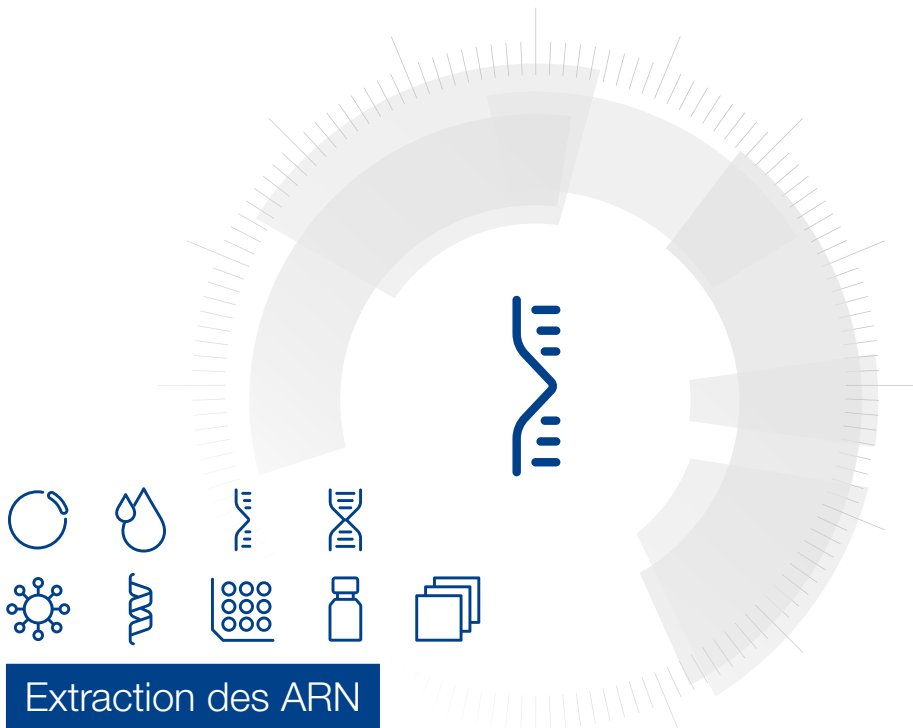


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



■ NucleoSpin® RNA Plus

Avril 2023 / Rev. 06

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

Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-333
E-mail: 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

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

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

Table of contents

1 Composants	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur	5
1.3 Environnement de travail exempt de RNase	5
1.4 A propos de ce manuel	6
2 Description du produit	7
2.1 Principe général	7
2.2 Caractéristiques du kit	7
2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons	9
2.4 Procédures d'élution	11
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	12
4 Instructions de sécurité	13
4.1 Elimination des déchets	13
5 Protocole NucleoSpin® RNA Plus	14
6 Annexes	17
6.1 Digestion à la rDNase en solution	17
6.2 Guide de résolution des problèmes	19
6.3 Informations de commande	22
6.4 Restrictions d'utilisation / garantie	23
6.5 Versions linguistiques et prédominance	23

1 Composants

1.1 Contenu du kit

NucleoSpin® RNA Plus			
REF	10 preps 740984.10	50 preps 740984.50	250 preps 740984.250
Tampon de lyse LBP	5 mL	25 mL	125 mL
Solution de fixation BS	1.5 mL	6 mL	30 mL
Tampon de lavage WB1	3 mL	12 mL	60 mL
Tampon de lavage WB2 (Concentré)*	6 mL	12 mL	50 mL
H ₂ O RNase-free	13 mL	13 mL	60 mL
Colonnes NucleoSpin® gDNA removal (anneaux jaunes)	10	50	250
Colonnes NucleoSpin® RNA Plus (anneaux bleu clair - plus tubes collecteurs)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	20	100	500
Tubes collecteurs (1,5 mL)	10	50	250
Manuel d'utilisation	1	1	1

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

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

Réactifs

- 96 – 100 % d'éthanol (pour préparer le tampon de lavage WB2, éthanol non dénaturé recommandé)

Consommables

- Tubes de 1,5 mL ou 2,0 mL (pour préparer les lysats)
- Cônes stériles exempts de RNases

Équipement

- Pipettes manuelles
- Vortex
- Centrifugeuse pour microtubes
- Équipement pour le broyage et l'homogénéisation des échantillons (voir le chapitre 2.3).
- Équipements de protection individuelle (p.e., blouse, gants, lunettes)
- Environnement de travail exempt de RNase A

Note : Les agents réducteurs (p.e. β -mercaptoéthanol) souvent utilisés pour l'extraction de l'ARN ne sont généralement pas nécessaires pour les préparations avec le NucleoSpin® RNA Plus.

