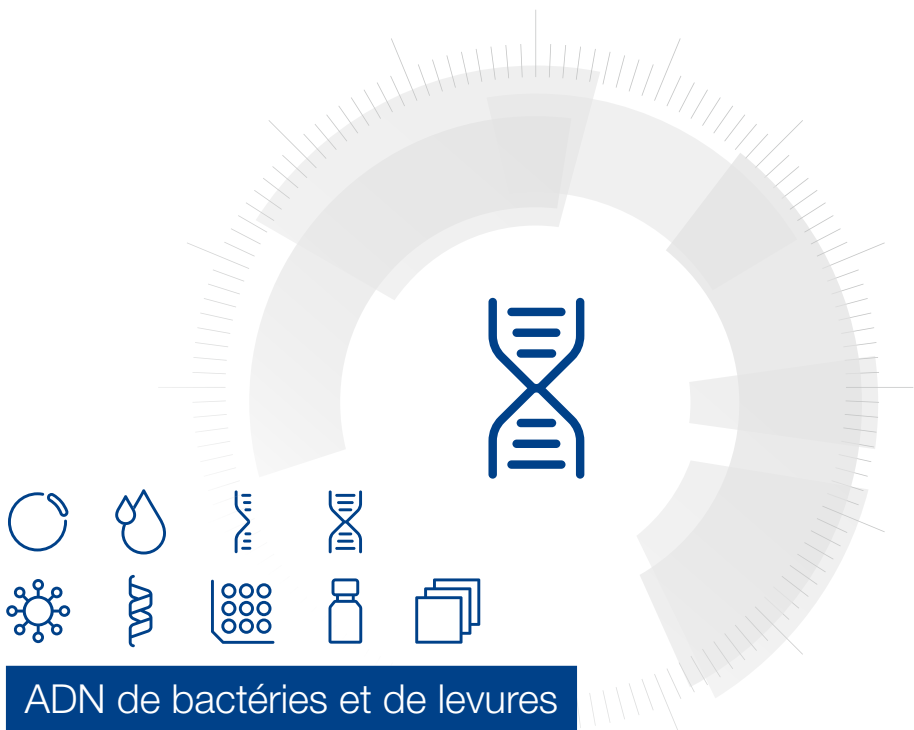


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



■ NucleoMag® DNA Bacteria

Mai 2024 / Rev. 03

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennener 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

Sommaire

1 Composants	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur	5
1.3 A propos de ce manuel	7
1.4 Support pour l'automatisation	7
2 Description du produit	8
2.1 Principe général	8
2.2 Caractéristiques du kit	8
2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons	9
2.4 Lyse et broyage des échantillons	9
2.4.1 Dispositif de broyage	9
2.4.2 Type de tubes ou de plaques de billes	10
2.4.3 Durée et fréquence du broyage	10
2.5 Systèmes de séparation magnétique	14
2.6 Réglage des paramètres d'agitation	15
2.7 Manipulation des billes magnétiques	15
2.8 Procédures d'éluion	16
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	17
4 Instructions de sécurité	18
4.1 Elimination des déchets	18
5 Protocole d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de bactéries et de levures	19
5.1 Résumé du protocole utilisant les MN Bead Tubes Type B	19
5.2 Protocole détaillé d'utilisation des MN Bead Tubes Type B	22
5.3 Protocole détaillé d'utilisation de la MN 96 Bead Plate Types B	25
6 Annexes	27
6.1 Guide de résolution des problèmes	27
6.2 Informations de commande	29
6.3 Restriction d'utilisation / garantie	31

1 Composants

1.1 Contenu du kit

NucleoMag® DNA Bacteria		
REF	1 × 96 preps 744310.1	4 × 96 preps 744310.4
NucleoMag® B-Beads	2 × 1,5 mL	12 mL
Tampon IML	60 mL	250 mL
Tampon de fixation IMB*	40 mL	2 × 75 mL
Tampon de lavage IMW (Concentré)**	50 mL	200 mL
Tampon IME***	60	250 mL
Protéinase K liquide	1,25 mL	4,5 mL
RNase A liquide	0,3 mL	1,25 mL
Manuel d'utilisation	1	1

*Stocker le tampon de fixation IMB dès son arrivée à 4 °C.

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

***Composition du tampon IME : 5 mM Tris/HCl, pH 8.5

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

Réactifs

- 80 % d'éthanol
- 96 – 100 % d'éthanol

Consommables

- MN Bead Tubes Type A pour le broyage mécanique des culots de levure dans un format tube.
- MN Bead Tubes Type B pour le broyage mécanique des culots bactériens dans un format tube.
- MN 96 Bead Plate Type B pour le broyage mécanique des culots bactériens dans un format pratique de 96 puits.
- Récipient de réaction approprié pour la purification à base de billes magnétiques (p.e. tubes de réaction de 1,5 mL ou plaque à 96 puits (voir le tableau de la page suivante).

Équipement

- Centrifugeuse pour microtubes ou plaques en fonction des consommables utilisés pour le broyage
- Vortex
- Équipements de protection individuelle (p.e., blouse, gants, lunettes)

Dispositif de broyage des échantillons :

- Il est recommandé d'utiliser le MN Bead Tube Holder (voir le tableau de la page suivante) avec le Vortex-Genie® 2 pour un broyage économique et pratique des échantillons en combinaison avec les MN Bead Tubes.
- Il est également possible d'utiliser un broyeur à oscillation ou un dispositif similaire en tenant compte des précautions énoncées au chapitre 2.4.3 et de la compatibilité avec les consommables de broyage (par exemple, le Mixer Mill MM200, MM300, MM400 (Retsch®)).

AVERTISSEMENT : L'utilisation d'autres dispositifs de broyage tels que FastPrep® System (MP Biomedicals), Precellys® (Bertin Technologies), MagNA™ Lyser (Roche), TissueLyser (QIAGEN), Bullet Blender® (Next Advance), Mini-Beadbeater™ (Biospec Products), Speed Mill (Analytik Jena) ou d'autres dispositifs similaires peut entraîner la destruction des tubes de billes ou des plaques de billes. De tels dispositifs de broyage peuvent provoquer un stress mécanique élevé sur les tubes de billes ou les plaques de billes. En fonction du type de tube de billes/plaque de billes et de son contenu (billes comme les billes d'acier, volume de liquide, type d'échantillon), une fréquence d'agitation particulièrement élevée et/ou une longue durée d'agitation peuvent entraîner la destruction des tubes de billes ou des plaques de billes. En cas d'utilisation d'un tel dispositif de broyage, il incombe à l'utilisateur d'effectuer des tests de stabilité préliminaires pour garantir la stabilité des tubes ou des plaques de billes au cours de la configuration du dispositif expérimental (p.e., intensité de l'agitation). Voir également le paragraphe 2.4.3 !

