

MACHEREY-NAGEL

# Mode d'emploi



## ARN de sang stabilisé

■ NucleoSpin® Dx RNA Blood



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



740201.50



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG  
Valenciener Str. · 11 52355 Düren · Allemagne  
Tél. : +49 24 21 969-0



50 prép.



Juin 2025 / Rév. 02

## 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](mailto:info@mn-net.com)

### Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-333  
E-mail: [support@mn-net.com](mailto: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](mailto: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](mailto: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


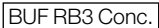

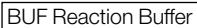

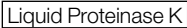

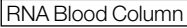
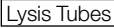
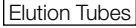


MACHEREY-NAGEL AG  
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland  
Tel.: +41 62 388 55 00  
E-mail: [sales-ch@mn-net.com](mailto:sales-ch@mn-net.com)

## Table des matières

1	Détail des composants	4
1.1	Contenu du kit	4
1.2	Réactifs, consommables et matériel à fournir par l'utilisateur	5
1.3	À propos de ce mode d'emploi	5
2	Description du produit	6
2.1	Usage prévu	6
2.2	Limites d'utilisation du produit	6
2.3	Contrôle qualité	6
2.4	Présentation du kit et de ses spécifications	6
2.5	Performances analytiques et cliniques	8
2.6	Manipulation, préparation et conservation des équipements indispensables	10
2.7	Procédures d'élution	11
3	Conditions de conservation et préparation des solutions de travail	12
4	Consignes de sécurité	14
4.1	Élimination	14
5	Extraction d'ARN à partir d'un tube S-Monovette® RNA Exact de SARSTEDT à l'aide du kit NucleoSpin® Dx RNA Blood	15
5.1	Mode opératoire résumé	16
5.2	Procédure détaillée	17
6	Annexe	19
6.1	Guide de résolution des problèmes	19
6.2	Exigence de notification	21
6.3	Bibliographie générale	21
6.4	Références	22
6.5	Explication des pictogrammes	22
6.6	Limites d'utilisation du produit et garantie	22

# 1 Détail des composants

## 1.1 Contenu du kit

NucleoSpin® Dx RNA Blood		
REF	Symbole	50 préparations 740201.50
Wash Buffer RB2		13 mL
Wash Buffer RB3 (Concentrate)**		12 mL
Membrane Desalting Buffer MDB		25 mL
Reaction Buffer for rDNase		7 mL
rDNase, RNase-free (lyophilized)*		2 flacons (taille D)
Liquid Proteinase K		600 µL
RNase-free H <sub>2</sub> O		13 mL
NucleoSpin® RNA Blood Columns (light blue rings -plus Collection Tubes)		50
Lysis Tubes (2 mL, with lid)		50
Elutions Tubes (1.5 mL)		50
Collection Tubes (2 mL)		150
Mode d'emploi		1

\* Pour la préparation des solutions de travail et les conditions de conservation, consulter la section 3.

## 1.2 Réactifs, consommables et matériel à fournir par l'utilisateur

### Réactifs

- Éthanol à 96 – 100 % (pour préparer le tampon de lavage RB3)

### Consommables

- Embouts stériles sans RNase

### Matériel

- Pipeteurs manuels
- Mélangeur vortex
- Dispositif de centrifugation pour tubes de microcentrifugation de 2 mL
- Équipements de protection individuelle (par ex. : blouse de laboratoire, gants, lunettes de sécurité)

## 1.3 À propos de ce mode d'emploi

Il est fortement conseillé de lire les sections détaillées des modes opératoires figurant dans le présent mode d'emploi. La version résumée du mode opératoire est uniquement destinée à servir d'aide-mémoire pendant la procédure de purification.

Les modes d'emploi MACHEREY-NAGEL sont disponibles sur notre site Internet, **[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)**.

Contactez le service d'assistance technique pour en savoir plus sur les modifications du présent mode d'emploi par rapport aux versions antérieures.

### Coordonnées de contact

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG

Valenciener Str. 11

52355 Düren, Allemagne

Tél. : +49 24 21 969-0

Numéro vert : 0800 26 16 000 (depuis l'Allemagne uniquement)

E-mail : [info@mn-net.com](mailto:info@mn-net.com)

### Assistance technique Bioanalyse

Tél. : +49 24 21 969-333

E-mail : [support@mn-net.com](mailto:support@mn-net.com)

Benutzerhandbücher in weiteren Sprachen sind im Download-Bereich auf der Produktseite verfügbar.

Les manuels d'utilisation dans d'autres langues sont disponibles dans la section Téléchargements de la page du produit.

Los manuales de usuario en otros idiomas están disponibles en la sección de descargas de la página del producto.



## 2 Description du produit

### 2.1 Usage prévu

**NucleoSpin® Dx RNA Blood** est un kit destiné à l'extraction de l'ARN humain à partir de sang total recueilli dans le tube *S-Monovette® RNA Exact* de SARSTEDT afin de procéder ensuite à l'analyse diagnostique *in vitro*. Le produit permet d'obtenir de l'ARN humain purifié qui peut être utilisé pour des analyses aval telles que RT-PCR, qRT-PCR ou séquençage afin de recueillir des informations sur le taux d'expression de l'ARN dans l'échantillon. Le produit est réservé aux utilisateurs professionnels dans les laboratoires de diagnostic.

Le kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** n'est pas destiné à être utilisé comme autotest ni pour les tests au chevet du patient. L'utilisateur doit avoir une certaine expérience des techniques de biologie moléculaire, notamment la manipulation d'échantillons de sang total, et d'autres échantillons d'origine humaine potentiellement infectieux.

Il est recommandé d'utiliser les contrôles appropriés.

Seul le sang recueilli dans le tube *S-Monovette® RNA Exact* peut être utilisé.

Le kit est destiné à une utilisation manuelle.

### 2.2 Limites d'utilisation du produit

Le kit **NucleoSpin® DX RNA Blood** peut être utilisé pour purifier l'ARN du sang prélevé dans le tube *S-Monovette® RNA Exact*. L'utilisation du kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** n'a pas été validée avec d'autres types d'échantillons (p. ex. : sang traité à l'EDTA).

