3.3. Protocol for gDNA isolation from cultured cells, buccal cells, animal tissues and FFPE samples

2.3.1 Sample Preparation

Note:

- The volume of Lysis Buffer must represent at least 3 times the sample volume.
- The volume of Binding Buffer must be equal to volume of Lysis Buffer.

A. From cultured cells: Procedure described up to 5×10^5 cells

5. Collect the cells and transfer them to a 1.5ml microcentrifuge tube in order to have them in a minimal volume of culture media or PBS (up to 1/5 of the Lysis Buffer volume, see Table 3).
6. Add 50µl to 150µl of Lysis Buffer (see Table 3).
7. Add 5µl of Proteinase K and 1µl of RNase. Mix by pipetting (or flick the tube) and incubate at room temperature for 5 minutes.
8. Go to paragraph **2.3.2.**

B. From buccal cells:

a. Dry swab

- 1- Add 200µl to 1ml of PBS 1X to the swab sample. Choose the right volume in order to immerse the swab.
- 2- Vortex for 1 minute.
- 3- Centrifuge at maximal speed for 1 minute.
- 4- Remove the supernatant.
- 5- Add 100µl of Lysis Buffer to the pellet and resuspend cells.
- 11- Add 5 µl of proteinase K and 1µl of RNase
- 12- Incubate at room temperature for 5 minutes.
- 13- Add 5µl of particles (Smart Adembeads).
- 14- Add 100µl of Binding Buffer and incubate for 1 minute at room temperature.
- 15- Go to paragraph **2.3.2.**

b. Transport swab.

- 10- Vortex for 1 minute.
- 11- Centrifuge at maximal speed for 1 minute.
- 12- Press and remove the swab as much as possible in order to recover the maximum of liquid.
- 13- Centrifuge at maximal speed for 1 minute.
- 14- Remove the maximum of liquid.
- 15- Add 100µl of Lysis Buffer and resuspend cells.
- 16- Add 5 µl of proteinase K and 1µl of RNase.
- 17- Incubate for 5 minutes at room temperature.
- 18- Add 5µl of particles (Smart Adembeads).
- 10- Add 100µl of Binding Buffer and incubate for 1 minute at room temperature.
- 11- Go to paragraph **2.3.2.**

C. From animal tissues: Procedure described up to 25mg

- 6- Add 100µl of Lysis Buffer and 5µl of Proteinase K to a 1.5ml microcentrifuge tube. Flick the tube (or mix by pipetting).
- 7- Immerse fresh or thawed tissues (up to 25mg) in the lysis solution and incubate at room temperature for 5-10 minutes.

Note: Dilaceration is not necessary for optimal gDNA recovery from soft tissues.

- 8- Remove and transfer the lysis solution to a new 1.5ml microcentrifuge tube.
- 9- Add 1µl of RNase. Flick the tube (or mix by pipetting) and incubate at room temperature for 5 minutes.
- 10- Go to paragraph **2.3.2.**

From rodent tail, ears and phalanx: Procedure described up to 0.5cm

- 4- Add 100µl of lysis buffer and 5µl Proteinase K to a 1.5ml microcentrifuge tube. Flick the tube (or mix by pipetting).
- 5- Immerse fresh or thawed tissues (up to 0.5cm) in the lysis solution and incubate at 65°C for 1 hour.
- 6- **Homogenize by pipetting or vortex** (high speed).

Note: Dilaceration by pipetting can improve gDNA recovery from hard tissues (cartilaginous tissues).

- 7- Remove and transfer the lysis solution to a new 1.5ml microcentrifuge tube.
- 8- Add 1µl of RNase. Flick the tube (or mix by pipetting) and incubate at room temperature for 5 minutes.
- 9- Go to paragraph **2.3.2**.

Note:

- Refer to Table 3 and Table 4 for the recommended amount of reagents.
- To save time, a solution containing Lysis Buffer, Proteinase K and RNase can be prepared and added directly to the starting samples. Caution, RNase should be added in the last to avoid its early degradation by Proteinase K.

