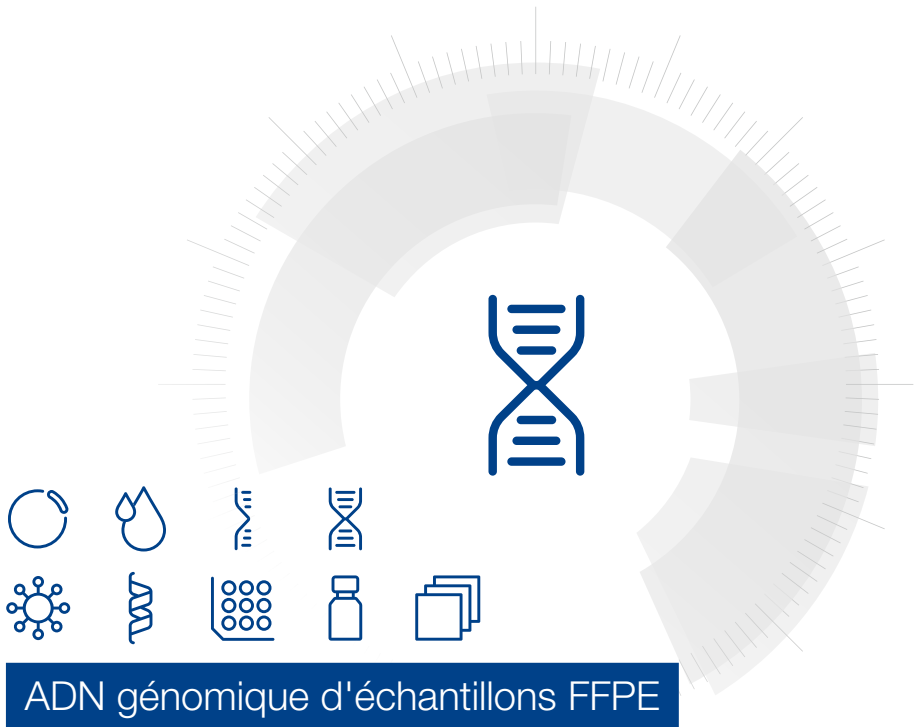


MACHEREY-NAGEL

# Manuel d'utilisation



## ADN génomique d'échantillons FFPE

■ NucleoMag® DNA FFPE

Novembre 2023 / Rev. 04

## Contact MN

### Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG  
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany  
Tel.: +49 24 21 969-0  
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)  
E-mail: [info@mn-net.com](mailto:info@mn-net.com)

### Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-333  
E-mail: [support@mn-net.com](mailto:support@mn-net.com)

### USA

MACHEREY-NAGEL Inc.  
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA  
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)  
E-mail: [sales-us@mn-net.com](mailto:sales-us@mn-net.com)

### France

MACHEREY-NAGEL SAS  
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France  
Tel.: +33 388 68 22 68  
E-mail: [sales-fr@mn-net.com](mailto:sales-fr@mn-net.com)

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €  
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

### Switzerland

MACHEREY-NAGEL AG  
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland  
Tel.: +41 62 388 55 00  
E-mail: [sales-ch@mn-net.com](mailto:sales-ch@mn-net.com)

# Sommaire

1 Composants	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, équipements et consommables à fournir par l'utilisateur	5
1.3 A propos de ce manuel	5
2 Description du produit	6
2.1 Principe général	6
2.2 Caractéristiques du kit	6
2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons	7
2.4 Systèmes de séparation magnétique	8
2.5 Réglage des paramètres de l'agitateur	8
2.6 Manipulation des billes	9
2.7 Utilisation de la protéinase K	10
2.8 Procédures d'éluion	10
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	11
4 Instructions de sécurité	12
4.1 Elimination des déchets	12
5 Protocole d'extraction de l'ADN génomique à partir de tissus	13
6 Annexes	19
6.1 Guide de résolution des problèmes	19
6.2 Informations de commande	21
6.3 Restriction de l'utilisation du produit / garantie	22

# 1 Composants

## 1.1 Contenu du kit

<b>NucleoMag® DNA FFPE</b>		
<b>REF</b>	<b>1 × 96 prep. 744320.1</b>	<b>4 × 96 preps 744320.4</b>
Billes NucleoMag® B-Beads	1,8 mL	4 × 1,8 mL
Tampon de lyse FL	30 mL	4 × 30 mL
Tampon de liaison MB2	100 mL	500 mL
Tampon de lavage MB4	75 mL	300 mL
Tampon d'éluion MB6	30 mL	125 mL
Protéinase K (lyophilisée)*	75 mg	4 × 75 mg
Tampon de protéinase PB	15 mL	35 mL
Tampon de dissolution de la paraffine « Paraffin Dissolver » (bleu)	60 mL	2 × 125 mL
Tampon de décrosslink D-Link	30 mL	2 × 30 mL
Manuel d'utilisation	1	1

\* Pour la préparation des réactifs et les conditions de stockage, voir le chapitre 3.

