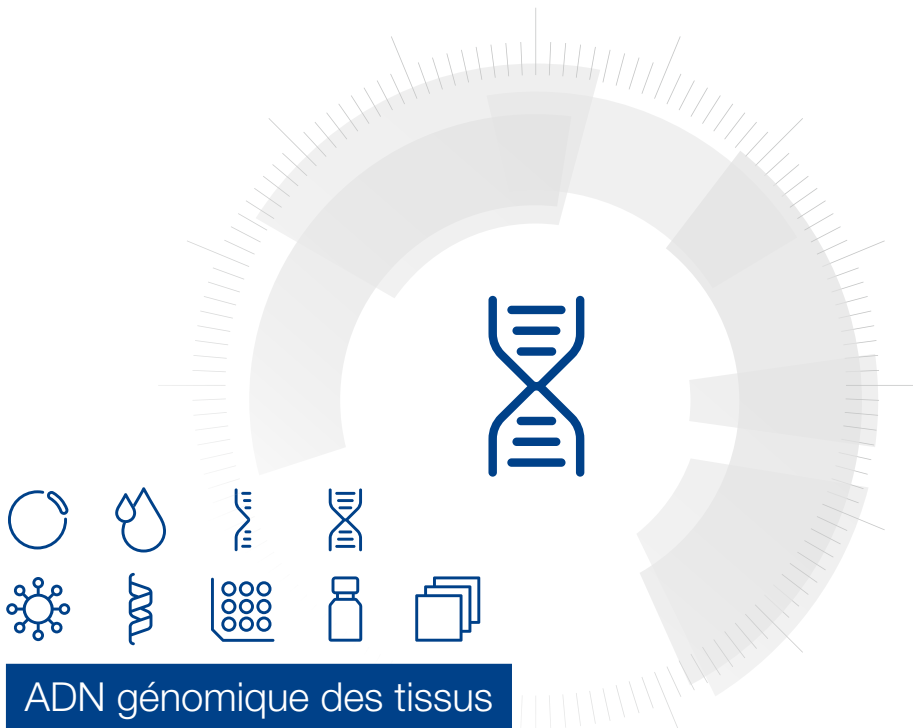


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



- NucleoMag® Tissue
- NucleoMag® Tissue Prefilled Plates

Avril 2025 / 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	Matériels à fournir par l'utilisateur	5
1.3	A propos de ce manuel	5
1.4	Aide à l'automatisation	6
2	Description	7
2.1	Principe général	7
2.2	Caractéristiques du kit	7
2.3	Système de séparation magnétique	8
2.4	Réglage de l'agitateur	8
2.5	Manipulation des billes	9
2.6	Procédures d'éluion	10
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	11
4	Instructions de sécurité	12
4.1	Elimination des déchets	12
5	Protocole d'extraction d'ADN génomique des tissus	13
6	Protocole pour les plaques préremplies NucleoMag® Tissue	18
6.1	Protocole détaillé pour IsoPure™ Mini et MagnetaPure 32 Plus	18
7	Annexes	21
7.1	Guide de résolution des problèmes	21
7.2	Informations de commande	23
7.3	Restrictions d'utilisation / garantie	24
7.4	Versions linguistiques et prédominance	24

1 Composition du kit

1.1 Composants

NucleoMag® Tissue			
REF	1 x 96 preps 744300.1	4 x 96 preps 744300.4	24 x 96 preps 744300.24
Billes NucleoMag® B-Beads	2 x 1.5 mL	12 mL	70 mL
Tampon de lyse T1	50 mL	100 mL	1000 mL
Tampon de fixation MB2	45 mL	180 mL	2 x 500 mL
Tampon de lavage MB3	75 mL	300 mL	2 x 900 mL
Tampon de lavage MB4	75 mL	300 mL	2 x 900 mL
Tampon de lavage MB5	125 mL	500 mL	3 x 1000 mL
Tampon d'éluion MB6	30 mL	125 mL	2 x 500 mL
Protéinase K (lyophilisée)*	75 mg	4 x 75 mg	24 x 75 mg
Tampon de protéinase PB	8 mL	15 mL	3 x 35 mL
	1	1	1

NucleoMag® Tissue Prefilled Plates	
REF	6 x 16 preps 744302
Tampon de lyse T1	50 mL
Plaques 96 puits préremplies NucleoMag® Tissue	6 pièces
Protéinase K Liquide	4 mL
Tip Combs 8-wells	6 x 2 pièces
Manuel d'utilisation	1

