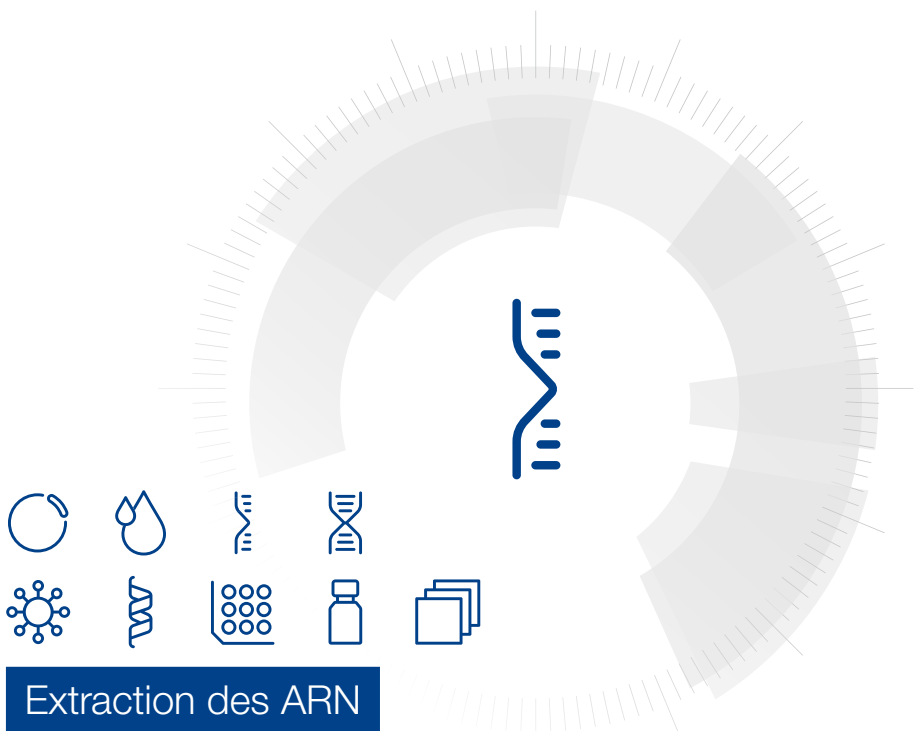


MACHEREY-NAGEL

# Manuel d'utilisation



## Extraction des ARN

- NucleoSpin® RNA
- NucleoSpin® RNA Midi

November 2023 / Rev. 22

# Extraction d'ARN































## Résumé du protocole (Rev. 22)

Mini

Midi

### NucleoSpin® RNA

### NucleoSpin® RNA Midi

1 Préparation de l'échantillon		30 mg		100 mg
2 Lyse des cellules		350 µL RA1 3.5 µL µL β-mercaptoethanol Mélanger		1.8 mL RA1 18 µL µL β-mercaptoethanol Mélanger
3 Filtration du lysat	 	11,000 x g, 1 min	 	4,500 x g, 10 min
4 Ajustement des conditions de fixation des ARN		350 µL éthanol 70 % Mélanger		1,8 mL éthanol 70 % Mélanger
5 Fixation de l'ARN	 	Charger le lysat 11,000 x g, 30 s	 	Charger le lysat 4,500 x g, 3 min
6 Dessalage de la membrane de silice	 	350 µL MDB 11,000 x g, 1 min	 	2,2 mL MDB 4,500 x g, 3 min
7 Digestion de l'ADN		95 µL de mélange réactionnel de rDNase TA, 15 min		250 µL de mélange réactionnel de rDNase TA, 15 min
8 Lavage et séchage de la membrane de silice	 	1 <sup>er</sup> lavage 200 µL RAW2 2 <sup>ème</sup> lavage 600 µL RA3 3 <sup>ème</sup> lavage 250 µL RA3 1 <sup>er</sup> et 2 <sup>ème</sup>  11,000 x g, 30 s 3 <sup>ème</sup>  11,000 x g, 2 min	 	1 <sup>er</sup> lavage 2.6 mL RAW2 2 <sup>ème</sup> lavage 2.6 mL RA3 3 <sup>ème</sup> lavage 2.6 mL RA3 1 <sup>er</sup> et 2 <sup>ème</sup>  4,500 x g, 3 min 3 <sup>ème</sup>  4,500 x g, 5 min
9 Elution d'ARN purifié	 	60 µL RNase-free H <sub>2</sub> O 11,000 x g, 1 min	 	500 µL RNase-free H <sub>2</sub> O TA, 2 min 4,500 x g, 3 min

## Sommaire

1	Composition du kit	4
1.1	Composants	4
1.2	Réactifs, consommables et équipements complémentaires requis	6
1.3	À propos de ce manuel d'utilisation	6
2	Description du produit	7
2.1	Le principe de base	7
2.2	Caractéristiques du kit	8
2.3	Manipulation, préparation et stockage des échantillons	12
2.4	Procédures d'élution	14
3	Conditions de stockage et préparation des solutions de travail	15
4	Instructions de sécurité	17
4.1	Élimination	17
5	Protocoles NucleoSpin® RNA	18
5.1	Extraction d'ARN à partir de cellules cultivées et de tissus	18
5.2	Préparation d'ARN à partir de 10 <sup>9</sup> ou 30 mg de cellules bactériennes	21
5.3	Préparation d'ARN à partir de 5 × 10 <sup>7</sup> ou 30 mg de cellules de levure	23
5.4	Préparation d'ARN à partir de tissus inclus en paraffine*	25
5.5	Purification de l'ARN de mélanges réactionnels	26
5.6	Extraction d'ARN à partir d'insectes	27
6	Protocoles NucleoSpin® RNA Midi	28
6.1	Extraction d'ARN à partir de cellules cultivées et de tissus	28
6.2	Préparation d'ARN à partir d'un maximum de 5 × 10 <sup>9</sup> cellules bactériennes	32
6.3	Préparation d'ARN à partir d'un maximum de 3 × 10 <sup>8</sup> cellules de levure	34
6.4	Purification de l'ARN de mélanges réactionnels	37
7	Protocoles NucleoSpin® RNA / NucleoSpin® RNA Midi	38
7.1	Préparation d'ARN à partir d'échantillons traités avec du NucleoProtect® RNA ou du RNAlater®	38
7.2	Digestion rDNase en solution	38
8	Annexes	40
8.1	Guide de résolution des problèmes	40
8.2	Informations pour la commande	43
8.3	Restrictions d'utilisation / garantie	44
8.4	Versions linguistiques et prédominance	44