## 1.2 Réactifs, équipements et consommables à fournir par l'utilisateur

### Réactifs

- 80 % d'éthanol

### Équipement / Consommables

Produit	REF	Conditionnement
<b>Système de séparation magnétique</b> p.e. NucleoMag <sup>®</sup> SEP (voir paragraphe 2.4)	744900	1
<b>Plaque pour la séparation des billes magnétiques,</b> p.e. Square-well Block (bloc 96 puits avec des puits carrés de 2,1 mL)	740481 740481.24	4 24
<b>Barrettes de tubes pour l'incubation des échantillons et la lyse,</b> p.e. Rack of Tubes Strips (1 set comprend 1 Rack, 12 barrettes de 8 tubes chacun (puits de 1,2 mL) et 12 barrettes de 8 bouchons)	740477 740477.24	4 sets 24 sets
<b>Plaque d'éluion pour la collecte d'acides nucléiques purifiés,</b> Plaque d'éluion à 'fond en U' (96 puits de 0,3 mL)	740486	24
Plaque d'éluion à 'fond plat' (96 puits de 0,3 mL)	740673	20
<b>Pour l'utilisation du kit sur le KingFisher<sup>®</sup> 96 :</b> Set d'accessoires 'KingFisher <sup>®</sup> 96 Accessory Kit A' (Square-well Blocks, Tip Combs, Plaques d'éluion pour 4 × 96 preps NucleoMag <sup>®</sup> DNA FFPE pour le système KingFisher <sup>®</sup> 96)	744950	1 set

## 1.3 A propos de ce manuel

Il est recommandé de lire attentivement les instructions de ce manuel avant toute utilisation. Toute la documentation technique est également disponible sur Internet à l'adresse suivante [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com).

Veuillez contacter le service technique pour obtenir des informations sur les modifications apportées de ce manuel d'utilisation par rapport aux révisions précédentes.

## 2 Description du produit

Les échantillons de tissus fixés à la formaline et inclus en paraffine (dits 'FFPE' : Formalin-fixed paraffin-embedded) sont couramment préparés à partir d'échantillons de tissus chirurgicaux humains par fixation à la formaline suivie d'une inclusion dans la paraffine. De fines coupes d'échantillons FFPE sont utilisées en routine pour des analyses d'histopathologie et les blocs de tissus inclus en paraffine restants sont généralement archivés. Les vastes archives existantes d'échantillons de tissus FFPE représentent une source précieuse pour les études rétrospectives des profils d'expression des gènes et l'analyse des mutations. Toutefois, l'utilisation de ces échantillons pour l'analyse de l'ADN est limitée en raison des modifications chimiques entraînées par le formaldéhyde et la fragmentation de l'ADN pendant la préparation des tissus (prélèvement, fixation, inclusion) et leur stockage (humidité, durée, température) des échantillons. Les procédures standard d'extraction de l'ADN aboutissent souvent à un faible rendement d'ADN ou à de mauvaises performances dans les applications en aval (par exemple, PCR).

### 2.1 Principe général

Le kit **NucleoMag® DNA FFPE** est conçu pour l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons de tissus fixés à la formaline et inclus en paraffine (FFPE). La procédure remplace l'utilisation de xylène ou de d-limonène, inflammables et malodorants, couramment utilisés pour le déparaffinage. De plus, la procédure permet d'éviter les difficultés liées à l'élimination des solvants organiques à partir de culots de tissus souvent à peine visibles. Le **NucleoMag® DNA FFPE** utilise un tampon inodore breveté (Paraffin Dissolver, brevet en cours) et permet une lyse efficace en deux phases. Ce kit fournit des réactifs et des billes magnétiques pour une méthode pratique, fiable et rapide d'extraction de l'ADN à partir de 96 ou 384 échantillons. Tout d'abord, la paraffine des paragraphes FFPE est dissoute dans le Paraffin Dissolver. Le tissu est ensuite digéré par la protéinase pour solubiliser le tissu fixé et libérer l'ADN dans la solution. Ensuite, une incubation à chaud avec un tampon spécialement formulé élimine efficacement les liaisons covalentes (crosslink) de l'ADN précédemment libéré en solution. Pour la fixation de l'ADN aux billes paramagnétiques, le tampon de fixation MB2 et les billes NucleoMag® B-Beads sont ajoutés au lysat.

La procédure est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques sur des billes paramagnétiques dans des conditions de tampons appropriées. Après la séparation magnétique, les billes paramagnétiques sont lavées pour éliminer les contaminants et les sels à l'aide de tampons de lavage MB4 et d'éthanol 80 %. L'éthanol résiduel des étapes de lavage précédentes est éliminé par séchage à l'air. Enfin, l'ADN hautement pur est élué avec le tampon d'éluion MB6 à faible teneur en sel. L'ADN purifié peut être directement utilisé pour des applications en aval, par exemple la qPCR. Le kit **NucleoMag® DNA FFPE** peut être utilisé manuellement ou automatiquement sur des robots pipeteurs standards ou des séparateurs magnétiques automatisés.