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

1.2 Matériels à fournir par l'utilisateur

Produit	REF	Conditionnement
Système de séparation magnétique		
Ex : NucleoMag [®] SEP (voir 2.3)	744900	1
NucleoMag [®] SEP Mini	744901	1
NucleoMag [®] SEP Maxi	744902	1
NucleoMag [®] SEP 24	744903	1
Plaque de séparation pour la séparation des billes magnétiques (pour une utilisation manuelle)		
ex : bloc 96 puits 'Square-well Block' (puits carrés de 2.1 mL)	740481	4
	740481.24	24
 Tubes de lyse pour l'incubation et la lyse des échantillons , ex : Rack de barrettes de tubes 'Tubes Strips' (1 set : 1 Rack, 12 barrettes de 8 tubes (1,2 mL) et 12 barrettes de bouchons).		
	740477	4 sets
	740477.24	24 sets
Plaque d'éluion pour la collecte des acides nucléiques purifiés ,		
ex : Plaque d'éluion 'U-bottom' (96 puits de 0,3 mL ; fond en 'U')	740486.24	24
Kit d'accessoires A 96 puits pour KingFisher		
Blocs à puits carrés (Square-well Blocks), Tip combs pour Deep-well, plaques d'éluion 4 × 96 preps NucleoMag [®] Tissue pour utilisation avec la plateforme KingFisher [®] Flex.	744950	1 set
Pour l'utilisation du kit sur MagnatePure32 Plus ou IsoPure[™] Mini :		
Plaques 96 Deep-well pour systèmes à barreaux magnétiques (déjà incluses dans la REF 744302 NucleoMag [®] Tissue Prefilled Plates)	744955	25 pieces
Tip Combs 8-wells pour systèmes à barreaux magnétiques (déjà inclus dans la REF 744302 NucleoMag [®] Tissue Prefilled Plates)	744960	25 × 2 pieces

1.3 A propos de ce manuel

Il est recommandé de lire attentivement les instructions de ce manuel d'utilisation avant de l'utiliser. Toute la documentation technique est disponible sur notre site Internet à l'adresse www.mn-net.com.

Veuillez contacter le service technique pour toute information concernant les mises à jour apportées au manuel d'utilisation.

1.4 Aide à l'automatisation

Les kits d'extraction MN sont spécialement conçus pour faciliter l'automatisation des processus. Ils sont compatibles avec une large gamme de systèmes robotiques ouverts. Que vous utilisiez des systèmes à barreaux magnétiques ou des manipulateurs de liquides tels que Hamilton, Tecan, Eppendorf ou d'autres plateformes, nos kits garantissent des extractions efficaces et fiables. Contactez-nous pour obtenir une assistance et des solutions d'automatisation sur mesure, afin de rendre votre expérience d'extraction simple et sans effort.

Si vous avez des questions concernant les scripts ou le service d'automatisation de MACHEREY-NAGEL, n'hésitez pas à nous contacter pour un accompagnement personnalisé :
Téléphone : +49 2421 969 333
E-mail : support@mn-net.com

2 Description

2.1 Principe général

La procédure **NucleoMag® Tissue** est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques aux billes paramagnétiques, en présence des tampons appropriés. Les échantillons de tissus, cellules ou bactéries sont lysés avec une solution de SDS/Protéinase K (tampon T1). Pour créer les conditions de fixation des acides nucléiques aux billes, le tampon de fixation MB2 et les billes NucleoMag® B-Beads sont ajoutés au lysat. Après séparation magnétique, les billes sont lavées deux fois pour éliminer les contaminants et les sels avec les tampons de lavage MB3 et MB4. Le séchage n'est pas nécessaire pour éliminer l'éthanol : celui-ci peut être éliminé lors d'une courte incubation dans le tampon MB5. L'ADN purifié est enfin élué dans une solution faiblement saline (Tampon MB6) et directement utilisé pour les applications avalées. Le kit est utilisable manuellement ou automatisable sur la plupart des robots pipeteurs ou la plupart des 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

NucleoMag® Tissue est conçu pour la préparation rapide, manuelle ou automatisée, d'ADN génomique hautement purifié à partir d'échantillons de tissus, cellules ou bactéries en utilisant le séparateur magnétique NucleoMag® SEP (voir 'informations de commande') ou un autre système (voir chapitre 2.3). La durée de la procédure manuelle pour 96 échantillons est d'environ 120 minutes. L'ADN purifié peut être utilisé directement pour les PCR, les applications de blotting ou tout autre type de réactions enzymatiques.