Un effet inhibiteur potentiel des substances présentes dans le sang (p. ex., produits pharmaceutiques) ne peut être complètement exclu. Il est par conséquent recommandé d'utiliser des contrôles appropriés.

### 2.3 Contrôle qualité

Conformément au système d'assurance qualité en vigueur chez MACHEREY-NAGEL, chaque lot de kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** est testé par rapport à des spécifications prédéfinies, afin d'assurer une qualité de produit constante.

### 2.4 Présentation du kit et de ses spécifications

Le kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** permet d'isoler l'ARN du sang total recueilli dans les tubes de prélèvement sanguin *S-Monovette® RNA Exact* de Sarstedt. L'un des aspects les plus importants de la purification de l'ARN est de prévenir les variations du niveau d'expression des transcrits après le prélèvement sanguin et avant la lyse sanguine, et d'empêcher la dégradation de l'ARN pendant le transport, la conservation et l'extraction. Grâce à la méthode **NucleoSpin® Dx RNA Blood**, l'ARN est isolé à partir de sang recueilli dans le tube *S-Monovette® RNA Exact* dans lequel les leucocytes (la principale source d'ARN dans le sang total) et d'autres cellules sanguines sont lysés immédiatement lorsque le sang entre en contact avec la solution de stabilisation présente dans le tube. Cette solution de stabilisation intégrée au tube *S-Monovette® RNA Exact* inactive immédiatement les RNases (qui sont présentes dans pratiquement tous les matériaux biologiques), facilite le transport et la conservation des échantillons sanguins et crée des conditions de liaison appropriées qui favorisent l'adsorption de l'ARN sur la membrane de silice. L'ADN contaminant, qui se lie également à la membrane de silice, est éliminé par une solution de DNase recombinante (fournie) qui est directement appliquée sur la membrane de silice lors de la préparation. Des étapes de lavage simples à l'aide d'un tampon

de lavage chaotropique (RB2) et d'un tampon de lavage éthanolique (RB3) éliminent les sels, les métabolites et les composants cellulaires macromoléculaires. L'ARN pur est *in fine* élué dans des conditions de faible force ionique avec de l'H<sub>2</sub>O sans Rnase (fournie).

La préparation de l'ARN à l'aide des kits **NucleoSpin® Dx RNA Blood** est effectuée à température ambiante. Il n'est pas nécessaire de disposer d'une centrifugeuse réfrigérée. Cependant, l'éluat doit être manipulé avec précaution car l'ARN est très sensible à la contamination des RNases, y compris sous forme de traces souvent présentes sur le matériel de laboratoire, sur les doigts et dans la poussière. Afin de garantir la stabilité de l'ARN, l'ARN doit être congelé à -20 °C pour une conservation à court terme ou à -70 °C pour une conservation à long terme.

- Le kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** est recommandé pour l'extraction de l'ARN du sang total recueilli dans les tubes de prélèvement sanguin *S-Monovette® RNA Exact* de Sarstedt. Il ne doit pas être utilisé pour isoler l'ARN du sang prélevé dans d'autres tubes de prélèvement sanguin tels que les tubes contenant de l'EDTA, du citrate ou de l'héparine.
- Les kits **NucleoSpin® Dx RNA Blood** permettent la purification de l'ARN selon un rapport  $A_{260}/A_{280}$  généralement compris entre 1,9 et 2,1 (mesuré dans un tampon TE, pH 7,5).
- L'ARN isolé est prêt à être utilisé pour des analyses aval ultérieures telles que RT-PCR, qRT-PCR ou séquençage afin de recueillir des informations sur le taux d'expression de l'ARN dans l'échantillon.
- L'ARN isolé à l'aide des kits sanguins NucleoSpin® Dx RNA Blood est généralement d'une intégrité élevée. Cependant, l'intégrité de l'ARN dépend fortement de la qualité de l'échantillon qui, elle-même, dépend de la température et la durée de conservation.

Le niveau de contamination par l'ADN est considérablement réduit lors de la digestion sur colonne par rDNase. Cependant, dans des applications très sensibles, il peut être possible de détecter des traces d'ADN. La probabilité de détection de l'ADN par PCR augmente avec :

1. le nombre de copies d'ADN par préparation : cible à copie unique < cible plasmidiale / mitochondriale < plasmide transfecté dans les cellules.
2. la diminution de la taille de l'amplicon obtenu par PCR.

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

Paramètre	NucleoSpin® Dx RNA Blood
Matériau échantillonné	Solution de 1,2 mL de sang stabilisé provenant de tubes de prélèvement sanguin <i>S-Monovette® RNA Exact</i> (SARSTEDT REF 01.2048.001).
Format	Minicolonne de centrifugation
Taille du fragment	> 200 nt
Rendement généralement constaté	> 1 µg (0,7 – 4,2 µg) par préparation à partir de sang de sujets sains
$A_{260}/A_{280}$	1,6 – 2,2 (généralement 1,9 – 2,1)
Volume d'éluion	60 µL ou 40 µL
Capacité théorique de liaison	200 µg

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

Temps de préparation	55 min pour 6 préparations
----------------------	----------------------------

Le kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** fonctionne selon un mode opératoire qui permet d'utiliser une solution de 1,2 mL de sang stabilisé provenant d'un tube *S-Monovette® RNA Exact* de Sarstedt.

L'ARN isolé peut être utilisé comme matrice dans l'analyse des réactions (q)RT-PCR et du séquençage de l'ARN. Généralement, une matrice pour la RT-PCR peut être obtenue à partir d'un volume de 1 à 4 µL d'un éluat de 60 µL provenant d'une préparation.

## 2.5 Performances analytiques et cliniques

La performance analytique du kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** a été évaluée en aval par quantification de l'ARN extrait.

La répétabilité intracycle du rendement a été calculée à partir de 12 cycles de préparations indépendants comptant 6 préparations chacun, pour lesquels l'ARN a été quantifié par spectrophotométrie et/ou fluorimétrie. Le coefficient de variation moyen (CV) du rendement de l'ARN était de 11 % (6–20 %) sur un cycle.