### 2.2 Caractéristiques du kit

Le kit **NucleoMag® DNA FFPE** est recommandé pour l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons de tissus fixés à la formaline et inclus en paraffine (FFPE). Les échantillons sont généralement des coupes fines (d'une épaisseur d'environ 3 à 20 µm) d'origine humaine ou animale généralement obtenus par résection ou biopsie tissulaire.

- **Quantité d'échantillon** : La quantité maximale de l'échantillon est déterminée par : a) la quantité de tissu et b) la quantité de paraffine. **NucleoMag® DNA FFPE** convient pour un maximum de 5 mg de tissu. La quantité de paraffine est limitée à 15 mg, lors de

l'utilisation du protocole standard avec le Paraffin Dissolver (environ 7 coupes de 10 µm x 250 mm<sup>2</sup>). Cependant, des quantités plus importantes d'échantillons de paraffine peuvent être traitées en utilisant soit un volume supérieur de Paraffin Dissolver ou soit une déparaffinant à l'aide de xylène.

- **Le rendement en ADN** dépend fortement du type d'échantillon, de sa qualité, de sa quantité ainsi que des conditions et de la durée de stockage. De plus, le rendement d'ADN mesuré peut varier considérablement d'une méthode de quantification à l'autre. Le rendement déterminé par une mesure d'absorption à 260 nm ou par un colorant fluorescent (par exemple, PicoGreen<sup>®</sup>) peut s'écarter des valeurs obtenues par quantification au moyen de la PCR. Même les valeurs de quantification obtenues par PCR avec un amplicon court (par exemple, 80 pb) et un amplicon long (par exemple, 300 pb) peuvent également différer considérablement. L'écart de quantification dépend également de la distribution de la taille de l'ADN ainsi que de l'efficacité de la réticulation (ou de la persistance de réticulation).
- **Distribution de la taille des fragments d'ADN** : L'ADN isolé à partir de tissus fixés à la formaline et inclus en paraffine présente une distribution de taille allant de 50 à 5 000 bases. On observe surtout de l'ADN d'environ 100 à 300 bases, en particulier lorsque l'échantillon est ancien. Cependant, les échantillons qui ont été soumis à de bonnes pratiques de fixation, d'inclusion et de stockage des tissus peuvent produire de l'ADN d'une taille supérieure à 5 000 pb.
- Le temps de préparation de l'ADN dépend fortement de l'échantillon et du temps de lyse nécessaire. Pour obtenir les meilleurs résultats, la lyse est effectuée à température ambiante pendant au moins trois heures. Pour certains types d'échantillons, une lyse plus longue (par exemple toute la nuit) permet même d'obtenir un rendement d'ADN significativement supérieur.
- L'utilisation de ce kit est réservée à l'usage de la recherche.

**Le kit NucleoMag<sup>®</sup> DNA FFPE** est conçu pour être utilisé avec le séparateur magnétique NucleoMag<sup>®</sup> SEP (voir les informations de commande, paragraphe 6.2) ou d'autres systèmes de séparation magnétique (voir paragraphe 2.4). Le temps de préparation manuelle de 96 échantillons est d'environ 120 minutes.

**Le kit NucleoMag<sup>®</sup> DNA FFPE** permet une automatisation facile sur les instruments courants de manipulation des liquides ou les séparateurs magnétiques automatisés. Le temps de préparation réel dépend de la configuration de l'instrument et du système de séparation magnétique utilisé. Typiquement, 96 échantillons peuvent être purifiés en moins de 120 minutes en utilisant le NucleoMag<sup>®</sup> SEP sur une plateforme d'automatisation.

## 2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons

De nombreux facteurs influencent le rendement et la qualité de l'ADN obtenu à partir d'échantillons FFPE. La procédure d'échantillonnage des tissus, le délai entre l'échantillonnage et la fixation, la durée de la fixation, l'inclusion et les conditions de stockage ont un impact important sur la qualité et le rendement de l'ADN. À partir d'un bloc de tissu inclus en paraffine, les échantillons doivent être coupés proprement. Les coupes de paraffine peuvent être conservés à +4 °C ou à une température inférieure pendant au moins plusieurs semaines sans effets observables sur le rendement de l'ADN ou la possibilité d'utilisation. Le stockage à long terme des coupes de paraffine peut avoir un effet négatif sur l'ADN en raison de l'oxydation de l'air. Porter des gants à tout moment pendant la préparation. Changer de gants fréquemment.

## 2.4 Systèmes de séparation magnétique

Pour l'utilisation du **NucleoMag® DNA FFPE**, il est recommandé d'utiliser le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. La séparation est effectuée dans un bloc 96 puits carrés (voir les informations de commande, paragraphe 6.2). Le kit peut également être utilisé avec d'autres séparateurs magnétiques.