1.3 Environnement de travail exempt de RNase

Les composants du kit ont été testés pour garantir qu'ils sont exempts de RNases. Cependant, un environnement de travail exempt de RNases est également un facteur critique pour la réussite de l'extraction et de la manipulation de l'ARN. Il convient donc de suivre les recommandations générales visant à éviter la contamination par les RNases :

- Maintenir un espace séparé, des pipettes et du matériel dédiés lorsque l'on travaille avec de l'ARN.
- Porter des gants pour manipuler l'ARN et les réactifs afin d'éviter tout contact avec la peau, qui est une source de RNases. Changer fréquemment de gants.
- Utiliser des tubes en plastique stériles exempts de RNases. Des tubes collecteurs (2 mL, pour la collecte des filtrats et 1,5 mL pour l'élution) sont fournis dans le kit. Les tubes pour la préparation du lysat doivent être fournis par l'utilisateur.
- Utiliser l'eau RNase-free contenue dans le kit pour l'élution.
- Conserver les flacons de réactifs bien fermés en dehors des étapes d'utilisation

1.4 A propos de ce manuel

Il est fortement recommandé de lire les paragraphes détaillés du protocole de ce manuel d'utilisation si le kit **NucleoSpin® RNA Plus** est utilisé pour la première fois. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Le résumé du protocole est conçu pour être utilisé uniquement comme un outil supplémentaire de référence rapide pendant l'exécution de la procédure de purification.

Toute la documentation technique est disponible sur Internet à l'adresse suivante : **www.mn-net.com**.

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

2 Description du produit

2.1 Principe général

Le kit **NucleoSpin® RNA Plus** est conçu pour purifier l'ARN à partir de divers types de cellules et de tissus. Ce kit est constitué de colonnes NucleoSpin® gDNA Removal qui permettent par centrifugation d'éliminer rapidement et efficacement la contamination par l'ADN génomique sans étape de digestion à la DNase.

Un des principaux facteurs de réussite lors de l'extraction de l'ARN est la prévention de sa dégradation. Les cellules et tissus sont d'abord lysés par incubation dans une solution de lyse fortement concentrée en ion chaotropiques, inactivant immédiatement les RNases. Le lysat est ensuite déposé sur une colonne NucleoSpin® gDNA Removal (bagues jaunes) pour à la fois, clarifier le lysat et aussi éliminer l'ADN génomique contaminant. Après ajout de la solution de fixation (tampon BS) au filtrat, l'ARN est fixé sur une colonne NucleoSpin® RNA Plus (bagues bleues). Deux étapes consécutives de lavages éliminent les sels, les métabolites, et les composants cellulaires macromoléculaires. L'ARN purifié est au final élué dans de l'eau RNase-Free.

La procédure NucleoSpin® RNA Plus s'effectue à température ambiante.

L'éluat doit être traité avec soin car l'ARN est sensible aux traces de contamination par les RNases, que l'on trouve souvent sur le matériel de laboratoire, les doigts et la poussière. Garder l'ARN congelé à -20 °C pour un stockage à court terme ou à -70 °C pour un stockage à long terme afin de garantir la stabilité de l'ARN

2.2 Caractéristiques du kit

- Les kits **NucleoSpin® RNA Plus** sont recommandés pour l'extraction d'ARN à partir de cellules en culture et de tissus. Les kits **NucleoSpin® RNA Plus** permettent la purification d'ARN de haute qualité. Les kits **NucleoSpin® RNA Plus** permettent la purification d'ARN dont le rapport A_{260}/A_{280} est généralement supérieur à 1,9 (mesuré dans le tampon TE, pH 7,5).
- L'ARN purifié est prêt à être utilisé dans diverses applications en aval.
- L'ARN purifié avec les kits **NucleoSpin® RNA Plus** est d'une grande intégrité. L'indice d'intégrité de l'ARN (RIN) de l'ARN isolé à partir d'échantillons frais de haute qualité (p.e. cellules eucaryotes ou foie de souris frais) est généralement supérieur à 9. Cependant, l'intégrité de l'ARN dépend fortement de la qualité de l'échantillon.
- Les molécules d'ARN isolées avec **NucleoSpin® RNA Plus** sont de taille supérieure à environ 200 nucléotides. Ce kit permet d'enrichir l'ARNm puisque la plupart des ARN < 200 nucléotides (p.e. ARNr 5.8S, ARNr 5S, les ARNt, les microARN - qui représentent ensemble environ 15 à 20 % de l'ARN total) sont sélectivement exclus.
- L'ARN purifié avec les kits **NucleoSpin® RNA Plus** peut généralement contenir des quantités infimes d'ADN génomique en raison d'un léger relarguage à partir des colonnes NucleoSpin® gDNA Removal. La probabilité de détection de l'ADN par PCR augmente avec :
 1. le nombre de copies d'ADN par préparation : cible à copie unique < cible plasmidiale / mitochondriale < plasmides transfectés dans les cellules.
 2. la diminution de la taille de l'amplicon PCR.