NucleoMag® Tissue Prefilled Plates

Les **NucleoMag® Tissue Prefilled Plates** (REF 744302) sont des plaques à 96 puits profonds spécialement conçues pour être utilisées avec les systèmes MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure™ Mini. Le tampon de fixation MB2, les billes NucleoMag® B-Beads, les tampons de lavage MB3 et MB4, l'éthanol à 80 % ainsi que le tampon d'éluion MB6 sont préremplis dans leurs puits respectifs. La préparation/lyse des échantillons est effectuée selon la procédure standard du kit NucleoMag® Tissue. Les échantillons lysés sont ensuite transférés dans les puits contenant le tampon de fixation MB2 et les NucleoMag® B-Beads pour un traitement automatisé sur les systèmes MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure™ Mini.

NucleoMag® Tissue est aisément automatisable sur les robots pipeteurs courants. La durée de la procédure dépend alors de la configuration de l'instrument et du système de séparation magnétique utilisé. Généralement, 96 échantillons peuvent être extraits en moins de 120 minutes en utilisant le séparateur NucleoMag® SEP.

Le kit fournit les réactifs pour la purification de 20 µg d'ADN purifié à partir d'échantillons de tissus (20 mg max.), cellules (jusqu'à 1×10^6), ou bactéries issues de 1 mL de culture réalisée sur la nuit. Le ratio A_{260}/A_{280} obtenu est $\geq 1.6-1.9$ et la concentration finale de l'ADN généralement de 20–50 ng/µL. En fonction du volume d'éluion utilisé, une concentration finale de 10–150 ng/µL peut être obtenue.

Après la lyse des échantillons avec la protéinase K, la procédure est réalisée à température ambiante. Cependant, effectuer l'éluion à 55 °C permet d'accroître le rendement de 15–20 %.

Réservé à l'usage de la recherche.

2.3 Système de séparation magnétique

Pour utiliser le kit **NucleoMag® Tissue**, nous recommandons le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Les séparations s'effectuent dans un bloc 96 puits carrés (voir 'Informations de commande'). Le kit est également compatible avec d'autres séparateurs.

Séparateur magnétique	Plaque ou tube de séparation
NucleoMag® SEP (MN REF 744900)	Bloc 'Square-well Block' (MN REF 740481/.24)
NucleoMag® SEP Mini (MN REF 744901)	1.5 mL ou 2 mL tubes de réaction (Sarstedt)
NucleoMag® SEP Maxi (MN REF 744902)	50 mL tubes (Falcon)
Tecan Te-MagS™	Tubes 1.5 mL sans bouchon (Sarstedt)

Séparateurs à aimants fixes

Les séparateurs à aimants fixes, comme le NucleoMag® SEP (utilisable manuellement ou sur automates pipeteurs), sont recommandés en association avec un agitateur pour plaques, permettant une resuspension optimale des billes pendant les étapes de lavages et d'éluion. Alternativement, les billes peuvent être resuspendues dans les tampons par plusieurs cycles de pipetage. Pour automatiser totalement la procédure sur un robot pipeteur, un bras manipulateur est nécessaire, afin de transférer la plaque du séparateur magnétique vers l'agitateur pour la resuspension des billes.

Système à aimants mobiles

Ces séparateurs disposent d'aimants se déplaçant d'un côté à l'autre des puits, entraînant les billes à travers les tampons. La séparation magnétique a lieu lors de l'arrêt du système.

Séparateurs automatisés

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

MagnetaPure32 Plus et IsoPure™ Mini

Les NucleoMag® Tissue Prefilled Plates (REF 744302) sont spécialement conçues pour être utilisées avec les systèmes à barreaux magnétiques MagnetaPure 32 Plus et IsoPure™ Mini. Les réactifs sont préremplis selon une disposition par colonne. La préparation et la lyse des échantillons sont effectuées à l'extérieur, puis les échantillons lysés sont transférés dans les puits contenant le tampon de fixation et les billes magnétiques.

2.4 Réglage de l'agitateur

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

Réglage de l'agitation pour les étapes de fixation et de lavages :

- Déposer 1000 µL d'eau colorée (étape de fixation) ou 600 µL (pour les étapes de lavage) 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 pour une durée de 30 secondes supplémentaire et vérifier l'absence de projections.
- Continuer à augmenter la vitesse d'agitation jusqu'à observer des projections au-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'éluion :

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

2.5 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. Un mélange préliminaire des billes magnétiques avec le tampon de fixation MB2 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 de magnétisation des billes doivent être ajustés en fonction de chaque système. Il est recommandé d'utiliser des plaques ou tubes de séparation validés pour le type de séparateur magnétique utilisé.

