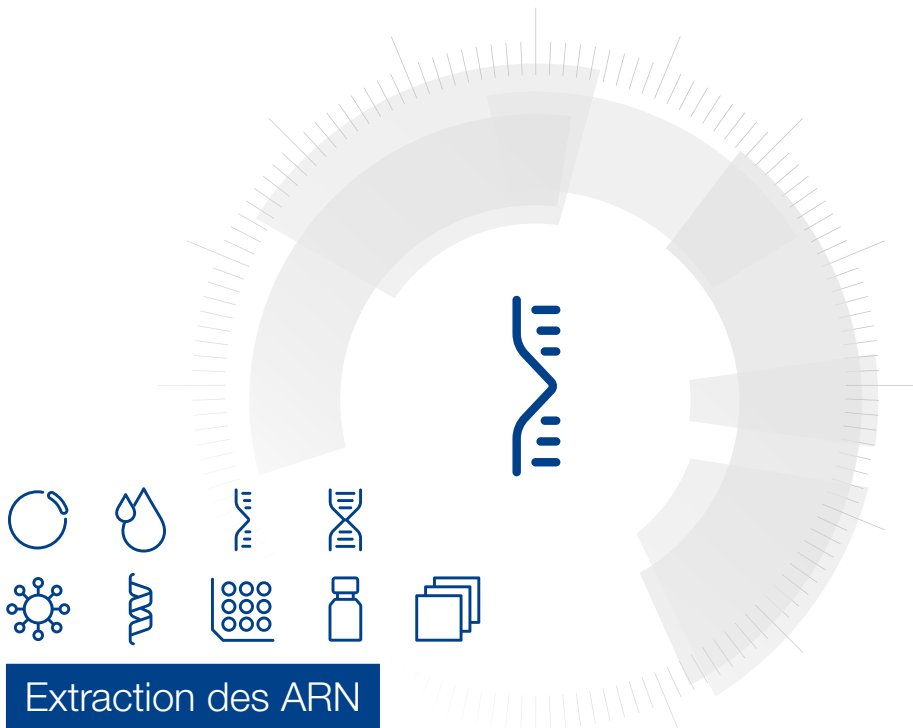


MACHEREY-NAGEL

# Manuel d'utilisation



■ NucleoSpin® RNA XS















Mai 2023 / Rev. 12

# Extraction des ARN

## Résumé du protocole (Rev.12)

XS

### NucleoSpin® RNA XS

1 Préparation de l'échantillon		Utiliser jusqu'à 10 <sup>6</sup> cellules en culture ou 5 mg tissus
2 Lyse et homogénéisation des cellules		100 µL RA1 2 µL TCEP Mélanger
3 Ajout d'ARN Carrier		5 µL de solution d'ARN Carrier Mélanger
4 Filtration du lysat ( <i>optionnel</i> )	 	11,000 x g, 30 s
5 Ajustement les conditions de fixation de l'ARN		100 µL Ethanol 70 % Mélanger
6 Fixation de l'ARN	 	Charger le lysat 11,000 x g, 30 s
7 Dessalage de la membrane de silice	 	100 µL MDB 11,000 x g, 30 s
8 Digestion de l'ADN		25 µL de mélange réactionnel de rDNase TA, 15 min
9 Lavage et séchage de la membrane de silice	  	1 <sup>er</sup> lavage 100 µL RA2 2 <sup>ème</sup> lavage 400 µL RA3 3 <sup>ème</sup> lavage 200 µL RA3 11,000 x g, 30 s 11,000 x g, 2 min
9 Elution d'ARN purifié	 	10 µL RNase-free H <sub>2</sub> O 11,000 x g, 30 s

## Sommaire

1	Composition du kit	4
1.1	Composants	4
1.2	Réactifs, consommables et équipements complémentaires requis	5
1.3	À propos de ce manuel d'utilisation	5
2	Description du produit	6
2.1	Le principe de base	6
2.2	Caractéristiques du kit	6
2.3	Manipulation, préparation et stockage des échantillons	9
2.4	Procédures d'éluion	10
2.5	Stabilité de l'ARN purifié	10
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	11
4	Instructions de sécurité	13
4.1	Élimination des déchets	13
5	Protocoles	14
5.1	Purification d'ARN à partir de cellules en culture, de cellules isolées par capture laser ou de cryosections microdisséquées	14
5.2	Purification de l'ARN de tissus	17
5.3	Purification et concentration de l'ARN	20
5.4	Digestion en solution avec la rDNase	22
6	Annexes	24
6.1	Guide de résolution des problèmes	24
6.2	Informations de commande	28
6.3	Références	29
6.4	Restrictions d'utilisation /garantie	30
6.5	Versions linguistiques et prédominance	30

# 1 Composition du kit

## 1.1 Composants

NucleoSpin® RNA XS			
REF	10 préps 740902.10	50 préps 740902.50	250 préps 740902.250
Tampon de lyse RA1	6 mL	25 mL	125 mL
Tampon de lavage RA2	2 × 1 mL	15 mL	2 × 15 mL
Tampon de lavage RA3 (Concentré)*	6 mL	12 mL	50 mL
Tampon de dessalage de la membrane MDB	10 mL	10 mL	50 mL
Tampon de réaction pour la rDNase	7 mL	7 mL	30 mL
rDNase, exempte de RNase (lyophilisée)*	1 flacon (taille A)	1 flacon (taille C)	2 flacons (taille D)
ARN Carrier*	300 µg	300 µg	300 µg
Agent réducteur TCEP*	14 mg	3 × 14 mg	2 × 107 mg
H <sub>2</sub> O RNase-free	13 mL	13 mL	13 mL
NucleoSpin® Filters (anneaux violets)	10	50	250
Colonnes NucleoSpin® RNA XS (anneaux bleus - plus tubes collecteurs)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	30	150	750
Tubes d'éluion (1,5 mL)	10	50	250
Manuel d'utilisation	1	1	1

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

## 1.2 Réactifs, consommables et équipements complémentaires requis

### Réactifs

- Éthanol à 96 – 100 % (pour préparer le tampon de lavage RA3 et pour la procédure de purification, chapitre 5.3)
- Éthanol à 70 % (pour ajuster les conditions de fixation de l'ARN)

### Consommables

Tubes de microcentrifugation de 1,5 mL

Cônes stériles, exempts de RNases

### Equipements

- Pipettes manuelles
- Centrifugeuse pour microtubes
- Vortex
- Équipement de protection individuelle (par exemple, blouse de laboratoire, gants, lunettes)

## 1.3 À propos de ce manuel d'utilisation

Il est fortement recommandé de lire les protocoles détaillés de ce manuel d'utilisation si le kit **NucleoSpin® RNA XS** est utilisé pour la première fois. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Celui-ci est conçu pour repérer aisément le déroulement de la procédure en rappelant la chronologie des différentes étapes.