Séparateur magnétique	Plaque ou tube de séparation
NucleoMag® SEP (MN REF 744900)	Bloc 96 puits carré (MN REF 740481 / .24)
Tecan Te-MagS™	Tubes de 1,5 mL sans couvercle (Sarstedt)

### Séparation à aimants statiques

Les séparateurs à aimants statiques, par exemple notre NucleoMag® SEP (utilisation manuelle ou sur robot pipeteur), sont recommandés en association avec un agitateur à plaques pour une resuspension optimale des billes lors des étapes de lavage et d'éluion. Alternativement, les billes peuvent être resuspendues dans les tampons par plusieurs cycles d'aspiration / refoulement. Pour une automatisation totale de la procédure sur un automate de pipetage, un bras 'gripper' est nécessaire pour le transfert des plaques de séparation de l'aimant vers l'agitateur et inversement.

### Systèmes à aimants mobiles

Les séparateurs à aimants mobiles font bouger les aimants d'un côté à l'autre des puits, entraînant ainsi les billes à travers les solutions de lavage et d'éluion. La séparation magnétique a lieu lors de l'arrêt des aimants.

### Séparateurs automatisés

Ces séparateurs transfèrent les billes dans les différents tubes ou plaques. Les billes sont resuspendues par rétractation des aimants à l'intérieur de leur protection. Après chaque étape de fixation, de lavage ou d'éluion, les billes sont collectées et transportées dans le tube ou plaque correspondant à la solution suivante.

## 2.5 Réglage des paramètres de l'agitateur

Lors de l'utilisation d'un agitateur de plaques pour les étapes de lavage et d'éluion, les réglages des paramètres de l'agitateur doivent être soigneusement ajustés afin d'éviter toute contamination croisée d'un puits à l'autre. Procéder comme suit :

### Réglage de l'agitation pour les étapes de fixation et de lavage :

- Déposer 600 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation. Placer la plaque sur l'agitateur et commencer à agiter à vitesse modérée pendant 30 secondes. Arrêter l'agitateur et vérifier l'absence de projections à la surface de la plaque.
- Augmenter la vitesse, agiter pendant 30 secondes supplémentaires et vérifier l'absence de projections à la surface de la plaque.
- Continuer à augmenter la vitesse d'agitation jusqu'à observer des projections sur le dessus de la plaque de séparation. Réduire ensuite progressivement la vitesse, vérifier l'absence de projections et utiliser ce réglage pour les étapes de lavage.

**Réglage de l'agitation pour l'étape d'éluion :**

- Introduire 100 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de collecte et procéder comme mentionné ci-dessus.

**2.6 Manipulation des billes****Distribution des billes**

Une distribution homogène des billes magnétiques dans les différents puits de la plaque de séparation est essentielle pour une bonne reproductibilité. Par conséquent, avant de distribuer les billes, s'assurer qu'elles sont complètement remises en suspension. Bien agiter le flacon de stockage ou le placer brièvement sur un vortex. Le mélange préliminaire des billes magnétiques avec le tampon de fixation permet une distribution plus homogène des billes dans les différents puits de la plaque de séparation. Lors de l'automatisation, une étape de mélange des billes et du tampon de fixation dans les réservoirs avant leur distribution dans les plaques de séparation est recommandée afin de s'assurer que les billes demeurent bien en suspension.

**Durée de séparation magnétique**

L'attraction des billes magnétiques sur les aimants magnétiques dépend de la force magnétique de l'aimant, de la plaque de séparation sélectionnée, de la distance entre les parois des puits et les aimants ainsi que du volume présent dans les puits. Les temps d'aimantation des billes doivent être ajustés en fonction de chaque système. Il est recommandé d'utiliser des plaques ou tubes de séparation validés pour le type de séparateur magnétique utilisé.

**Lavage des billes**

Le lavage des billes est effectué par agitation ou pipetage. Contrairement au pipetage, l'agitation permet la resuspension des billes dans tous les puits simultanément. Ceci permet de réduire le temps de la procédure et le nombre de cônes nécessaires. Cependant, la resuspension par pipetage est plus efficace que l'agitation de la plaque ou l'agitation magnétique.

Méthode	Efficacité de resuspension	Rapidité	Nombre de cônes
Magnétique	+	++	Faible
Agitateur	++	++	Faible
Pipetage	+++	+*	Elevé

+ : acceptable, ++ : bon, +++ : excellent, \* Pipette 8-canaux

## 2.7 Utilisation de la protéinase K

Afin de distribuer la solution de protéinase K à chaque échantillon, il est recommandé de préparer la quantité nécessaire dans un tube séparé. En utilisant un dispositif de manipulation des liquides, il est recommandé de distribuer la solution de protéinase K nécessaire (25 µL par préparation) avec 10 % de volume supplémentaire dans un tube approprié pour le robot. La solution de protéinase K non utilisée doit être conservée à - 20 °C pour les extractions ultérieures.

## 2.8 Procédures d'élution

L'ADN purifié peut être directement élué avec le tampon d'élution MB6 fourni avec un volume  $\geq$  à 25 µL. Il est essentiel de couvrir complètement les billes NucleoMag® B-Beads avec le tampon d'élution durant cette étape. Le volume de tampon d'élution distribué dépend du système de séparation magnétique (p.e. la position du culot de billes à l'intérieur des tubes de la plaque de séparation). Pour une élution efficace, le culot de billes magnétiques doit être complètement remis en suspension dans le tampon d'élution. Pour certains séparateurs, des volumes d'élution plus élevés peuvent être nécessaires pour recouvrir totalement le culot de billes magnétiques.