Lavage des billes

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

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

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

2.6 Procédures d'élution

L'ADN purifié peut être directement élué dans le tampon MB6 fourni. L'élution est réalisable dans un volume \geq 50 μ L. Il est nécessaire de couvrir complètement les billes NucleoMag[®] Beads avec le tampon d'élution. Le volume de tampon d'élution nécessaire dépend du système de séparation magnétique utilisé (ex : position du culot de billes dans les puits). Pour une élution optimale, les culots de billes doivent être resuspendus totalement dans le tampon d'élution. Avec certains séparateurs, des volumes d'élution supérieurs peuvent être nécessaires afin de recouvrir totalement les culots de billes magnétiques.

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

Les plaques préremplies NucleoMag[®] Tissue (REF 744302) contiennent 100 μ L de tampon d'élution MB6 par puits. Pour les mesures photométriques d'absorbance UV, les éluats peuvent être mesurés avec un blanc constitué d'eau distillée (dH₂O).

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention : les tampons MB2, MB3, et MB4 contiennent des sels chaotropiques ! Porter des gants et des lunettes de protection !

Conditions de stockage :

- Tous les composants du kit **NucleoMag® Tissue** doivent être stockés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette sur le kit.
- Les NucleoMag® Tissue Prefilled Plates doivent être conservées en position verticale à une température comprise entre 15 et 25 °C, à l'abri de la lumière UV et de la lumière du soleil. Ne conservez pas les plaques NucleoMag® Tissue Prefilled Plates à des températures supérieures à 25 °C ou inférieures à 15 °C. Avant utilisation, vérifiez l'absence de précipités dans les tampons et préchauffez la plaque afin de dissoudre les précipités. Lorsqu'elles sont conservées correctement, les plaques préremplies sont stables jusqu'à : voir l'étiquette du kit.

Tous les tampons sont fournis prêts à l'emploi.

- Avant de débiter la procédure **NucleoMag® Tissue**, préparer :
- **Protéinase K :** Ajouter le volume indiqué sur le flacon de tampon de protéinase PB pour dissoudre l'enzyme lyophilisée. La solution de protéinase K est stable à -20 °C pendant au moins 6 mois.

Note : Les NucleoMag® Tissue Prefilled Plates (REF 744302) sont livrées avec de la protéinase K liquide, prête à l'emploi.

NucleoMag® Tissue			
REF	1 x 96 preps 744300.1	4 x 96 preps 744300.4	24 x 96 preps 744300.24
Protéinase K (lyophilisée)	75 mg Ajouter 2.6 mL de tampon PB	4 x 75 mg Ajouter 2.6 mL de tampon PB à chaque flacon	24 x 75 mg Ajouter 2.6 mL de tampon PB à chaque flacon

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec les kits **NucleoMag® Tissue** ou **NucleoMag® Tissue Prefilled Plates**, portez des vêtements de protection appropriés (par exemple : une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection). Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité appropriées (les FDS sont disponibles en ligne sur www.mn-net.com/msds).



Attention : Le perchlorate de sodium dans les tampons MB2, MB3 et MB4 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 les kits **NucleoMag® Tissue** ou **NucleoMag® Tissue Prefilled Plates** 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.

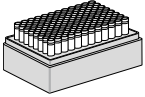




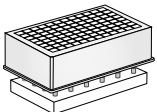


5 Protocole d'extraction d'ADN génomique des tissus

Résumé du protocole

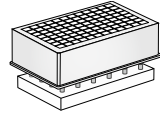
- A propos des équipements et matériel nécessaires, voir les chapitres 1.2 et 2.3.
- Pour des informations détaillées à propos de chaque étape, voir page 15

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier la préparation de la protéinase K selon les recommandations du chapitre 3

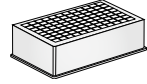
1 Lyse des échantillons (≤ 20 mg tissus, ≤ 1 × 10 ⁶ cellules ou culot bactérien issu de 1 mL de culture ON)	25 µL Protéinase K 200 µL T1 Mélanger 56 °C, 1 – 3 h ou toute la nuit	
2 Clarifier les lysats par centrifugation, transférer 225 µL de lysat clarifié dans un bloc 96 puits carrés	5,600 × g, 5 min 225 µL de lysat clarifié	 
3 Fixation de l'ADN aux NucleoMag® B-Beads	24 µL NucleoMag® B-Beads 360 µL MB2 Agiter 5 min à TA <i>(Option : Mélanger par pipetage)</i> Jeter le surnageant après 2 min de séparation	  
4 Laver avec MB3	Enlever le bloc du NucleoMag® SEP 600 µL MB3 Resuspension : agiter 5 min à TA <i>(Option : Mélanger par pipetage)</i>	 

