

MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



Extraction d'ARN

■ NucleoMag® RNA

Février 2024 / Rev. 08

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

Sommaire

1	Composition du kit	4
1.1	Composants	4
1.2	Équipement et consommables nécessaires	5
1.3	A propos de ce manuel	5
2	Description du kit	6
2.1	Principe général	6
2.2	Caractéristiques du kit	6
2.3	Manipulation, préparation et stockage des échantillons biologiques	7
2.4	Système de séparation magnétique	8
2.5	Réglage de l'agitateur	8
2.6	Manipulation des billes	9
2.7	Procédures d'éluion	9
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	10
4	Instructions de sécurité	11
4.1	Élimination des déchets	11
5	Protocole pour l'extraction d'ARN	12
6	Annexes	18
6.1	Guide de résolution des problèmes	18
6.2	Informations de commande	20
6.3	Restrictions d'utilisation / garantie	21
6.4	Versions linguistiques et prédominance	21

1 Composition du kit

1.1 Composants

NucleoMag® RNA		
REF	1 × 96 preps 744350.1	4 × 96 preps 744350.4
NucleoMag® B-Beads	2 × 1.5 mL	12 mL
Tampon de lyse MR1	60 mL	250 mL
Tampon de fixation MR2	80 mL	400 mL
Tampon de lavage MR3	80 mL	320 mL
Tampon de lavage MR4	250 mL	1000 mL
Tampon d'éluion MR5*	30 mL	125 mL
Agent réducteur TCEP	1 flacon (107 mg/flacon)	4 flacons (107 mg/flacon)
rDNase, lyophilisée**	3 flacons (dimension D)	12 flacons (dimension D)
Tampon de réaction de la rDNase	30 mL	2 × 60 mL
H ₂ O RNase-free	13 mL	30 mL
Brochure d'utilisation	1	1

* Tampon d'éluion MR5: H₂O RNase-free

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

1.2 Equipement et consommables nécessaires

Produit	REF	Conditionnement
<ul style="list-style-type: none"> • Système de séparation magnétique Ex: NucleoMag® SEP (voir chapitre 2.3) 	744900	1
<ul style="list-style-type: none"> • Plaques de séparation des billes magnétiques, Ex : Square-well Block (blocs 96 puits carrés de 2,1 mL) 	740481 740481.24	4 24
<ul style="list-style-type: none"> • Tubes de lyse pour l'incubation des échantillons et la lyse, ex: Rack de barrettes 'Tube Strips' (1 set comprend 1 support, 12 barrettes de 8 tubes (1,2 mL) et 12 barrettes de bouchons. 	740477 740477.24	4 sets 24 sets
<ul style="list-style-type: none"> • Plaques d'éluion pour collecter les acides nucléiques purifiés, ex: Plaque d'éluion 'fond en U' (96 puits de 0,3 mL) ex: Plaque d'éluion à fond plat (96 puits de 0,3 mL) 	740486.24 740673	24 20
<ul style="list-style-type: none"> • Pour utilisation du kit sur KingFisher® Flex, Set d'accessoires 'KingFisher® Accessory Kit B' (Blocs 96 puits, Tip combs, Plaques d'éluion pour 4 × 96 preps NucleoMag® RNA sur KingFisher® Flex) 	744951	1 set

1.3 A propos de ce manuel

Nous recommandons vivement la lecture du protocole détaillé aux nouveaux utilisateurs du kit **NucleoMag® RNA**. Les utilisateurs expérimentés, quant à eux, pourront utiliser le résumé du protocole. Ce dernier est conçu pour un suivi rapide des différentes étapes de la procédure.

Toute la documentation technique est disponible sur notre site internet www.mn-net.com.

2 Description du kit

2.1 Principe général

La procédure **NucleoMag® RNA** est basée sur l'adsorption réversibles des acides nucléiques sur les billes paramagnétiques en présence des tampons adéquats. La lyse de l'échantillon est menée lors de son homogénéisation dans une solution contenant des ions chaotropiques. Pour créer les conditions de fixation des acides nucléiques aux billes paramagnétiques, le tampon MR2 et les billes NucleoMag® B-Beads sont ajoutés au lysat. Après séparation magnétique, les billes sont incubées dans une solution de DNase recombinante pour l'élimination de l'ADN également fixé. Après une nouvelle étape de fixation de l'ARN aux billes, les contaminants et les sels sont éliminés avec les tampons de lavage MR3 et MR4. L'éthanol résiduel issu de ces étapes est éliminé lors d'une étape de séchage. Pour finir, l'ARN hautement purifié est élué dans le tampon d'éluion MR5 et peut être directement utilisés pour les applications avalées. Le kit **NucleoMag® RNA** est utilisable manuellement ou sur divers automates de pipetage ou divers séparateurs magnétiques automatisés.