# 1 Composition du kit

## 1.1 Composants

REF	NucleoSpin® RNA		
	10 préps 740955.10	50 préps 740955.50	250 préps. 740955.250
Tampon de lyse RA1	10 mL	25 mL	125 mL
Tampon de lavage RAW2	13 mL	13 mL	80 mL
Tampon de lavage RA3 (concentré)*	6 mL	12 mL	3 × 25 mL
Tampon de dessalage de la membrane MDB	10 mL	25 mL	125 mL
Tampon de réaction pour la rDNase	7 mL	7 mL	30 mL
rDNase, RNase-free (lyophilisée)*	1 flacon (taille D)	1 flacon (taille F)	5 flacons (taille F)
H <sub>2</sub> O RNase-free	13 mL	13 mL	60 mL
NucleoSpin® Filters (bagues violette)	10	50	250
Colonnes NucleoSpin® RNA (bagues bleues claires - plus tubes collecteurs)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	30	150	750
Tubes d'élution (1,5 mL)	10	50	250
Manuel d'utilisation	1	1	1

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

**Composants suite**

<b>NucleoSpin® RNA Midi</b>	
<b>REF</b>	<b>20 préps. 740962.20</b>
Tampon de lyse RA1	125 mL
Tampon de lavage RAW2	80 mL
Tampon de lavage RA3 (concentré)*	25 mL
Tampon de dessalage des membranes MDB	50 mL
Tampon de réaction pour la rDNase	7 mL
rDNase, RNase-free (lyophilisée)*	1 flacon (taille D)
H <sub>2</sub> O RNase-free	13 mL
NucleoSpin® Filters Midi (plus tubes collecteurs)	20
Colonnes NucleoSpin® RNA Midi (plus tubes collecteurs)	20
Tubes collecteurs (15 mL)	20
Manuel d'utilisation	1

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

## 1.2 Réactifs, consommables et équipements complémentaires requis

### Réactifs

- Éthanol à 96 – 100 % (pour préparer le tampon de lavage RA3)
- Éthanol à 70 % (pour ajuster les conditions de fixation de l'ARN)
- Agent réducteur [ $\beta$ -mercaptoéthanol, DTT (dithiothreitol) **ou** TCEP (BisTris (Bis-(2-hydroxyéthyl)-imino-tris(hydroxyméthyl)-méthane)] en complément du tampon de lyse RA1

### Consommables

- Tubes de microcentrifugation de 1,5 mL (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA) ou tubes de 15 mL (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Midi)
- Cônes stériles, RNases-free

### Equipements

- Pipettes manuelles
- NucleoSpin<sup>®</sup> RNA : centrifugeuse pour microtubes
- NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Midi : centrifugeuse pour tubes de 15 mL avec rotor pivotant et godets appropriés pouvant atteindre 4 000–4 500  $\times g$
- Équipement pour le broyage et l'homogénéisation de l'échantillon (voir paragraphe 2.3)
- Equipements de protection individuelle (par exemple, blouse de laboratoire, gants, lunettes)

## 1.3 À propos de ce manuel d'utilisation

Il est fortement recommandé de lire les protocoles détaillés de ce manuel d'utilisation si le kit **NucleoSpin<sup>®</sup> RNA** ou **NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Midi** est utilisé pour la première fois. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Celui-ci est conçu pour repérer aisément le déroulement de la procédure en rappelant la chronologie des différentes étapes.

Toute la littérature technique est disponible sur notre site [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com).

Merci de contacter notre support technique pour toute information concernant les changements éventuels entre cette version du manuel et les précédentes versions.

## 2 Description du produit

### 2.1 Le principe de base

Un des aspects les plus importants lors de l'extraction de l'ARN concerne la prévention de sa dégradation. Avec les méthodes **NucleoSpin® RNA**, les cellules sont lysées par incubation dans une solution contenant une forte concentration d'ions chaotropiques. Ce tampon de lyse inactive immédiatement les RNases – omniprésentes dans quasiment tous les échantillons biologiques – et crée les conditions favorables pour la fixation de l'ARN à la membrane de silice. L'ADN contaminant, également fixé à la membrane de silice, est éliminé par digestion au moyen d'une solution de rDNase directement appliquée sur la membrane de silice pendant la procédure (la rDNase RNase-Free est incluse dans le kit). De simples étapes de lavages avec deux tampons différents permettent d'éliminer les sels, les métabolites et autres composants cellulaires macromoléculaires. L'ARN purifié est finalement élué dans de l'H<sub>2</sub>O RNases-free (fournie dans le kit).

La préparation de l'ARN avec les kits de la gamme **NucleoSpin® RNA** peut être effectuée à TA. Cependant, une fois élué, l'éluat doit être traité avec précaution en raison de sa forte vulnérabilité vis-à-vis des RNases, souvent présentes sur le matériel, les traces de doigts et la poussière. Pour garantir la stabilité de l'ARN, conserver le congelé à -20 °C pour un stockage à court terme ou à -70 °C pour un stockage à long terme.