Jeter le surnageant après
2 min de séparation



5 Laver avec MB4

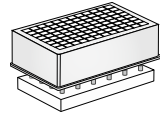
Enlever le bloc du NucleoMag® SEP
600 µL MB4



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



Jeter le surnageant après
de séparation 2 min



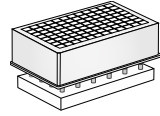
6 Rincer avec MB5

Laisser le bloc
sur le NucleoMag® SEP

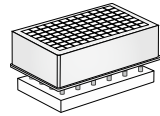
900 µL MB5

Incuber 45–60 s

*Note : ne pas resuspendre les billes
dans le tampon MB5 !*



Jeter le surnageant



7 Eluer l'ADN

Enlever le bloc du
NucleoMag® SEP

50-200 µL MB6

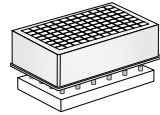
(Option : *Eluer à 55 °C*)



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



**Séparer les billes 2 min et
transférer les éluats dans une
plaques / des tubes de collecte**



Protocole détaillé

Ce protocole décrit la procédure utilisant un séparateur à aimants fixes (ex : NucleoMag® SEP) et un agitateur à plaques approprié (voir chapitre 2.3). L'utilisation des blocs 96 puits carrés 'Square-well Block' est recommandée (voir chapitre 1.2). Alternativement, l'extraction peut être effectuée dans des tubes avec un séparateur magnétique compatible. Ce protocole détaille la procédure manuelle et peut servir de guide pour l'automatisation du kit.

Avant de débiter la procédure :

- Vérifier la préparation de la protéinase K selon les recommandations du chapitre 3.
-

1 Lyse des échantillons

Calculer la quantité de tampon de lyse nécessaire : pour chaque échantillon **25 µL de solution de Protéinase K et 200 µL de tampon T1** sont nécessaires. Préparer le volume de mélange adéquat et vortexer.

Ne jamais préparer la solution de lyse plus de 15 minutes avant de l'ajouter aux échantillons (incubée dans le tampon T1, la Protéinase K s'auto-digère en absence de substrat).

Transférer 225 µL de la solution de lyse dans chaque tube contenant jusqu'à 20 mg de tissus (ex : fragment de queue de souris), jusqu'à 1×10^6 cellules de culture ou encore un culot bactérien issu de 1 mL de culture réalisée sur la nuit. Fermer les tubes. Mélanger vigoureusement au vortex pendant 10–15 s. Centrifuger brièvement (15 s ; 1,500 x g) pour collecter la totalité de l'échantillon au fond des tubes.

L'échantillon doit être submergé dans la solution de lyse.

Incuber les tubes contenant l'échantillon à 56 °C jusqu'à ce que la lyse soit totale (au moins 1–3 h ou durant la nuit). Pour les cellules de culture, l'incubation peut être effectuée à 70 °C pendant 10–15 min. Pour optimiser la lyse, mélanger de temps en temps pendant l'incubation. Veiller à ce que les tubes de lyse demeurent bien clos.

Si l'ADN obtenu est souhaité exempt de toutes traces d'ARN, en fonction des applications avales, un traitement à la RNase peut être effectué : 20 µL de solution de RNase A (20 mg/mL, non fournie, voir 'Informations de commandes' et incuber pendant 5 minutes supplémentaires à TA.

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 **225 µL de lysat clarifié** (équilibré à TA) dans un bloc 96 puits carrés 'Square-well Block'. Ne pas contaminer les parois des puits en transférant les liquides.

Note : voir le chapitre 1.2 pour les recommandations à propos de la compatibilité entre les tubes / plaques de séparation et les séparateurs magnétiques.

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

Ajouter **24 µL de billes NucleoMag® B-Beads** et **360 µL de tampon MB2** dans chaque puits du bloc. Mélanger par pipetage (6 fois) et **agiter** pendant **5 min** à **température ambiante**. Alternativement, lors de l'utilisation du kit sans agitateur, mélanger 10 fois par pipetage et incubé pendant 5 min à température ambiante.

Note : les billes NucleoMag® B-Beads et le tampon MB2 peuvent être mélangés avant distribution dans les puits. Préparer le mélange juste avant utilisation, le stockage des billes dans le tampon est déconseillé. Mélanger 24 µL de billes NucleoMag® B-Beads et 360 µL de tampon MB2 pour chaque échantillon. Prévoir un excédent en fonction du volume mort des réservoirs utilisés. Utiliser 384 µL de suspension par puits. Veiller à bien resuspendre les billes NucleoMag® B-Beads avant de les prélever dans le flacon. Vortexer le flacon brièvement afin d'obtenir une suspension homogène.