Toute la littérature technique est disponible sur notre site [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com).

Merci de contacter notre support technique pour toute information concernant les changements éventuels entre cette version du manuel et les précédentes versions.

## 2 Description du produit

### 2.1 Le principe de base

Un des aspects les plus importants lors de l'extraction de l'ARN concerne la prévention de sa dégradation. Avec les méthodes NucleoSpin® RNA, les cellules sont lysées par incubation dans une solution contenant une forte concentration d'ions chaotropiques. Ce tampon de lyse inactive immédiatement les RNases – omniprésentes dans quasiment tous les échantillons biologiques – et crée les conditions favorables pour la fixation de l'ARN à la membrane de silice. L'ADN contaminant, également fixé à la membrane de silice, est éliminé par digestion au moyen d'une solution de rDNase directement appliquée sur la membrane de silice pendant la procédure (la rDNase RNase-Free est incluse dans le kit). De simples étapes de lavages avec deux tampons différents permettent d'éliminer les sels, les métabolites et autres composants cellulaires macromoléculaires. L'ARN purifié est finalement élué dans de l'H<sub>2</sub>O exempte de RNases (fournie dans le kit).

La préparation de l'ARN avec les kits de la gamme **NucleoSpin® RNA** peut être effectuée à TA. Cependant, une fois élué, l'éluat doit être traité avec précaution en raison de sa forte vulnérabilité vis-à-vis des RNases, souvent présentes sur le matériel, les traces de doigts et la poussière. Pour garantir la stabilité de l'ARN, conserver le congelé à -20 °C pour un stockage à court terme ou à -70 °C pour un stockage à long terme.

### 2.2 Caractéristiques du kit

- Le kit **NucleoSpin® RNA XS** est recommandé pour l'extraction d'ARN de très petits échantillon, par exemple de petites quantités de cellules (jusqu'à 10<sup>5</sup>) et de tissus (jusqu'à 5 mg) sous forme de culots, de cellules isolées par capture laser, de cryosections microdisséquées, de biopsies, des biopsies aspirées dans des aiguilles et des cellules triées au cytomètre de flux (Tableau 1, page 8).
- Le design innovant de la colonne, avec une bague de sécurité en entonnoir et une membrane de faible surface permettent d'élué l'ARN dans un volume réduit de 5 – 30 µL. Ainsi, l'**ARN purifié** est élué avec une **forte concentration**, et est prêt à l'emploi pour les applications (ex : RT-PCR)
- Le **rendement ARN** dépend fortement de la nature de l'échantillon, de sa qualité et de la quantité utilisée (voir Tableau 2, page 8 pour plus de détails).
- L'**ARN de haut intégrité** est obtenu (RNA Integrity Number (RIN) > 9 selon la méthode Agilent 2100 Bioanalyzer) aussi bien pour de petits échantillons (par ex. 10<sup>3</sup> cellules, ou 0.1 mg de tissus) que pour des quantités de matériel biologique plus importantes (ex : 10<sup>5</sup> cellules, 5 mg de tissus). Le ratio ARNr (28S / 18S) est généralement de 1.8 – 2.0. La qualité de l'ARN est toutefois très liée à la qualité des échantillons (voir Chapitre 6.3).
- Le kit **NucleoSpin® RNA XS** permet la purification de l'ARN avec un ratio  $A_{260}/A_{280}$  généralement supérieur à 1.9 (mesuré en tampon TE pH 7.5). Étant donné la pureté élevée de l'ARN obtenu, une grande partie de la fraction éluée peut être utilisée comme matrice pour les RT-PCR sans inhibition (ex : 8 µL sur 10 µL d'éluat total utilisé comme matrice dans un mix de qRT-PCR de 20 µL génère un signal plus important en

comparaison à des réactions menées avec une quantité moindre de matrice (PCR en LightCycler avec un kit Sigma SYBR Green de RT-PCR Quantitative).

- La **durée de la procédure** est d'environ 45 minutes pour 12 échantillons.
- Le kit contient un **agent réducteur**, le **TCEP** (Tris(2-carboxyethyl)phosphine). Le TCEP est inodore, plus stable, plus spécifique des ponts disulfures et moins toxique que les autres agents réducteurs utilisés habituellement.
- L'**ARN Carrier** (ARN poly(-A) : sel de potassium poly(A), préparé à partir d'ADP avec la polynucéotide phosphorylase) est inclus dans le kit pour des performances optimales sur les plus petits échantillons.

L'utilisation de l'ARN Carrier est recommandée par ajout au lysat (20 ng par échantillon). Une telle petite quantité n'interfère pas dans les applications de RT-PCR, même lors de l'utilisation d'amorces oligo-dT. La faible quantité d'ARN Carrier transférée dans la réaction de RT-PCR est généralement sans influence sur le résultat de la réaction, en raison du large excès d'amorces oligo-dT. Le bénéfice lié à l'ajout de l'ARN Carrier au lysat dépend du type d'échantillon, de la quantité initialement utilisée et du type d'analyse en aval de l'ARN. L'ARN Carrier devra être omis pour les applications suivantes :

- si une purification spécifique de l'ARN poly-A est ensuite effectuée.
- si l'ARN est ensuite soumis à un séquençage

- La **rDNase** est fournie dans le kit. Les contaminants en ADN sont éliminés lors d'une digestion avec la rDNase directement appliquée sur la membrane de silice. Pour les applications les plus sensibles aux contaminations résiduelles en ADN, (ex : analyse de l'expression de gènes à partir de cellules transfectées avec des plasmides, analyse de gènes plastidiaux ou mitochondriaux) une digestion supplémentaire utilisant la rDNase en solution dans l'éluat est possible.
- Réservé à l'usage de la recherche

**Tableau 1 : Résumé des caractéristiques du kit**

Paramètres	NucleoSpin® RNA XS
Format	Colonne Mini à centrifuger – Design XS
Echantillon	Petites quantités d'échantillon < 5 mg de tissus, < 100 000 cellules en culture
Taille des fragments	> 200 nt
Rendement	Voir les exemples des données dans le tableau 2
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	1.9–2.1
RIN (RNA integrity number)	> 9 (selon la qualité de l'échantillon)
Volume d'élution	5–30 µL
Temps de préparation	35 min/6 preps
Capacité de fixation	110 µg

**Tableau 2 : Aperçu des rendements moyens en ARN obtenus à l'aide du NucleoSpin® RNA XS**

Echantillon	Rendement moyen
10 <sup>5</sup> cellules HeLa	1000–1500 ng
10 <sup>4</sup> cellules HeLa	100–150 ng
10 <sup>3</sup> cellules HeLa	10–15 ng
10 <sup>2</sup> cellules HeLa	0.1–1.5 ng
5 mg de foie de souris	5–8 µg
1 mg de foie de souris	2 µg

## 2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons

### Environnement de travail

Maintenir un environnement de travail exempt de RNases. Porter des gants à tout moment pendant la préparation. Changer de gants fréquemment.