Produit	REF	Conditionnement
Système de séparation magnétique		
p.e., NucleoMag [®] SEP (adapté aux plaques 96 puits (profonds))	744900	1
p.e., NucleoMag [®] SEP Mini (adapté aux tubes de 1,5 à 2 mL)	744901	1
p.e., NucleoMag [®] SEP Maxi (adapté aux tubes de 50 mL)	744902	1
p.e., NucleoMag [®] SEP 24 (adapté aux plaques 24 puits (profonds))	744903	1
Plaque de séparation pour la séparation des billes magnétiques		
p.e., Square-well Block (bloc de 96 puits avec des puits carrés de 2,1 mL)	740481 740481.24	4 sets 24 sets
Système d'homogénéisation des échantillons		
p.e., MN Bead Tubes Type A Tubes de billes contenant des billes de céramique de 0,6–0,8 mm ; convient en conjonction avec le MN Bead Tubes Holder ou un système de broyage.	740786.50	50
p.e., MN Bead Tubes Type B Tubes de billes contenant des billes de verre de 40 à 400 µm ; utilisables avec le MN Bead Tube Holder ou un dispositif de broyage.	740812.50	50
p.e., MN 96 Bead Plate Type B Un rack de barrettes de tubes préremplis (8 × 12) contenant des billes de verre de 40 à 400 µm ; utilisation avec un système de broyage	740851.4 740851.24	4 24
p.e., MN Bead Tube Holder Support de tubes pour l'instrument Vortex-Genie [®] et une plate-forme de 3 pouces afin de loger jusqu'à 12 tubes de billes.	740469	1
Enzymes supplémentaires (si nécessaire)		
Protéinase K liquide	740396	5 mL
RNase A liquide	740397	2 × 1.25 mL
Consommables pour une utilisation à haut débit		
p.e., Rack de barrettes de tubes 1 set comprend 1 Rack, 12 barrettes de 8 bouchons (puits de 1,2 mL) et 12 Cap Strips.	740477 740477.24	4 sets 24 sets
p.e., Plaque d'éluion à fond en U Plaque d'éluion pour la collecte d'acides nucléiques purifiés (microplaque de 96 puits de 0,3 mL avec des puits à fond en U de 300 µL)	740486.24	24

Produit	REF	Conditionnement
Pour l'utilisation du kit sur les instruments KingFisher		
p.e., KingFisher® 96 / plateforme Flex : KingFisher® 96 Accessory Kit A (Square-well Blocks, Deep-well tip Combs, plaques pour 4 × 96 NucleoMag®DNA Bacteria preps)	744950	1 set
p.e., plate-forme KingFisher® DUO / DUO Prime : KingFisher® DUO Accessory Kit (Square-well Blocks, Deep-well tip Combs, plaques pour 8 × 12 NucleoMag®DNA Bacteria preps).	744952	1 set

1.3 A propos de ce manuel

Il est fortement recommandé aux personnes qui utilisent pour la première fois le kit **NucleoMag® DNA Bacteria** de lire les paragraphes détaillés du protocole de ce manuel d'utilisation. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Le résumé du protocole est conçu pour être utilisé comme un outil de référence rapide pendant l'exécution de la procédure de purification.

Toute la documentation technique est disponible 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.

Der folgende Absatz muss hinzugefügt werden. :

1.4 Support pour l'automatisation

Les kits d'extraction MN sont conçus pour une automatisation offrant une compatibilité avec une large gamme de systèmes robotiques ouverts. Que vous utilisiez des systèmes avec des barreaux magnétiques ou des manipulateurs de liquides comme Hamilton, Tecan, Eppendorf ou d'autres plateformes, nos kits garantissent des procédures d'extraction efficaces et fiables. Contactez-nous pour obtenir une assistance complète et des solutions d'automatisation sur mesure, afin de rendre votre expérience d'extraction transparente et sans effort.

Vous avez des questions sur l'assistance de MACHEREY-NAGEL en matière de programmes ou sur le service d'automatisation ?

Veuillez nous contacter pour une assistance personnalisée :
Téléphone : +49 2421 969 333 + 49 2421 969 333
Courriel : support@mn-net.com

2 Description du produit

2.1 Principe général

Le kit **NucleoMag® DNA Bacteria** est conçu pour l'extraction d'ADN à partir de micro-organismes, tels que les bactéries Gram-positives ou Gram-négatives et les levures. Pour une utilisation optimale du kit **NucleoMag® DNA Bacteria** pour les échantillons de levures ou de mycéliums fongiques, des tubes de billes spécifiques peuvent être nécessaires (voir paragraphe 2.4.2).

Le kit **NucleoMag® DNA Bacteria** utilise une chimie de tampon unique (brevet en instance), qui ne nécessite pas de sels chaotropiques nocifs et corrosifs ni de fortes concentrations d'alcools pendant l'étape de fixation.

Les échantillons microbiens tels que les bactéries Gram-positives, les levures et les spores peuvent être difficiles à lyser en raison de la structure complexe de leurs parois cellulaires. Les kits **NucleoMag® DNA Bacteria** combinent la lyse enzymatique et le broyage mécanique des échantillons avec les tubes de billes MN ou les plaques 96 de billes MN.

La procédure est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques sur des billes paramagnétiques dans des conditions de tampons appropriées. Après la lyse de l'échantillon (traitement enzymatique combiné à un broyage mécanique de l'échantillon à l'aide de tubes de billes MN ou de plaques 96 de billes MN), les mélanges de lyse peuvent être clarifiés par centrifugation et les conditions de fixation sont ajustées par l'ajout du tampon IML. Pour la fixation des acides nucléiques aux billes paramagnétiques, le tampon de fixation IMB et les NucleoMag® B-Beads sont ajoutés au lysat transféré. Après la séparation magnétique, les billes paramagnétiques sont lavées pour éliminer les contaminants à l'aide de tampons de lavage IMW et d'éthanol à 80 %. L'éthanol résiduel des étapes de lavage précédentes est éliminé par séchage à l'air. Ensuite, l'ADN hautement purifié est élué avec le tampon IME et peut être utilisé directement pour des applications en aval. Le kit **NucleoMag® DNA Bacteria** peut être utilisé soit manuellement, soit de manière automatisée sur des robots pipeteurs standards et des séparateurs magnétiques automatisés.

Nous pouvons fournir une assistance personnalisée, des informations sur les protocoles ou des programmes vérifiés pour de nombreuses plateformes. Pour plus d'informations, veuillez contacter notre support technique ou visiter le site www.mn-net.com/automation.

2.2 Caractéristiques du kit

- **NucleoMag® DNA Bacteria** est recommandé pour l'extraction rapide, manuelle et automatisée, de l'ADN total de micro-organismes. L'ADN des bactéries ou des levures est extrait simultanément à l'aide d'une technologie basée sur des billes magnétiques et peut être directement soumis à des applications en aval telles que la PCR en temps réel, le séquençage de nouvelle génération, etc.
- Le kit **NucleoMag® DNA Bacteria** 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® SEP sur une plateforme de manipulation de liquide commune ou en moins de 30 minutes en utilisant un système à barreaux magnétiques (hors lyse des échantillons). Pour plus d'informations sur le processus d'automatisation et la disponibilité de programmes prêts à l'emploi pour certaines plateformes, veuillez contacter votre distributeur local ou MN directement.

Résumé des caractéristiques du kit

Paramètres	NucleoMag® DNA Bacteria
Technologie	Technologie des billes magnétiques
Format	Billes superparamagnétiques hautement réactives
Matériau de l'échantillon	Culots de culture de bactéries Gram-positives et Gram-négatives et de levures
Quantité d'échantillon	Jusqu'à environ 40 mg de poids humide
Rendement typique	Varie selon l'échantillon et le dispositif de broyage.
Volume d'élution	50 – 200 µL
Utilisation	Réserver à l'usage de la recherche

2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons

Les cellules en culture microbienne doivent être récoltées à partir de cultures microbiennes fraîches par sédimentation via la centrifugation. Le surnageant doit être soigneusement éliminé par aspiration. Les culots de cellules microbiennes peuvent être utilisés frais ou congelés (-20 °C à -80 °C) avant de débiter la procédure.