D. From formaldehyde-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues

Deparaffined sample (an alternative can be to plunge sample into baths of the various solutions).

Sample deparaffinization and rehydration step.

- 15-Add 500µl of toluene or xylene to the section (keep the slide horizontal).
Toluene treatment completely removes paraffin from the sections.



Toluene or Xylene is a toxic substance; handle it only in a well ventilated area using personal protection equipment. Dispose of toluene or xylene waste according to applicable regulations.

Smart D-N-Adem-Kit for cultured cells, buccal cells, animal tissues and FFPE samples.

16-Incubate for 5 minutes at room temperature.

17-Remove the toluene by pipetting.

18-Repeat twice steps 1 and 2.

19-Add 500µl of absolute ethanol to the section.

The ethanol washes remove toluene from the sample.

20-Incubate for 5 minutes at room temperature.

21-Remove the ethanol by pipetting.

22-Repeat steps 5, 6 and 7.

23-Add 500µl of 70% ethanol to the section.

24-Incubate for 5 minutes at room temperature.

25-Remove the 70% ethanol.

26-Add 500µl of water DNase / RNase free.

27-Incubate for 5 minutes at room temperature.

28-Remove the water.

Protocol purification of gDNA

1- Resuspend the section with 100 to 150µl of Lysis Buffer and transfer the tissue into a new tube (For optimal recovery of tissue, scrape it with a scalpel) (see Table 4).

2- Add 5µl Proteinase K and 1µl RNase.

7- Incubate for 15 - 30 minutes at room temperature or at 65°C for optimal lysis of large section.

8- Add 5µl of Nucleo-Adembeads.

9- Add 100 or 150µl of Binding Buffer (this volume must be equal to that of the Lysis Buffer) and incubate for 1 minute at room temperature (see Table 4).

10- Go to paragraph 2.3.3.

Note: DNA isolated from FFPE samples is usually of lower molecular weight than DNA from fresh or frozen samples. The degree of fragmentation depends on the type and age of the sample and the conditions used for fixation.

2.3.3 DNA Capture

- 3- Add 1µl to 5µl of homogenized Smart-Adembeads (see Table 3 or Table 4).
- 4- Add 50µl to 150µl of Binding Buffer (this volume must be equal to that of the Lysis Buffer) and homogenize by pipetting (see Table 3 or Table 4). Incubate at room temperature for 1 minute.

Note:

- It is important not to increase the incubation time, that could decrease the efficiency of DNA capture.
- To save time, a solution containing Smart-Adembeads and Binding Buffer can be prepared and added directly to your lysed samples.

2.3.6 Wash [DNA Smart-Adembeads] complexes

- 3- Place the tube on the magnet for at least 1 minute or until supernatant clearing and discard the supernatant. Remove the tube from the magnet and add 100µl of Washing Buffer and mix by pipetting.
- 4- Repeat once step 1 using 100µl of Washing Buffer.

Note: When removing the supernatant, start by pipetting the potentially formed foam.

2.3.7 Resuspension [DNA Smart-Adembeads] complexes

- 4- Place the tube on the magnet for at least 1 minute or until supernatant clearing and discard slowly the supernatant.
- 5- Resuspend beads in 10 to 50µl of Amplification Buffer and mix by pipetting (see Table 3 or Table 4).

Note: You may observe the formation of aggregates, due to DNA capture by beads, which can be easily resuspended by pipetting.

- 6- Use the final solution directly for PCR and Real-Time PCR (see recommendations in paragraph 2.3.6) or/and store it at -20°C (long-term storage).