### Stockage des échantillons et inhibition des RNases

Les RNases peuvent dégrader rapidement l'ARN contenu dans les échantillons si ceux-ci ne sont pas protégés de l'activité des RNases après la collecte. Utiliser l'une des méthodes suivantes pour éviter la dégradation de l'ARN :

- Utiliser un échantillon fraîchement prélevé pour une lyse immédiate et une purification de l'ARN.
- Immerger et conserver les échantillons dans du NucleoProtect® RNA ou dans des solutions de stabilisation similaires. Veiller à ce que l'échantillon soit complètement imprégné de la solution de stabilisation avant de le congeler. Retirer l'excès de solution de stabilisation de l'échantillon avant l'isolement de l'ARN conformément au manuel d'utilisation de la solution de stabilisation.
- Congeler rapidement l'échantillon dans de l'azote liquide immédiatement après la récolte et le conserver à -70 °C. Les échantillons congelés sont stables jusqu'à 6 mois. Un mortier et un pilon peuvent être utilisés pour pulvériser l'échantillon à l'état congelé. Veiller à ce que l'échantillon ne soit pas décongelé avant d'entrer en contact avec le tampon de lyse.
- Conserver les échantillons dans le tampon de lyse RA1 après le broyage à -70 °C jusqu'à un an, à 4 °C jusqu'à 24 heures ou à température ambiante pendant quelques heures. Les échantillons congelés dans le tampon de lyse RA1 doivent être décongelés lentement avant de commencer l'extraction de l'ARN.

### Broyage et homogénéisation de l'échantillon

- **Cellules cultivées en suspension :**  
Récolter les cellules par centrifugation, éliminer le surnageant et ajouter immédiatement le tampon de lyse RA1 conformément à l'étape 2 du protocole standard (voir les chapitres 5.1, 6.1).
- **Culture de cellules adhérentes (lyse en boîte de culture) :**  
Aspirer complètement le milieu de culture. Ajouter immédiatement le tampon de lyse RA1 à la boîte de culture cellulaire. Éliminer complètement le milieu de culture afin de permettre une lyse complète par le tampon de lyse. Poursuivre par la filtration du lysat (étape 3 du protocole standard).
- **Culture de cellules adhérentes (lyse après trypsination) :**  
Aspirer le milieu de culture et laver les cellules avec du PBS. Aspirer le PBS. Ajouter 0,1 – 0,3 % de trypsine dans du PBS et incuber pendant une durée appropriée pour détacher les cellules de la surface de la boîte. Après le décollement des cellules, ajouter du milieu, transférer les cellules dans un tube approprié (non fourni) et les culotter par centrifugation pendant 5 minutes à 300 x g. Éliminer le surnageant et ajouter le tampon de lyse RA1 au culot cellulaire.

- **Tissus d'animaux :**

Pour une préparation efficace de l'ARN, il est essentiel que tout l'ARN contenu dans l'échantillon soit libéré des cellules par broyage et que la viscosité de l'échantillon soit réduite par homogénéisation. La décongélation des échantillons de tissus non broyés doit être effectuée uniquement en présence du tampon de lyse RA1 et pendant le broyage mécanique, par exemple avec un broyeur à rotor-stator ou un système à billes. Ceci garantit que l'ARN n'est pas dégradé par des RNases avant même de débiter la procédure de purification.

Les techniques courantes de broyage des tissus d'animaux sont, par exemple, la méthode '**pilon et mortier**' ou l'utilisation de **seringues et aiguilles**, permettant, après de multiples passages du lysat, d'homogénéiser l'échantillon. Cependant, les échantillons utilisables avec le kit **NucleoSpin® RNA XS** étant de petite taille, ces méthodes de broyage sont souvent inapplicables.

## 2.4 Procédures d'élution

Une concentration élevée de l'ARN purifié est généralement souhaitée pour les applications avals. En particulier en raison du volume limité des réactions effectuées, la concentration de l'ARN analysé peut être déterminante. A cause d'un volume d'élution minimal élevé, les kits standards produisent généralement un ARN faiblement concentré si de petits échantillons biologiques sont utilisés pour l'extraction. De telles concentrations nécessitent souvent une étape de concentration supplémentaire de l'ARN afin de rendre l'analyse possible.

Contrairement aux kits standards, le kit **NucleoSpin® RNA XS** permet une élution performante dans un volume final réduit, induisant une concentration élevée de l'ARN purifié.

Des volumes d'élution de 5–30 µL sont recommandés, le volume d'élution préconisé par défaut est de 10 µL.

## 2.5 Stabilité de l'ARN purifié

L'ARN purifié doit être immédiatement placé et conservé sur la glace pour une stabilité optimale. La contamination par des RNases quasiment omniprésentes (matériel, traces de doigts, poussières) constitue une menace pour l'ARN extrait. Pour un stockage à court terme, congeler l'ARN à -20 °C ou à -70 °C pour une conservation de longue durée.

### 3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

**Attention :** Les tampons RA1, RA2 et MDB contiennent un sel chaotropique et des détergents. Porter des gants et des lunettes de protection !

**ATTENTION :** les tampons RA1, RA2 et MDB contiennent du thiocyanate de guanidine pouvant induire la formation de composés hautement réactifs en présence de Javel (hypochlorite de sodium). NE PAS ajouter de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets liquides issus de la procédure.

- Stocker la rDNase lyophilisée, l'agent réducteur TCEP, et l'ARN Carrier à 4 °C à réception du kit (stabilité pendant 1 an maximum).
- Tous les autres constituants du kit doivent être stockés entre 15–25 °C et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette du kit. Le stockage à des températures inférieures peut entraîner la précipitation de sels.
- Vérifier la disponibilité de l'éthanol 70 % pour l'ajout au lysat de l'échantillon dans le tampon RA1 pour l'étape de création des conditions de fixation de l'ARN.
- Vérifier la disponibilité de l'éthanol 96–100 % (pour le protocole de purification de l'ARN seulement).