2.4 Lyse et broyage des échantillons

Afin d'obtenir des rendements optimaux d'ADN à partir d'échantillon, un broyage complet de l'échantillon est nécessaire. L'efficacité du broyage de l'échantillon dépend des paramètres suivants et peut être obtenue en suivant les suggestions présentées dans les paragraphes suivants.

2.4.1 Dispositif de broyage

Les dispositifs suivants sont compatibles avec les MN Bead Tubes ou les MN 96 Bead Plates. Veuillez vérifier si les MN Bead Tubes ou les MN 96 Bead Plates peuvent s'adapter aux adaptateurs de tubes disponibles avant de commencer la procédure.

Support MN Bead Tube Holder (pour les tubes de billes MN) en combinaison avec le Vortex-Genie® 2 (recommandé).

Système de broyage MM200, MM300, MM400 (Retsch®) (adapté aux MN Bead Tubes ou aux MN 96 Bead Plates ; veuillez vérifier la compatibilité des adaptateurs disponibles avant de commencer la procédure).

S'il est prévu d'utiliser d'autres dispositifs de broyage (paragraphe 1.2), il convient de tenir compte du paragraphe 2.4.3 et de lire attentivement la note d'AVERTISSEMENT.

2.4.2 Type de tubes ou de plaques de billes

- Le type de billes, le temps de broyage et la fréquence/vitesse doivent être optimisés pour un échantillon donné afin d'obtenir un rendement et une qualité d'ADN optimum.

Type de tube de billes	Recommandé pour	REF
MN Bead Tubes Type A (billes de céramique de 0,6–0,8 mm)	Sol et sédiments, cellules de levure	740786.50
MN Bead Tubes Type B (40–400 µm billes de verre)	Bactéries Gram-positives et négatives	740812.50
MN Bead Tubes Type D (billes d'acier de 3 mm)	Échantillons d'insectes	740814.50
MN 96 Bead Plate Type B (40–400 µm billes de verre)	Bactéries Gram-positives et négatives	740851.4 740851.24
MN 96 Bead Plate Type D (billes d'acier de 3 mm)	Échantillons d'insectes	740853.4 740853.24
Autres types de billes disponibles pour diverses applications		
MN Bead Tubes Type E (combinaison de billes d'acier de 3 mm et de billes de verre de 40–400 µm)	Tissu difficile à lyser contenant des bactéries Gram-positives	740815.50
MN Bead Tubes Type G (billes d'acier de 5 mm)	Matériel végétal	740817.50

2.4.3 Durée et fréquence du broyage

MN Bead Tubes

Les recommandations suivantes ont été établies pour le MN Bead Tube Holder en combinaison avec un Vortex-Genie® 2 ou un Retsch® Mixer Mill MM300 fonctionnant à la fréquence la plus élevée (30 Hertz). **Pour l'utilisation d'autres dispositifs de broyage et d'autres matériaux d'échantillonnage, le temps et la fréquence doivent être optimisés.**

En règle générale, les échantillons microbiens sont broyés pendant 20 min à l'aide du MN Bead Tube Holder sur un Vortex-Genie® 2.

Durée et fréquence du broyage à l'aide du MN Bead Tube Holder sur un Vortex-Genie® 2

Echantillon	Tube de billes MN	Temps / vitesse de broyage
Bactéries Gram-positives p.e., <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio fischeri</i>	MN Bead Tubes Type B (Alternative : Type A)	Environ 12 min, à pleine vitesse
Bactéries Gram-positives p.e., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i>	MN Bead Tubes Type B (Alternative : Type A)	Environ 14 min, à pleine vitesse
Levures p.e., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MN Bead Tubes Type A	Environ 15 min, à pleine vitesse
Champignons filamenteux p.e., <i>Aspergillus nidulans</i> ; <i>Moisissure du melon</i> ; <i>Moisissure des agrumes</i> ; <i>Moisissure de la pomme de terre</i>	MN Bead Tubes Type D	Environ 15 min, à pleine vitesse
Echantillon d'insectes p.e., frais, congelé, séché ou conservé à l'éthanol	MN Bead Tubes Type D (Alternative : Type G)	Environ 12 – 20 min, à pleine vitesse
Tissus riches en lipides p.e., cerveau, tissu adipeux ou tissu de poisson gras	MN Bead Tubes Type D	Environ 20 min, à pleine vitesse
Bactéries provenant d'échantillons d'insectes	MN Bead Tubes Type E	Environ 20 min, à pleine vitesse

Durée et fréquence du broyage à l'aide d'un broyeur Retsch MM300

Echantillon	Tube de billes MN	Durée / fréquence du broyage
Bactéries Gram-négatives p.e., <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio fischeri</i>	MN Bead Tubes Type B (Alternative : Type A,)	Environ 6 min 30Hz
Bactéries Gram-positives p.e., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i>	MN Bead Tubes Type B (Alternative : Type A)	Environ 6 min 30Hz
Levures p.e., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MN Bead Tubes Type A	Environ 7 min 30 Hz

Echantillon	Tube de billes MN	Durée / fréquence du broyage
Champignons filamenteux p.e., <i>Aspergillus nidulans</i> ; <i>Moisissure du melon</i> ; <i>Moisissure des agrumes</i> ; <i>Moisissure de la pomme de terre</i>	MN Bead Tubes Type D	Environ 1 – 2 min 25 Hz
Echantillon d'insectes p.e., frais, congelé, séché ou conservé à l'éthanol	MN Bead Tubes Type D (Alternative : Type G)	Environ 40 s, 20 Hz
Tissus riches en lipides p.e., cerveau, tissu adipeux ou tissu de poisson gras	MN Bead Tubes Type D	Environ 1 min 10 Hz suivi d'environ 10 s, 20 Hz.

Note : Les tests de performance et de stabilité ont été effectués sur les MN Bead Tubes Type A, B, C et D sur un Retsch® Mixer Mill MM300 à la fréquence la plus élevée (30 Hertz) jusqu'à 15 minutes (Type A, B et C) ou jusqu'à 30 min (Type D). Pour un broyage optimal de l'échantillon, éviter la fragmentation de l'ADN et obtenir le rendement d'ADN le plus élevé, voir le tableau de recommandations ci-dessus pour les conditions de broyage adéquates. D'autres dispositifs de broyage (voir par exemple le paragraphe 2.4.1) nécessiteront des paramètres différents en ce qui concerne la fréquence et la durée pour une performance optimale avec le matériel d'échantillonnage sélectionné. Veuillez noter que la position du tube dans la machine (Retsch® Mixer Mill) est importante pour une performance optimale ! Veuillez consulter le manuel d'instructions de l'appareil concerné.

AVERTISSEMENT : De nombreux dispositifs de broyage modernes peuvent provoquer un apport d'énergie très élevé dans les tubes de billes. En fonction du type de tube de billes et de son contenu (billes, volume de liquide, type d'échantillon), une fréquence d'agitation particulièrement élevée et/ou une longue durée d'agitation peuvent entraîner la rupture des tubes de billes ! **Il incombe à l'utilisateur d'effectuer un test de stabilité initial pour les tubes de billes utilisés dans les conditions d'utilisation !**

Effectuer le test initial avec de l'eau au lieu du tampon de lyse et un paramètre modéré de la machine (basse fréquence, courte durée) afin d'éviter le déversement du tampon de lyse chaotrope en cas de rupture du tube. L'intégrité et l'étanchéité du tube doivent être contrôlées après chaque essai.