#### **Extraction simultanée d'ARN, de protéines et d'ADN (NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set\*, NucleoSpin® TriPrep\*)**

Le set de tampons 'NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set' (voir les informations de commande) est un kit permettant l'extraction d'ARN et d'ADN lorsqu'il est combiné avec les kits NucleoSpin® RNA, NucleoSpin® RNA XS, NucleoSpin® RNA Plant ou NucleoSpin® RNA/Protein.

Cette technologie brevetée permet l'éluion successive de l'ADN et de l'ARN à partir d'une colonne NucleoSpin® avec un tampon à faible teneur en sel et de l'eau, respectivement. L'ADN et l'ARN sont immédiatement prêts pour les applications en aval.

La combinaison du kit NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set avec le kit NucleoSpin® RNA/Protein permet d'isoler en parallèle l'ARN, l'ADN et les protéines à partir d'un seul échantillon sans le diviser.

Le kit NucleoSpin® TriPrep permet l'extraction d'ARN, d'ADN et des protéines à partir d'échantillons uniques non divisés.

## 2.2 Caractéristiques du kit

- Les kits **NucleoSpin® RNA** sont recommandés pour l'extraction d'ARN à partir de cellules et de tissus cultivés. Des protocoles supports pour la purification d'ARN à partir de mélanges réactionnels, de bactéries et de levures à l'aide du kit **NucleoSpin® RNA** sont également inclus. Les kits **NucleoSpin® RNA** permettent la purification d'ARN pur avec un ratio  $A_{260}/A_{280}$  généralement supérieur à 1,9 (mesuré dans le tampon TE, pH 7,5).
- Même des échantillons biologiques, parfois difficiles à traiter, produisent de l'ARN de haute qualité. Il s'agit par exemple de tissus de souris (foie, cerveau), de différentes lignées de cellules tumorales, de *Streptococcus* et d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- L'ARN purifié est prêt à être utilisé pour des applications telles que la transcriptase inverse-PCR (RT-PCR), l'extension d'amorces ou les essais de protection par la RNase.
- L'ARN purifié avec les kits NucleoSpin® RNA est d'une grande intégrité. L'indice RIN pour RNA Integrity Number de l'ARN purifié à partir d'échantillons frais de haute qualité (par exemple, des cellules eucaryotes ou du foie de souris frais) est généralement supérieur à 9,0. Toutefois, l'intégrité de l'ARN dépend fortement de la qualité de l'échantillon. L'intégrité de l'ARN a été examinée à l'aide de la méthode Agilent 2100 Bioanalyzer en association avec le test RNA 6000 Nano ou Pico.
- La contamination en ADN est considérablement réduite grâce à la digestion avec la rDNase directement appliquée sur la membrane de silice. Néanmoins, dans des applications très sensibles, il peut être possible de détecter des traces d'ADN. L'élimination de l'ADN lors de la digestion sur colonne **NucleoSpin® RNA** est testée avec la procédure suivante : un million de cellules HeLa sont soumises à l'extraction d'ARN conformément au protocole. L'éluat d'ARN est utilisé comme modèle pour la détection par PCR d'un fragment de 1 kb dans une réaction de 30 cycles. En général, aucun fragment PCR n'est obtenu si la DNase est appliquée, tandis qu'un fragment PCR intense peut être obtenu si la digestion à la DNase est omise. 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 PCR.

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

Paramètres	NucleoSpin® RNA	NucleoSpin® RNA Midi
Technologie	Technologie des membranes de silice	Technologie des membranes de silice
Utilisation	Réservé uniquement à usage de la recherche	Réservé uniquement à usage de la recherche
Format	Mini colonne à centrifuger	Midi colonne à centrifuger
Traitement	Manuel et centrifugation	Manuel et centrifugation
Echantillon	< 5 × 10 <sup>6</sup> cellules en culture, < 10 <sup>9</sup> cellules de bactéries, < 10 <sup>8</sup> cellules de levure, < 30 mg de tissus	< 5 × 10 <sup>7</sup> cellules en culture, < 10 <sup>10</sup> cellules de bactéries, < 3 × 10 <sup>8</sup> cellules de levure, < 200 mg de tissus
Taille du fragment	> 200 nt	> 200 nt
Rendement	14 µg à partir de 10 <sup>6</sup> cellules HeLa, 70 µg à partir de 10 <sup>9</sup> cellules de bactéries.	180 µg de 10 <sup>7</sup> cellules HeLa, 620 µg de 4 × 10 <sup>7</sup> cellules HeLa
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	1.9–2.1	1.9–2.1
RIN (RNA integrity number)	> 9	> 9
Volume d'éluat	40–120 µL	500 µL
Temps de préparation	30 min/6 préparations	80 min/4 préparations
Capacité de reliure	200 µg	700 µg

**NucleoSpin® RNA**

- Le protocole standard (paragraphe 5.1) permet de purifier jusqu'à 70 µg d'ARN par **colonne NucleoSpin® RNA** à partir de 5 × 10<sup>6</sup> cellules en culture ou de 30 mg de tissus (voir également le tableau 1). L'ARN purifié peut être utilisé comme matrice dans une réaction RT-PCR. En général, 1 à 10 % de l'éluat d'ARN préparé à partir de 1 × 10<sup>6</sup> cellules ou 10 mg de tissus suffit comme matrice pour la RT-PCR. Si possible, il convient de définir des amorces sur des exons qui encadrent un ou plusieurs intron(s) pour la RT-PCR.
- L'ARN préparé à partir de quantités élevées est généralement exempt d'ADN résiduel, bien que des traces infimes d'ADN puissent subsister dans la préparation si le matériel utilisé est riche en acide nucléique. Toutefois, si l'ARN purifié doit être utilisé comme matrice dans une réaction RT-PCR, nous recommandons d'utiliser des quantités plus

faibles d'échantillon (par exemple,  $1 \times 10^6$  cellules en culture ou 10 mg de tissus, ce qui donne environ 20  $\mu\text{g}$  d'ARN).