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

2.2 Caractéristiques du kit

Le kit **NucleoMag® RNA** est conçu pour la préparation rapide, manuelle et automatisée d'ARN hautement pur à partir de 20 mg de tissu ou de 2×10^6 de cellules. Le kit est conçu pour une utilisation avec le séparateur magnétique pour plaques 96 puits NucleoMag® SEP (voir 'Informations de commande, chapitre 6.2) ou d'autres systèmes de séparation magnétique (voir chapitre 2.3). La durée de la procédure manuelle pour 96 échantillons est d'environ 120 minutes. L'ARN purifié peut être utilisé directement pour les applications comme les RT-PCR ou tout autre type de réaction enzymatique.

Uniquement pour la recherche.

Grâce à la DNase recombinante incluse dans le kit, l'ARN est considéré comme quasiment exempt d'ADN.

Le kit **NucleoMag® RNA** est aisément automatisable sur les plateformes courantes de manipulation de liquides ou sur les séparateurs magnétiques, comme par exemple les KingFisher® de Thermo Fisher Scientific. La durée de la procédure dépend de la configuration de l'instrument utilisé. En général, 96 échantillons peuvent être extraits en moins de 120 minutes lors de l'utilisation du NucleoMag® SEP sur un robot pipeteur.

Le kit comprend tous les réactifs pour extraire jusqu'à 30 µg d'ARN purifié. En fonction du volume d'éluion, des concentrations de 10–30 ng/µL sont obtenues.

Le kit **NucleoMag® RNA** est entièrement utilisable à température ambiante.

Les NucleoMag® B-Beads sont des billes superparamagnétiques hautement réactives. La capacité de fixation est d'environ 0,4 µg d'ARN pour 1 µL de suspension de billes NucleoMag® B-Bead. 1 µL de suspension contient 130 µg de billes.

Pour plus d'informations, visitez notre site web :



www.mn-net.com/bioanalytik/htp-information

Chez MN, nous vous proposons des scripts pour différentes plateformes. Il vous suffit de nous contacter et nous vous ferons suivre le script. Si vous êtes à la recherche de solutions plus personnalisées, nous pourrions également vous aider. Contactez-nous et nous ferons de l'automatisation pour vous une expérience agréable grâce à notre soutien.

2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons biologiques

Environnement de travail

Maintenir un environnement de travail exempt de RNase. Portez des gants à tout moment pendant la préparation. Changez fréquemment de gants.

Stockage des échantillons et inhibition des RNase

- Les RNases peuvent rapidement dégrader l'ARN des échantillons si ceux-ci ne sont pas protégés de l'activité des RNases après la récolte. Les méthodes suivantes sont recommandées pour éviter la dégradation de l'ARN :
- Utiliser un échantillon fraîchement récolté pour une lyse et une purification immédiate de l'ARN.
- Submerger et conserver les échantillons dans des solutions de stabilisation NucleoProtect® RNA ou similaires. Veillez à ce que l'échantillon soit complètement imprégné de la solution de stabilisation avant de le congeler. Retirez l'excès de solution de stabilisation de l'échantillon avant d'extraire l'ARN conformément au manuel d'utilisation de la solution de stabilisation.
- Congeler l'échantillon dans de l'azote liquide immédiatement après la récolte et conservez-le à -70 °C. Les échantillons ainsi congelés sont stables jusqu'à 6 mois. Un mortier et un pilon peuvent être utilisés pour pulvériser l'échantillon à l'état congelé. S'assurer que l'échantillon ne décongèle pas avant d'être repris dans le tampon de lyse.
- Conserver les échantillons dans le tampon de lyse MR1 après broyage à -70 °C jusqu'à un an, à 4 °C pour maximum 24 heures ou à température ambiante pendant quelques heures. Les échantillons congelés dans le tampon de lyse MR1 doivent être décongelés lentement avant de commencer l'extraction des ARN.