Avant de débuter la procédure **NucleoSpin® RNA XS**, préparez :

- **rDNase :** Ajouter le volume indiqué sur le flacon (ou voir tableau ci-dessous) d'H<sub>2</sub>O RNase-Free dans le flacon de rDNase lyophilisée et incubé pendant 1 min à température ambiante. Retourner doucement le flacon pour dissoudre totalement la rDNase. Veiller à ne pas mélanger la rDNase vigoureusement, l'enzyme étant sensible à l'agitation mécanique. Distribuer en aliquotes et stocker -20 °C. La solution congelée est stable pendant 6 mois. Ne pas congeler/décongeler les aliquotes plus de trois fois.
- **Agent réducteur TCEP :** Ajouter le volume indiqué d'H<sub>2</sub>O RNase-Free dans le flacon et incubé quelques minutes à température ambiante. Mélanger pour dissoudre totalement le TCEP. Stocker le TCEP dissout à -20 °C.
- **ARN Carrier :** Préparer une **solution stock** à la première utilisation. Dissoudre l'ARN Carrier dans 750 µL de tampon RA1 de manière à obtenir une solution stock à 400 ng/µL. Préparer une **solution de travail** avant l'extraction de l'ARN : diluer à 1 :100 avec le tampon RA1 (ex : 1 µL de solution stock d'ARN Carrier + 99 µL de tampon RA1) afin d'obtenir une solution de travail à 4 ng/µL. Utiliser ensuite 5 µL de cette solution de travail (20 ng de carrier ARN) dans chaque lysat (étape 3 du protocole, voir chapitre 5). Conserver la solution stock à -20 °C ; ne pas préparer à l'avance la solution de travail, celle-ci doit être préparée fraîchement avant chaque utilisation.  
*Note : En raison du mode de production, l'ARN Carrier lyophilisé peut être difficilement visible dans le flacon.*
- **Tampon de lavage RA3 :** Ajouter le volume indiqué d'éthanol 96–100 % dans le tampon RA3 concentré. Indiquer sur le flacon l'ajout de l'éthanol. Conserver le tampon de lavage RA3 à 15–25 °C pendant au plus 1 an.

<b>NucleoSpin® RNA XS</b>			
<b>REF</b>	<b>10 préps 740902.10</b>	<b>50 préps 740902.50</b>	<b>250 préps 740902.250</b>
Tampon de lavage RA3 (Concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol	50 mL Add 200 mL ethanol to each bottle
rDNase, exempt de RNase (lyophilisée)	1 tube (taille A) Ajouter 55 µL d'H <sub>2</sub> O RNase-free	1 tube (taille C) Ajouter 230 µL d'H <sub>2</sub> O RNase-free	2 tube (taille D) Ajouter 540 µL d'H <sub>2</sub> O RNase-free à chaque tube
ARN Carrier	300 µg	300 µg	300 µg
	Ajouter 750 µL de tampon RA1 pour obtenir une solution stock concentrée.		
	Diluer 1:100 avec le tampon RA1 pour obtenir la solution de travail.		
Agent réducteur TCEP	14 mg Ajouter 100 µL d'H <sub>2</sub> O RNase-free	3 × 14 mg Ajouter 100 µL d'H <sub>2</sub> O RNase-free à chaque tube	2 × 107 mg Ajouter 750 µL d'H <sub>2</sub> O RNase-free à chaque tube

## 4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit NucleoSpin® RNA XS, porter des vêtements de protection appropriés (par exemple : une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection). Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité appropriées (FDS disponibles en ligne sur [www.mn-net.com/msds](http://www.mn-net.com/msds)).



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans les tampons RA1 et RA2 peuvent former des composés hautement réactifs lorsqu'ils sont combinés avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets liquides issus de la procédure.

Les déchets générés par le kit **NucleoSpin® RNA XS** n'ont pas été testés pour la présence de matériel infectieux résiduel. Une contamination des déchets liquides par du matériel infectieux résiduel est hautement improbable en raison du tampon de lyse fortement dénaturant et du traitement à la protéinase K mais elle ne peut 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 Elimination des déchets

Éliminer les substances dangereuses, potentiellement infectieuses ou contaminées par du matériel biologique de manière sûre et conforme aux dispositions réglementaires locales.

## 5 Protocoles

### 5.1 Purification d'ARN à partir de cellules en culture, de cellules isolées par capture laser ou de cryosections microdisséquées

Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le TCEP, l'ARN Carrier, la rDNase et le tampon de lavage RA3 ont bien été préparés selon les indications du chapitre 3.

#### 1 Préparer l'échantillon

Préparer un échantillon tel qu'un culot de cellules en culture ( $10^5$  maximum), de cellules isolées ou des cryosections microdisséquées) dans un microtube (non fourni).

Pour des détails sur les quantités d'échantillon appropriées, voir le paragraphe 2.2.

#### 2 Lyser et homogénéiser les cellules

Ajouter **100  $\mu$ L de tampon RA1** et 2  $\mu$ L de TCEP à l'échantillon puis vortexer vigoureusement (2 x 5 s).



+ 100  $\mu$ L RA1  
+ 2  $\mu$ L TCEP

Si des séries d'échantillons sont traitées, la préparation d'un pré-mix est recommandée (par ex : 1,1 mL de tampon de lyse RA1 et 22  $\mu$ L de TCEP pour 10 préparations en parallèle. Utiliser pour chaque échantillon, 102  $\mu$ L de ce mélange).

La procédure suffit généralement pour homogénéiser les cellules en culture, les cellules isolées par capture laser ou les cryosections microdisséquées. Pour plus de détails concernant les méthodes d'homogénéisation, voir le paragraphe 2.3.

#### 3 Ajouter l'ARN Carrier

Ajouter **5  $\mu$ L de solution de travail d'ARN Carrier** (20 ng) au lysat. Mélanger en vortexant (2 x 5 s). Centrifuger brièvement (environ 1 s 1000 x g) pour nettoyer le bouchon.



+ 5  $\mu$ L  
ARN Carrier  
Mélanger

*Pour la préparation de la solution de travail de l'ARN Carrier, voir le chapitre 3*

#### 4 Filtrer le lysat (optionnel)

Placer une colonne **NucleoSpin® Filter** (bague violette) dans un tube collecteur (2 mL ; fourni), déposer le mélange et centrifuger pendant 30 s à 11,000 x g.



11,000 x g  
30 s

*Cette étape peut être omise pour les échantillons de petite taille, par exemple, inférieurs à  $10^5$  cellules.*



**5 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN**

Jeter le NucleoSpin® Filter (bague violette). Ajouter 100 µL d'éthanol (70 %) au lysat homogénéisé et mélanger par pipetage (5 fois).



+ 100 µL  
70 % EtOH  
Mélanger

*Autrement, ajouter 100 µL d'éthanol (70 %) à l'échantillon dans un tube 1,5 mL (non fourni) et mélanger en vortexant (2 × 5 s). Centrifuger brièvement (environ 1 s à 1000 × g) pour nettoyer le bouchon. Pipeter le lysat 2 fois avant de charger le lysat.*

**6 Fixer l'ARN**

Pour chaque préparation, prendre une colonne **NucleoSpin® RNA XS** (bague bleue claire) et placer dans un tube collecteur. Charger le lysat sur la colonne. Centrifuger pendant **30 s à 11,000 × g**.



Charger le  
lysate

Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur 2 mL.