Table 1: Résumé des caractéristiques du kit

Paramètres	NucleoSpin® RNA Plus
Technologie	Système utilisant 2 colonnes à membrane de silice : 1. Colonne pour l'élimination de l'ADN 2. Colonne pour l'extraction de l'ARN
Format	Mini colonne à centrifuger
Échantillon	< 1×10^7 cellules en culture, < 10^9 cellules bactériennes, < 10^8 cellules de levure, < 30 mg de tissu
Taille du fragment	> 200 nt
Rendement typique	Cellules HeLa 5×10^6 : 40–60 µg Foie de souris 20 mg : 80–100 µg Rein de souris 20 mg : 40–70 µg Rate de souris 5 mg : 30–60 µg
A_{260}/A_{280}	1.9–2.1
A_{260}/A_{230}	1.8–2.5
RIN (indice d'intégrité de l'ARN)	> 9
Volume d'élution	30–120 µL
Temps de préparation	20 min/6 preps
Capacité de fixation	200 µg
Utilisation	Réserver à l'usage de la recherche

2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons

Il est important d'utiliser une quantité appropriée d'échantillon afin d'obtenir un rendement et une pureté optimaux de l'ARN. La quantité maximale d'échantillon pouvant être utilisée avec le kit NucleoSpin® RNA Plus dépend du type d'échantillon et de sa teneur en ARN et en ADN.

Quantité maximale d'échantillon à utiliser par préparation (valeurs approximatives) :

- Cellules eucaryotes (p.e. cellules HeLa) : 10^7 cellules
- Tissu animal : 30 mg (poids humide)
- Tissu végétal : 100 mg (poids humide)
- Micro-organismes (p.e. levure) : 30 mg

Collecte des échantillons et inhibition des RNases

L'ARN n'est pas protégé contre la digestion tant que l'échantillon n'est pas congelé ou broyé en présence d'agents inhibiteurs ou dénaturants de la RNase.

Méthodes de collecte des échantillons :

- Utiliser l'échantillon fraîchement récolté pour une lyse immédiate et une purification de l'ARN.
- Les échantillons peuvent être conservés dans le tampon de lyse après broyage à -70 °C jusqu'à un an, à 4 °C jusqu'à 24 heures ou jusqu'à plusieurs heures à température ambiante. Les échantillons congelés dans le tampon de lyse doivent être décongelés lentement avant de commencer l'extraction de l'ARN.
- Congeler rapidement l'échantillon dans du N2 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.
- Les échantillons peuvent être immergés et conservés dans du RNAlater®. Avant d'utiliser ce type d'échantillon, il convient d'éliminer l'excès de solution RNAlater® du tissu.

Broyage et homogénéisation des échantillons

Cellules - Lyse de cellules adhérentes cultivées en plaques

Aspirer complètement le milieu de culture cellulaire et ajouter immédiatement le tampon de lyse dans les puits de la plaque de culture cellulaire. Éliminer complètement le milieu de culture cellulaire afin de garantir une activité optimale du tampon de lyse. Mélanger les cellules en culture avec le tampon de lyse est généralement suffisant pour obtenir une lyse complète.

Cellules - Lyse de cellules adhérentes recueillies après trypsination

Aspirer le milieu de culture cellulaire et ajouter une quantité égale de PBS afin de laver les cellules en culture. Aspirer le PBS. Ajouter 0,1–0,3 % de trypsine dans du PBS et incubé pendant une durée appropriée pour détacher les cellules de la surface de la boîte. Après le détachement des cellules, ajouter le milieu de culture cellulaire, transférer les cellules dans un tube approprié (non fourni) et les culotter par centrifugation pendant 5 min à $300 \times g$. Retirer le surnageant et poursuivre l'ajout du tampon de lyse au culot cellulaire. Mélanger les cellules en culture avec le tampon de lyse est généralement suffisant pour une lyse complète.

Les tissus provenant des animaux sont souvent solides et doivent donc être broyés mécaniquement et lysés. Il est essentiel, pour une préparation efficace de l'ARN, que tout l'ARN contenu dans l'échantillon soit libéré des cellules par broyage ; en cas de viscosité, l'échantillon doit être homogénéisé davantage pour réduire la viscosité.

La technique la plus couramment utilisée pour le broyage des tissus provenant des animaux est le broyage à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Broyer l'échantillon en une fine poudre en présence de N₂ liquide. Veiller à ce que l'échantillon ne se décongèle pas pendant ou après le broyage ou la pesée et ajoutez la poudre congelée à un aliquote appropriée de tampon de lyse et mélanger immédiatement. Le tissu broyé et lysé est ensuite appliqué à la colonne NucleoSpin® gDNA Removal (incluse dans le kit) afin de fixer l'ADN et d'éliminer les matières insolubles.