2.4 Système de séparation magnétique

Pour utiliser le NucleoMag® RNA, nous recommandons le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. La séparation s'effectue dans un bloc 96 puits carrés (voir 'Informations de commande' chapitre 6.2). Le kit peut aussi être utilisé avec d'autres séparateurs magnétiques. Consulter les informations du fabricant pour connaître les plaques de séparation appropriées.

Séparateur magnétique	Plaque ou tube de séparation
NucleoMag® SEP (MN REF 744900)	Bloc 96 puits carrés (MN REF 740481/.24)
Tecan Te-MagS™	Tubes 1.5 mL sans bouchons (Sarstedt)

Séparation à aimants statiques

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

Systèmes à aimants mobiles

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

Séparateurs automatisés

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

2.5 Réglage de l'agitateur

Lors de l'utilisation d'un agitateur à plaques pour les étapes de lavages et d'éluion, les paramètres d'agitation doivent être ajustés précautionneusement afin de garantir la bonne resuspension des billes tout en évitant tout risque de contaminations croisées.

Réglage de l'agitation pour les étapes de lavages :

- Déposer 900 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation. Placer la plaque sur l'agitateur et lancer l'agitation à vitesse modérée pendant 30 secondes. Stopper et vérifier l'absence de projections.
- Augmenter la vitesse d'agitation sur une durée de 30 secondes supplémentaire et vérifier l'absence de projections.
- Continuer à augmenter la vitesse d'agitation jusqu'à observer des projections sur le dessus de la plaque de séparation. Réduire ensuite progressivement la vitesse, vérifier l'absence de projections et utiliser ce réglage pour les étapes de lavages.

Réglage de l'agitation pour l'étape d'élution :

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

2.6 Manipulation des billes**Distribution des billes**

Une distribution homogène des billes dans les puits de la plaque de séparation est essentielle pour une bonne reproductibilité. Avant de distribuer les billes, veiller à bien les resuspendre. Agiter le flacon ou placer le sur un vortex brièvement. Le mélange préliminaire des billes magnétiques avec le tampon de fixation permet une distribution plus homogène des billes dans les différents puits de la plaque de séparation. Lors de l'automatisation, une étape de mélange des billes et du tampon de fixation dans les réservoirs avant leur distribution dans les plaques de séparation est recommandée afin de s'assurer que les billes demeurent bien en suspension.

Durée de séparation magnétique

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

Lavages des billes

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

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

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

2.7 Procédures d'élution

L'ARN purifié peut être élué directement dans le tampon d'élution MR5 fourni. L'élution s'effectue dans un volume ≥ 50 µL. Il est essentiel que les billes NucleoMag® B-Beads soient totalement recouvertes par le tampon d'élution. Le volume minimal nécessaire dépend du système de séparation magnétique (ex : la position des culots de billes dans les puits de la plaque de séparation). Pour une élution efficace, les culots de billes magnétiques doivent être totalement resuspendues dans le tampon MR5. Avec certains séparateurs magnétiques, le volume d'élution nécessaire pour recouvrir les billes peut être plus important.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention: les tampons MR1 et MR3 contiennent des sels chaotropiques ! Porter des gants et des lunettes de protection !

ATTENTION: les tampons MR1 et MR3 contiennent du thiocyanate de guanidine, pouvant former des composants hautement réactifs en présence d'eau de Javel (hypochlorite de sodium). NE PAS ajouter d'eau de Javel ou des solutions acides dans les déchets liquides issus de la procédure.

- Tous les composants du kit **NucleoMag® RNA** doivent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables : voir l'étiquette sur le kit.
- Tous les tampons sont fournis prêt à l'emploi.