- Le kit peut être utilisé pour préparer de l'ARN à partir de différentes quantités d'échantillons. Pour des résultats optimaux, le volume de tampon de lyse RA1 (étape 1 du protocole) et d'éthanol (étape 3 du protocole) doit être adapté conformément au Tableau 2.

**Tableau 2 : Adaptation de la lyse**

Échantillon	Quantité	Volume de	
		Tampon de lyse RA1 (étape 2 du protocole)	Éthanol (étape 4 du protocole)
Cellules animales ou humaines en culture (par exemple, cellules HeLa)	$< 5 \times 10^6$	350 $\mu\text{L}$	350 $\mu\text{L}$
Tissu humain ou animal	$< 20$ mg	350 $\mu\text{L}$	350 $\mu\text{L}$
	20 mg – 30 mg*	600 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L}$
Tissu conservé dans du NucleoProtect® RNA ou RNAlater®.	$< 20$ mg	350 $\mu\text{L}$	350 $\mu\text{L}$
	20 mg – 30 mg*	600 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L}$
Échantillons réputés difficiles à lyser	$< 5 \times 10^7$ *	600 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L}$

Une étape de chargement supplémentaire est nécessaire si 600  $\mu\text{L}$  de tampon RA1 et d'éthanol sont utilisés (charger l'échantillon sur la colonne en deux étapes de centrifugation successives).

Selon le type d'échantillon, le rendement moyen est d'environ 5–70  $\mu\text{g}$  d'ARN (voir tableau 3). Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  est généralement supérieur à 1,9, ce qui indique la pureté de l'ARN.

\* Le volume de tampon de lyse RA1 inclus dans le kit n'est pas suffisant pour effectuer toutes les préparations avec 600  $\mu\text{L}$ . Si nécessaire, du tampon de lyse RA1 supplémentaire peut être commandé séparément (voir les informations de commande, chapitre 8.2).

**Tableau 3 : Aperçu des rendements moyens en ARN obtenus à l'aide du NucleoSpin® RNA**

Échantillon	Rendement moyen
$8 \times 10^4$ cellules HeLa	1,5 µg
$4 \times 10^5$ cellules HeLa	4 µg
$1 \times 10^6$ cellules HeLa	14 µg
$2 \times 10^6$ cellules HeLa	21 µg
$2,5 \times 10^6$ cellules HeLa	25 µg
$5 \times 10^6$ cellules HeLa	50 µg

**NucleoSpin® RNA Midi**

- Le kit peut être utilisé pour extraire de l'ARN à partir de différentes quantités d'échantillons. Pour des résultats optimaux, le volume de tampon de lyse RA1 (étape 1 du protocole) et d'éthanol (étape 3 du protocole) doit être adapté conformément au tableau 4 :

**Tableau 4 : Adaptation de la lyse**

Échantillon	Quantité	Volume de	
		Tampon de lyse RA1 (étape 1 du protocole)	Éthanol (étape 4 du protocole)
Cellules animales en culture (par exemple, cellules HeLa)	$5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$	1,8 mL	1,8 mL
	$2 \times 10^7 - 5 \times 10^7$	3,6 mL	3,6 mL
Tissu animal	30–100 mg	1,8 mL	1,8 mL
	100–200 mg	3,6 mL	3,6 mL
Bactéries	$1 \times 10^9 - 5 \times 10^9$	1,8 mL	1,8 mL
	$2 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$	3,6 mL	3,6 mL
Levure	$< 3 \times 10^8$	3,6 mL	3,6 mL

Une étape de chargement supplémentaire est nécessaire si 3,6 mL de tampon RA1 et d'éthanol sont utilisés. Si vous isolez l'ARN d'un certain type de tissu pour la première fois avec le kit NucleoSpin® RNA Midi, nous vous recommandons de commencer avec un maximum de 100 mg de tissu. En fonction de la nature du tissu, il est possible de traiter jusqu'à 200 mg. Ne pas utiliser plus de 200 mg de tissu pour éviter le colmatage de la colonne.

Selon le type d'échantillon, le rendement moyen est d'environ 70–400 µg d'ARN (voir tableau 5). Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  indiquant la pureté de l'ARN est généralement supérieur à 1,9.

**Tableau 5 :**  
**Aperçu des rendements moyens en ARN obtenus à l'aide de NucleoSpin® RNA Midi**

Échantillon	Rendement moyen
1 × 10 <sup>6</sup> cellules HeLa	20 µg
1 × 10 <sup>7</sup> cellules HeLa	160 µg
2 × 10 <sup>7</sup> cellules HeLa	330 µg
4 × 10 <sup>7</sup> cellules HeLa	620 µg
200 mg de foie de porc	450 µg
200 mg de foie de souris	320 µg

## 2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons

### Environnement de travail

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

### Stockage des échantillons et inhibition de la RNase

Les RNases peuvent dégrader rapidement l'ARN contenu dans les 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 l'échantillon fraîchement récolté pour une lyse immédiate et une extraction de l'ARN.
- Immerger et conserver les échantillons dans NucleoProtect® RNA ou dans des solutions de stabilisation similaires. Veiller à ce que l'échantillon soit complètement imprégné de la solution de stabilisation avant de le congeler. Retirer l'excès de solution de stabilisation de l'échantillon avant l'isolement de l'ARN conformément au manuel d'utilisation de la solution de stabilisation.
- Congeler rapidement l'échantillon dans de l'azote liquide immédiatement après la récolte et le conserver à -70 °C. Les échantillons congelés sont stables jusqu'à 6 mois. Un mortier et un pilon peuvent être utilisés pour pulvériser l'échantillon à l'état congelé. Veiller à ce que l'échantillon ne soit pas décongelé avant d'entrer en contact avec le tampon de lyse.
- Conserver les échantillons dans le tampon de lyse RA1 après rupture à -70 °C jusqu'à un an, à 4 °C jusqu'à 24 heures ou à température ambiante pendant quelques heures. Les échantillons congelés dans le tampon de lyse RA1 doivent être décongelés lentement avant de commencer l'isolement de l'ARN.