Séparer les billes 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.

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

4 Lavage avec MB3

Enlever le bloc du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Déposer **600 µL de tampon MB3** dans chaque puits et resuspendre les billes en agitant (**5 min**). Alternativement, resuspendre les billes par pipetages répétés (15 fois).

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.

5 Lavage avec MB4

Enlever le bloc du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Déposer **600 µL de tampon MB4** dans chaque puits et resuspendre les billes en agitant (5 min). Alternativement, resuspendre les billes par pipetages répétés (15 fois).

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.

6 Rinçage avec MB5

Laisser le bloc sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

! *Note : le surnageant est incolore, le culot de billes magnétiques est clairement visible.*

- Déposer doucement **900 µL de tampon MB5** dans chacun des puits et incubé pendant **45–60 s** tandis que les billes restent fixer sur les aimants. Retirer et jeter les surnageants.

Note : ne pas resuspendre les billes dans le tampon MB5. Cette étape permet d'éliminer les traces d'éthanol en évitant l'étape de séchage à l'air.

7 Elution

Enlever le bloc du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Déposer le volume adéquat de **tampon MB6 (50–200 µL)** dans chaque puits du bloc 96 puits carrés et resuspendre les billes en agitant pendant **5–10 min à 56 °C** si possible. Alternativement, resuspendre les billes par pipetages répétés pendant **5–10 min à 56 °C**.

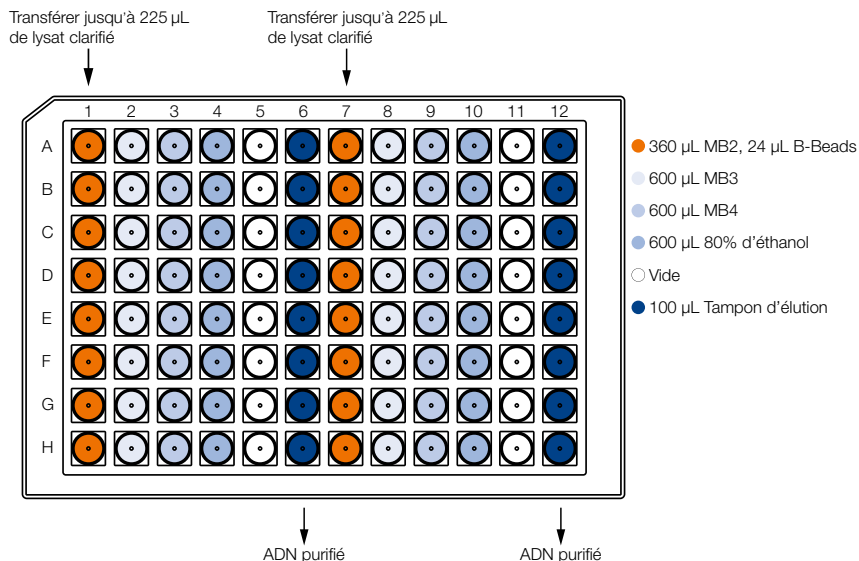
Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Transférer les surnageants contenant l'ADN purifié dans la plaque/les tubes de collecte.

Note : le rendement peut être accru de 15–20% en utilisant le tampon d'éluion préchauffé (55 °C) ou en incubant les billes dans le tampon d'éluion à 55 °C pendant 10 min.

Note : l'étape de rinçage peut être remplacée par une étape de lavage supplémentaire avec 600 µL d'éthanol à 80 %, suivie d'un séchage des billes magnétiques à température ambiante pendant au moins 10 min après élimination du surnageant.

6 Protocole pour les plaques préremplies NucleoMag® Tissue

Les plaques préremplies NucleoMag® Tissue sont spécifiquement conçues pour être utilisées sur les instruments MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure™ Mini uniquement. Veuillez contacter notre support technique pour toute question concernant la compatibilité sur d'autres instruments. Aperçu schématique de la plaque de réactifs pré-remplie.



Note : Les fichiers de méthode nécessaires à la procédure de traitement des plaques préremplies NucleoMag® Tissue sur les instruments IsoPure™ Mini ou MagnetaPure 32 Plus peuvent être demandés à l'adresse suivante : support@mn-net.com.