La variation inter-cycles du rendement de l'ARN a été déterminée en comparant le rendement de l'ARN de deux cycles comportant chacun 6 préparations. La différence entre les rendements moyens de l'ARN des deux analyses était de 2 %.

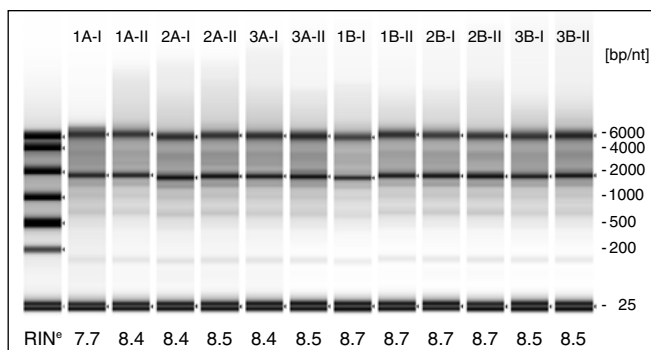
La répétabilité inter-lots a été déterminée en comparant le rendement de l'ARN de trois lots comportant chacun 6 préparations. Le rendement moyen entre les lots différait de 1 à 3 %.

La reproductibilité inter-opérateurs a été déterminée par comparaison du rendement de l'ARN obtenu par deux opérateurs ayant analysé chacun six préparations. La différence entre les rendements moyens de l'ARN était de 35 % entre les opérateurs.

Dans une étude portant sur les déficiences dans la réponse au stress cellulaire, l'épissage différentiel des transcrits du gène XBP1 a été étudié. L'ARN a été isolé à partir de sang humain prélevé dans le tube *Monovette® RNA Exact* de SARSTEDT. Deux échantillons de sang ont été prélevés à intervalles rapprochés chez 3 donneurs, puis conservés pendant 2 heures ou 24 heures avant extraction de l'ARN à l'aide du kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood**. La quantité et la qualité de l'ARN ont été déterminées, puis une analyse qRT-PCR a été pratiquée sur quatre transcrits (deux gènes domestiques (ACTB, HPRT) et deux variants d'épissage de XBP1).

**Tableau 2: Rendement et qualité de l'ARN après extraction de l'ARN à partir d'un tube Monovette® RNA Exact de SARSTEDT. 1, 2, 3 représentent les donneurs ; A et B représentent les doublons de 2 tubes de prélèvement sanguin. L'ARN a été extrait 2 h (I) et 24 h (II) après le prélèvement sanguin. L'ARN a été analysé avec des instruments NanoDrop™ et Qubit.**

Échantillon	NanoDrop			Qubit
	ng/µL	260 / 280	260 / 230	ng/µL
1A - I	45,2	2,08	1,94	44,9
1A - II	46,5	2,08	1,35	46,7
2A - I	50,4	2,05	1,77	47,2
2A - II	52,0	2,06	1,04	52,9
3A - I	55,3	2,02	1,31	52,4
3A - II	54,4	2,03	1,68	50,8
1B - I	44,0	2,03	1,66	41,4
1B - II	42,6	2,07	1,63	40,1
2B - I	53,0	2,00	1,06	49,9
2B - II	50,9	2,04	1,72	50,8
3B - I	50,3	2,04	1,20	50,1
3B - II	54,1	2,02	1,73	52,6
Ø	<b>49,9</b>	<b>2,0</b>	<b>1,5</b>	<b>48,3</b>
Rendement moyen d'ARN total (volume d'éluion de 40 µL)	2,5 µg			2,4 µg



**Figure 1** Détermination de l'intégrité de l'ARN (RIN<sup>e</sup> = RNA Integrity Number, score d'intégrité de l'ARN obtenu à l'aide du système RNA ScreenTape<sup>®</sup>). Un RIN<sup>e</sup> moyen de 8,5 a été obtenu. Les échantillons de gauche à droite représentent les échantillons du Tableau 2 (1A-I à 3B-II).

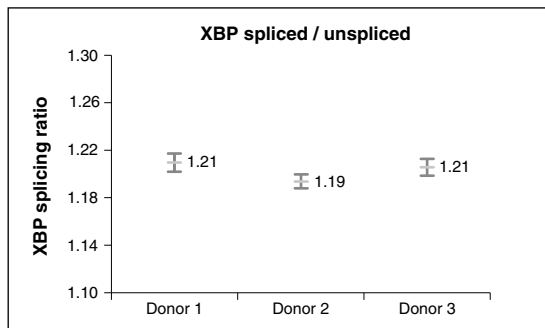


Figure 2 Analyse des variants d'épissage XBP1 (épissés/non épissés) par qRT-PCR provenant de trois donneurs sains.

### Conclusions

Au total, douze extractions d'ARN ont été réalisées à l'aide des tubes de prélèvement sanguin Monovette® RNA Exact et du kit NucleoSpin® Dx RNA Blood. Tous les échantillons ont permis d'obtenir un ARN approprié pour effectuer ensuite une analyse qRT-PCR.

Une comparaison du rapport entre les transcrits d'ARN épissés et non épissés dérivés du gène XBP1 a révélé des différences mineures entre les trois donneurs, comme illustré sur la figure ci-dessus.

Les écarts-types illustrés par donneur, représentés par les barres grises, englobent les réplicats techniques à deux niveaux : premièrement, les différents prélèvements sanguins consécutifs, et deuxièmement, le temps de conservation (2 et 24 heures) du tube de prélèvement. Les résultats d'analyse soulignent la capacité de détecter de légères différences en termes de niveaux de stress cellulaire, y compris au sein de la cohorte de trois donneurs sains.

La littérature existante souligne que les patients présentant des réponses aberrantes en matière de stress cellulaire ont tendance à avoir des rapports épissés/non épissés allant de 0,5 à 1,5. Dans ce contexte, il apparaît clairement que les procédures de prélèvement sanguin, de conservation et d'extraction de l'ARN démontrent une robustesse et une précision suffisantes pour l'examen des individus atteints de troubles de la réponse au stress cellulaire.