## Broyage et homogénéisation de l'échantillon

### • Cellules cultivées en suspension :

Récolter les cellules par centrifugation, éliminer le surnageant et ajouter immédiatement le tampon de lyse RA1 conformément à l'étape 2 du protocole standard (voir les paragraphes 5.1, 6.1).

### • Cultures de cellules adhérentes (lyse dans la boîte de culture) :

Aspirer complètement le milieu de culture. Ajouter immédiatement le tampon de lyse RA1 dans la boîte de culture. Éliminer complètement le milieu de culture afin de permettre une activité de lyse complète du tampon de lyse. Poursuivre la filtration du lysat (étape 3 du protocole standard).

### • Cultures de cellules adhérentes (lyse après trypsination) :

Aspirer le milieu de culture et laver les cellules une fois avec du PBS. Aspirer le PBS. Ajouter 0,1 – 0,3 % de trypsine dans du PBS et incuber pendant une durée appropriée pour détacher les cellules de la surface de la boîte. Après le détachement des cellules, ajouter du milieu, transférer les cellules dans un tube approprié (non fourni) et les culotter par centrifugation pendant 5 minutes à 300 × g. Éliminer le surnageant et poursuivre l'addition du tampon de lyse RA1 au culot cellulaire.

### • Tissus d'animaux :

Pour une préparation efficace de l'ARN, il est essentiel que tout l'ARN contenu dans l'échantillon soit libéré des cellules par broyage et que la viscosité de l'échantillon soit réduite par homogénéisation. La technique la plus couramment utilisée pour le broyage des tissus d'animaux est le broyage à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Réduire l'échantillon en poudre fine en présence d'azote liquide. Veiller à ce que l'échantillon ne décongèle pas pendant ou après le broyage ou la pesée et ajouter la poudre congelée à une aliquote appropriée de tampon RA1 contenant un agent réducteur (par exemple,  $\beta$ -mercaptoéthanol, DTT ou TCEP) et mélanger immédiatement. Le tissu fragmenté doit ensuite être homogénéisé à l'aide d'un NucleoSpin® Filter/Filter Midi (inclus dans le kit) ou en passant  $\geq 5$  fois à travers une aiguille de seringue de 0,9 mm. La décongélation des tissus non broyés doit se faire exclusivement en présence du tampon RA1 lors d'un broyage mécanique simultanée, par exemple, avec un broyeur à rotor-stator. Cela garantit que l'ARN n'est pas dégradé par les RNases avant le début de la préparation. Le rotor-stator broie et homogénéise simultanément l'échantillon par cisaillement mécanique de l'ADN en quelques secondes à quelques minutes (le temps d'homogénéisation dépend de l'échantillon). Veiller à ce que l'extrémité du rotor soit immergée afin d'éviter la formation d'une mousse excessive. Choisir un broyeur de taille appropriée (des rotors de 5 à 7 mm de diamètre peuvent être utilisés pour l'homogénéisation dans des tubes de microcentrifugeuse). Le broyage mécanique et l'homogénéisation dans le tampon RA1 (par exemple, avec un homogénéisateur à rotor-stator) sont également recommandées pour les échantillons de tissus stockés dans des solutions de stabilisation comme NucleoProtect® RNA ou RNAlater®.

### • Bactéries et levures :

Une lyse enzymatique ou mécanique est nécessaire dans la plupart des cas. Pour la lyse enzymatique, les échantillons doivent être incubés avec des solutions de lysozyme (bactéries) ou de lyticase/zymolase (levures) (voir les protocoles supports aux paragraphes 5.2 et 5.3). Ce traitement permet de digérer ou au moins d'affaiblir les parois cellulaires robustes de ces organismes, ce qui est essentiel pour une lyse cellulaire efficace par le tampon RA1. Pour les micro-organismes dont les parois cellulaires sont extrêmement résistantes - comme certaines souches bactériennes Gram-positives - il peut être nécessaire d'optimiser les conditions de traitement avec des enzymes lytiques ou les conditions de culture. Les cellules de bactéries et de levures peuvent également

être lysées mécaniquement par broyage avec des billes. Par conséquent, remettre en suspension le culot cellulaire dans le tampon de lyse RA1, transférer la solution dans un tube MN Bead Tubes Type B et broyer les échantillons par grâce aux billes (par exemple, en utilisant le support MN Bead Tube Holder sur un Vortex Genie® 2). Après la lyse, l'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un NucleoSpin® Filter ou par passage dans une aiguille-seringue.

## 2.4 Procédures d'élution

Il est possible d'adapter la méthode d'élution et le volume d'eau utilisé à l'application ultérieure qui nous intéresse. Outre la méthode standard décrite dans les protocoles individuels (taux de récupération d'environ 70–90 %), plusieurs modifications sont possibles.

- **Rendement élevé** : effectuer deux étapes d'élution avec le volume indiqué dans le protocole individuel. Environ 90 à 100 % de l'acide nucléique lié sera élué.
- **Rendement et concentration élevés** : éluer avec le volume d'élution standard et appliquer l'éluat une fois de plus sur la colonne pour une nouvelle élution.