6.1 Protocole détaillé pour IsoPure™ Mini et MagnetaPure 32 Plus

La préparation et la lyse des échantillons doivent être effectuées en dehors de l'instrument. Avant de débiter la procédure :

- Porter des lunettes de protection et des vêtements de protection appropriés
- Vérifier l'absence de précipités dans les tampons conformément au chapitre 3.
- Vérifiez si le bon programme est installé sur votre instrument.
 - IsoPure™ Mini : NMTissuePFP
 - MagnetaPure32 Plus : NMTissuePFP

1 Lyse de l'échantillon

Calculer les volumes de réactifs nécessaires pour la lyse : pour chaque échantillon, **38 µL de solution de protéinase K liquide + 200 µL de tampon T1** sont nécessaires. Préparer la solution mère pour la lyse en conséquence et vortexer.

Ne jamais préparer la solution mère de lyse plus de 15 min avant de l'ajouter aux échantillons. La protéinase K a tendance à s'autodigérer lorsqu'elle est incubée dans le tampon T1 sans substrat.

Transférer 225 µL de la solution mère obtenue dans chaque tube de lyse contenant jusqu'à 20 mg d'échantillon de tissu (p.e. paragraphe de queue de souris), ou jusqu'à 1×10^6 cellules en culture ou jusqu'à 1 mL d'une culture de bactéries d'une nuit. Fermer les tubes individuels. Mélanger par agitation ou par pipetage pendant 10 à 15 s. Centrifuger brièvement (15 s ; 1 500 x g) pour recueillir tout échantillon au fond du tube.

L'échantillon doit être immergé dans la solution.

Incuber les tubes contenant les échantillons à 56 °C jusqu'à l'obtention d'une lyse complète (au moins 1–3 h ou toute une nuit). Pour les cellules en culture, l'incubation peut être effectuée à 70 °C pendant 10–15 min. Pour une lyse optimale, mélanger de temps en temps pendant l'incubation. S'assurer que les tubes de lyse sont bien fermés.

Si de l'ADN sans ARN est crucial pour les applications en aval, une digestion RNase peut être effectuée : ajouter 20 µL de solution de RNase A (20 mg/mL) (non inclus, voir les informations de commande) et incuber pendant 5 min supplémentaires à température ambiante.

2 Préparer la/les plaque(s) de réactifs

Centrifuger brièvement (p.e. 10–15 s à 1 000 x g) la plaque 96 puits scellée NucleoMag® Tissue Prefilled Plates dans une centrifugeuse appropriée pour éliminer les gouttelettes de la face inférieure du film pour sceller.

3 Retirer le(s) film(s)

Retirez délicatement le film de la plaque de réactifs en tirant sur le film d'un côté avec une force égale.

Note : Vérifier qu'il n'y a pas de résidus de colle du film sur la plaque et l'enlever avec une pince à épiler si nécessaire.

4 Transférer le(s) lysat(s) clarifié(s)

Transférer jusqu'à 225 µL de l'échantillon clarifié et lysé de l'étape 1 dans les puits respectifs des colonnes 1 et 7 des plaques utilisées.

Note : Ne pas souiller le bord supérieur de la plaque 96 Deep-well plates.

5 Sélectionner le protocole et lancer le run

Charger la (les) plaque(s) sur l'instrument.

Insérer les Tip combs sur les rainures de montage.

Lancer le run.

Note : Equiper tous les barreaux magnétiques avec des Tip combs même pour les puits non utilisés.

6 Transférer l'éluat

L'instrument s'arrête après la dernière étape d'élution. Retirer et jeter les Tip combs.

Décharger la/les plaque(s) de l'instrument et transférer l'éluat pour une procédure ultérieure dans une plaque ou des tubes appropriée (és).