Avant de démarrer la procédure **NucleoMag® RNA**, préparer:

- **Solution de rDNase :** Ajouter 800 µL d'H₂O RNase-free dans chaque flacon de rDNase et incuber pendant 1 min à température ambiante. Retourner doucement le flacon pour dissoudre complètement l'enzyme. Veiller à ne pas mélanger vigoureusement car la rDNase est sensible à l'agitation mécanique. Cette solution peut être conservée à -20 °C pendant au moins 6 mois. Ne pas congeler / décongeler plus de trois fois la solution.
- **Mélange réactionnel de rDNase :** Ajouter 9.2 mL de tampon de réaction pour rDNase à 800 µL de solution de rDNase et mélanger. Le mélange réactionnel obtenu est suffisant pour 32 extractions et est à utiliser rapidement. Lors de séries inférieures à 32 échantillons, préparer un volume plus petit de mélange réactionnel. Pour chaque extraction, mélanger 276 µL de tampon de réaction et 24 µL de solution de rDNase.
- **Agent réducteur TCEP :** Ajouter 750 µL d'H₂O RNase-free dans le flacon de TCEP et incuber pendant plusieurs minutes à température ambiante. Agiter le flacon pour dissoudre le TCEP dans l'eau et incuber pendant plusieurs minutes à température ambiante. Stocker la solution de TCEP à -20 °C.

NucleoMag® RNA		
REF	1 × 96 preps 744350.1	4 × 96 preps 744350.4
rDNase (lyophilisée)	3 flacons (dimension D) Ajouter 800 µL H ₂ O RNase-free dans chaque flacon	12 flacons (dimension D) Ajouter 800 µL H ₂ O RNase-free dans chaque flacon
TCEP	1 flacon (107 mg) Ajouter 750 µL d'H ₂ O RNase-free	4 flacons (107 mg/flacon) Ajouter 750 µL d'H ₂ O RNase-free dans chaque flacon

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoMag® RNA**, portez des vêtements de protection appropriés (par exemple, une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection).

Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité appropriées (FDS disponibles en ligne sur www.mn-net.com/msds).



Attention : Le thiocyanate de guanidine dans les tampons MR1 et MR3 peuvent former des composés hautement réactifs lorsqu'ils sont combinés avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets liquides issus de la procédure.

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

4.1 Elimination des déchets

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

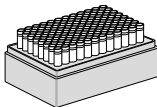
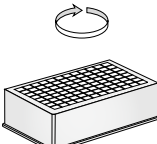
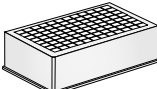

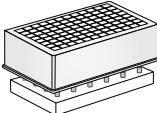
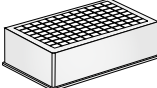
5 Protocole pour l'extraction d'ARN

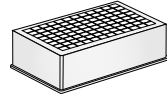
Résumé du protocole

- A propos du matériel et de l'équipement nécessaires, voir les chapitres 1.2 et 2.3.
- Pour des informations sur chaque étape, voir page 18.

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que la rDNase a bien été préparé selon les recommandations du chapitre 3.

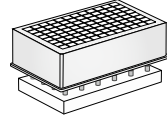
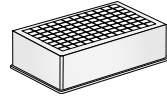
<p>1 Homogénéisation / lyse des échantillons</p>	<p>Jusqu'à 20 mg de tissus ou 2×10^6 cellules</p> <p>350 μL MR1</p> <p>6 μL TCEP</p> <p>Mélanger ou broyer mécaniquement</p>	
<p>2 Clarification des lysats par centrifugation, et transférer 350 μL de lysats clarifié dans un bloc 96 puits carrés</p>	<p>5,600 x g, 5 min</p> <p>350 μL de lysat clarifié</p>	
<p>3 Fixation de l'ARN aux billes NucleoMag® B-Beads</p>	<p>28 μL NucleoMag® B-Beads</p> <p>350 μL MR2</p>	
<p>Mélanger par agitation 5 min à TA (Option: Mélanger par pipetage)</p>		
<p>Prélever le surnageant après 2 min de séparation</p> <p>Sécher 5 min à TA</p>		
<p>4 Digestion de l'ADN</p>	<p>Enlever le bloc 96 puits du NucleoMag® SEP</p> <p>300 μL de mélange réactionnel rDNase</p> <p>Mélanger</p> <p>Incuber 15 min à TA</p>	

5 **Refixation** de l'ADN350 μ L MR2

Mélanger par agitation
5 min à TA
(Option: Mélanger par pipetage)



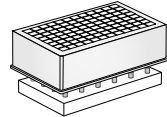
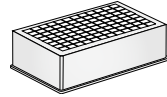
Éliminer le surnageant après
2 min de séparation