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

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

**Attention :**

*Les tampons RA1, RAW2 et MDB contiennent du sel chaotropique. Porter des gants et des lunettes !*

*ATTENTION : Les tampons RA1, RAW2 et MDB contiennent des sels chaotropiques qui peuvent former des composés très réactifs lorsqu'ils sont combinés à de l'eau de Javel (hypochlorite de sodium). NE PAS ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation des échantillons.*

- Conserver la **rDNase lyophilisée (RNase-free)** à 4 °C dès son arrivée au laboratoire (stable jusqu'à : voir l'étiquette de l'emballage).
- Tous les autres composants du kit doivent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette de l'emballage. Le stockage à des températures inférieures peut entraîner la précipitation de sels.
- Vérifier que de l'éthanol à 70 % est disponible comme solution supplémentaire pour ajuster les conditions de fixation de l'ARN dans le lysat.
- Vérifier que l'agent réducteur (β-ME, DTT ou TCEP) est disponible.

Avant de commencer le protocole **NucleoSpin® RNA**, préparer les éléments suivants :

- **rDNase (RNase-free)** : Ajouter le volume d'H<sub>2</sub>O RNase-free indiqué (voir tableau ci-dessous) dans le flacon de rDNase lyophilisée et incubé pendant 1 minute à température ambiante. Agiter doucement le flacon pour dissoudre complètement la rDNase. Veiller à ne pas mélanger la rDNase vigoureusement, l'enzyme étant sensible à l'agitation mécanique. Distribuer en aliquotes et conserver à -20 °C. La solution de travail congelée est stable pendant au moins 6 mois. Ne pas congeler/décongeler les aliquotes plus de trois fois. (Faire attention lors de l'ouverture du flacon car certaines particules du lyophilisat peuvent être attachées au couvercle). Pour le stockage temporaire de la rDNase dissoute au cours d'une journée de travail, toujours la conserver sur la glace.

Dans certains cas, le flacon de rDNase peut sembler vide. Ceci est dû au fait que l'enzyme lyophilisée colle au septum. Pour éviter la perte de rDNase, veiller à recueillir la rDNase au fond du flacon avant de retirer le bouchon.

- **Tampon de lavage RA3** : ajouter le volume indiqué d'éthanol 96–100 % (voir le tableau de la page suivante) au tampon RA3 concentré. Marquer l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. Le tampon de lavage RA3 peut être conservé à température ambiante (15–25 °C) pendant au moins un an.

<b>NucleoSpin® RNA</b>			
<b>REF</b>	<b>10 préps 740955.10</b>	<b>50 préps 740955.50</b>	<b>250 préps. 740955.250</b>
Tampon de lavage RA3 (concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol	3 × 25 mL Ajouter 100 mL d'éthanol à chaque flacon
rDNase, RNase-free (lyophilisée)	1 flacon (taille D) Ajouter 120 µL de H <sub>2</sub> O RNase-free	1 flacon (taille F) Ajouter 550 µL de H <sub>2</sub> O RNase-free	5 flacons (taille F) Ajouter 550 µL de H <sub>2</sub> O RNase-free à chaque flacon.

<b>NucleoSpin® RNA Midi</b>	
<b>REF</b>	<b>20 préps. 740962.20</b>
Tampon de lavage RA3 (concentré)	25 mL Ajouter 100 mL d'éthanol
rDNase, RNase-free (lyophilisée)	1 flacon (taille D) Ajouter 540 µL de H <sub>2</sub> O RNase-free

## 4 Instructions de sécurité

Les composants suivants des kits **NucleoSpin® RNA** et **NucleoSpin® RNA Midi** contiennent des substances dangereuses.

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

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



Attention : Le thiocyanate de guanidine dans le tampon RA1 et le chlorhydrate de guanidine dans le tampon RAW2 peuvent former des composés très réactifs lorsqu'ils sont combinés avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajouter pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

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

### 4.1 Élimination

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

## 5 Protocoles NucleoSpin® RNA

### 5.1 Extraction d'ARN à partir de cellules cultivées et de tissus

Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 et la rDNase ont été préparés conformément au chapitre 3.

#### 1 Préparer l'échantillon

**Broyer** jusqu'à **30 mg de tissu** (pour les quantités d'échantillons, voir le paragraphe 2.2 ; pour les méthodes d'homogénéisation, voir le paragraphe 2.3).



**Broyer**  
l'échantillon

Jusqu'à **5 × 10<sup>6</sup>** cellules eucaryotes cultivées peuvent être collectées par centrifugation et lysées en ajoutant directement le tampon RA1.

#### 2 Lysér les cellules

Ajouter 350 µL de tampon RA1 et **3,5 µL de β-mercaptoéthanol (β-ME)** au culot cellulaire ou au tissu broyé et agiter vigoureusement au vortex.



+ 350 µL RA1  
+ 3,5 µL  
β-ME

*Pour les quantités appropriées d'échantillon et de tampon de lyse, voir le paragraphe 2.2.*

*Note : L'agent réducteur DTT ou TCEP peut être utilisé à la place du β-ME. Utiliser une concentration finale de 10–20 mM de DTT ou de TCEP dans le tampon de lyse RA1.*

#### 3 Filtrer le lysat

Réduire la viscosité et clarifier le lysat par filtration à travers le **NucleoSpin® Filter (bague violette)** : placer le NucleoSpin® Filter dans un tube collecteur (2 mL), appliquer le mélange et centrifuger pendant **1 minute** à **11,000 × g**.



**11,000 × g,**  
**1 min**

*Le lysat peut alternativement être passé ≥ 5 fois à travers une aiguille de 0,9 mm (calibre 20) montée sur une seringue.*

*En cas de formation d'un culot visible (en fonction de la quantité et de la nature de l'échantillon), transférer le surnageant sans aucun culot formé dans un nouveau tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).*

**Important :** pour traiter des quantités plus importantes de cellules (> 1 × 10<sup>6</sup>) ou de tissus (> 10 mg), le lysat doit d'abord être homogénéisé à l'aide d'une aiguille de 0,9 mm (calibre 20), puis filtré à l'aide de NucleoSpin® Filters.

**4 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN**

Éliminer le NucleoSpin® Filter et ajouter 350 µL d'éthanol (70 %) au lysat homogénéisé et mélanger par pipetage successif (5 fois).