2.3.8 Choose your own starting point

Cells number	*10 - 10 ²	10 ² – 25x10 ³	25x10 ³ - 10 ⁵	10 ⁵ – 5x10 ⁵
Lysis Buffer	50µl	50µl	100µl	150µl
Proteinase K	5µl	5µl	5µl	5µl
RNase	1µl	1µl	1µl	1µl
Smart-Adembeads	1µl	5µl	5µl	5µl
Binding Buffer	50µl	50µl	100µl	150µl
Washing Buffer (x2)	100µl	100µl	100µl	100µl
Amplification Buffer	10µl	50µl	50µl	50µl

Table 3: Buffer amounts for DNA preparation from Cultured cells

*For very small starting sample (less than 10 cells), resuspend the DNA/beads complexes in 5µl of amplification buffer and use all of the solution for PCR detection.

Animal tissues	Tail, ears, phalanx	FFPE Samples	All others tissues (up to 25mg)
Lysis Buffer	100µl	100-150µl	100µl
Proteinase K	5µl	5µl	5µl
RNase	1µl	1µl	1µl
Smart Adembeads	2µl	5µl	5µl
Binding Buffer	100µl	100-150µl	100µl
Washing Buffer (x2)	100µl	100µl	100µl
Amplification Buffer	20-50µl	50µl	50µl

Table 4: Buffer amounts for DNA preparation from animal tissues

2.3.6 Recommendations for direct DNA amplification on Smart-Adembeads

■ General guidelines for PCR

- 1- Homogenize the final solution thoroughly (gDNA/Beads complexes in Amplification Buffer).
- 2- Add the volumes of the previous solution (see below) to the PCR mixtures.
- 3- Perform your PCR reactions following manufacturer's recommendations.



Make sure the number of cycles is sufficient and the primers have been tested and are satisfactory quality for amplification of small quantities of DNA.

- 4- We recommend performing first long qPCR (50 cycles) instead of standard qPCR (35-40 cycles)
- 5- If starting sample represents a low quantity DNA then analysis methods for quantification and detection must be well adapted. “Nested PCR” can be used instead of standard PCR.

■ **Performing Standard PCR:**

From cells and animal tissues, 1-5µl of the final solution (gDNA/Beads complexes in Amplification Buffer) is recommended for 25µl or 50µl PCR reaction.

■ **Performing Real-Time PCR for detection:**

From cells and animal tissues, 1-5µl of the final solution (gDNA/Beads complexes in Amplification Buffer) is recommended for a 25µl PCR reaction or 1-10µl of the final solution (gDNA/Beads complexes in Amplification Buffer) for a 50µl PCR reaction.

■ **Performing Real-Time PCR for quantification:**

From cells, the starting quantity of sample should not exceed 5×10^3 cells. We recommend diluting your starting sample in PBS or culture media. Remember, the diluted starting sample must not exceed 1/5 of the Lysis Buffer volume.

To quantify DNA, the following volumes are recommended,

- *1-3µl of the final solution (gDNA/Beads complexes in Amplification Buffer) for a 25µl PCR reaction.
- *1-5µl of the final solution (gDNA/Beads complexes in Amplification Buffer) for a 50µl PCR reaction.

Troubleshooting

No or low amounts of PCR products detected after standard PCR or qPCR.

- **DNA degradation:** Ensure that the deparaffined sample and the process is completed in a nuclease free environment to avoid introducing any nucleases during the procedure or later handling.
- **Optimize the lysis step:**

The volume of Lysis Buffer must represent at least 3 times the sample volume.

From animal tissues, incubation time should be increased until 1 hour at room temperature or 65°C if necessary.
- **Binding of nucleic acid:** Binding of nucleic acid is optimal when volume of Binding Buffer is equal to volume of Lysis Buffer.
- **Too much gDNA/beads complexes used as PCR templates:**