L'utilisation diagnostique *in vitro* des kits NucleoSpin® RNA Blood associés au tube *S-Monovette® RNA Exact* est illustrée dans les publications suivantes

- Linden J *et al.* (2020) : Impact of RNA Stabilizing Blood Collection Tubes on Gene Expression Data Validity – A Comparison of S-Monovette® RNA Exact, PAXgene™ Blood RNA Tubes & Tempus™ Blood RNA Tubes. [https://www.sarstedt.com/fileadmin/user\\_upload/Mediacycenter/Studien/an\\_007\\_rna-exact\\_monovette\\_0123.pdf](https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/Mediacycenter/Studien/an_007_rna-exact_monovette_0123.pdf)
- Reith M. *et al.* (2022) : Novel, Apparently Silent Variant in MFSD8 Causes Neuronal Ceroid Lipofuscinosis with Marked Intrafamilial Variability. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 2271. <https://doi.org/10.3390/ijms23042271>.

## 2.6 Manipulation, préparation et conservation des équipements indispensables

Le kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** est conçu pour extraire l'ARN total à partir de sang prélevé dans un tube *S-Monovette® RNA Exact* de Sarstedt.

Le sang doit être prélevé dans le tube *S-Monovette® RNA Exact* de Sarstedt conformément au manuel d'instructions du tube *S-Monovette® RNA Exact*. Les conditions de transport et de conservation recommandées du tube *S-Monovette® RNA Exact* s'appliquent également après le prélèvement sanguin. L'efficacité de la stabilisation de l'ARN dans les tubes *S-Monovette® RNA Exact* est validée pendant 5 jours à 22 °C et 14 jours à 8 °C. Pour une conservation à long terme, la congélation à une température inférieure à -40 °C est possible mais une température de conservation à long terme à -80 °C est recommandée.

Pour plus de détails, consulter : <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovette/produkt/01.2048.001/>

Porter des gants à tout moment pendant la préparation. Changer fréquemment de gants.

## 2.7 Procédures d'élution

Il est possible d'ajuster le volume d'élution de 60 µL (volume d'élution standard) et de passer à 40 µL, ce qui entraîne une concentration d'ARN légèrement plus élevée.

L'ARN élué doit être immédiatement placé et conservé sur de la glace pour une stabilité optimale et pour empêcher les RNases omniprésentes (matériel de laboratoire, doigts, poussière) de dégrader l'ARN. Pour la conservation à court terme, congeler à -20 °C ; pour la conservation à long terme, congeler à -70 °C ou à une température inférieure.

### 3 Conditions de conservation et préparation des solutions de travail

**Attention** : Les tampons RB2 et MDB contiennent des sels chaotropiques. Porter des gants et des lunettes de protection.

**ATTENTION** : Les tampons RB2 et MDB contiennent des sels de guanidinium qui peuvent former des composés très réactifs en présence d'eau de Javel (hypochlorite de sodium). Ne PAS verser d'eau de Javel ni de solutions acides directement dans les déchets issus de la préparation des échantillons.

**Attention :**

- À réception, vérifier l'état des différents composants du kit. Si les flacons de tampon ou les sachets blister sont endommagés, contacter l'assistance technique et le service client de MACHEREY-NAGEL, ou votre revendeur habituel.
- Ne pas utiliser les composants du kit s'ils sont endommagés.
- La rDNase lyophilisée est expédiée à température ambiante dans le kit. Conserver la rDNase lyophilisée (exempte de RNase) à 4 °C à l'arrivée (stable jusqu'à : voir la mention sur l'emballage).
- Tous les autres composants du kit doivent être conservés à une température comprise entre 15 et 25 °C et sont stables jusqu'à : voir la mention sur l'emballage. La conservation à des températures inférieures peut provoquer la précipitation de sels.
- Les colonnes **NucleoSpin® RNA Blood** peuvent être utilisées jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage du kit.
- Après la première utilisation, conserver la protéinase K liquide à 4 °C ou à -20 °C.
- Vérifier que de l'éthanol à 96–100 % est disponible comme solution supplémentaire pour préparer le tampon de lavage RB3.

Avant de débiter un quelconque mode opératoire **NucleoSpin® Dx RNA Blood**, préparer les éléments suivants :

- **rDNase (sans RNase)** : Ajouter le volume indiqué de tampon de réaction pour la rDNase (voir tableau ci-dessous) au flacon de rDNase et laisser incuber pendant 1 min à température ambiante. Agiter doucement les flacons pour dissoudre complètement la rDNase. Veiller à ne pas mélanger énergiquement la rDNase car celle-ci est sensible à l'agitation mécanique. Répartir en aliquotes et conserver à -20 °C. La solution de travail congelée est stable pendant 6 mois. Ne pas congeler/décongeler les aliquotes plus de trois fois. (Ouvrir le flacon avec précaution car des particules du lyophilisat peuvent être fixées sur le couvercle.)
- **Tampon de lavage RB3** : Ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96–100 % (voir tableau ci-dessous) au concentré de tampon RB3. Indiquer sur l'étiquette du flacon que de l'éthanol a été ajouté. Conserver le tampon de lavage RB3 entre 15 et 25 °C jusqu'à un an.

NucleoSpin® Dx RNA Blood	
<b>REF</b>	<b>50 préparations 740201.50</b>
Concentré de tampon de lavage RB3	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol

**NucleoSpin® Dx RNA Blood**

rDNase, sans RNase (lyophilisée)

2 flacons (taille D)  
Ajouter 2,5 mL de tampon de réaction pour rDNase  
dans chaque flacon

## 4 Consignes de sécurité

Lors de l'utilisation du kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood**, porter des vêtements de protection appropriés (p. ex. : blouse de laboratoire, gants à usage unique et lunettes de sécurité). Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) disponibles en ligne sur <http://www.mn-net.com/msds>.