La décongélation de tissus non broyés doit se faire exclusivement en présence d'un tampon de lyse lors d'un broyage mécanique simultané, par exemple à l'aide d'un homogénéisateur à rotor-stator. Cela permet de s'assurer que l'ARN n'est pas dégradé par les RNases avant que la procédure ne débute. Le rotor broie et homogénéise simultanément l'échantillon par action mécanique, et casse l'ADN en quelques secondes ou quelques minutes (la durée nécessaire dépend de l'échantillon). Veiller à conserver l'extrémité du rotor submergée dans le lysat afin de ne pas former trop de mousse. Choisir un rotor de taille adaptée (5–7 mm de diamètre pour broyer en tubes 1,5–2 mL).

Les bactéries et les levures doivent être incubées dans des solutions de lysozyme ou de lyticase/zymolase, respectivement. Grâce à ce traitement, les parois cellulaires robustes de ces organismes sont digérées ou au moins affaiblies, ce qui est essentiel pour une lyse cellulaire efficace par le tampon de lyse du kit. Pour les microorganismes aux parois cellulaires extrêmement résistantes, comme certaines bactéries Gram-positives, les conditions de lyse enzymatique peuvent nécessiter des optimisations ou un changement des conditions de culture. Après la lyse dans le tampon de lyse, l'homogénéisation est effectuée lors de la filtration sur les colonnes NucleoSpin® gDNA Removal.

Alternativement, les cellules de bactéries et de levures peuvent être brisées avec un broyeur à billes. Par conséquent, remettre en suspension le culot cellulaire dans le tampon de lyse RA1, transférer la solution dans un MN Bead Tube (voir informations commande) et broyer les échantillons par broyage (par exemple, en utilisant le MN Bead Tubes Holder sur un Vortex Genie® 2). Sur la base des données générées par notre R&D, nous suggérons l'utilisation de MN Bead Tubes Type A pour les bactéries et les levures. Nous recommandons vivement d'optimiser la procédure de broyage avec des billes en fonction de votre application et de votre matériel de départ. Il peut être nécessaire de tester différents tubes de billes MN et temps de broyage pour obtenir les meilleurs résultats.

Traitement enzymatique : remettre en suspension le culot de cellules bactérien (souches Gram négatives) dans 100 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA ; pH 8) contenant 1 mg/mL de lysozyme en vortexant vigoureusement. Incuber à 37 °C pendant 10 min. Pour la préparation de l'ARN des bactéries Gram positives, remettre en suspension les cellules dans 100 µL de TE contenant 2 mg/mL de lysozyme. Il peut être nécessaire d'optimiser le temps d'incubation et la concentration en lysozyme, en fonction de la souche bactérienne.

Note : En raison de la concentration beaucoup plus élevée d'équivalents génomiques dans une préparation d'acide nucléique de bactéries par rapport au matériel eucaryote, il peut être nécessaire d'utiliser une quantité plus faible de cellules pour la préparation.

Le matériel végétal peut être broyé, par exemple, à l'aide d'un mortier et d'un pilon à l'état congelé (N₂ liquide) avant l'ajout du tampon de lyse, ou à l'aide de Dispomix® (par exemple,

Xiril/VWR), ou de gentleMACSTM Dissociator (Miltenyi Biotec) immédiatement après l'ajout du tampon de lyse. Si du matériel végétal congelé est utilisé comme échantillon, s'assurer qu'il ne sera pas décongelé avant le broyage. Le temps écoulé entre le contact de l'échantillon avec le tampon de lyse et le broyage doit être aussi court que possible. Pour certaines matières végétales, jusqu'à 100 mg peuvent être utilisés ; pour d'autres matières végétales, la quantité maximale d'échantillon est comprise entre 20 et 50 mg.

2.4 Procédures d'élution

Il est possible d'adapter la méthode d'élution et le volume d'eau utilisé en fonction des applications avals. Plusieurs procédures d'élution sont possibles.

- **Rendement élevé** : Effectuer deux étapes d'élution avec 30 µL. Environ 90 à 100 % de l'acide nucléique lié sera élué.
- **Rendement et concentration élevés** : Eluer avec le volume d'élution standard et appliquer l'éluat une fois de plus sur la colonne pour une nouvelle élution.
- **Élution simple** : Éluer une fois avec 60 µL d'eau.

L'ARN élué doit être immédiatement mis et toujours conservé sur de la glace pour une stabilité optimale, car les RNases presque omniprésentes (articles de laboratoire, empreintes digitales, poussière) dégradent l'ARN. Pour un stockage à court terme, congeler à -20 °C, pour un stockage à long terme, congeler à -70 °C.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention :

Les tampons LBP et WB2 contiennent du sel chaotropique. Porter des gants et des lunettes !

ATTENTION : Les tampons LBP et WB2 contiennent du sel chaotropique qui peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec de l'eau de Javel (hypochlorite de sodium). NE PAS ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation des échantillons.

- Tous les composants du kit doivent être conservés à température ambiante (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.