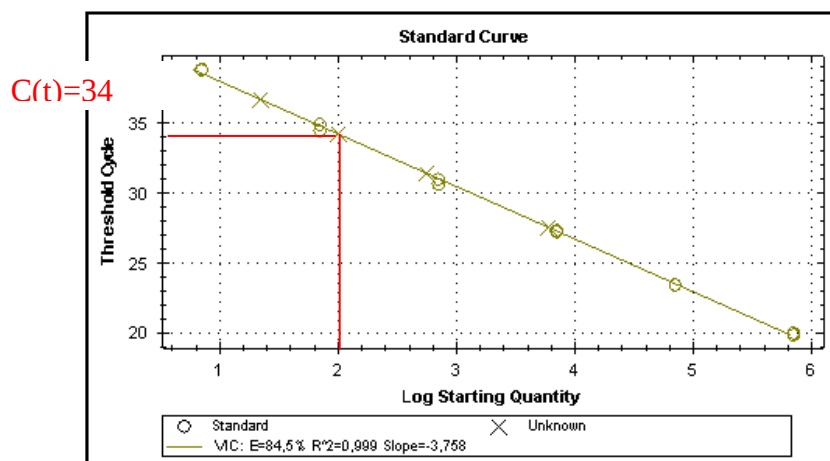
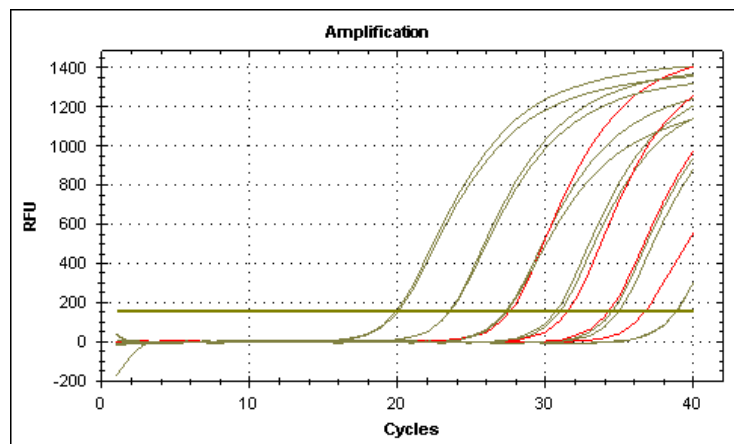
Decrease the volume of the final solution (gDNA/beads in Amplification Buffer) that is introduced in PCR reactions.
- **Optimize the qPCR or PCR assay:**
 - For results improvement, the first PCR step (initial denaturation) could be increased at 3 to 5 minutes.
 - Optimization parameters include primer design, primer concentration, probe design and probe concentration.
 - For better results, primers should be designed in order to introduce amplicons <150 bp for qPCR.
 - If starting sample represents a low quantity DNA then analysis methods for quantification and detection must be well adapted.

Example: use “nested PCR” instead of standard PCR, perform long qPCR (50 cycles) instead of standard qPCR (35-40 cycles).
 - Increase the number of PCR cycles: 40-45 for FFPE samples and tissues.
 - Determine the optimal primer binding temperature for the PCR cycling program.
 - For long strength fragment, a more processive DNA polymerase is recommended.
 - For PCR and qPCR, primers must be of an excellent quality especially for FFPE samples and tissues.

Appendix: Determination of the yield of DNA bound onto Smart-Adembeads

- We do not recommend using UV spectrometric measurements (A260/A280 nm), this method is inaccurate for low DNA concentrations.
- Real-Time PCR is the most appropriate and precise approach for determining DNA yields. **Use a standard curve** that is prepared from a dilution series of a reference template. Prepare a standard dilution with a genomic reference DNA.

Note: Ideally a standard curve consists of at least 4 points, and each concentration should be run at least in duplicate.



$[DNA]=100ng$

Warranty

This product is only for use in research. The purchaser is responsible to validate the performance of this product for any particular use, and to use the product in compliance with any applicable regulations.

The products are warranted to the original purchaser only to conform to the quality and contents stated on the vial and outer labels for duration of the stated shelf life. Ademtech's obligation and the purchaser's exclusive remedy under this warranty is limited either to replacement, at Ademtech's expense, of any products which shall be defective in manufacture, and which shall be returned to Ademtech, transportation prepaid, or at Ademtech's option, refund of the purchase price. Claims for merchandise damaged in transit must be submitted to the carrier.