7 Annexes

7.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Cause possible et suggestions
Faible rendement en ADN	<i>Volume de tampon d'éluotion insuffisant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Les billes doivent être totalement recouvertes par le tampon d'éluotion.
	<i>Performance insuffisante du tampon d'éluotion</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Les tampons doivent être éliminés totalement après chaque séparation magnétique. Les tampons résiduels diminuent l'efficacité des lavages et de l'éluotion.
	<i>Séchage excessif des billes</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Ne pas laisser les billes sécher excessivement, ceci induirait une diminution de l'efficacité d'éluotion.
Purété insuffisante	<i>Elution partielle et perte de l'ADN dans le tampon de lavage MB5</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Maintenir le bloc sur le séparateur magnétique lors de la distribution du tampon de lavage MB5. Ne pas resuspendre les billes dans le tampon et ne pas incuber les billes dans le tampon pendant plus de 2 min. Le tampon MB5 étant aqueux, il pourrait conduire à l'éluotion prématurée de l'ADN.
	<i>Aspiration d'une partie des billes présents sur l'aimant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Ne pas perturber les culots de billes en aspirant les surnageants, en particulier après la première séparation, les culots étant difficilement visibles dans les lysats. Aspirer doucement en suivant les parois du côté opposé.
Mauvaise performance de l'ADN lors des applications avales	<i>Incubation après distribution des billes dans les lysats</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Mélanger immédiatement après distribution des billes NucleoMag® B-Beads / et du tampon MB2 aux lysats.
	<i>Procédure de lavage insuffisante</i>
Faible pureté	<ul style="list-style-type: none"> Utiliser des plaques prévues pour le séparateur magnétique, par exemple les blocs 'Square-well Block' et le NucleoMag® SEP. Resuspendre totalement les billes pendant les lavages. Pipeter plusieurs fois si l'agitation est insuffisante.
	<i>Contamination par de l'éthanol des tampons de lavage</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Veiller à éliminer l'éthanol provenant des étapes de lavage, l'éthanol résiduel impactant négativement les applications avales.
	<i>Faible pureté</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Voir ci-dessus

Problème	Cause possible et suggestions
Perte de billes	<i>Temps de séparation magnétique trop court</i> <ul style="list-style-type: none">• Augmenter la durée de la séparation magnétique pour permettre aux billes d'être attirées par les aimants avant d'aspirer les liquides.
	<i>Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'élution)</i> <ul style="list-style-type: none">• Une vitesse d'aspiration trop élevée au cours de l'étape d'élution peut entraîner l'aspiration de billes. Réduire la vitesse d'aspiration.
Contamination croisées	<i>Contamination des parois des puits</i> <ul style="list-style-type: none">• Ne pas contaminer la partie supérieure des blocs lors du transfert des lysats. Si les parois sont souillées, sceller le bloc avec un film adhésif en PE (voir 'Informations de commandes') avant de lancer l'agitation.

7.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® Tissue	744300.1	1 × 96 preps
	744300.4	4 × 96 preps
	744300.24	24 × 96 preps
NucleoMag® Tissue Prefilled Plates	744302	6 × 16 preps
Tampon T1	740940.25	50 mL
	740940.100	100 mL
	740940.1000	1000 mL
RNase A	740505.50	50 mg
NucleoMag® SEP	744900	1
Blocs 96 puits 'Square-well Blocks'	740481	4
	740481.24	24
Films adhésifs en PE	740676	50 feuilles
Rack de barrettes de tubes 'Tube Strips' (set comprenant : 1 support, 12 barrettes de 8 tubes (1,2 mL) et 12 barrettes de bouchons)	740477	4 sets
	740477.24	24 sets
Plaque d'élution fond en 'U'	740486.24	24
Plaque d'élution fond plat	740673	20
Kit d'accessoires A 96 puits pour KingFisher Blocs à puits carrés (Square-well Blocks), Tip combs pour Deep-well, plaques d'élution 4 × 96 preps NucleoMag® Tissue pour utilisation avec la plateforme KingFisher® Flex.	744950	1 set
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

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

7.3 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

Tél : +49 24 21 969 333

support@mn-net.com

7.4 Versions linguistiques et prédominance

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

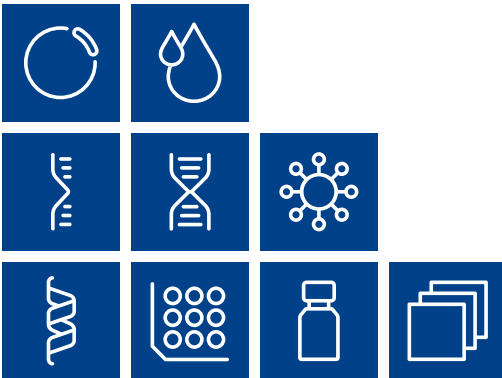
Marques déposées :

KingFisher est une marque déposée de Thermo Fisher Scientific

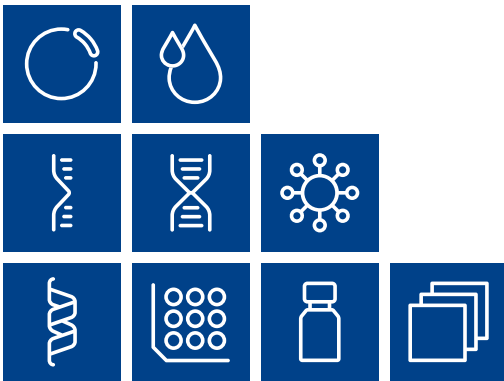
NucleoMag® est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG

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



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