Avant de débiter une procédure **NucleoSpin® RNA Plus**, préparer les éléments suivants :

- Tampon de lavage WB2** : ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96–100 % (voir tableau ci-dessous) au tampon WB2 concentré. Marquer l'étiquette du flacon pour indiquer que de l'éthanol a été ajouté. Le tampon de lavage WB2 peut être conservé à température ambiante pendant au moins un an.

NucleoSpin® RNA Plus			
	10 preps	50 preps	250 preps
REF	740984.10	740984.50	740984.250
Tampon de lavage WB2 (concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol	50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol

- La solution de fixation BS est prête à l'emploi.
- Un agent réducteur (p.e., β -mercaptoéthanol) n'est pas nécessaire pour les préparations **NucleoSpin® RNA Plus**.

4 Instructions de sécurité

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



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans le tampon WB1 et le thiocyanate de guanidinium dans le tampon LBP peuvent former des composés très réactifs lorsqu'ils sont combinés à de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

Les déchets générés par le kit **NucleoSpin[®]RNA Plus** n'ont pas été testés pour détecter la présence de matériel infectieux résiduel. Une contamination des déchets liquides par du matériel infectieux résiduel est très improbable en raison du traitement par tampon de lyse fortement dénaturant, 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 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 Protocole NucleoSpin® RNA Plus

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon de lavage WB2 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Homogénéiser et lyser l'échantillon

Ajouter **350 µL de tampon LBP** par échantillon et broyer l'échantillon selon l'une des méthodes décrites au chapitre 2.3.

Note : Le tube de lyse n'est pas inclus dans le kit. L'ajout d'un agent réducteur (p.e. β -mercaptoéthanol, DTT ou TCEP) n'est pas nécessaire. L'échantillon doit être broyé et lysé le plus totalement possible.

Note : Si des quantités considérables de matériel d'échantillon non lysé sont encore visibles après le broyage de l'échantillon (ce qui peut se produire avec certaines plantes), centrifuger brièvement le lysat (environ 3 s à 2 000 x g) afin de sédimenter les débris de l'échantillon. Si les sédiments représentent p.e. > 20 % du volume total du lysat, ne pas les transférer sur la colonne NucleoSpin® gDNA Removal.



+ 350 µL LBP

Pour certains types d'échantillons (par exemple, certains types de plantes), il peut être avantageux d'utiliser 500 µL de tampon de lyse au lieu de 350 µL, en particulier, si de nombreux débris d'échantillons sont observés après le broyage de l'échantillon.

Note : L'utilisation de volumes plus élevée de tampon LBP nécessite des volumes supplémentaires de solution de fixation BS (non fournie dans le kit).

2 Éliminer l'ADNg et filtrer le lysat

Placer la colonne NucleoSpin® gDNA Removal (anneau jaune) dans un tube collecteur (2 mL ; fourni), transférer le lysat homogénéisé dans la colonne NucleoSpin® gDNA Removal et centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g.



Jeter la colonne et **poursuivre la procédure avec le filtrat.**

Note : S'assurer qu'il ne reste plus de liquide sur la membrane de la colonne après la centrifugation. Si nécessaire, répéter la centrifugation jusqu'à ce que tout le liquide ait traversé la membrane.



11,000 x g,
30 s

Si (événement rare) des débris insolubles sont visibles dans le filtrat, pipeter le filtrat en les évitant. Optimiser la méthode de broyage pour les futures extractions

3 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN

Ajouter **100 µL de solution de fixation BS** au filtrat et bien mélanger par vortex modéré ou par pipetages successifs.

Note : si le mélange est effectué en vortexant, veiller à éviter toute projection de liquide, le tube collecteur 2 mL étant dépourvu de bouchon

Note : Si un volume supérieur à 350 µL de tampon de lyse LBP a été utilisé pour la lyse (par exemple, 500 µL), veiller à ajouter environ 0,3 volume de tampon de fixation BS au lysat clarifié afin d'ajuster les conditions de fixation de l'ARN.



**+ 100 µL BS
Mélanger**

Note : L'utilisation de volumes plus élevés de tampon LBP nécessite des volumes supplémentaires de solution de fixation BS (non fournie dans le kit).

Après l'ajout de la solution de fixation BS, un précipité filandreux peut devenir visible, ce qui n'affectera pas l'extraction de l'ARN. Veiller à désagréger tout précipité en le mélangeant et en le chargeant entièrement sur la colonne comme décrit dans l'étape suivante. Ne pas centrifuger le lysat après l'ajout de la solution de fixation avant de le charger sur la colonne afin d'éviter de culotter le précipité.

4 Fixer l'ARN

Transférer le lysat entier (~ 450 µL) dans la colonne NucleoSpin® RNA Plus (anneau bleu clair) préassemblée avec un tube collecteur. Centrifuger pendant **15 s à 11 000 x g**.



Charger le lysat

Note : Le filtrat (~ 450 µL) peut rester dans le tube collecteur. Alternativement, jeter le filtrat et réutiliser le tube collecteur ou placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL (non fourni).