L'élution est possible à température ambiante. Le rendement peut être augmenté de 15 à 20 % si l'élution est effectuée à 55 °C.

### 3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

**Attention :** Les tampons MB2 et MB4 contiennent des sels chaotropiques ! Porter des gants et des lunettes !

Conditions de stockage :

- Tous les composants du kit NucleoMag® DNA FFPE doivent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette de l'emballage.
- Tous les tampons sont livrés prêts à l'emploi.

Avant de commencer le protocole **NucleoMag® DNA FFPE**, préparer les éléments suivants :

- **Protéinase K** : avant la première utilisation du kit, ajouter le volume indiqué de tampon protéinase PB pour dissoudre la **protéinase K** lyophilisée. La solution de protéinase K est stable à - 20 °C pendant au moins 6 mois.

NucleoMag® DNA FFPE		
REF	1 × 96 prep. 744320.1	4 × 96 preps 744320.4
Protéinase K (lyophilisée)	75 mg Ajouter 2,8 mL de tampon protéinase PB	75 mg Ajouter 2,8 mL de tampon protéinase PB

- **Éthanol à 80 %** : Utiliser de l'éthanol de qualité biologie moléculaire, diluer avec de l'eau exempte de nucléases jusqu'à 80 %.

## 4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoMag® DNA FFPE**, portez des vêtements de protection appropriés (par exemple, une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection). Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité appropriées (les FDS sont disponibles en ligne sur [www.mnnet.com/msds](http://www.mnnet.com/msds)).



Attention : Le perchlorate de sodium contenu dans les tampons MB2 et MB4 peut former des composés hautement réactifs lorsqu'il est combiné à de l'eau de Javel ! Par conséquent, ne pas ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

Les déchets générés par le kit **NucleoMag® DNA FFPE** n'ont pas été testés pour détecter la présence de matériel infectieux résiduel. Une contamination des déchets liquides par du matériel infectieux résiduel est hautement improbable en raison de la forte dénaturation du tampon de lyse et du traitement à la protéinase K, mais elle ne peut pas être totalement exclue. Par conséquent, les déchets liquides doivent être considérés comme infectieux et doivent être manipulés et éliminés conformément aux réglementations de sécurité locales.

### 4.1 Élimination des déchets

Éliminer les matériaux dangereux, infectieux ou biologiquement contaminés d'une manière sûre et acceptable et conformément à toutes les exigences locales et réglementaires.



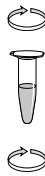
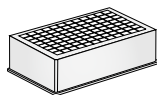
## 5 Protocole d'extraction de l'ADN génomique à partir de tissus

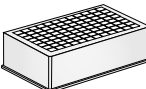

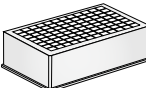

### Résumé du protocole

- Pour les exigences complémentaires en matière d'équipement et de matériel, voir les paragraphes 1.2 et 2.4, respectivement.
- Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir page 16.

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si la protéinase K a été préparée conformément au chapitre 3.

1 Déparaffinage de l'échantillon	<p>400 <math>\mu</math>L de Paraffin Dissolver 60 °C, 3 min</p> <p>Mélanger immédiatement l'échantillon chaud au vortex</p> <p>Refroidir jusqu'à TA</p>	
2 Lyse de l'échantillon	<p>Ajouter à chaque échantillon : 200 <math>\mu</math>L de FL 25 <math>\mu</math>L de protéinase K</p> <p>Mélanger au vortex pendant 5 s 11 000 x g, 1 min 56 °C, 1–3 h</p>	
3 Décrosslink	<p>11 000 x g, 30 s</p> <p>100 <math>\mu</math>L D-Link</p> <p>Mélanger au vortex pendant 5 s 11 000 x g, 1 min 90 °C, 30 min 11 000 x g, 1 min</p>	
4 Transfert de l'échantillon	<p>Charger la phase aqueuse (inférieure) dans le Square-well Block</p>	

<p><b>5</b> Fixation de l'ADN aux NucleoMag® B-Beads</p>	<p><b>14 µL NucleoMag® B-Beads</b> <b>600 µL MB2</b></p>	
<p><b>Mélanger en agitant à 1 000 rpm pendant 5 min à TA.</b> <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>		
<p><b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b></p>		
<p><b>6</b> Lavage avec le tampon MB4</p>	<p>Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP</p>	
<p><b>Agiter 1 – 3 min à TA</b> <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>		
<p><b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b></p>		
<p><b>7</b> Lavage avec de l'éthanol à 80 % (1<sup>er</sup>)</p>	<p>Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP</p>	
<p><b>600 µL d'éthanol à 80 %.</b></p> <p><b>Agiter 1 – 3 min à TA</b> <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>		
<p><b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b></p>		
<p><b>8</b> Lavage avec de l'éthanol à 80 % (2<sup>ème</sup>)</p>	<p>Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP</p>	
<p><b>600 µL d'éthanol à 80 %.</b></p>		