6 **Lavage** MR3Enlever le bloc du NucleoMag[®]
SEP600 μ L MR3

Resuspension : agiter 5 min à TA
(Option : Mélanger par pipetage)



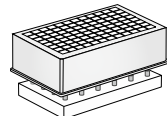
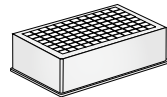
Éliminer le surnageant
après 2 min de séparation

7 **Lavage** MR4 (1^{er})Enlever le bloc du NucleoMag[®]
SEP900 μ L MR4

Resuspension : agiter 5 min à TA
(Option: Mélanger par pipetage)



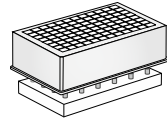
Éliminer le surnageant après
2 min de séparation

8 **Lavage** MR4 (2^{ième})Enlever le bloc du NucleoMag[®]
SEP900 μ L MR4

Resuspension : agiter 5 min à TA
(Option : *Mélanger par pipetage*)



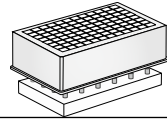
**Eliminer le surnageant après
2 min de séparation**



9 Séchage

Laisser le bloc sur le NucleoMag®
SEP

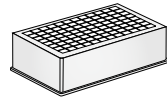
Sécher à l'air 10 – 15 min à TA



10 Elution de l'ARN

Enlever le bloc du NucleoMag®
SEP

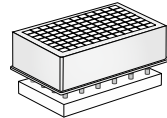
50-200 µL MR5



Agiter 5 – 10 min à TA
(Option : *Mélanger par pipetage*)



**Séparer les billes pendant 2 min
et transférer l'ARN dans une
plaque / des tubes d'élution**



Protocole détaillée

Ce protocole décrit la procédure utilisant un séparateur magnétique à aimants fixes (ex: NucleoMag® SEP) associé à un agitateur de plaque adéquat (voir paragraphe 2.3). Il est recommandé d'utiliser les bloc 96 puits carrés "Square-well Block" pour les étapes de séparation magnétique (voir paragraphe 1.2). Autrement, l'extraction de l'ARN est réalisable en tubes avec un séparateur approprié. Ce protocole détaille la procédure manuelle et peut servir de guide pour l'automatisation du kit.

Avant de débiter la préparation:

- Vérifier que la rDNase a bien été préparée selon les recommandations du chapitre 3.

1 Homogénéisation / lyse des échantillons

Lyser jusqu'à **20 mg de tissus** ou **2 x 10⁶ cellules** dans **350 µL de tampon MR1 + 6 µL TCEP**.

Pour les échantillons de tissus : utiliser un système de broyage approprié pour homogénéiser les échantillons dans le tampon MR1. Les échantillons peuvent être par exemple broyés au moyen d'un système à billes, par ex: GenoGrinder* ou Mixer Mill MM400** (voir les recommandations du fabricant à propos des tubes et plaques compatibles), ou tout autre système de broyage similaire.

Pour les cellules : Ajouter le tampon MR1 sur le colot de cellules. Mélanger par plusieurs cycles de pipetage pour lyser les cellules.

Option : utiliser les colonnes NucleoSpin® Filters ou les plaques NucleoSpin® RNA Filter Plates (voir paragraphe 6.2) ou encore une seringue pour réduire la viscosité du lysat. Transférer le lysat dans un bloc 96 puits carrés pour la suite de la procédure.

2 Clarification des lysats

Centrifuger les échantillons pendant **5 min** à vitesse élevée (**5,600 – 6,000 x g**).

Enlever les barrettes de bouchons.

Transférer **350 µL de lysat clarifié** dans un bloc 96 puits carrés. Veiller à ne pas contaminer les bords des puits pour éviter tout risque de contaminations croisées.

Note: consulter nos recommandations à propos des différentes plaques ou tubes utilisables et leur compatibilité avec les séparateurs magnétiques (voir paragraphe 1.2).

En option : les colonnes NucleoSpin® Filter ou les plaques NucleoSpin® RNA Filter Plates peuvent être utilisés pour clarifier les lysats (voir paragraphe 6.2). Transférer les surnageants limpides dans les puits du bloc 96 puits carrés (voir paragraphe 6.2) pour la suite de la procédure.