**11,000 x g,
15 s**

5 Laver et sécher la membrane de silice

1er lavage

Ajouter **200 µL de tampon WB1** à la colonne NucleoSpin® RNA Plus. Centrifuger pendant **15 s à 11 000 x g**. Jeter le filtrat avec le tube collecteur et placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL (fourni).



+ 200 µL WB1



**11,000 x g,
15 s**

2ème lavage

Ajouter **600 µL de tampon WB2** à la colonne NucleoSpin® RNA Plus. Centrifuger pendant 15 s à 11 000 x g. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur



+ 600 µL WB2



**11,000 x g,
15 s**

Note : Veiller à ce que le tampon résiduel des étapes précédentes soit lavé avec le tampon WB2, en particulier si le lysat est entré en contact avec l'embout supérieur de la colonne pendant le chargement du lysat. Rincer cette partie avec le tampon WB2

3ème lavage

Ajouter **250 µL de tampon WB2** à la colonne NucleoSpin® RNA Plus. Centrifuger pendant **2 min à 11 000 x g** pour sécher complètement la membrane. Placer la colonne dans un tube collecteur exempt de nucléase (1,5 mL, fourni).



+ 250 µL WB2



**11,000 x g,
2 min**

Si, pour une raison quelconque, le niveau de liquide dans le tube collecteur a atteint la colonne NucleoSpin® RNA Plus après la centrifugation, jeter le filtrat et centrifuger à nouveau.

6 Eluer l'ARN

Ajouter **30 µL de H₂O RNase-free** et centrifuger à **11 000 x g**, pendant 1 min.



**+ 30 µL H₂O
RNase-free**

**11,000 x g,
1 min**

Ajouter à nouveau **30 µL de H₂O RNase-free** et centrifuger à **11 000 x g**, pendant 1 min.



**+ 30 µL H₂O
RNase-free**

**11,000 x g,
1 min**

L'éluion peut également être effectuée avec 1 × 60 µL, mais le rendement peut être légèrement réduit par rapport à l'éluion avec 2 × 30 µL. Pour d'autres procédures d'éluion, voir le paragraphe 2.4.

6 Annexes

6.1 Digestion à la rDNase en solution

Le passage de l'échantillon lysé dans la colonne NucleoSpin® gDNA Removal selon le protocole standard est très efficace pour la fixation de l'ADN, ce qui se traduit par un minimum d'ADN résiduel dans l'ARN purifié. L'ADN résiduel ne sera pas détectable dans la plupart des applications en aval. Malgré cela, certaines applications exigent des teneurs en ADN résiduel encore plus faibles. Cependant, l'élimination de l'ADN à un niveau totalement indétectable est un défi et l'efficacité de la colonne NucleoSpin® gDNA Removal n'est parfois pas suffisante pour les applications en aval exigeant une teneur résiduelle en ADN la plus faible possible. Cela peut être particulièrement le cas si une grande quantité d'échantillon ou un échantillon contenant beaucoup d'ADN est traité avec la colonne NucleoSpin® gDNA Removal. La quantité d'ADN résiduel détectée dépend du type d'échantillon, de sa quantité et de sa teneur en ADN, ainsi que de la sensibilité de détection de la méthode utilisée pour analyser l'ADN résiduel.

Un exemple typique d'une application aussi exigeante est une réaction de RT-PCR dans laquelle les amorces ne font pas la différence entre l'ADNc (dérivé de l'ARN) et l'ADN génomique contaminant. En particulier, si

- les cibles à nombre de copies élevé sont analysées (p.e. familles de gènes multiples, cibles mitochondriales, plastidiales ou plasmidiques (à partir de transfections))
- le gène cible a un niveau d'expression très faible
- l'amplicon est relativement petit (< 200 pb).

La digestion de l'ADN en solution peut détruire efficacement l'ADN contaminant. Toutefois, un contrôle rigoureux de la RNase et une purification ultérieure de l'ARN (afin d'éliminer le tampon, les sels, la DNase et l'ADN digéré) sont généralement nécessaires.

La RNase-free recombinante de haute qualité (REF 740963) facilite une telle digestion en solution afin d'éliminer même les traces d'ADN contaminant.

A Digérer l'ADN (préparation de la réaction)

Ajouter **6 µL de tampon de réaction pour la rDNase** et **0,6 µL de rDNase à 60 µL d'ARN élué**.

(Alternativement, mélanger au préalable 100 µL de tampon de réaction pour la rDNase et 10 µL de rDNase et ajouter 1 / 10 volume à 1 volume d'ARN élué).

Agiter doucement le tube afin de mélanger la solution. Centrifuger doucement (environ 1 s à 1 000 x g) pour recueillir chaque gouttelette de la solution au fond du tube.

B Incuber l'échantillon

Incuber pendant **10 min à 37 °C**.