Les déchets produits lors de l'utilisation du kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** n'ont pas été testés pour vérifier la présence de résidus de matières infectieuses. Une contamination des déchets liquides par des matières infectieuses est fortement improbable en raison de l'action puissante de dénaturation exercée par le réactif de stabilisation dans le tube *S-Monovette® RNA Exact* et du traitement par la protéinase K, mais elle ne peut être totalement exclue. Les déchets liquides doivent donc être considérés comme infectieux et ils doivent être manipulés et éliminés conformément aux règles de sécurité en vigueur localement.

### 4.1 Élimination

Éliminer les matériaux dangereux, infectieux ou contaminés par des agents biologiques d'une manière sûre et acceptable et conformément à toutes les exigences locales et réglementaires.

## 5 Extraction d'ARN à partir d'un tube *S-Monovette*® RNA Exact de SARSTEDT à l'aide du kit NucleoSpin® Dx RNA Blood

La procédure suivante décrit les instructions pour un seul échantillon de sang. Il est cependant possible de traiter plusieurs échantillons simultanément ; le nombre dépend de la capacité de la microcentrifugeuse utilisée.

### **Avant de commencer la procédure :**

- Vérifier que le tampon de lavage RB3 a été préparé conformément aux instructions de la section 3.
- Vérifier que la rDNase a été préparée conformément aux instructions de la section 3.
- L'intégralité de la procédure doit être effectuée à température ambiante (15 à 25 °C).
- En règle générale, ne pas mélanger des réactifs et des colonnes de kits ou de lots différents.

## 5.1 Mode opératoire résumé

En complément du mode opératoire résumé : Lire attentivement le mode opératoire détaillé (section 5.2) avant de commencer la procédure.

---

<b>Lyse sanguine</b>	<b>1</b>	Prendre le tube <i>S-Monovette® RNA Exact</i> contenant le sang
	<b>2</b>	Transférer 1,2 mL de solution dans un tube de 2 mL.
	<b>3</b>	10 µL de protéinase K
	<b>4</b>	Température ambiante pendant 15 min (en agitant)
	<b>5</b>	Centrifugation courte pour nettoyer le couvercle

---

<b>Fixation de l'ARN/ADN</b>	<b>6</b>	Charger 600 µL de lysat sur la colonne
	<b>7</b>	11 000 x g, 30 s
	<b>8</b>	Charger le lysat restant (~600 µL)
	<b>9</b>	11 000 x g, 30 s

---

<b>Dessaler la membrane en silice</b>	<b>10</b>	350 µL de tampon MDB
	<b>11</b>	11 000 x g, 30 s

---

<b>Digestion de l'ADN</b>	<b>12</b>	95 µL de rDNase
	<b>13</b>	Température ambiante pendant 15 min

---

<b>Lavage de la membrane en silice</b>	<b>14</b>	200 µL de tampon RB2
	<b>15</b>	11 000 x g, 30 s
	<b>16</b>	600 µL de tampon RB3
	<b>17</b>	11 000 x g, 30 s
	<b>18</b>	250 µL de tampon RB3
	<b>19</b>	11 000 x g, 2 min

---

<b>Éluéon de l'ARN</b>	<b>20</b>	Placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (1,5 mL)
	<b>21</b>	60 µL de H <sub>2</sub> O sans RNase
	<b>22</b>	11 000 x g, 30 s

---

---

## 5.2 Procédure détaillée

---

- 1 Prendre le tube *S-Monovette® RNA Exact* de SARSTEDT (contenant environ 2,4 mL de sang dans 7,3 mL de solution stabilisante).
  - 2 **Prélever 1,2 mL** de solution (sang total prélevé dans un tube *S-Monovette® RNA Exact*) dans le tube *S-Monovette® RNA Exact* et transférer dans un tube de lyse (tube de 2 mL avec couvercle, fourni).
  - 3 Ajouter **10 µL de protéinase K liquide**.
  - 4 Incuber **15 min à température ambiante** en agitant vigoureusement le tube. Il est également possible de vortexer vigoureusement pendant 30 s avant d'incuber sans agitation.
  - 5 Centrifugation courte pour nettoyer le couvercle.
  - 6 Appliquer **600 µL** de lysat sur la colonne **NucleoSpin® RNA Blood** placée dans un tube de prélèvement (fourni). Il est possible que le lysat commence à s'écouler à travers la colonne ; ceci n'est pas un problème.  
*Note : Ne pas pipeter plus de 650 µL dans la colonne à centrifuger, sous peine de débordement ! Éviter la formation de mousse et d'aérosols. Éviter de mouiller le bord de la colonne.*
  - 7 Centrifuger pendant **30 s à 11 000 x g**.  
Éliminer le tube de prélèvement et le liquide qu'il contient. Placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (2 mL ; fourni).
  - 8 **Appliquer le lysat restant** (environ 600 µL) sur la minicolonne NucleoSpin® RNA Blood.
  - 9 Centrifuger pendant **30 s à 11 000 x g**.  
Éliminer le tube de prélèvement et le liquide qu'il contient. Placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (2 mL ; fourni).
  - 10 Ajouter **350 µL de tampon MDB** (tampon de dessalage de la membrane) sur la colonne.
  - 11 Centrifuger pendant **30 s à 11 000 x g**.  
*Note : Après centrifugation, la colonne peut rester dans le tube de prélèvement (avec le liquide qu'il contient). Le liquide excédentaire peut être légèrement brun, et peut demeurer dans le tube sans que cela ne perturbe la digestion de l'ADN.*
  - 12 Ajouter **95 µL de rDNase** sur la colonne.
  - 13 Incuber à **température ambiante** pendant **15 min**.  
*Note : La centrifugation après incubation n'est pas nécessaire.*
  - 14 Ajouter **200 µL de tampon RB2** dans la colonne NucleoSpin® Dx RNA Blood.  
*Note : Le tampon RB2 désactive la rDNase.*
-