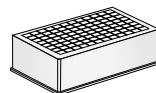
**Agiter1 – 3 min à TA**  
(*Optionnel : mélanger par pipetages successifs*)



**Retirer le surnageant après 2 min de séparation.**

**9 Séchage des billes magnétiques**

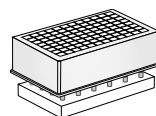
**Sécher à l'air pendant 10 min à TA**



**10 Elution de l'ADN**

**Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP**

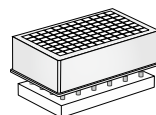
**25 – 100 µL MB6**  
(*Optionnel : élution à 56 °C*)



**Agiter 5 min à RT**  
(*Optionnel : mélanger par pipetages successifs*)



**Séparer 2 min et transférer l'ADN dans la plaque d'élution / les tubes.**



## Protocole détaillé

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques à aimants statiques (p. ex. NucleoMag® SEP) et les agitateurs de plaques appropriés (voir paragraphe 2.4). Il est recommandé d'utiliser un Square-well Block pour la séparation (voir paragraphe 1.2). L'extraction de l'ADN peut également être réalisée dans des tubes de réaction avec des séparateurs magnétiques appropriés. Ce protocole est destiné à une utilisation manuelle et peut servir de guide pour l'automatisation du kit.

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si la protéinase K a été préparée conformément au chapitre 3.
- 

#### 1 Déparaffinage de l'échantillon

Placer l'échantillon dans un microtube approprié de 1,5 mL.

Ajouter **400 µL de Paraffin Dissolver** à l'échantillon. Incuber **3 min à 60 °C** (pour faire fondre la paraffine). **Vortexer ou agiter** l'échantillon immédiatement (à 60 °C) à une vitesse élevée pour dissoudre la paraffine. Refroidir l'échantillon à la température ambiante.

*Veiller à ce que la paraffine fonde complètement pendant l'étape d'incubation à chaud et bien mélanger après la dissolution pour dissoudre complètement la paraffine.*

*Un mélange insuffisant de l'échantillon chauffé peut entraîner la réapparition de particules de paraffine solides. S'assurer que l'échantillon ne contient pas plus de 15 mg de paraffine ou ajuster le volume du Paraffin Dissolver.*

---

#### 2 Lyse de l'échantillon

Ajouter **200 µL de tampon de lyse FL** et **25 µL de protéinase K** à la phase aqueuse inférieure. Bien mélanger par pipetages successifs, en vortexant ou par agitation. Centrifuger à **11 000 x g** pendant **1 min** et incubé à **56 °C** pendant **1 à 3 h** ou toute une nuit sous agitation.

---

#### 3 Décrosslink

Centrifuger pendant **1 min à 11000 x g**.

Régler le bloc chauffant à 90 °C. Ajouter **100 µL de tampon D-Link**, mélanger par pipetages successifs, vortexer pendant 5 s ou agiter.

Centrifuger pendant **1 min à 11 000 x g** pour obtenir la formation d'une phase. Incuber à **90 °C** pendant **30 min**, mélanger au vortex pendant 5 s. Refroidir les échantillons à température ambiante

Centrifuger les échantillons pendant **1 min à 11 000 x g**.

*L'étape de décrosslink est fortement recommandée pour les lyses de courte durée (1 – 3 h) et peut être omise après une lyse d'une nuit.*

---

#### 4 Chargement de l'échantillon dans le Square-well Block.

Transférer **400 µL** de la phase aqueuse inférieure de chaque échantillon dans un Square-well Block pour la suite de la procédure.

---

## 5 Fixation de l'ADN aux NucleoMag® B-Beads

Ajouter **14 µL de billes NucleoMag® B-Beads** et **600 µL de tampon MB2** à l'échantillon lysé.

**Mélanger** par pipetages successifs 6 fois et **agiter** pendant **5 min** à **température ambiante**.

*Sinon, lors de la procédure sans agitateur, répéter le pipetage 10 fois et incuber pendant 5 min à température ambiante.*

*Note : Veiller à remettre en suspension les NucleoMag® B-Beads avant de les retirer du flacon de stockage. Vortexer brièvement le flacon de stockage jusqu'à ce qu'une suspension homogène soit formée.*

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

*Note : Ne pas perturber les billes sur l'aimant lors de l'aspiration du surnageant.*

---

## 6 Lavage avec le MB4

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **600 µL de tampon MB4** dans chaque puits et mélanger les billes en agitant jusqu'à ce qu'elles soient complètement remises en suspension (**1 – 3 min**). Alternativement, remettre complètement les billes en suspension par pipetages successifs (15 fois).

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 7 Lavage avec de l'éthanol à 80 % (1er)

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **600 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits et mélanger les billes en agitant jusqu'à ce qu'elles soient complètement remises en suspension (**1 – 3 min**). Alternativement, remettre complètement les billes en suspension par pipetages successifs (15 fois).