C Repurifier l'ARN

Repurifier l'ARN à l'aide d'une procédure de purification de l'ARN appropriée, par exemple en utilisant les kits NucleoSpin® RNA Cleanup , NucleoSpin® RNA Cleanup XS (voir informations de commande), ou par précipitation à l'éthanol

Précipitation de l'éthanol, à titre d'exemple :

Ajouter **0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2** et **2,5 volumes d'éthanol 96–100 %** à **1 volume d'échantillon**. Mélanger soigneusement.

Incubate **quelques minutes à quelques heures à -20 °C** ou **4 °C**

Note : Choisir des temps d'incubation longs si l'échantillon contient une faible concentration d'ARN. Des temps d'incubation courts sont suffisants si l'échantillon contient une forte concentration d'ARN.

Centrifuger pendant **10 min** à **vitesse maximale**.

Laver le culot d'ARN avec de l'**éthanol à 70 %**.

Sécher le culot d'ARN et remettre l'ARN en suspension dans de l'H₂O RNase-free.

6.2 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
ARN dégradé / pas d'ARN	<p><i>Contamination par les RNases</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Créer un environnement de travail exempt de RNases. Porter des gants pendant toutes les étapes de la procédure. Changer de gants fréquemment. Il est recommandé d'utiliser des tubes en polypropylène stériles et jetables. Garder les tubes fermés dans la mesure du possible pendant la préparation. Les contenants en verre doit être autoclavés pendant au moins 2 heures à 250 °C avant d'être utilisés.
	<p><i>Qualité insuffisante de l'échantillon</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Contrôler la collecte, le stockage et la lyse des échantillons. Veiller à ce que les échantillons soient récoltés, stockés et lysés de manière adéquate afin de préserver l'intégrité de l'ARN.
Faible qualité ou rendement en ARN	<p><i>Mauvaise utilisation ou préparation des réactifs</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Les réactifs n'ont pas été correctement préparés. Ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96 % au tampon WB2 concentré et mélanger L'échantillon et les réactifs n'ont pas été complètement mélangés. Toujours vortexer vigoureusement après l'ajout de chaque réactif. Aucune solution de fixation BS n'a été ajoutée après la lyse. La liaison de l'ARN à la membrane de silice n'est efficace qu'en présence de la solution de fixation.
	<p><i>Stockage du kit</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Conserver les composants du kit à température ambiante. Le stockage à basse température peut provoquer une précipitation de sel. Garder les bouteilles bien fermées afin d'éviter l'évaporation ou la contamination.

La force ionique et le pH influencent l'absorption de l' A_{260} ainsi que le rapport A_{260}/A_{280} .

Faible qualité ou rendement en ARN (suite)

- Pour les mesures d'adsorption, utiliser 5 mM Tris pH 8.5 comme diluant. Voir aussi :
 - Manchester, K L. 1995. Valeur des rapports A_{260}/A_{280} pour la mesure de la pureté des acides nucléiques. *Biotechniques* 19, 208–209.
 - Wilfinger, W W, Mackey, K et Chomczynski, P. 1997. Effet du pH et de la force ionique sur l'évaluation spectrophotométrique de la pureté des acides nucléiques. *Biotechniques* 22, 474–481.

Nature des échantillons

- L'échantillon n'a pas été stocké correctement. Dans la mesure du possible, utiliser du matériel frais. Si ce n'est pas possible, congeler rapidement les échantillons dans de l'azote liquide. Les échantillons doivent toujours être conservés à -70 °C. Ne jamais laisser les tissus décongeler avant l'ajout du tampon LBP. Effectuer le broyage des échantillons dans l'azote liquide.
- Broyage et/ou homogénéisation insuffisants des échantillons. Assurer un broyage complet de l'échantillon.

Contamination avec du thiocyanate de guanidinium

Faible rapport A_{260}/A_{230}

- Charger soigneusement le lysat dans la colonne NucleoSpin® RNA Plus et essayer d'éviter une contamination de la partie supérieure de la colonne et du couvercle de la colonne.
- S'assurer qu'une quantité / concentration suffisante d'ARN est utilisée pour la quantification afin que la valeur A_{230} soit significativement plus élevée que le bruit de fond.
- La mesure d'une faible quantité / concentration d'ARN entraînera des valeurs instables du rapport A_{260}/A_{230} .

Échantillons biologiques

Colonne NucleoSpin® colmatée / Faible qualité ou rendement de l'ARN

- Utilisation d'une trop grande quantité d'échantillons. Une surcharge peut entraîner une diminution du rendement global. Réduire la quantité d'échantillon ou utiliser un plus grand volume de tampon de lyse.
 - Broyage et/ou homogénéisation insuffisants des échantillons. Veiller à un broyage complet de l'échantillon et utiliser la colonne NucleoSpin® gDNA Removal pour éliminer l'ADN et faciliter l'homogénéisation du matériel de départ broyé.
 - Augmenter la force g et la durée de centrifugation si nécessaire.
-

Trop de matériel de départ utilisé

- Réduire la quantité de cellules ou de tissus utilisés.