**+ 350 µL  
d'éthanol  
70 %**

Autrement, transférer le filtrat dans un nouveau tube de 1,5 mL (non fourni), ajouter **350 µL d'éthanol (70 %)** et mélanger en vortexant (2 × 5 s).

**Mélanger**

*Après l'ajout d'éthanol, un précipité filandreux peut devenir visible, ce qui n'affectera pas l'isolement de l'ARN. Veiller à désagréger ce précipité en mélangeant et charger l'ensemble sur la colonne comme décrit à l'étape 5. Ne pas centrifuger le lysat après l'ajout de l'éthanol et avant chargement de la colonne afin d'éviter de culotter le précipité.*

**5 Fixer l'ARN**

Pour chaque préparation, prendre une colonne **NucleoSpin® RNA (bague bleue)** placée dans un tube collecteur. Mélanger le lysat en pipetant 2 à 3 fois et **charger le lysat** dans la colonne. Centrifuger pendant **30 s à 11,000 × g**. Placer la colonne dans un nouveau tube de collecte (2 mL).



**Charger le  
lysat**

**11,000 × g,  
30 s**

La capacité de chargement maximale des colonnes NucleoSpin® RNA est de 750 µL. Répéter la procédure si des volumes plus importants doivent être traités.

**6 Dessaler la membrane de silice**

Ajouter **350 µL de MDB** (tampon de tampon de dessalage de la membrane) et centrifuger à **11,000 × g** pendant **1 min** pour sécher la membrane.



**+ 350 µL  
MDB**

**11,000 × g,  
1 min**

L'élimination du sel rend la digestion à la rDNase beaucoup plus efficace. Si la sortie de la colonne est entrée en contact avec le filtrat de la colonne pour quelque raison que ce soit, jeter le filtrat et centrifuger à nouveau pendant 30 s à 11 000 × g.

**7 Digérer l'ADN**

**Préparer le mélange réactionnel pour la rDNase** dans un microtube stérile de 1,5 mL (non fourni) : pour chaque préparation, ajouter **10 µL de rDNase reconstituée** (voir également le chapitre 3) à **90 µL de tampon de réaction pour la rDNase**. Mélanger en tapotant le tube.



**+ 95 µL  
Mélange  
réactionnel  
rDNase**

**RT,  
15 min**

Appliquer **95 µL de mélange réactionnel de rDNase** directement sur le centre de la membrane de silice de la colonne. Incuber à **température ambiante** pendant **15 min**.

**8 Laver et sécher la membrane de silice****1<sup>er</sup> lavage**

Ajouter **200 µL de tampon RAW2** à la colonne NucleoSpin® RNA. Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 × g**. Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur (2 mL).

*Le tampon RAW2 inactive la rDNase.*



**+ 200 µL  
RAW2**  
**11,000 × g,  
30 s**

**2<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter **600 µL de tampon RA3** à la colonne NucleoSpin® RNA. Centrifuger pendant **30 s** à **11,000 × g**. Jeter l'écoulement et replacer la colonne dans le tube collecteur.

*Note : S'assurer que le tampon résiduel des étapes précédentes a été lavé avec le tampon RA3, en particulier si le lysat a été en contact avec le bord interne de la colonne pendant le chargement du lysat sur la colonne. Pour un lavage efficace du bord interne, le rincer avec le tampon RA3.*



**+ 600 µL RA3**  
**11,000 × g,  
30 s**

**3<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter **250 µL de tampon RA3** à la colonne NucleoSpin® RNA. Centrifuger pendant **2 min** à **11,000 × g** pour sécher complètement la membrane. Placer la colonne dans un tube collecteur exempt de nucléase (1,5 mL, fourni).

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

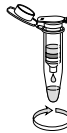


**+ 250 µL RA3**  
**11,000 × g,  
2 min**

**9 Eluer l'ARN**

Éluer l'ARN dans **60 µL de H<sub>2</sub>O RNase-free**, (fourni) et centrifuger à **11,000 × g** pendant 1 min.

Si des concentrations plus élevées d'ARN sont souhaitées, l'éluion peut être effectuée avec 40 µL. Le rendement global, cependant, diminuera lors de l'utilisation de volumes plus petits.



**+ 60 µL  
RNase-free  
H<sub>2</sub>O**  
**11,000 × g,  
1 min**

Pour d'autres procédures d'éluion alternatives, voir le paragraphe 2.4.

## 5.2 Préparation d'ARN à partir de 10<sup>9</sup> ou 30 mg de cellules bactériennes

Réactifs supplémentaires à fournir par l'utilisateur :

- Lysozyme ou
- MN Bead Tubes Type B (voir informations de commande, paragraphe 8.2)

### Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 et la rDNase ont été préparés conformément au chapitre 3.
- 

### 1 Homogénéiser l'échantillon

Deux protocoles alternatifs sont proposés pour l'homogénéisation des cellules bactériennes. Les utilisateurs peuvent choisir entre une digestion enzymatique (A) et une homogénéisation mécanique (B), en fonction de l'équipement du laboratoire et de leurs préférences personnelles.

#### **A) Homogénéisation par digestion enzymatique**

Remettre en suspension le culot de cellules bactériennes (souches Gram négatives, jusqu'à 10<sup>9</sup> cellules) dans **100 µL de tampon TE** (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA ; pH 8) contenant 1 mg/mL de lysozyme en agitant vigoureusement le vortex. Incuber à **37 °C pendant 10 minutes**.

*Pour la préparation de l'ARN des bactéries Gram-positives, remettre en suspension les cellules dans 100 µL de TE contenant 2 mg/mL de lysozyme. Il peut être nécessaire d'optimiser le temps d'incubation et la concentration en lysozyme, en fonction de la souche bactérienne.*

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

Ajouter **350 µL de tampon RA1** et **3,5 µL de β-mercaptoéthanol** à la suspension et vortexer vigoureusement.