- 15** Centrifuger pendant **30 s** à **11 000 x g**.  
Éliminer le tube de prélèvement et le liquide qu'il contient, et placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (2 mL ; fourni).
- 
- 16** Ajouter **600 µL de tampon RB3** dans la colonne NucleoSpin® RNA Blood.  
Note : Vérifier que le tampon résiduel des étapes précédentes est rincé à l'aide du tampon RB3, en particulier si le lysat a été en contact avec le bord intérieur de la colonne pendant le dépôt du lysat sur la colonne. Pour un lavage efficace du bord intérieur, rincer à l'aide de tampon RB3.
- 
- 17** Centrifuger pendant **30 s** à **11 000 x g**.  
Jeter le liquide excédentaire et placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (2 mL ; fourni).
- 
- 18** Ajouter **250 µL de tampon RB3** dans la colonne NucleoSpin® RNA Blood.
- 
- 19** Centrifuger pendant **2 min** à **11 000 x g**.  
Au cours de cette étape, l'éthanol est éliminé de la colonne.  
*Si, pour une raison quelconque, le niveau de liquide dans le tube de prélèvement a atteint la colonne NucleoSpin® RNA Blood après centrifugation, jeter le liquide et centrifuger à nouveau.*
- 
- 20** Placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement sans nucléase (1,5 mL, fourni) et éliminer le tube de prélèvement ainsi que le liquide de l'étape précédente.
- 
- 21** Ajouter **60 µL de H<sub>2</sub>O sans RNase** (fourni) sur la colonne.  
Note : L'élué peut aussi être effectuée avec 40 µL.
- 
- 22** Centrifuger pendant **30 s** à **11 000 x g**.  
L'ARN est élué dans le tube de prélèvement.
-

## 6 Annexe

### 6.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Cause possible et suggestions
L'ARN est dégradé / aucun ARN n'est obtenu	<p><i>Contamination par la RNase</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Créer un environnement de travail sans RNase. Porter des gants pendant toutes les étapes de la procédure. Changer fréquemment de gants. Il est recommandé d'utiliser des tubes stériles et jetables en polypropylène. Conserver les tubes fermés autant que possible pendant la préparation. La verrerie doit être passée au four pendant au moins 2 heures à 250 °C avant utilisation.</li> </ul>
Faible qualité ou rendement de l'ARN	<p><i>Les réactifs ne sont pas utilisés ou conservés correctement.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Les réactifs ne sont pas conservés correctement. Ajouter le volume d'éthanol indiqué au concentré de tampon RB3 et mélanger. Reconstituer et conserver la rDNase lyophilisée conformément aux instructions de la section 3.</li> <li>L'échantillon et les réactifs n'ont pas été complètement mélangés. Toujours vortexer vigoureusement après chaque ajout de réactif.</li> </ul> <p><i>Conservation du kit</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Conserver la rDNase lyophilisée/reconstituée conformément aux instructions de la section 3.</li> <li>Conserver les autres composants du kit à température ambiante. La conservation à basse température peut entraîner la précipitation de sels.</li> <li>Conserver les flacons bien fermés afin d'éviter toute évaporation ou contamination.</li> </ul> <p><i>La force ionique et le pH influencent l'absorption <math>A_{260}</math> ainsi que le rapport <math>A_{260}/A_{280}</math></i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Pour mesurer l'absorption de l'ARN extrait, utiliser 5 mm de tampon Tris de pH 8,5 comme diluant. Voir aussi : <ul style="list-style-type: none"> <li>-Manchester, K L. 1995. Value of <math>A_{260}/A_{280}</math> ratios for measurement of purity of nucleic acids. <i>Biotechniques</i> 19, 208–209.</li> <li>-Wilfinger, W W, Mackey, K and Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. <i>Biotechniques</i> 22, 474–481.</li> </ul> </li> </ul>

Problème	Cause possible et suggestions
Colonne NucleoSpin® obstruée / faible qualité ou rendement de l'ARN	<p data-bbox="295 209 501 228"><i>Matériau échantillonné</i></p> <ul data-bbox="295 244 978 368" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="295 244 978 368">• Mauvaise qualité de l'échantillon. S'assurer que le sang est prélevé dans un tube <i>S-Monovette® RNA Exact</i> de SARSTEDT conformément aux instructions d'utilisation. Veiller à mélanger le sang à la solution de stabilisation présente dans le tube <i>S-Monovette® RNA Exact</i> juste après le prélèvement, conformément aux instructions d'utilisation.</li> </ul> <p data-bbox="295 384 636 403"><i>Conditions de lyse/liaison inadaptées</i></p> <ul data-bbox="295 419 978 491" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="295 419 978 491">• Veiller à agiter pendant l'incubation de la lyse selon l'une des deux options décrites à la section 5.2.4. – il est important pour la procédure de bien agiter.</li> </ul>
	Contamination de l'ARN par l'ADN génomique

Problème	Cause possible et suggestions
----------	-------------------------------

Performance sous-optimale de l'ARN dans les expériences en aval	<i>Contamination par l'éthanol ou un sel</i>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ne pas laisser le liquide entrer en contact avec la sortie de la colonne après le deuxième lavage au tampon RB3. Veiller à centrifuger à la vitesse correspondante pendant la durée indiquée afin d'éliminer complètement le tampon éthanol RB3.</li><li>• Vérifier si le tampon RB3 a été équilibré à température ambiante avant utilisation. Le lavage à basse température réduit l'efficacité de l'élimination des sels par le tampon RB3.</li></ul>
	<i>Conserver correctement l'ARN extrait</i>

- L'ARN élué doit toujours être conservé sur de la glace pour une stabilité optimale car les RNases omniprésentes à l'état de traces contaminantes (matériel de laboratoire, doigts, poussière) dégradent l'ARN. Congeler à -20 °C pour une conservation à court terme, et à -70 °C pour la conservation à long terme.

Contact : MACHEREY-NAGEL Allemagne

Tél. : +49 (0) 24 21 969 333

e-mail : support@mn-net.com

## 6.2 Exigence de notification

Veillez noter que le fabricant et l'autorité compétente de l'État membre européen doivent être avisés immédiatement de tout incident sérieux en rapport avec le produit. Agences en charge de la matériovigilance en Europe : [https://ec.europa.eu/health/md\\_sector/contact\\_en](https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_en)

## 6.3 Bibliographie générale

Ceylan A *et al.* (2022) : Evaluation of mRNA Expression Levels of IL-10, IL-12, TGF- $\beta$ , FOXP3, IFN in Multiple Sclerosis Patients. Eastern Anatolian Journal of Science Volume VIII, Issue I, 2022, 9–14.