11,000 × g  
30 s

*Le volume maximal de la colonne NucleoSpin® RNA XS est de 600 µL. Répéter la procédure si un volume de lysat supérieur est utilisé.*

**7 Dessaler la membrane de silice**

Ajouter **100 µL de tampon MDB** (Tampon de dessalage de la membrane) et centrifuger à **11,000 × g** pendant **30 s** pour sécher la membrane. Il n'est pas nécessaire d'utiliser un nouveau tube collecteur après cette étape de centrifugation.



+ 100 µL MDB

*L'élimination des sels rend le traitement à la rDNase beaucoup plus efficace. Si, pour quelque raison, l'embout de sortie de la colonne est entré en contact avec le filtrat, jeter le liquide et centrifuger à nouveau 30 s à 11,000 × g.*

11,000 × g  
30 s

**8 Digérer l'ADN**

Préparer le **mélange réactionnel de rDNase** dans un microtube stérile (non inclus) : pour chaque préparation, ajouter **3 µL de rDNase** reconstituée (voir chapitre 3) à **27 µL de tampon de réaction pour la rDNase**. Mélanger en tapotant le tube



+ 25 µL  
Mélange  
réactionnel  
rDNase

Déposer **25 µL de mélange réactionnel de rDNase** directement au centre de la membrane de silice. Refermer la colonne. Incuber à **température ambiante** pendant **15 min**.

TA  
15 min

*Il n'est pas nécessaire de changer le tube collecteur après l'étape d'incubation.*

**9 Laver et sécher la membrane de silice****1<sup>er</sup> lavage**

Ajouter **100 µL de tampon RA2** dans la colonne NucleoSpin® RNA XS. Incuber pendant **2 min** à TA. Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 x g**.

Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur (2 mL).

*Le tampon RA2 inactive la rDNase.*

**2<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter **400 µL de tampon RA3** dans la colonne NucleoSpin® RNA XS. Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.

Note : veiller à éliminer avec le tampon RA3 les résidus de tampons des étapes précédentes, en particulier si le lysat est entré en contact avec l'ouverture de la colonne pendant l'étape de chargement du lysat sur la colonne. Pour un lavage efficace, rincer l'ouverture avec le tampon RA3.

**3<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter **200 µL de tampon RA3** dans la colonne NucleoSpin® RNA XS. Centrifuger **2 min** à **11,000 x g** pour sécher la membrane. Placer la colonne dans un tube d'éluion exempt de nucléases (1.5 mL ; fourni).

*Si, pour quelque raison, l'embout de sortie de la colonne est entré en contact avec le filtrat, jeter le liquide et centrifuger à nouveau 30 s à 11,000 x g.*

+ 100 µL RA2

TA  
2 min

11,000 x g  
30 s



+ 400 µL RA3



11,000 x g  
30 s

+ 200 µL RA3

11,000 x g  
2 min

**10 Eluer l'ARN purifié**

Eluer l'ARN dans **10 µL H<sub>2</sub>O** (RNase-free ; fourni) et centrifuger à **11,000 x g** pour **30 s**.

*Si une concentration supérieure ou encore un volume final supérieur sont souhaités, le volume peut être ajusté de 5 à 30 µL.*

*Pour plus de détails voir le paragraphe 2.4.*



+ 10 µL RNase-free H<sub>2</sub>O



11,000 x g  
30 s

## 5.2 Purification de l'ARN de tissus

### Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le TCEP, l'ARN Carrier, la rDNase et le tampon de lavage RA3 ont bien été préparés selon les indications du chapitre 3.

#### 1 Préparer l'échantillon

Préparer un échantillon tel qu'une biopsie dans un microtube (non fourni).

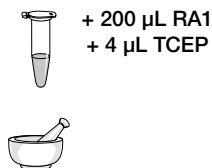
Pour les quantités de tissus recommandées, voir le paragraphe 2.2.

#### 2 Lyser et homogénéiser les tissus

Ajouter **200 µL de tampon RA1** et **4 µL de TCEP** à l'échantillon et vortexer vigoureusement (2 × 5 s).

L'utilisation d'un broyeur à rotor-stator ou d'un système à billes sont des méthodes recommandées pour l'homogénéisation des échantillons de tissus. Pour plus de remarques concernant les méthodes d'homogénéisation, voir le paragraphe 2.3.

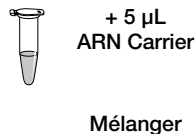
Si les échantillons sont traités en série, la préparation d'un prémix est recommandée (ex : 2.2 mL de tampon RA1 et 44 µL de TCEP pour 10 préparations). Utiliser 204 µL de ce mélange par échantillon.



#### 3 Ajouter l'ARN Carrier

Ajouter **5 µL de solution de travail d'ARN Carrier** (20 ng) au lysat. Mélanger en vortexant (2 × 5 s). Centrifuger brièvement (environ 1 s à 1000 x g) pour nettoyer le bouchon.

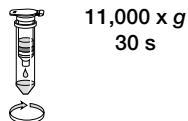
*Voir le chapitre 3 pour la préparation de l'ARN Carrier.*



#### 4 Filtrer le lysat

Reduire la viscosité et clarifier le lysat par filtration à travers un **NucleoSpin® Filter** (bague violette) : placer le NucleoSpin® Filter dans un tube collecteur 2 mL (fourni), déposer l'échantillon et centrifuger pendant **30 s à 11,000 x g**.

Si un culot visible se forme (en fonction de la nature et la quantité d'échantillon), transférer le surnageant dans un nouveau tube 1,5 mL (non fourni) en évitant tout matériel insoluble.



**5 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN**

Jeter le NucleoSpin® Filter (bague violette), ajouter **200 µL d'éthanol (70 %)** au lysat homogénéisé et mélanger en pipetant (5 fois).



**+ 200 µL  
70 % EtOH**  
**Mélanger**

Autrement, transférer le filtrat dans un nouveau tube 1,5 mL (non fourni), ajouter **200 µL d'éthanol (70 %)**, et mélanger en vortexant (2 × 5 s). Centrifuger brièvement (environ 1 s à 1000 × g) pour nettoyer le bouchon. Pipeter le lysat deux fois pour le mélanger avant de le transférer.

*Après ajout d'éthanol, un précipité filandreux peut apparaître, ceci n'affectera pas la procédure d'extraction de l'ARN. Veiller à désagréger totalement ce précipité en mélangeant et charger l'ensemble sur la colonne comme indiqué à l'étape 6. Ne pas centrifuger le lysat après ajout de l'éthanol et avant chargement de la colonne afin d'éviter de culotter le précipité.*

**6 Fixer l'ARN**

Pour chaque échantillon, prendre une **colonne NucleoSpin® RNA XS** (bague bleue) placée dans son tube collecteur et charger le lysat. Centrifuger pendant **30 s à 11,000 × g**. Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur (2 mL).