* GenoGrinder: <http://www.spexcsp.com/sampleprep/>

** Mixer Mill MM400 <http://www.retsch.com/products/milling/ball-mills/mm-400/>

3 Fixation de l'ARN aux billes NucleoMag® B-Beads

Ajouter **28 µL de suspension de billes NucleoMag® B-Beads** et **350 µL de tampon MR2** aux lysats. Mélanger en agitant pendant 5 min à température ambiante ou en pipetant le mélange au moins 6 fois, puis en incubant à TA pendant 5 minutes. Les billes NucleoMag® B-Beads et le tampon MR2 peuvent être mélangés au préalable.

Veiller à bien resuspendre les billes NucleoMag® B-Beads avant de les prélever dans le flacon. Vortexer brièvement le flacon afin d'obtenir une suspension de billes homogène.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** afin que toutes les billes aient été attirées vers les aimants. Retirer et jeter le surnageant par pipetage en veillant d'éliminer la totalité du surnageant.

Note: ne pas perturber les culots de billes pendant l'aspiration des surnageants. Les culots de billes magnétiques ne sont pas visibles à cette étape. Pipeter le surnageants du côté opposé des puits.

Sécher les billes pendant **5 min à température ambiante**. Conserver le bloc sur le séparateur NucleoMag® SEP pendant l'étape de séchage.

4 Digestion de l'ADN

Enlever le bloc du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter **300 µL de mélange réactionnel de rDNase** et resuspendre les billes par pipetage. Incuber pendant **15 min à température ambiante**. Garder les billes en suspension !

5 Refixation de l'ARN

Ajouter **350 µL de tampon MR2** à chaque échantillon. **Mélanger** par agitation pendant 5 min à température ambiante ou en pipetant au moins 6 fois puis incubé 5 min à température ambiante.

Séparer les billes magnétiques contre les parois des puits en plaçant le bloc sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par les aimants. Retirer et jeter les surnageants.

6 Lavage MR3

Enlever le bloc 96 puits du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **600 µL de tampon MR3** dans chacun des puits et resuspendre totalement les billes par agitation (**5 min**). Alternativement, resuspendre les billes par pipetage (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au **moins 2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par les aimants. Retirer et jeter les surnageants.

7 1^{er} lavage MR4

Enlever le bloc 96 puits du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL de tampon MR4** dans chacun des puits et resuspendre totalement les billes par agitation (**5 min**). Alternativement, resuspendre les billes par pipetage (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par les aimants. Retirer et jeter les surnageants. remove the Square-well Block from the NucleoMag® SEP magnetic separator.

8 2^{ème} lavage MR4

Répéter le lavage précédent avec **900 µL de tampon MR4**. Laisser le bloc sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP pour la prochaine étape.

9 Séchage

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

10 Elution de l'ARN

Enlever le bloc 96 puits du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter le volume adéquat de **tampon MR5 (au moins 50 µL, 50–200 µL)** et resuspendre les billes par agitation jusqu'à resuspension totale de toutes les billes (**5 min**). Alternativement, resuspendre les billes par pipetage (15 fois).

Incuber la suspension pendant **5 min à température ambiante**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par les aimants. Transférer les surnageants contenant l'ARN purifié dans un tube ou une plaque de collecte appropriée (voir paragraphe 6.2).

6 Annexes

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problèmes	Causes possible et suggestions
ARN dégradé/ Aucun ARN obtenu	<p><i>Contamination par des 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. L'utilisation de consommables stériles, de tubes ou de plaques en polypropylène est recommandé. Les contenants en verre doivent avoir été autoclavés pendant au moins 2 h à 250 °C avant utilisation.
	<p><i>Volume de tampon d'éluion insuffisant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Les culots de billes doivent être totalement recouverts par le tampon d'éluion. <p><i>Performance insuffisante du tampon d'éluion</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Éliminer complètement les tampons résiduels à chaque étape de séparation. Les tampons résiduels diminuent l'efficacité des étapes de lavages et d'éluion.
Rendement faible	<p><i>Billes séchées excessivement</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Ne pas laisser les billes sécher excessivement, l'efficacité de l'éluion en serait impactée. <p><i>Aspiration du culot de billes présents sur l'aimant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Ne pas perturber les culots de billes sur l'aimant lors de l'aspiration des surnageants, en particulier lors de la première séparation lorsque les culots ne sont pas visibles dans les lysats. <p><i>Aspiration et perte de billes</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Le temps de séparation magnétique est trop court ou la vitesse d'aspiration trop élevée lors du pipetage des liquides.
	<p><i>Procédure de lavage insuffisante</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Utiliser uniquement des plaques ou tubes recommandés pour les séparateurs magnétiques, par exemple les blocs 96 puits carrés 'Square-well Block' en association avec le séparateur NucleoMag® SEP. Veiller à resuspendre totalement les billes pendant les lavages. Si l'agitation est insuffisante, mélanger par pipetage.
	Pureté faible