AVERTISSEMENT : Au paragraphe 5–8, il est recommandé d'utiliser un certain volume de liquide pendant le broyage. La réduction du liquide augmentera fortement l'impact mécanique de la matrice de broyage et peut entraîner des dommages à l'ADN et au tube (en particulier si les MN Bead Tubes Type D et E sont utilisés).

MN 96 Bead Plate

Les recommandations suivantes ont été établies pour le Retsch® Mixer Mill MM300 fonctionnant à la fréquence la plus élevée (30 Hertz). **Pour l'utilisation d'autres dispositifs de broyage, et d'autres matériaux d'échantillonnage, le temps et la fréquence doivent être optimisés.**

Durée et fréquence du broyage à l'aide d'un broyeur Retsch® MM300

Echantillon	Plaque de 96 billes MN	Durée / fréquence du broyage
Bactéries Gram-négatives p.e., <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio fischeri</i>	MN 96 Bead Plate Type B	Environ 2 × 4 min*, 30 Hz
Bactéries Gram-positives p.e., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i>	MN 96 Bead Plate Type B	Environ 2 × 4 min*, 30 Hz
Levures	MN 96 Bead Plate Type B	Environ 2 × 4 min*, 30 Hz
Echantillon d'insectes p.e., frais, congelé, séché ou conservé à l'éthanol	MN 96 Bead Plate Type D	Environ 2 × 20 s*, 20 Hz
Champignons filamenteux p.e., <i>Aspergillus nidulans</i> ; Moisissure du melon ; Moisissure des agrumes ; Moisissure de la pomme de terre	MN 96 Bead Plate Type D	Environ 2 × 1 min*, 20 Hz

Note : Les tests de performance et de stabilité ont été effectués sur la MN 96 Bead Plate Types B et D sur un broyeur Retsch® MM300 à la fréquence la plus élevée (30 Hertz) pendant une durée maximale de 15 minutes (types B et D). Pour un broyage optimal de l'échantillon, éviter la fragmentation de l'ADN et obtenir le rendement d'ADN le plus élevé, voir le tableau de recommandations ci-dessus pour des conditions de broyage adéquates. D'autres dispositifs de broyage (voir paragraphe 2.4.1) nécessiteront des paramètres différents en ce qui concerne la fréquence et la durée pour une performance optimale avec le matériel d'échantillonnage sélectionné. *Note* : la position du tube dans la machine (Retsch® Mixer Mill) est importante pour une performance optimale ! Veuillez consulter le manuel d'instructions de l'appareil concerné.

AVERTISSEMENT : De nombreux dispositifs de broyage modernes peuvent provoquer un apport d'énergie très élevé sur la MN Bead 96 Plates. En fonction du type de plaque et de son contenu (billes, volume de liquide, type d'échantillon), une fréquence d'agitation élevée et/ou une longue durée d'agitation peuvent entraîner la rupture de tubes ou de plaques individuels ! **Ne jamais utiliser la MN 96 Bead Plate avec moins de 12 barrettes de tubes. Il incombe à l'utilisateur d'effectuer un test de stabilité initial pour les MN 96 Bead Plates utilisées dans les conditions d'utilisation !**

* Réorienter les plaques de 96 billes MN verticalement de 180° après le premier broyage. S'assurer que tous les puits sont correctement scellés avant et après chaque broyage. Les échantillons qui étaient les plus proches du corps de la machine doivent maintenant être les plus éloignés les uns des autres.

Effectuer le test initial avec de l'eau au lieu du tampon de lyse et un paramètre modéré de la machine (basse fréquence, courte durée) afin d'éviter le déversement du tampon de lyse chaotropique en cas de rupture des tubes. L'intégrité et l'étanchéité du tube doivent être contrôlées après chaque essai.

AVERTISSEMENT : Au paragraphe 5–8, il est recommandé d'utiliser un certain volume de liquide pendant le broyage. La réduction du liquide augmentera fortement l'impact mécanique de la matrice de broyage et peut entraîner des dommages à l'ADN et au tube (en particulier si les MN Bead Tubes Type D et E sont utilisés).

2.5 Systèmes de séparation magnétique

Pour l'utilisation du **NucleoMag® DNA Bacteria**, il est recommandé d'utiliser le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. La séparation est effectuée dans un Square-well Blocks (voir les informations de commande). Le kit peut également être utilisé avec d'autres séparateurs courants.

Séparateur magnétique	Plaque ou tube de séparation
NucleoMag® SEP (MN REF 744900)	Square-well Block (MN REF 740481)
NucleoMag® SEP Mini (MN REF 744901)	Tubes de réaction de 1,5 mL ou 2 mL (Sarstedt)
NucleoMag® SEP Maxi (MN REF 744902)	Tubes de 50 mL (Falcon)
NucleoMag® SEP 24 (MN REF 744903)	24 Square-well Blocks U-bottom (MN REF 740448.4/.24)
Tecan Te-MagS™	Tubes de 1,5 mL sans couvercle (Sarstedt)

Séparation à aimants statiques

Les séparateurs avec aimants statiques, par exemple le NucleoMag® SEP ou d'autres séparateurs magnétiques courants, conviennent à une utilisation manuelle et sur les stations de travail de manipulation des liquides : Ce type de séparateur est recommandé en combinaison avec un agitateur de microplaques approprié pour une remise en suspension optimale des billes pendant les étapes de lavage et d'éluion. Alternativement, les billes peuvent être remises en suspension dans le tampon par pipetages successifs. Pour une utilisation entièrement automatisée sur les stations de travail de manipulation des liquides, un bras manipulateur est nécessaire ; la plaque est transférée vers le séparateur magnétique pour la séparation des billes et transférée vers le module agitateur pour la remise en suspension des billes.

Systèmes magnétiques mobiles

Séparateurs à aimants mobiles : Les aimants/tiges magnétiques sont déplacés d'un côté à l'autre du puits et vice versa. Les billes suivent ce mouvement et sont ainsi entraînées à travers le tampon pendant les étapes de lavage et d'éluion. La séparation a lieu lorsque le système s'arrête.

Séparateurs automatisés

Séparateurs à aimants mobiles : Les billes magnétiques sont transférées dans des plaques ou des tubes appropriés. Les billes sont remises en suspension à partir des aimants recouverts de

protection. Après la fixation, le lavage ou l'éluion, les billes sont à nouveau recueillies avec les aimants recouverts de protection et transférées dans la plaque ou le tube suivant.

2.6 Réglage des paramètres d'agitation

Lors de l'utilisation d'un agitateur de plaques pour les étapes de lavage et d'éluion, les paramètres d'agitation doivent être réglés avec soin pour chaque plaque de séparation et chaque agitateur afin d'éviter toute contamination croisée d'un puits à l'autre. Procéder comme suit :

Réglage de la vitesse de l'agitateur pour les étapes de fixation et de lavage :

- Verser 1000 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation. Placer la plaque sur l'agitateur et commencer à agiter avec un paramètre de vitesse modérée pendant 30 secondes. Éteindre l'agitateur et vérifier la présence de petites gouttelettes d'eau colorée à la surface de la plaque.
- Augmenter le paramètre de vitesse, agiter pendant 30 sets supplémentaires et vérifier à nouveau la présence de gouttelettes à la surface de la plaque.
- Continuez à augmenter la vitesse jusqu'à ce que vous observiez des gouttelettes sur le dessus de la plaque de séparation. Réduisez le paramètre de vitesse, vérifiez à nouveau et utilisez ce réglage pour l'étape de lavage.