**Charger le lysat**

Le volume utile de la colonne NucleoSpin® RNA XS est de 600 µL. Répéter cette étape si un volume de lysat supérieur est utilisé.



**11,000 × g  
30 s**

**7 Dessaler la membrane de silice**

Ajouter **100 µL de tampon MDB** (Tampon de dessalage de la membrane) et centrifuger à **11,000 × g** pendant **30 s** pour sécher la membrane. Il n'est pas nécessaire d'utiliser un nouveau tube collecteur après cette étape de centrifugation.



**+ 100 µL MDB**



**11,000 × g  
30 s**

*L'élimination des sels rend le traitement à la rDNase beaucoup plus efficace. Si, pour quelque raison, l'embout de sortie de la colonne est entré en contact avec le filtrat, jeter le liquide et centrifuger à nouveau.*

**8 Digérer l'ADN**

Préparer le **mélange réactionnel de rDNase** dans un microtube stérile (non inclus) : pour chaque préparation, ajouter **3 µL** de rDNase reconstituée (voir le chapitre 3) à **27 µL de tampon de réaction pour la rDNase**. Mélanger en tapotant le tube.



+ 25 µL  
Mélange  
réactionnel  
rDNase

TA  
15 min

Déposer **25 µL de mélange réactionnel de rDNase** directement au centre de la membrane de silice. Refermer la colonne. Incuber à **température ambiante** pendant **15 min**.

*Il n'est pas nécessaire de changer le tube collecteur après l'étape d'incubation.*

**9 Laver et sécher la membrane de silice**

Ajouter **100 µL de tampon RA2** dans la colonne NucleoSpin® RNA XS. Incuber pendant **2 min** à **TA**. Centrifuger pendant **30 s** à **1 g**.



+ 100 µL RA2

TA  
2 min

Placer la colonne dans un tube collecteur 2 mL



**11,000 x g**  
30 s

*Le tampon RA2 inactive la rDNase.*

Ajouter **400 µL de tampon RA3** dans la colonne NucleoSpin® RNA XS. Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne sur un tube collecteur.

+ 400 µL RA3

**11,000 x g**  
30 s

Ajouter **200 µL de tampon RA3** dans la colonne NucleoSpin® RNA XS. Centrifuger pendant **2 min** à **11,000 x g** pour sécher la membrane. Placer la colonne dans un tube d'éluion exempt de nucléases (1.5 mL ; fourni).



+ 200 µL RA3

**11,000 x g**  
2 min

*Si, pour quelque raison, l'embout de sortie de la colonne est entré en contact avec le filtrat, jeter le liquide et centrifuger à nouveau 30 s à 11,000 x g.*

**10 Eluer l'ARN purifié**

Eluer l'ARN dans **10 µL d'H<sub>2</sub>O** (RNase-free ; fournie) et centrifuger à **11,000 x g** pendant **30 s**.



+ 10 µL RNase-  
free H<sub>2</sub>O

Si des concentrations en ARN supérieures ou encore un volume final supérieur sont souhaités, le volume d'éluion utilisé peut être ajusté de 5 à 30 µL.



**11,000 x g**  
30 s

*Pour plus de détails concernant les procédures alternatives d'éluion, voir le paragraphe 2.4.*

## 5.3 Purification et concentration de l'ARN

### Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 a bien été préparé selon les indications du chapitre 3.

#### 1 Préparer l'échantillon

Fournir **jusqu'à 300 µL d'échantillon** comme de l'ARN purifié (ex : purifié au phénol) ou de mélange réactionnel d'ARN (ex : réaction de marquage) dans un microtube (non fourni).

Voir le paragraphe 2.2 pour plus de détails sur les quantités d'échantillon initial.



Echantillon

#### 2 Préparer le mélange de lyse - fixation

Pour chaque fraction de 100 µL d'échantillon, mélanger **25 µL de tampon RA1** et **75 µL d'éthanol (96 – 100 %)**. Si des séries d'échantillons sont à traiter, préparer un prémix (1 volume de tampon RA1 plus 3 volumes d'éthanol 96 – 100 %).

+ 25 µL RA1  
+ 75 µL EtOH  
(96 – 100 %)  
par 100 µL  
d'échantillon

Mélanger

#### 3 Ajouter l'ARN Carrier

Inutile !

#### 4 Filtrer le lysat

Inutile !

#### 5 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN

Ajouter **un volume de prémix** à l'échantillon (ex : 100 µL de prémix à 100 µL d'échantillon) et mélanger en vortexant (2 × 5 s). Si nécessaire, centrifuger brièvement (environ 1 s à 1000 x g) pour nettoyer le bouchon.



Ajouter 1 vol. de  
prémix à 1 vol  
d'échantillon

Mélanger

#### 6 Fixer l'ARN

Pour chaque échantillon, prendre une colonne **NucleoSpin® RNA XS** (bague bleue claire) placée dans son tube collecteur 2 mL et **charger le lysat** dans la colonne. Centrifuger pendant **30 s à 11,000 x g**. Pour les échantillons de volume > 300 µL, charger la colonne en deux fois.



Charger le lysat

Remplacer la colonne dans un tube collecteur 2 mL neuf.



11,000 x g  
30 s

*Pour les applications les plus exigeantes, le rendement de purification peut être accru ainsi : centrifuger 30 s à 2,000 x g avant la centrifugation de 30 s à 11,000 x g.*

**7 Dessalage de la membrane**

Inutile !

**8 Digestion de l'ADN**

Inutile !

**9 Laver et sécher la membrane de silice****1<sup>er</sup> lavage**

Déposer **400 µL de tampon RA3** dans la colonne NucleoSpin® RNA XS. Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur.



+ 400 µL RA3

11,000 x g  
30 s**2<sup>ème</sup> lavage**

Déposer **200 µL de tampon RA3** dans la colonne NucleoSpin® RNA XS. Centrifuger pendant **2 min** à **11,000 x g** pour sécher la membrane. Placer la colonne dans un tube d'éluion exempt de nucléases (1,5 mL ; fourni).



+ 200 µL RA3

11,000 x g  
2 min

*Si, pour quelque raison, l'embout de sortie de la colonne est entré en contact avec le filtrat, jeter le liquide et centrifuger à nouveau 30 s à 11,000 x g.*

**10 Eluer l'ARN purifié**

Eluer l'ARN dans **10 µL d'H<sub>2</sub>O** (RNase-free ; fourni) et centrifuger à **11,000 x g** pendant **30 s**.