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 8 Lavage avec de l'éthanol à 80 % (2ème)

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **600 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**1 – 3 min**). Alternativement, remettre complètement les billes en suspension par pipetages successifs (15 fois).

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 9 Séchage à l'air

Sécher à l'air le culot de billes magnétiques pendant **10 min à température ambiante**.

---

## 10 Elution de l'ADN

Ajouter le volume désiré de **tampon MB6 (25 – 100 µL)** à chaque Square-well Block et remettre les billes en suspension en agitant **5 min à température ambiante**. Alternativement, remettre complètement les billes en suspension par pipetages successifs et incubé pendant **10 min à 56 °C**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Transférer le surnageant contenant l'ADN génomique purifié dans des microtubes ou des barrettes de tubes (voir les informations de commande, paragraphe 6.2).

*Note : Le rendement peut être augmenté de 15 à 20 % en utilisant un tampon d'éluion préchauffé (55 °C) ou en incubant la suspension billes/tampon d'éluion à 55 °C pendant 10 min.*

---

## 6 Annexes

### 6.1 Guide de résolution des problèmes

Problèmes	Causes possible et suggestions
Faible rendement en ADN	<i>Volume de tampon d'éluion insuffisant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Les billes doivent être entièrement recouvertes de tampon d'éluion.</li> </ul>
	<i>Performance insuffisante du tampon d'éluion</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Les tampons doivent être éliminés totalement après chaque séparation magnétique. Les tampons résiduels diminuent l'efficacité des lavages et de l'éluion.</li> </ul>
	<i>Séchage excessif des billes</i>
Pureté insuffisante	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ne pas laisser les billes sécher car cela pourrait entraîner une baisse de l'efficacité de l'éluion.</li> </ul>
	<i>Aspiration d'une partie des billes présents sur l'aimant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ne pas perturber le culot de billes lors de l'aspiration du surnageant, en particulier lorsque le culot n'est pas visible dans le lysat.</li> </ul>
Mauvaise performance de l'ADN lors des applications avalés	<i>Aspiration et perte de billes</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Prolonger le temps de séparation magnétique ou diminuer la vitesse d'aspiration.</li> </ul>
	<i>Procédure de lavage insuffisante</i>
Mauvaise performance de l'ADN lors des applications avalés	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utiliser uniquement les combinaisons appropriées de séparateur et de plaque, par exemple, le Square-well Block en combinaison avec le NucleoMag® SEP.</li> <li>S'assurer que les billes sont complètement remises en suspension pendant la procédure de lavage. Pipeter plusieurs fois si l'agitation est insuffisante.</li> </ul>
	<i>Contamination par de l'éthanol des tampons de lavage</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Veiller à éliminer l'éthanol provenant des étapes de lavage, l'éthanol résiduel impactant négativement les applications avalés.</li> </ul>
Mauvaise performance de l'ADN lors des applications avalés	<i>Évaporation de l'éthanol des tampons de lavage</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fermer hermétiquement les flacons de tampons, éviter l'évaporation de l'éthanol des flacons ainsi que des tampons remplis dans les réservoirs pour la procédure automatisée. Ne pas réutiliser les tampons de ces réservoirs.</li> </ul>

Perte de billes	<p><i>Durée de séparation magnétique trop court</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Augmenter la durée de séparation pour permettre aux billes d'être complètement attirées par les aimants magnétiques avant d'aspirer tout liquide du puits.</li></ul> <p><i>Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'éluion)</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Une vitesse d'aspiration élevée lors de l'étape d'éluion peut entraîner l'aspiration des billes. Réduire la vitesse d'aspiration pour l'étape d'éluion.</li></ul>
Absence ou faible rendement en ADN	<p><i>Lyse incomplète</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>L'échantillon n'a pas été complètement immergé pendant l'incubation thermique. Couper les échantillons en petits morceaux. Bien mélanger. S'assurer que les échantillons sont complètement immergés dans le mélange tampon FL / Proteinase K. Incuber jusqu'à ce que les échantillons soient complètement lysés.</li></ul> <p><i>Réactifs mal préparés</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Préparer la solution tampon de protéinase K selon les instructions (voir chapitre 3).</li></ul>
Contamination par de l'ARN	<p><i>ARN dans l'échantillon</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Si l'on souhaite obtenir un ADN exempt d'ARN, refroidir à température ambiante après l'incubation de la lyse et ajouter 20 µL d'une solution de RNase A (20 mg/ml ; voir les informations de commande, paragraphe 6.2). Incuber pendant 15 min en agitant modérément.</li></ul>
Élimination insuffisante de la paraffine	<p><i>Quantité de paraffine trop élevée</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>L'utilisation d'un trop grand nombre de coupes de paraffine ou d'un excès de paraffine peut entraîner une solidification immédiate de la paraffine après l'incubation thermique lors du refroidissement du lysat à la température ambiante. Répéter l'incubation thermique en augmentant (par exemple, en doublant) le volume du Paraffin Dissolver.</li></ul>