Réglage de la vitesse de l'agitateur pour l'étape d'éluion :

- Charger 100–200 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de collecte et procéder comme décrit ci-dessus.

2.7 Manipulation des billes magnétiques

Distribution des billes magnétiques

Une distribution homogène des billes magnétiques NucleoMag® B-Beads dans les différents puits de la plaque de séparation est essentielle pour assurer une répétabilité d'un puits à l'autre. Par conséquent, avant de distribuer les billes magnétiques, s'assurer qu'elles sont complètement remises en suspension. Bien agiter le flacon de stockage ou le placer brièvement sur un vortex. Lors de l'automatisation, une étape de mélange au préalable avant d'aspirer les billes magnétiques est recommandée pour les garder remises en suspension.

Durée de séparation magnétique

L'attraction des billes magnétiques sur les aimants dépend de la force magnétique des aimants, de la plaque de séparation choisie, de la distance entre la plaque de séparation et les aimants et du volume à traiter. Les temps aimantation des billes magnétiques sur les aimants doivent être vérifiés et ajustés sur chaque système. Il est recommandé d'utiliser les plaques ou tubes de séparation spécifiés par le fournisseur du séparateur magnétique.

Lavage des billes magnétiques

Le lavage des billes magnétiques peut être réalisé par agitation ou par pipetage. Contrairement au mélange par pipetages successifs, le mélange par agitateur ou magnétique permet de mélanger simultanément tous les échantillons. Cela permet de réduire le temps et le nombre de cônes nécessaires à la préparation. La remise en suspension par pipetages successifs est cependant plus efficace que le mélange par agitation ou par mélange magnétique.

Méthode	Efficacité de la remise en suspension	Vitesse	Possibilité d'un faible volume d'élution	Nombre de cônes nécessaires
Mélange magnétique	+	++	+	Faible
Agitateur	++	++	+++	Faible
Pipetage	+++	+*	++	Haut

+ : acceptable, ++ : bon, +++ : excellent, * Dispositif de pipetage à 8 canaux

2.8 Procédures d'élution

L'ADN purifié peut être élué directement avec le tampon IME fourni. L'élution peut être effectuée dans un volume $\geq 50 \mu\text{L}$. Il est essentiel de recouvrir complètement les NucleoMag® B-Beads de tampon IME pendant l'étape d'élution. Le volume de tampon IME distribué dépend du système de séparation magnétique (p.e., la position du culot à l'intérieur de la plaque de séparation). Pour une élution efficace, le culot de billes magnétiques doit être entièrement remis en suspension dans le tampon IME. Pour certains séparateurs, des volumes d'élution plus importants peuvent être nécessaires pour recouvrir la totalité du culot.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

- Stocker le tampon IMB dès son arrivée à 4 °C.
- La protéinase K liquide est prête à l'emploi. Après la première utilisation, conserver la protéinase K liquide à 4 °C ou -20 °C.
- La RNase A liquide est prête à l'emploi. Après la première utilisation, conserver la RNase A liquide à 4 °C ou -20 °C.
- Le stockage du tampon IML à une température inférieure à 20 °C peut entraîner la précipitation des composants. Si une précipitation est observée, incuber le tampon à 30–40 °C pendant plusieurs minutes et bien mélanger jusqu'à dissolution complète du précipité. Refroidir à température ambiante avant utilisation.
- Tous les autres 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 débuter une **procédure NucleoMag®DNA Bacteria**, préparer les éléments suivants :

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

NucleoMag® DNA Bacteria		
REF	1 × 96 preps 744310.1	4 × 96 preps 744310.4
Tampon de lavage IMW (concentré)	50 mL Ajouter 25 mL d'éthanol	200 mL Ajouter 95 mL d'éthanol

4 Instructions de sécurité

Il est toujours recommandé de suivre les règles de bonnes pratiques de laboratoire.

Portez des gants et des lunettes et suivez les instructions de sécurité du laboratoire.

AVERTISSEMENT : L'utilisation d'autres dispositifs de broyage tels que FastPrep® System (MPBiomedicals), Precellys® (Bertin Technologies), MagNA™ Lyser (Roche), TissueLyser (QIAGEN), Bullet Blender® (Next Advance), Mini-Beadbeater™ (Biospec Products), Speed Mill (Analytik Jena), ou d'autres dispositifs similaires peut entraîner la destruction des tubes ou des plaques de billes. De tels dispositifs de broyage peuvent provoquer un stress mécanique élevé sur les tubes de billes ou les plaques de billes. En fonction du type de tube à billes/plaque à billes et de son contenu (billes comme les billes d'acier, volume de liquide, type d'échantillon), une fréquence d'agitation particulièrement élevée et/ou une longue durée d'agitation peuvent entraîner la destruction des tubes de billes ou des plaques de billes. **En cas d'utilisation d'un tel dispositif de broyage, il incombe à l'utilisateur d'effectuer des tests de stabilité initiaux pour garantir la stabilité des tubes ou des plaques de billes au cours de la configuration du dispositif expérimental (p.e., intensité de l'agitation).** Voir également le paragraphe 2.4.3 !

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoMag® DNA Bacteria**, portez des vêtements de protection appropriés (p.e., blouse de laboratoire, gants jetables et lunettes de protection). Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité appropriées (FDS disponibles en ligne sur www.mn-net.com/msds).



Les déchets générés par le kit **NucleoMag® DNA Bacteria** 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 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 Élimination des déchets

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







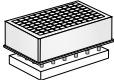
5 Protocole d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de bactéries et de levures

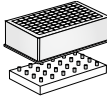


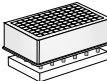
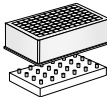


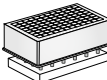
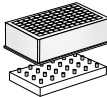


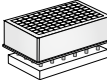
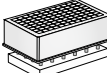
5.1 Résumé du protocole utilisant les MN Bead Tubes Type B

Pour les exigences supplémentaires en matière d'équipement et de matériel, voir les paragraphes 1.2, 2.4.1 et 2.4.2 respectivement.

MN Bead Tubes Type A est recommandé pour un broyage optimal des culots de levure. MN Bead Tubes Type D est recommandé pour un broyage optimal des champignons filamenteux. Voir le paragraphe 2.4.3 pour de plus amples informations sur le broyage des échantillons.

Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir le paragraphe 5.2.

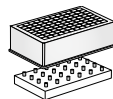
1 Préparer l'échantillon	< 40 mg de culot microbien (poids humide) 140 µL IME	
2 Lyse de l'échantillon	Transférer l'échantillon dans un MN Bead Tubes Type B 10 µL de protéinase K liquide 2,5 µL de RNase A liquide Agiter sur un broyeur rotatif ou un dispositif similaire 0,5 – 15 min 11.000 × g, 30 s	
3 Ajuster les conditions de fixation	460 µL IML Vortex 3 s, 11.000 × g, 30 s	
4 Fixation de l'ADN aux NucleoMag® B-Beads	Jusqu'à 500 µL de lysat 24 µL NucleoMag® B-Beads 320 µL IMB	
	Mélanger en agitant pendant 5 min à TA.	
	<i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i>	
	Retirer le surnageant après 5 min de séparation.	