Genre F *et al.* (2020) : Omentin : a biomarker of cardiovascular risk in individuals with axial spondyloarthritis. Scientific Reports 10 :9636, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66816-x>

Jennings LJ (2022) : Normalization of NPM1 mutant transcript to the wild-type transcript. eJHaem. 2022 ;3 :1343–1345.

Pulito-Cueto, V. *et al.* (2022) : Angiogenic T Cells : Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Interstitial Lung Disease in Autoimmune Diseases?. Biomed-icines 2022, 10, 851. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040851>.

Shimizu T *et al.* (2022) : Depletion of R270C Mutant p53 in Osteosarcoma Attenuates Cell Growth but Does Not Prevent Invasion and Metastasis In Vivo. Cells. 2022, 11, 3614. <https://doi.org/10.3390/cells11223614>.

Van der Sijde (2020) : RNA from stabilized whole blood enables more comprehensive immune gene expression profiling compared to RNA from peripheral blood mononuclear cells. PLoS ONE 15(6) : e0235413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235413>

Yamagata H *et al.* (2023) : Interferon signaling and hypercytokinemia-related gene expression in the blood of antidepressant non-responders. Heliyon 9 (2023) e13059.











Yuksel F *et al.* (2023) : The phenotypic spectrum of pathogenic ATP1A1 variants expands : the novel p.P600R substitution causes demyelinating Charcot–Marie–Tooth disease. *Journal of Neurology*, <https://doi.org/10.1007/s00415-023-11581-w>

## 6.4 Références

Produit	REF	Quantité
<b>Kits marqués CE-IVD</b>		
NucleoSpin® Dx RNA Blood	740201.50	50
NucleoSpin® Dx Blood	740899.50 / .250	50 / 250
NucleoSpin® Dx Virus	740895.50	50
NucleoSpin® Dx Pathogen	744215.4	4 × 96
<b>Kits destinés à la recherche</b>		
NucleoSpin® RNA Blood	740200,10 / 50	10 / 50
NucleoSpin® RNA Blood Midi	740210.20	20
NucleoSpin® 8 RNA Blood	740220 / .5	12 × 8 / 60 × 8
NucleoSpin® 96 RNA Blood	740225.2 / .4	2 × 96 / 4 × 96

Pour des informations plus détaillées sur les produits, rendez-vous sur [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com).

## 6.5 Explication des pictogrammes

 REF	Référence		Quantité suffisante pour < n > tests
 LOT	Identification du lot		Limites de température autorisées pour le stockage
	Fabricant		Utiliser avant
 IVD	Produits de diagnostic <i>in vitro</i>		Attention : pour plus d'informations, se reporter au mode d'emploi.
	Consulter le mode d'emploi		Ne pas réutiliser

## 6.6 Limites d'utilisation du produit et garantie

Les composants du kit **NucleoSpin® Dx RNA Blood** sont prévus, développés, conçus et vendus UNIQUEMENT À DES FINS DE RECHERCHE, à l'exception, toutefois, de toute autre fonction du produit qui est expressément décrite dans les brochures originales des produits MACHEREY-NAGEL.

Les produits MACHEREY-NAGEL sont destinés à une utilisation GÉNÉRALE EN LABORATOIRE UNIQUEMENT ! Les produits MACHEREY-NAGEL sont EXCLUSIVEMENT destinés à un PERSONNEL QUALIFIÉ. Lorsqu'ils manipulent des produits MACHEREY-NAGEL, les utilisateurs doivent toujours porter des VÊTEMENTS DE PROTECTION adéquats. Pour des informations détaillées, se référer à la fiche de données de sécurité correspondant au produit. Les produits MACHEREY-NAGEL doivent être utilisés exclusivement dans un ENVIRONNEMENT DE TEST ADÉQUAT. MACHEREY-NAGEL décline toute responsabilité concernant les dommages résultant d'une mauvaise application de nos produits dans d'autres domaines d'application. L'application sur le corps humain est STRICTEMENT INTERDITE. L'utilisateur concerné est responsable de tous les dommages résultant d'une telle application.

Les produits de purification d'ADN/ARN/PROTÉINES de MACHEREY-NAGEL conviennent UNIQUEMENT à un USAGE *IN VITRO*.

SEULS les produits MACHEREY-NAGEL portant la mention « IVD » peuvent également être utilisés pour le diagnostic *IN VITRO*. Lire avec attention l'emballage du produit. La mention « IVD » doit figurer expressément sur l'emballage des produits de diagnostic *IN VITRO*.

EN L'ABSENCE DE MENTION « IVD », LE PRODUIT NE PEUT PAS ÊTRE UTILISÉ POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

TOUT AUTRE PRODUIT NE PORTANT PAS LA MENTION « IVD » N'EST PAS ADAPTÉ À UN USAGE CLINIQUE (Y COMPRIS À UN USAGE DIAGNOSTIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET/OU PRONOSTIQUE).

Aucune revendication ou déclaration ne peut être utilisée pour identifier un organisme ou un usage clinique spécifique (y compris pour le diagnostic, le pronostic, le traitement ou les prélèvements sanguins). Il incombe plutôt à l'utilisateur ou – en cas de revente des produits – au revendeur de contrôler et de veiller à ce que les produits de purification d'ADN/ARN/protéines de MACHEREY-NAGEL soient utilisés pour une application bien définie et spécifique.

MACHEREY-NAGEL est responsable uniquement des spécifications des produits et de la gamme de performances des produits MN conformément aux spécifications du contrôle de qualité interne, de la documentation des produits et des supports marketing.

Ce produit MACHEREY-NAGEL est livré avec une documentation précisant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La seule obligation de MACHEREY-NAGEL et le seul recours du client se limitent au remplacement à titre gratuit des produits qui n'offriraient pas les performances garanties. Il convient également de se référer aux conditions générales de MACHEREY-NAGEL, qui sont imprimées sur la liste tarifaire, et dont un exemplaire sera remis sur simple demande.