## 6.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® DNA FFPE	744320.1	1 × 96 preps
	744320.4	4 × 96 preps
NucleoSpin® 96 DNA FFPE	740240.1	1 × 96 preps
	740240.4	4 × 96 preps
NucleoSpin® FFPE DNA XS	740980.10	10 preps
	740980.50	50 preps
	740980.250	250 preps
Paraffin Disolver (bleu)	740343.60	60 mL
Protéinase K (lyophilisée)	740506	100 mg
RNase A (lyophilisée)	740505.50	50 mg
	740505	100 mg
NucleoMag® SEP	744900	1
Blocs 96 puits carrés 'Square-well Block'	740481	4
	740481.24	24
Film PE auto-adhésif	740676	50 feuilles
Rack de barrettes de tubes (l'ensemble comprend 1 rack, 12 barrettes de 8 tubes chacun et 12 barrettes de 8 bouchons)	740477	4 sets
	740477.24	24 sets
Plaque d'éluion à 'fond en U'	740486.24	24
Plaque d'éluion à 'fond plat'	740673	20
KingFisher® 96 Accessory Kit A (ensemble composé de Square-well Blocks, Deep-well Tip combs, Plaques d'éluion pour 4 × 96 NucleoMag® DNA FFPE preps pour le système KingFisher® 96)	744950	1 set

Visitez le site [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) pour obtenir des informations plus détaillées sur les produits.

### 6.3 Restriction de l'utilisation du produit / garantie

Tous les produits MACHEREY-NAGEL sont conçus uniquement pour l'usage auquel ils sont destinés. Ils ne sont pas destinés à être utilisés pour un autre usage. La description de l'usage prévu des produits est disponible dans les notices originales des produits MACHEREY-NAGEL. Avant d'utiliser nos produits, veuillez lire attentivement le mode d'emploi et les consignes de sécurité figurant dans la Fiche de Données de Sécurité du produit.

Ce produit MACHEREY-NAGEL comporte une documentation énonçant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La garantie fournie est limitée aux spécifications et descriptions des données indiquées dans la documentation originale MACHEREY-NAGEL.

Aucune autre déclaration, verbale ou écrite, par des employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL n'est autorisée, à l'exception des déclarations écrites signées par un représentant dûment habilité de MACHEREY-NAGEL. Le client ne doit pas s'y fier et elles ne font pas partie d'un contrat de vente ou de la présente garantie.

La responsabilité pour tous les dommages éventuels survenant en lien avec nos produits est limitée au strict minimum, comme indiqué dans les conditions générales de vente de MACHEREY-NAGEL, dans leur dernière version, disponibles sur le site internet de la société. MACHEREY-NAGEL n'assume aucune autre garantie.

Les produits et leur application sont susceptibles de modifications. Par conséquent, veuillez contacter notre Equipe Service Technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur local pour obtenir des informations scientifiques à caractère général. Les descriptions figurant dans la documentation MACHEREY-NAGEL sont fournies à titre d'information uniquement.

Dernière mise à jour : 08/2022, Rev. 04

Veuillez contacter :  
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG  
Tel. : +49 24 21 969-333  
support@mn-net.com

---

Marques déposées :

KingFisher est une marque déposée de Thermo Fisher Scientific.

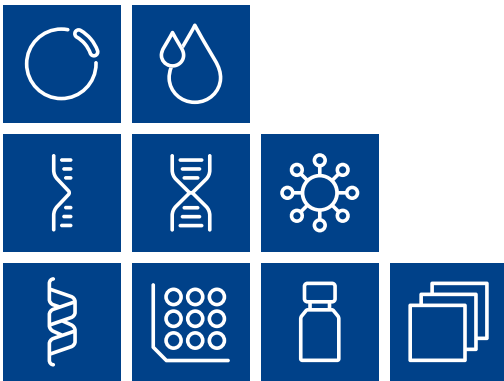
NucleoMag<sup>®</sup> est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG.

NucleoSpin<sup>®</sup> est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG.

PicoGreen est une marque déposée de Molecular Probes Inc.

Te-MagS est une marque déposée de Tecan Group Ltd, Suisse.

Tous les noms et dénominations utilisés peuvent être des marques, des marques déposées ou des marques enregistrées par leurs propriétaires respectifs, même s'ils ne sont pas des dénominations spéciales. La mention de produits et de marques n'est qu'une information (c'est-à-dire qu'elle ne porte pas atteinte aux marques et aux marques déposées et ne peut être considérée comme une recommandation ou une évaluation). En ce qui concerne ces produits ou services, nous ne pouvons accorder aucune garantie quant à leur sélection, leur efficacité ou leur fonctionnement.



**MACHERY-NAGEL**

[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)

MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germany

DE +49 24 21 969-0 [info@mn-net.com](mailto:info@mn-net.com)

CH +41 62 388 55 00 [sales-ch@mn-net.com](mailto:sales-ch@mn-net.com)

FR +33 388 68 22 68 [sales-fr@mn-net.com](mailto:sales-fr@mn-net.com)

US +1 888 321 62 24 [sales-us@mn-net.com](mailto:sales-us@mn-net.com)