*Si des concentrations supérieures en ARN ou encore un volume final supérieur sont souhaités, le volume d'éluion utilisé peut être ajusté de 5 à 30 µL.*

*Pour plus de détails concernant les procédures alternatives d'éluion, voir le paragraphe 2.4.*

+ 10 µL RNase-free H<sub>2</sub>O11,000 x g  
30 s

## 5.4 Digestion en solution avec la rDNase

La digestion effectuée selon la procédure standard directement sur la colonne est très efficace et induit une contamination en ADN résiduel minimale. Cet ADN résiduel ne sera pas détectable dans la plupart des applications. Cependant, l'élimination de l'ADN à un niveau totalement indétectable est difficile et l'efficacité de la digestion sur la membrane peut s'avérer parfois perfectible pour certaines applications très sensibles à la moindre trace d'ADN résiduel.

Parmi les applications sensibles figurent les réactions de RT-PCR utilisant des amorces ne différenciant pas les ADNc (dérivés de l'ARN) et l'ADN génomique contaminant. Plus particulièrement si :

- des cibles présentes en grands nombre de copies sont analysées (ex : familles multigéniques, cibles mitochondriales, plastidiales ou plasmidiques (après transfections des cellules))
- le gène cible a un niveau d'expression très faible.
- l'amplicon est plutôt petit (< 200 bp).

La digestion de l'ADN en solution peut efficacement détruire l'ADN contaminant. Cependant, un contrôle strict des RNases et une nouvelle étape de purification de l'ARN (afin d'éliminer les tampons, les sels, la rDNase et l'ADN digéré) sont habituellement nécessaires.

La DNase recombinante de haute qualité, exempte de RNase, incluse dans le kit NucleoSpin® RNA XS facilite la digestion en solution de manière à éliminer toute trace d'ADN contaminant.

**A Digérer l'ADN (Préparation de la réaction)**

Préparer un prémix enzyme-tampon : ajouter 1 µL de rDNase à 10 µL de tampon de réaction pour la rDNase.

Ajouter 1/10 volume de mélange enzyme-tampon à l'ARN élué (par ex : à 10 µL d'ARN, ajouter 1 µL de prémix contenant l'enzyme et le tampon).

---

**B Incuber l'échantillon**

Incuber pendant **10 min à 37 °C**.

---

**C Repurifier l'ARN**

Repurifier l'ARN avec une procédure appropriée, par exemple en utilisant une précipitation à l'éthanol ou un kit dédié NucleoSpin® RNA Clean-up XS (voir les Informations de commande).

**Précipitation à l'éthanol, exemple :**

Ajouter 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5.2 et 2.5 volume d'éthanol 96–100 % à un volume d'échantillon. Mélanger précautionneusement.

Incuber pendant une durée de plusieurs minutes à plusieurs heures respectivement à -20 °C ou à 4 °C.

Note : Choisir une durée d'incubation élevée si l'échantillon contient peu d'ARN. Une incubation courte est généralement suffisante si l'échantillon est fortement concentré en ARN.

Centrifuger pendant 10 min à vitesse maximale.

Laver le culot avec de l'éthanol 70 %.

Sécher le culot d'ARN et resuspendre dans de l'eau RNase-free.

## 6 Annexes

### 6.1 Guide de résolution des problèmes

Problèmes	Causes possible et suggestions
ARN dégradé/ rendement nul	<p><i>Contamination en RNases</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Créer un environnement de travail RNase-Free. Porter des gants pendant toute la procédure et les changer fréquemment. Utiliser des tubes jetables stériles en polypropylène. Conserver les tubes clos aussi souvent que possible pendant l'extraction. Les éventuels contenants en verre devront avoir été soumis à un traitement thermique d'au moins 2 heures à 250 °C avant utilisation.</li> </ul>
	<p><i>Mauvaise utilisation ou préparation des réactifs</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Réactifs mal préparés. Ajouter le volume indiqué d'H<sub>2</sub>O RNase-Free au flacon de rDNase et d'éthanol 96 % au tampon de lavage concentré RA3 et mélanger. Reconstituer et stocker la rDNase lyophilisée selon les instructions du chapitre 3.</li> <li>Echantillons et réactifs mal homogénéisés. Toujours vortexer vigoureusement après l'ajout d'un réactif.</li> <li>Omission de l'ajout d'éthanol après la lyse. La fixation de l'ARN à la membrane de silice n'est efficace qu'en présence d'éthanol.</li> </ul> <p><i>Stockage du kit</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Reconstituer et stocker la rDNase lyophilisée selon les instructions du chapitre 3.</li> <li>Stocker les autres composants du kit à température ambiante. La conservation à des températures inférieures peut induire la précipitation de sels.</li> <li>Conserver les flacons bien clos afin de prévenir l'évaporation ou la contamination des solutions.</li> </ul> <p><i>Influence de la force ionique et du pH sur l'absorption <math>A_{260}</math> et donc sur le ratio <math>A_{260}/A_{280}</math></i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Pour la mesure de l'absorption, utiliser du Tris 5 mM pH 8,5 comme diluant. Voir aussi : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Manchester, K L. 1995. Value of <math>A_{260}/A_{280}</math> ratios for measurement of purity of nucleic acids. <i>Biotechniques</i> 19, 208–209.</li> <li>- Wilfinger, W W, Mackey, K and Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. <i>Biotechniques</i> 22, 474–481.</li> </ul> </li> </ul>
ARN de faible qualité/ rendement faible	

Problèmes	Causes possible et suggestions
ARN de faible qualité / rendement faible (Suite)	<i>Echantillons</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mauvaises conditions de stockage des échantillons. Autant que possible, utiliser du matériel frais. Sinon, congeler les échantillons dans l'azote liquide dès la collecte. Les échantillons doivent être stockés à -70 °C. Ne jamais laisser les tissus décongeler avant ajout du tampon RA1. Procéder au broyage immédiatement après ajout du tampon RA1.</li> <li>• Broyage et/ou homogénéisation de l'échantillon insuffisants. Veiller à un broyage complet et utiliser les NucleoSpin® Filters pour homogénéiser facilement le lysat.</li> </ul>
Faible ratio $A_{260}/A_{230}$	<i>Contamination par le thiocyanate de guanidine</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déposer précautionneusement le lysat dans la colonne NucleoSpin® RNA XS en essayant d'éviter de contaminer l'ouverture supérieur de la colonne et le bouchon.</li> <li>• Veiller à éliminer le tampon de lavage RA2 avec le tampon suivant RA3. Déposer le RA3 de manière à rincer toute la surface interne de la colonne.</li> </ul>
Colonne NucleoSpin® RNA colmatée / Faible rendement et/ou qualité	<i>Echantillons</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantité excessive de matériel initial. La surcharge entraîne un rendement amoindri. Réduire la quantité d'échantillon ou utiliser un volume supérieur de RA1.</li> <li>• Broyage et/ou homogénéisation de l'échantillon insuffisants. Veiller à un broyage complet et utiliser les NucleoSpin® Filters pour homogénéiser facilement le lysat.</li> </ul>
Contamination de l'ARN par l'ADN génomique	<i>rDNase insuffisamment active</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reconstituer et stocker la rDNase lyophilisée selon les instructions du chapitre 3.</li> </ul>
	<i>Mauvaise utilisation de la rDNase</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déposer la solution de rDNase directement au centre de la membrane de silice et fermer le bouchon.</li> </ul>
	<i>Quantité d'échantillon excessive</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réduire la quantité de cellules ou de tissus utilisée.</li> </ul>