<p>5 Lavage avec le tampon IMW</p>	<p>Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP 600 µL IMW</p>	
<p>Remettre en suspension : Agiter 2 min à TA <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>		
		
<p>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</p>		
<p>6 Lavage avec l'éthanol à 80 %.</p>	<p>Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP 600 µL d'éthanol à 80 %.</p>	
<p>Remettre en suspension : Agiter 2 min à TA <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>		
		
<p>Retirer le surnageant après 2 min de séparation</p>		
<p>7 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol</p>	<p>Retirer le Square-well Blocks sur le NucleoMag® SEP 600 µL d'éthanol à 80 %.</p>	
<p>Remettre en suspension : Agiter 2 min à TA <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>		
		
<p>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</p>		
<p>8 Sécher les billes</p>	<p>10 min à TA</p>	

9 Eluer l'ADN

Retirer le Square-well Blocks du
NucleoMag® SEP

50-200 µL IME
(Optionnel : élution à 56 °C)

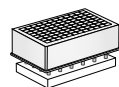


Agiter 5 min à TA

(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)



**Séparer 2 min et transférer l'ADN dans une
plaque d'élution.**



5.2 Protocole détaillé d'utilisation des MN Bead Tubes Type B

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques à aimants statiques (par exemple, NucleoMag® SEP) et les agitateurs de plaques adaptés (voir paragraphe 2.5). Il est recommandé d'utiliser un Square-well Block pour la séparation (voir paragraphe 2.5). 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 sert de guide pour l'adaptation du kit aux instruments robotisés.

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier si le tampon IMW a été préparé conformément au paragraphe 3.
- Les MN Bead Tubes Type A sont recommandés pour un broyage optimal des culots de levure. Les MN Bead Tubes Type D sont recommandés pour un broyage optimal des champignons filamenteux.
- Voir le paragraphe 2.4.3 pour des informations supplémentaires concernant la durée et la fréquence du broyage pour la lyse des échantillons.

1 Préparer l'échantillon

Récolter les cellules en culture par centrifugation. Jeter le surnageant.

Jusqu'à environ 40 mg de poids humide de culot de culture de cellules microbiennes peuvent être utilisés comme échantillon.

Ajouter **140 µL de tampon IME** et remettre le culot en suspension.

2 Lyse de l'échantillon

Transférer la suspension cellulaire dans un MN Bead Tubes Type B ou dans un autre tube de billes ou plaque adapté au broyage des micro-organismes.

Ajouter **10 µL de protéinase K liquide, 2,5 µL de RNase A liquide** et fermer le tube.

Agiter le MN Bead Tube Type B sur le MN Bead Tube Holder avec le Vortex-Genie®, le broyeur rotatif ou un appareil similaire pendant **0,5 – 15 min** (par exemple, 4 min pour le MN Bead Tubes Holder).

Note : Veuillez vous référer au paragraphe 5.3 pour le broyage d'échantillons dans un format de 96 puits.

Note : La durée, la vitesse et la fréquence optimales de l'agitation dépendent de l'appareil utilisé. Pour le MN Bead Tube Holder, elle est d'environ 12 – 14 min ; dans un broyeur mélangeur MM200, MM300, MM400 (Retsch®), p.e., 6 min à la fréquence maximale (30 Hertz) conviennent (voir paragraphe 2.4.3). Sur un broyeur à balancier, la position du tube dans le broyeur peut considérablement influencer le résultat. Veuillez vous référer au manuel d'instructions de l'appareil utilisé. Respectez les avertissements du paragraphe 1.2 et 2.4.3 si d'autres appareils sont destinés à être utilisés !

Centrifuger le MN Bead Tubes Type B pendant **30 s à 11 000 x g** pour nettoyer le couvercle.

Attention : Ne pas centrifuger à une force g supérieure, ni pendant plus de 30 s, car cela pourrait endommager le tube de billes MN

3 Ajuster les conditions de fixation

Ajouter **460 µL de tampon IML** et **mélanger** (p.e., vortexer pendant 3 s).

Note : Les billes de verre doivent être remises en suspension ; un culot résiduel (débris cellulaires) peut rester au fond du tube.

Centrifuger pendant **30 s à 11.000 x g**.

Note : Cette étape de centrifugation est effectuée afin de nettoyer le couvercle et de sédimenter les billes de verre et les débris cellulaires.

4 Fixation de l'ADN aux NucleoMag® B-Beads

Transférer **jusqu'à 500 µL de lysat dans un Square-well Block**. Ajouter **24 µL de NucleoMag® B-Beads** et **320 µL de tampon de fixation IMB**. Mélanger par pipetages successifs 6 fois et **agiter** pendant **5 min à température ambiante**. Alternativement, lors de la procédure sans agitateur, pipeter de haut en bas 10 fois et incuber pendant **5 min** à température ambiante.

Pipeter doucement afin d'éviter la formation de mousse. En cas d'utilisation de pipettes électroniques, n'utiliser que 40 % du volume total comme volume de mélange.

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 se forme.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins 5 min jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

Note : Ne pas perturber les culots de billes attirés lors de l'aspiration du surnageant. Le culot de billes peut ne pas être visible lors de cette étape. Prélever le surnageant de l'autre côté du puits.

5 Lavage avec le tampon

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

Ajouter **600 µL de tampon IMW** 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**). Il est également possible de remettre les billes en suspension en les pipétant successifs de haut en bas.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2–5 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette

6 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

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 les billes en suspension complètement par pipetages successifs.

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 aient été attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

7 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

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 les billes en suspension complètement par pipetages successifs.

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 aient été attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

8 Sécher les billes magnétiques à l'air libre

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

Sécher à l'air les billes magnétiques pendant **10 à 15 min** à **température ambiante**.

9 Eluer l'ADN

Ajouter le volume désiré de **tampon IME (50–200 µL)** à chaque puits du Square-well Block et remettre les billes en suspension en agitant pendant **5 min** à température ambiante. Il est également possible de remettre les billes en suspension par pipetages successifs et de les incubier pendant **5 à 10 min** à **température ambiante** ou 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 les aimants. Transférer le surnageant contenant l'ADN purifié sur une plaque d'éluion appropriée.

5.3 Protocole détaillé d'utilisation de la MN 96 Bead Plate Types B

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques à aimants statiques (par exemple, NucleoMag® SEP) et les agitateurs de plaques adaptés (voir paragraphe 2.5). Il est recommandé d'utiliser un Square-well Block pour la séparation (voir paragraphe 2.5). 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 sert de guide pour l'adaptation du kit aux instruments robotisés.

- Pour les exigences concernant les besoins en matériel, voir les paragraphes 2.4.1 et 2.4.2.

1 Préparer l'échantillon

Placer des échantillons individuels d'insectes dans chaque puits de la MN 96 Bead Plate Type B.

Centrifuger la MN 96 Bead Plate B brièvement pendant 1 seconde afin de concentrer les billes au fond.

Il est possible de traiter jusqu'à environ 40 mg de poids humide. Retirer l'excès de liquide (p.e., milieu de croissance) de l'échantillon.

Ajouter **140 µL de tampon IME** à chaque échantillon.