Problèmes

Causes possible et suggestions

Performance
insuffisante de
l'ARN dans les
applications avales

Contamination par de l'éthanol des tampons de lavage

- Eliminer complètement les solutions de lavage après les séparations, l'éthanol impacte négativement les applications.

Pureté insuffisante

- Voir ci-dessus.
-

Perte de billes

Durée de séparation magnétique insuffisante

- Augmenter le temps de séparation pour permettre aux billes d'être attirées totalement par les aimants avant d'aspirer le liquide contenu dans les puits.

Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'élution)

- Une vitesse d'aspiration trop élevée pendant l'élution peut induire une perte de billes. Réduire la vitesse d'aspiration pour l'étape d'élution.
-

Contaminations
croisées

Contamination des parois

- Ne pas contaminer le haut des parois des puits du bloc lors du transfert des lysats. Si le haut des puits est contaminé, sceller le bloc avec un film adhésif en PE (voir paragraphe 6.2) avant de débiter l'agitation.
-

6.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® RNA	744350.1	1 × 96 preps
	744350.4	4 × 96 preps
NucleoSpin® Filters	740606	50
NucleoSpin® RNA Filter Plates	740711	4
NucleoMag® SEP	744900	1
Square-well Blocks	740481.4	4
	740481.24	24
Films adhésifs en PE	740676	50 feuilles
Rack de barrettes de tubes 'Tube Strips' (set contenant: 1 rack, 12 barrettes de 8 tubes, et 12 barrettes bouchons)	740477.4	4 sets
	740477.24	24 sets
Barrettes de bouchons	740638	30 barrettes
96 Deep-well plates pour systèmes à barreaux magnétiques	744955	25
8-well Tip Combs pour système à barreaux magnétiques	744960	50
8-well Accessory Kit pour systèmes à barreaux magnétiques	744961	1 set
Pour utilisation de l'instrument KingFisher® Flex : Ex: set d'accessoires 'KingFisher® Accessory Kit B' Blocs 96 puits, tip combs, plaques d'élution pour 4 × 96 preps NucleoMag® RNA	744951	1 set

Visiter notre site web www.mn-net.com pour des informations plus détaillées.

6.3 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.

Veuillez contacter:

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG

Tel.: +49 24 21 969 333

support@mn-net.com

6.4 Versions linguistiques et prédominance

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

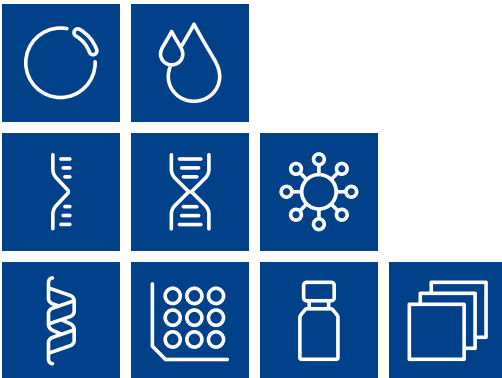
Marques déposées:

KingFisher est une marque déposée de Thermo Fisher Scientific

NucleoMag® est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG

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

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



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

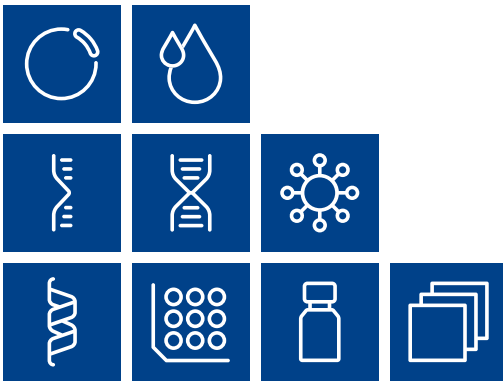
Viral RNA and DNA

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