---

**Problèmes**                      **Causes possible et suggestions**


---

Contamination de l'ARN par l'ADN génomique ( <i>suite</i> )	<p><i>Système de détection de l'ADN trop sensible</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La contamination en ADN est efficacement réduite par la digestion à la rDNase effectuée sur la membrane. Cependant, il est difficile de garantir l'élimination totale de l'ADN, aussi, pour des applications très sensibles, il peut parfois s'avérer possible de détecter de l'ADN résiduel.</li> </ul> <p>La probabilité de détection d'ADN par PCR augmente avec .</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- le nombre de copies d'ADN par préparation : cible monocopie &lt; cible plastidiale/mitochondriale &lt; cible plasmidique (après transfection)</li> <li>- la réduction de la taille de l'amplicon.</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utiliser si possible des cibles de PCR plus grandes (ex : &gt; 500 bp) ou des amorces couvrant les introns.</li> <li>• Utiliser le protocole additionnel 5.4 pour mener une digestion supplémentaire en solution avec la rDNase.</li> </ul>
Performance suboptimale de l'ARN dans les applications	<p><i>Contamination par de l'éthanol ou des sels</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne pas laisser l'embout de sortie de la colonne entrer en contact avec le filtrat après le second lavage avec le tampon RA3. Veiller à centrifuger à la vitesse et pendant la durée recommandée afin d'éliminer totalement le tampon éthanolique RA3.</li> <li>• Vérifier que le tampon RA3 est bien à température ambiante. Le lavage avec le tampon à température inférieure réduit l'efficacité de dessalage du tampon RA3.</li> <li>• En fonction de la robustesse du système de RT-PCR utilisé, la réaction peut être inhibée si la totalité de l'éluat est utilisée comme matrice pour la RT-PCR. Utiliser un volume moindre d'éluat.</li> </ul> <p><i>Conserver l'ARN proprement</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• L'ARN élué doit être conservé sur la glace pour garantir sa stabilité en raison de l'omniprésence des traces de RNases (matériel du laboratoire, traces de doigts, poussières) susceptibles de dégrader l'ARN purifié. Pour un stockage à court terme, stocker à -20 °C et à -70 °C pour une conservation à long terme.</li> </ul>

---

---

**Problèmes**                      **Causes possible et suggestions**

---

*Abrasion de la silice*

Discordance  
entre la  
quantification  
par mesure  
de l' $A_{260}$  et la  
quantification par  
PCR

- En raison du faible contenu en ARN des très petits échantillons extraits, induisant une faible quantité d'ARN purifié, la quantification de l'ARN par mesure de l'absorption  $A_{260}$  est souvent altérée en raison de la faible sensibilité de la mesure. Lorsque l'absorption mesurée est proche de la limite de détection du spectrophotomètre, la mesure est sensible à de minimes traces d'abrasion de silice. Afin de prévenir ce type de mesures incohérentes lors de la quantification par mesure de  $A_{260}$  de faibles quantités d'ARN, centrifuger l'éluat pendant 30 s à  $> 11.000 \times g$  et prélever un aliquote sans perturber le moindre sédiment éventuel. Autrement, privilégier une méthode insensible à la présence de résidus de silice (ex : Ribogreen).

---

*Mesure hors de la limite de détection du spectrophotomètre*

Ratio  $A_{260}/A_{280}$   
inattendu

- Afin que la mesure du ratio  $A_{260}/A_{280}$  soit significative, il est nécessaire que les valeurs  $A_{260}$  et  $A_{280}$  soit suffisamment supérieures à la limite de détection du photomètre utilisé. Une valeur  $A_{280}$  proche du bruit de fond de l'appareil entraîne des ratios  $A_{260}/A_{280}$  incohérents.
-

## 6.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® RNA XS	740902.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA Clean-up XS	740903.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® totalRNA FFPE XS	740969.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA	740955.10/.50/.250	10/50/250
NucleoZOL	740404.200	200 mL
NucleoSpin® RNA Blood	740200.10/.50	10/50
NucleoSpin® totalRNA FFPE	740982.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA Midi	740962.20	20
NucleoSpin® RNA/Protein	740933.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® TriPrep	740966.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA Clean-up	740948.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set	740944	Convient pour 100 préparations
Tampon RA1	740961 740961.500	60 mL 500 mL
rDNase Set	740963	1 set
Reducing Agent TCEP	740395.107	107 mg
NucleoSpin® Filters	740606	50
Tubes collecteurs (2 mL)	740600	1000
NucleoProtect® RNA	740400.50/.250/.500	50/250/500 mL

Visitez notre site [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) pour plus d'informations sur nos produits.

### 6.3 Références

**Fleige S, Pfaffl MW.** : RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun ; 27(2–3) :126–39. Epub 2006 Feb 15. Review.

**Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C.** : Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* 2005 Mar 30 ;33(6) :e56.

**Miller CL, Diglisic S, Leister F, Webster M, Yolken RH.** : Evaluating RNA status for RT-PCR in extracts of postmortem human brain tissue. *Biotechniques.* 2004 Apr ; 36(4) :628–33.

**Schoor O, Weinschenk T, Hennenlotter J, Corvin S, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanovic S.** : Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *Biotechniques.* 2003 Dec ; 35(6) :1192–6, 1198–201.

## 6.4 Restrictions d'utilisation / 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.

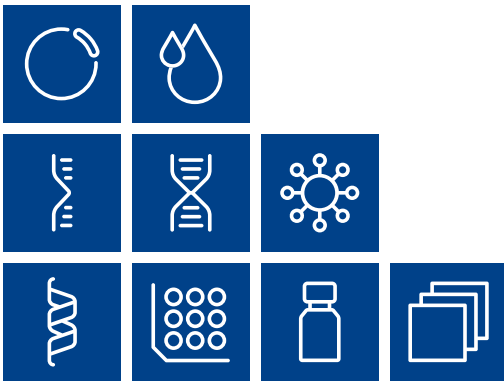
Les produits et leur application sont susceptibles de modifications. Par conséquent, veuillez contacter notre Equipe Service Technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur local pour obtenir des informations scientifiques 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

## 6.5 Versions linguistiques et prédominance

Ce document est disponible en plusieurs langues. En cas de divergence ou de problème d'interprétation, la version anglaise prévaut.



# MACHEREY-NAGEL

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

MACHEREY-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)