Le système de détection de l'ADN est trop sensible

La colonne NucleoSpin® gDNA Removal permet de réduire efficacement la contamination par l'ADN. Toutefois, il n'est pas possible de garantir que l'ARN purifié est exempt à 100 % d'ADN ; par conséquent, dans des applications très sensibles, il peut encore être possible de détecter de l'ADN. La probabilité de détection de l'ADN par PCR augmente avec :

Contamination de l'ARN par l'ADN génomique

- le nombre de copies d'ADN par préparation : cible à copie unique < cible plasmidiale / mitochondriale < plasmide transfecté dans les cellules
- la diminution de la taille de l'amplicon PCR.
- Utiliser si possible des cibles PCR plus grandes (p.e. > 500 bp) ou des amorces couvrant les introns.
- **Utiliser le protocole additionnel 6.1 pour la digestion ultérieure de la rDNase en solution.**

Contamination par de l'éthanol ou du sel

Performance sous-optimale de l'ARN dans les expériences en aval

- Ne pas laisser le filtrat toucher la sortie de la colonne après le deuxième lavage au tampon WB2. Veiller à centrifuger la vitesse correspondante pendant la durée correspondante afin d'éliminer complètement le tampon éthanolique WB2.
- Vérifier que le tampon WB2 a été équilibré à la température ambiante avant utilisation. Le lavage à des températures plus basses réduit l'efficacité de l'élimination des sels par le tampon WB2.

Conserver correctement l'ARN isolé

- L'ARN élué doit toujours être conservé sur de la glace pour une stabilité optimale, car les traces de contamination par les RNases omniprésentes (matériel de laboratoire, doigts, poussière) dégraderont l'ARN purifié. Pour un stockage à court terme, congeler à -20 °C, pour un stockage à long terme, congeler à -70 °C.

6.3 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® RNA Plus	740984.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA	740955.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA Midi	740962.20	20
NucleoSpin® miRNA	740971.10/.50/.250	10/50/250 preps
NucleoSpin® RNA/Protéine	740933.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® TriPrep	740966.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® totalRNA FFPE XS	740969.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® totalRNA FFPE	740982.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA Blood	740200.10/.50	10/50
NucleoSpin® RNA Blood Midi	740210.20	20
NucleoSpin® 8 RNA Blood	740220/.5	12 × 8/60 × 8
NucleoSpin® 96 RNA Blood	740225.2/.4	2 × 96/4 × 96
NucleoSpin® RNA Clean-up	740948.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA XS	740902.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA Clean-up XS	740903.10/.50/.250	10/50/250
rDNase Set	740963	1
Tubes collecteurs (2 mL)	740600	1000
MN Bead Tubes Type B	740812.50	50
MN Bead Tubes Type C	740813.50	50

Visitez le site www.mn-net.com pour obtenir des informations plus détaillées sur le produit.

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, Rév. 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.

Marques déposées :

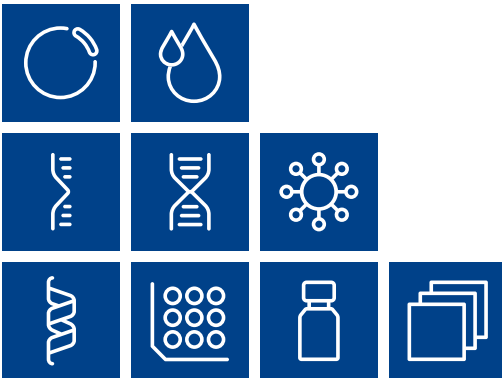
RNAlater[®] est une marque déposée d'AMBION, Inc.

NucleoSpin[®] est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG.

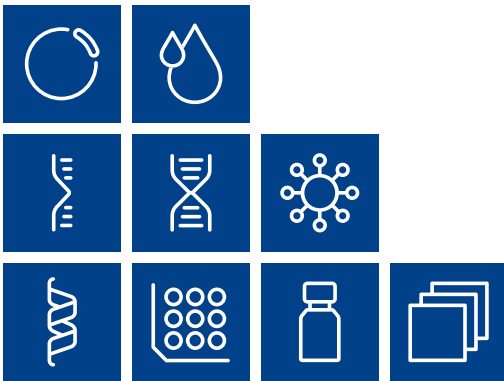
Dispomix[®] (p.e. Xiril / VWR)

GentleMACS[™] Dissoliator (Miltenyi Biotec)

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.



Plasmid DNA
Clean up
RNA
DNA
Viral RNA and DNA
Protein
High throughput
Accessories
Auxiliary tools



MACHEREY-NAGEL

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

CH +41 62 388 55 00 sales-ch@mn-net.com

FR +33 388 68 22 68 sales-fr@mn-net.com

US +1 888 321 62 24 sales-us@mn-net.com