MACHEREY-NAGEL ne saurait être tenue pour responsable des dommages ou des défauts se produisant pendant le transport et la manipulation (hors assurance expédition au bénéfice du client), ou résultant d'un accident ou d'une utilisation impropre ou anormale du présent produit ; ni des défauts des produits ou des composants non fabriqués par MACHEREY-NAGEL ; ni des dommages résultant desdits produits et composants issus de fabricants autres que MACHEREY-NAGEL.

MACHEREY-NAGEL n'accorde aucune autre garantie d'aucune sorte, et DÉCLINE ET EXCLUT SPÉCIFIQUEMENT TOUTE AUTRE GARANTIE DE TOUTE SORTE OU NATURE QUE CE SOIT, DIRECTEMENT OU INDIRECTEMENT, EXPLICITE OU IMPLICITE, Y COMPRIS CONCERNANT LE CARACTÈRE APPROPRIÉ, LA REPRODUCTIBILITÉ, DURABILITÉ, L'ADAPTATION À UN BUT OU UN USAGE PARTICULIER, LA QUALITÉ MARCHANDE, L'ÉTAT OU TOUT AUTRE SUJET, S'AGISSANT DES PRODUITS MACHEREY-NAGEL.

MACHEREY-NAGEL ne saurait en aucun cas être tenue pour responsable en cas de plaintes pour tout autre dommage, qu'il soit direct, indirect, fortuit, compensatoire, prévisible, consécutif ou particulier (y compris la perte d'utilisation, de revenus ou de profits), fondées sur la garantie, la responsabilité contractuelle, la responsabilité délictuelle civile (y compris la négligence) ou la responsabilité stricte découlant de la vente ou de la non-conformité d'un produit MACHEREY-NAGEL aux spécifications énoncées. La garantie est exclusive et MACHEREY-NAGEL n'accorde aucune autre garantie explicite ou implicite.

La garantie fournie dans le présent document et les données, spécifications et descriptions de ce produit MACHEREY-NAGEL figurant dans les catalogues publiés et la documentation sur le produit de MACHEREY-NAGEL constituent les seuls engagements de MACHEREY-NAGEL concernant le produit et la garantie. Aucun autre engagement ou déclaration, écrit ou oral, par des employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL n'est autorisé, à l'exception des déclarations écrites signées par un agent dûment agréé par MACHEREY-NAGEL ; le client ne doit pas se fier à de tels engagements ou déclarations, qui ne font pas partie du contrat de vente ou de la présente garantie.

Les allégations relatives au produit sont susceptibles d'être modifiées. Nous vous invitons par conséquent à contacter notre service d'assistance technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur habituel, pour obtenir des informations scientifiques à caractère général. Les applications mentionnées dans la documentation fournie par MACHEREY-NAGEL le sont uniquement à titre informatif. MACHEREY-NAGEL ne garantit pas que toutes les applications ont été testées dans les laboratoires de MACHEREY-NAGEL, avec des produits MACHEREY-NAGEL. MACHEREY-NAGEL ne garantit en aucun cas l'exactitude de ces applications.

Dernière mise à jour : 09/2023, Rév. 01

Motif de la révision : Nouveau document.

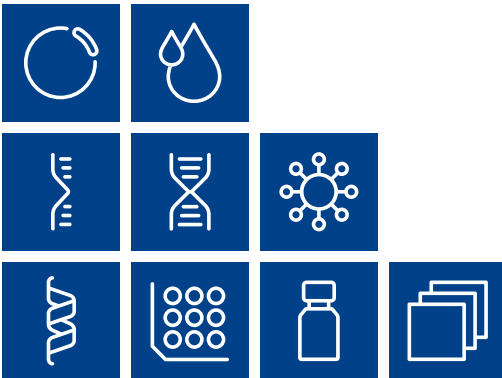
---

Marques commerciales :

NucleoSpin<sup>®</sup> est une marque commerciale de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG.

S-Monovette<sup>®</sup> est une marque déposée de Sarstedt.

Tous les noms et toutes les appellations employés peuvent être des marques, des marques commerciales ou des marques déposées appartenant à leur propriétaire respectif – y compris en l'absence d'appellation particulière. Les produits et les marques cités le sont uniquement à titre informatif (c'est-à-dire sans volonté de nuire à la marque ou à la marque déposée, ni intention de la recommander ou de l'évaluer). Nous n'accordons aucune garantie de sélection, d'efficacité ou de fonctionnement de ces produits ou services.



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

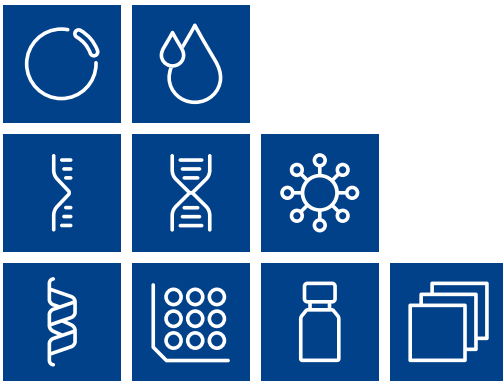
Viral RNA and DNA

Protein

High throughput

Accessories

Auxiliary tools



A0xxxx065xx

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

**MACHEREY-NAGEL**



 <b>TÜV Rheinland</b> CERTIFIED	Management System EN ISO 13485:2016 ISO 9001:2015	
	<a href="http://www.tuv.com">www.tuv.com</a> ID 0000056401	

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germany

DE +49 24 21 969-0 [info@mn-net.com](mailto:info@mn-net.com)

CH +41 62 388 55 00 [sales-ch@mn-net.com](mailto:sales-ch@mn-net.com)

FR +33 388 68 22 68 [sales-fr@mn-net.com](mailto:sales-fr@mn-net.com)

US +1 888 321 62 24 [sales-us@mn-net.com](mailto:sales-us@mn-net.com)