2 Lyse de l'échantillon

Ajouter **10 µL de protéinase K liquide, 2,5 µL de RNase A liquide** et fermer hermétiquement les barrettes de tubes avec les barrettes de bouchons.

Agiter la MN 96 Bead Plate Types B sur un broyeur rotatif ou un dispositif similaire pendant **2 x 0,5 – 5 min à 30 Hertz**.

Note : Réorienter les MN 96 Bead Plates verticalement de 180° après le premier broyage. Les échantillons qui étaient les plus proches du point central de la machine doivent maintenant être les plus éloignés les uns des autres. S'assurer que chaque puits est correctement scellé avant et après chaque broyage.

Note : La durée, la vitesse et la fréquence optimales de l'agitation dépendent de l'appareil utilisé. Pour le broyeur-mélangeur MM300 (Retsch®), p.e., 2 x 4 min à la fréquence maximale (30 Hertz) conviennent (voir paragraphe 2.4.3). Sur un broyeur à balancier, la position du tube dans le broyeur peut considérablement influencer le résultat. Veuillez vous référer au manuel d'instructions de l'appareil utilisé. Respectez les avertissements du paragraphe 1.2 et 2.4.3 si d'autres appareils sont destinés à être utilisés !

Centrifuger la MN 96 Bead Plate B pendant **5 min à 2.000 x g** pour nettoyer le couvercle.

Attention : Ne pas centrifuger à une force g supérieure, ni pendant plus de 30 s, car cela pourrait endommager la MN 96 Bead Plate.

3 Ajuster les conditions de fixation

Ajouter **460 µL de tampon IML**, sceller les barrettes de 8 bouchons et **mélanger** (p.e. vortexer pendant 10 s ou par inversion).

Note : Les billes d'acier doivent être agitées dans le tube ; quelques culots résiduels (débris cellulaires) peuvent rester au fond du tube.

Centrifuger pendant **5 min à 2.000 × g**.

Note : Cette étape de centrifugation est effectuée afin de nettoyer le couvercle et de sédimenter les billes d'acier et les débris cellulaires.

Attention : Ne pas centrifuger à une force g supérieure, ni pendant plus de 30 s, car cela pourrait endommager la MN 96 Bead Plate.

4 Fixation de l'ADN aux NucleoMag® B-Beads

Transférer **jusqu'à 500 µL de lysat dans un Square-well Block**. Éviter d'aspirer les débris cellulaires.

Note : Les barrettes de tubes individuelles peuvent être retirées du rack de barrettes de tubes, ce qui facilite l'accès pour l'aspiration du surnageant.

Ajouter **24 µL de NucleoMag® B-Beads** et **320 µL de tampon de fixation IMB**. Mélanger en pipétant de haut en bas 6 fois et **agiter** pendant **5 min à température ambiante**. Alternativement, lors de la procédure du kit sans agitateur, pipeter de haut en bas 10 fois et incuber pendant 5 min à température ambiante.

Pipeter doucement afin d'éviter la formation de mousse. En cas d'utilisation de pipettes électroniques, n'utiliser que 40 % du volume total comme volume de mélange.

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 se forme.

5 Passer à l'étape 5 du protocole détaillé pour l'extraction de l'ADN des micro-organismes (voir paragraphe 5.2).

6 Annexes

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
Faible rendement en ADN	<p><i>Broyage mécanique insuffisant de l'échantillon</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Pour la plupart des sources d'échantillons, nous recommandons un broyage mécanique avec les tubes de billes MN spécialisés sur le support MN Bead Tubes Holder ou avec d'autres broyeurs du commerce. Voir les paragraphes 2.4.1 et 2.4.2 pour d'autres recommandations.
	<p><i>Extraction insuffisante des acides nucléiques lors de la lyse</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Pour obtenir des rendements plus élevés d'acides nucléiques, une incubation supplémentaire de 10 min à 56 °C peut être effectuée avant le traitement mécanique.
	<p><i>L'échantillon contient trop d'ARN</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 2,5 µL de RNase A liquide après la lyse mécanique. En cas d'échec, ajouter l'enzyme au lysat clarifié et incubé pendant 10 min à température ambiante.
	<p><i>Volume de tampon d'éluion insuffisant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Le culot de billes doit être entièrement recouvert de tampon IME.
	<p><i>Performance insuffisante du tampon d'éluion pendant l'étape d'éluion</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Éliminer complètement les tampons résiduels lors des étapes de séparation. Les tampons résiduels diminuent l'efficacité des étapes de lavage et d'éluion suivantes.
	<p><i>Aspiration d'une partie des billes présents sur l'aimant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ne pas perturber les billes sur l'aimant lors de l'aspiration du surnageant, en particulier lorsque le culot magnétique n'est pas visible dans le lysat.
<p><i>Aspiration et perte de billes</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Durée de séparation magnétique trop courte ou vitesse d'aspiration trop élevée. 	

Problème	Causes possibles et suggestions
Purété insuffisante / Faible sensibilité	<p data-bbox="436 207 739 231"><i>Procédure de lavage insuffisante</i></p> <ul data-bbox="436 247 974 534" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 247 974 327">• Utiliser uniquement les combinaisons appropriées de séparateur et de plaque, par exemple, Square-well Blocks en combinaison avec NucleoMag® SEP. <li data-bbox="436 343 974 470">• S'assurer que les billes sont remises en suspension complètement pendant la procédure de lavage. Si l'agitation n'est pas suffisante pour remettre les billes en suspension complètement, mélanger en effectuant des pipetages successifs. <li data-bbox="436 486 974 534">• Répéter l'étape de lavage avec le tampon de lavage IMW
Mauvaise performance de l'ADN lors des applications avales	<p data-bbox="436 550 739 574"><i>Procédure de lavage insuffisante</i></p> <ul data-bbox="436 590 974 885" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 590 974 670">• Utiliser uniquement les combinaisons appropriées de séparateur et de plaque, par exemple, Square-well Blocks en combinaison avec NucleoMag® SEP. <li data-bbox="436 686 974 813">• S'assurer que les billes sont remises en suspension complètement pendant la procédure de lavage. Si l'agitation n'est pas suffisante pour remettre les billes en suspension complètement, mélanger en effectuant des pipetages successifs. <li data-bbox="436 829 974 885">• Répéter l'étape de lavage avec le tampon de lavage IMW. <p data-bbox="436 893 873 917"><i>Élimination de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul data-bbox="436 933 974 1013" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 933 974 1013">• Veillez à éliminer toute la solution de lavage éthanolique, car l'éthanol résiduel interfère avec les applications en aval. <p data-bbox="436 1029 884 1053"><i>Évaporation de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul data-bbox="436 1069 974 1173" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 1069 974 1173">• Fermer hermétiquement les flacons de tampons, éviter l'évaporation de l'éthanol des flacons de tampons ainsi que des tampons remplis dans les réservoirs. Ne pas réutiliser les tampons des réservoirs de tampons.
Perte des billes	<p data-bbox="436 1189 851 1212"><i>Durée de séparation magnétique trop courte</i></p> <ul data-bbox="436 1228 974 1316" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 1228 974 1316">• Augmenter la durée de séparation pour permettre aux billes d'être complètement attirées par les aimants avant d'aspirer tout liquide du puits. <p data-bbox="436 1324 879 1348"><i>Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'éluion)</i></p> <ul data-bbox="436 1364 974 1444" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 1364 974 1444">• Une vitesse d'aspiration élevée pendant l'étape d'éluion peut entraîner une perte des billes. Réduire la vitesse d'aspiration pour l'étape d'éluion.

Problème	Causes possibles et suggestions
	<i>Contaminations des parties supérieures des puits</i>
Contamination croisée	<ul style="list-style-type: none"> Ne pas souiller les bords du Square-well Blocks lors du transfert du lysat. Si le bord des puits est contaminé, sceller le Square-well Block avec une feuille PE auto-adhésive (voir les informations de commande) avant de démarrer l'agitateur.

6.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® DNA Bacteria	744310.1 744310.4	1 × 96 preps 4 × 96 preps
MN Bead Tube Type A (billes en céramique de 0,6–0,8 mm, recommandées pour la levure, le sol et les sédiments)	740786.50	50
MN Bead Tube Type B (billes de verre de 40 à 400 µm, recommandées pour les bactéries)	740812.50	50
MN Bead Tube Type D (billes d'acier de 3 mm, recommandées pour les insectes)	740814.50	50
MN Bead Tube Type E (billes de verre de 40 à 400 µm et billes d'acier de 3 mm, recommandées pour les bactéries difficiles à lyser dans les échantillons d'insectes)	740815.50	50
MN Bead Tube Type G billes d'acier de 5 mm, recommandées pour le matériel végétal)	740817.50	50
MN Bead Tube Holder (Support de tubes pour l'instrument Vortex-Genie® et une plateforme de 3 pouces afin de loger jusqu'à 12 tubes de billes MN)	740469	1
MN 96 Bead Plate Type A (Rack de barrettes de tubes préremplis (8 × 12) contenant des billes de céramique de 0,6–0,8 mm ; utilisation avec un système de broyage)	740853.4 740853.24	4 24

Produit	REF	Conditionnement
MN 96 Bead Plate Type B (Rack de barrettes de tubes préremplis (8 × 12) contenant des billes de verre de 40–400 µm ; utilisation avec un système de broyage)	740851.4 740851.24	4 24
MN 96 Bead Plate Type D (Rack de barrettes de tubes préremplis (8 × 12) contenant des billes d'acier de 3 mm ; utilisation avec un système de broyage)	740853.4 740853.24	4 24
Protéinase K liquide	740396	5 mL
NucleoMag® SEP	744900	1
NucleoMag® SEP Mini	744901	1
NucleoMag® SEP Maxi	744902	1
NucleoMag® SEP 24	744903	1
Square-well Blocks	740481 740481.24	4 24
Film PE auto-adhésif	740676	50 feuilles
Plaque d'élu­tion à fond en U (microplaque de 96 puits de 0,3 mL avec des puits à fond en U de 300 µL)	740486.24	24
KingFisher® 96/Flex Accessory Kit A (set composé de 16 Square-well Blocks, 4 Deep-well tip combs, 4 Elution Plates ; pour 4 × 96 NucleoMag® DNA Bacteria preps utilisant la plateforme KingFisher® 96/Flex)	744950	1 set
Kit d'accessoires KingFisher® DUO (8 Square- well Blocks, 8 Tip Combs, 8 Barrettes d'élu­tion ; pour 8 × 12 NucleoMag® DNA Bacteria preps en utilisant la plateforme KingFisher® DUO/DUO Prime.	744952	1 set
96 Deep-well plates pour systèmes de barreaux magnétiques	744955	25
8-well Tip Combs pour système de barreaux magnétiques	744960	50
8-well Accessory Kit pour systèmes de barreaux magnétiques	744961	1 set

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

6.3 Restriction d'utilisation / garantie

Tous les produits MACHEREY-NAGEL sont conçus pour l'usage auquel ils sont destinés. Ils ne sont pas destinés à être utilisés à d'autres fins. La description de l'utilisation prévue des produits se trouve dans les notices originales des produits MACHEREY-NAGEL. Avant d'utiliser nos produits, veuillez respecter les instructions d'utilisation et les consignes de sécurité de la fiche de données de sécurité respective du produit.

Ce produit MACHEREY-NAGEL est accompagné d'une documentation indiquant les spécifications et autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit qu'il répond aux spécifications indiquées. La garantie fournie est limitée aux spécifications des données et aux descriptions figurant dans la documentation originale de MACHEREY-NAGEL. Aucune autre déclaration ou représentation, écrite ou orale, par les employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL, à l'exception des déclarations écrites signées par un responsable dûment autorisé de MACHEREY-NAGEL, n'est autorisée. Le consommateur 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 survenus en rapport avec nos produits est limitée au strict minimum, comme indiqué dans les conditions générales de vente de MACHEREY-NAGEL dans leur dernière édition, qui peuvent être consultées sur le site Web de l'entreprise. MACHEREY-NAGEL n'assume aucune autre garantie.

Les produits et leurs applications sont susceptibles d'être modifiés. Par conséquent, veuillez contacter notre équipe de service technique pour obtenir les dernières informations sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre distributeur local pour obtenir des informations scientifiques générales. Les descriptions figurant dans la documentation de MACHEREY-NAGEL sont fournies à titre d'information uniquement.

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

Veuillez contacter

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG

Tél : +49 24 21 969-333

support@mn-net.com

Marques déposées :

KingFisher® est une marque déposée de Thermo Fisher Scientific

NucleoMag® et NucleoSpin® sont des marques déposées de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG

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

FastPrep® System est une marque déposée de MP Biomedicals, LLC

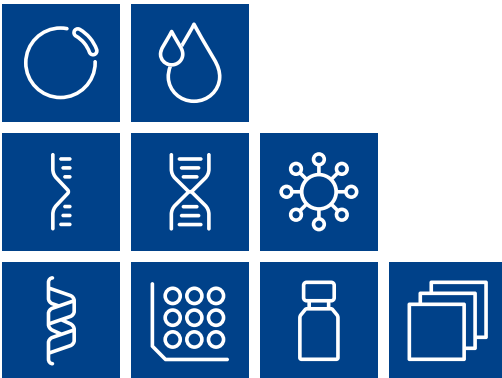
Precellys® est une marque déposée de Bertin Technologies

MagNA™ Lyser est une marque déposée de Roche Diagnostics GmbH

Bullet Blender® est une marque déposée de Next Advance

Mini-Beadbeater™ est une marque déposée de Biospec Products

Tous les noms et dénominations utilisés peuvent être des marques, des marques commerciales ou des marques déposées de leur propriétaire respectif. En ce qui concerne ces produits ou services, nous ne pouvons donner aucune garantie quant à leur sélection, leur efficacité ou leur fonctionnement.



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

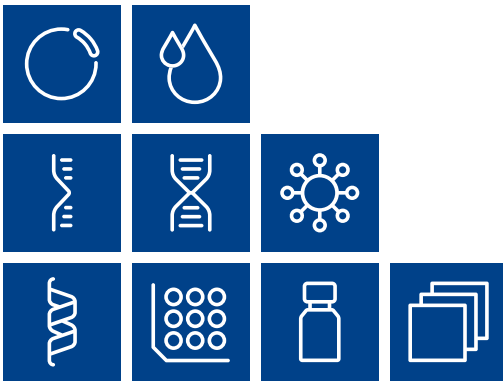
Viral RNA and DNA

Protein

High throughput

Accessories

Auxiliary tools



MACHERY-NAGEL

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

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