Pour les quantités appropriées d'échantillon et de tampon de lyse, voir le paragraphe 2.2.

*Note : L'agent réducteur DTT ou TCEP peut être utilisé à la place du β-ME. Utiliser une concentration finale de 10–20 mM de DTT ou de TCEP dans le tampon de lyse RA1.*

---

## **B) Homogénéisation à l'aide de tubes à billes MN**

Récolter les cellules (jusqu'à environ 30 mg de poids humide) par centrifugation et éliminer le surnageant.

Ajouter **350 µL de tampon RA1** au culot cellulaire et agiter vigoureusement au vortex.

*Note : Les agents réducteurs tels que le β-mercaptoéthanol, le DTT ou le TCEP ne sont pas nécessaires.*

Transférer les cellules remises en suspension dans un tube MN Bead Tubes Type B et fermer le tube.

### **Broyer sur un MN Bead Tube Holder :**

Mettre les tubes de billes MN Bead Tubes Type B **horizontalement** sur un vortex, par exemple en les fixant avec du ruban adhésif ou en utilisant un adaptateur spécial (par exemple, le MN Bead Tube Holder, voir les informations de commande).

Vortexer les échantillons à **pleine vitesse** et à **température ambiante** pendant **3 minutes**.

### **Homogénéisation avec un broyeur rotatif:**

Il est également possible de placer les tubes MN Bead Tubes Type B dans un broyeur rotatif et d'effectuer un broyage à 30 Hz pendant 1 minute.

*Note : Dans les deux cas, nous recommandons vivement d'optimiser la procédure de broyage avec les billes (augmentation ou diminution du temps de broyage) en fonction de votre application et du matériel de départ afin d'obtenir un bon équilibre entre le rendement et l'intégrité de l'ARN.*

Centrifuger le tube MN Bead Tubes Type B pendant 1 minute à 11,000 × g pour sédimenter les billes.

Récupérer le surnageant (lysat).

Passer à l'étape 3 du protocole NucleoSpin® RNA standard (paragraphe 5.1).

---

## 5.3 Préparation d'ARN à partir de $5 \times 10^7$ ou 30 mg de cellules de levure

Les réactifs et composants supplémentaires à fournir par l'utilisateur :

- Agent réducteur [ $\beta$ -mercaptoéthanol, ou DTT (dithiothréitol) ou TCEP (BisTris (Bis-(2-hydroxyéthyl)-imino-tris(hydroxyméthyl)-méthane)].
- Sorbitol et lyticase (ou zymolase) pour l'homogénéisation par digestion enzymatique
- MN Bead Tubes Type B et MN Bead Tube Holder ou broyeur rotatif pour l'homogénéisation mécanique

### Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 et la rDNase ont été préparés conformément au chapitre 3.

#### 1 Homogénéiser l'échantillon

Deux protocoles alternatifs sont proposés pour l'homogénéisation des cellules de levure. Les utilisateurs peuvent choisir entre une digestion enzymatique (A) ou une homogénéisation mécanique (B), en fonction de l'équipement du laboratoire et de leurs préférences personnelles. L'homogénéisation par digestion enzymatique n'est recommandée que pour les cellules fraîchement récoltées, l'homogénéisation par rupture mécanique peut également être réalisée avec des culots de levure, conservés à  $-70^\circ\text{C}$  pendant plusieurs mois ou des levures stabilisées avec du NucleoProtect® RNA (voir les informations de commande, paragraphe 8.2). Comme cela dépend fortement de l'organisme utilisé, nous recommandons de comparer à l'avance le matériel congelé et le matériel frais.

Note : En raison de la concentration beaucoup plus élevée d'équivalents génomiques dans une préparation d'acide nucléique de levures par rapport à des cellules cultivées ou à du matériel tissulaire, il peut être nécessaire d'utiliser une quantité plus faible de cellules pour la préparation.

#### A) Homogénéisation par digestion enzymatique

Récolter les levures de **2 à 5 mL de culture YPD** ( $5,000 \times g$  ; 10 min). Resuspendre le culot dans une quantité appropriée de **tampon sorbitol/lyticase** fraîchement préparé (50–100 U de lyticase ou de zymolase dans 1 M de sorbitol/100 mM d'EDTA) et incubé à  **$30^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes**. Concentrer les sphéroplastes obtenus par centrifugation ( $1,000 \times g$  ; 10 min).

Éliminer délicatement le surnageant.

Note : Il peut être nécessaire d'optimiser le temps d'incubation et la concentration en lyticase/zymolase, en fonction de la souche de levure.

Ajouter **350  $\mu\text{L}$  de tampon RA1** et **3,5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoéthanol** et vortexer vigoureusement pour lyser les sphéroplastes.

Pour les quantités appropriées d'échantillon et de tampon de lyse, voir le paragraphe 2.2.

*Note : L'agent réducteur DTT ou TCEP peut être utilisé à la place du  $\beta$ -ME. Utiliser une concentration finale de 10–20 mM de DTT ou de TCEP dans le tampon de lyse RA1.*

## **B) Homogénéisation par rupture mécanique**

Récolter les cellules de levure (environ 30 mg de poids humide) par centrifugation et jeter le surnageant. Remettre en suspension le culot cellulaire dans **350 µL de tampon de lyse RA1**.

Remarque : il n'est pas nécessaire d'utiliser un agent réducteur tel que le β-mercaptoéthanol, le DTT ou le TCEP.

Transférer les cellules remises en suspension dans un tube MN Bead Tubes Type B et fermer le tube.

### **Utiliser un broyeur rotatif pour homogénéiser l'échantillon :**

Agiter les échantillons à **30 Hz** pendant **10 secondes**.

### **Broyer les cellules avec un support MN Bead Tube Holder :**

Agiter les échantillons dans le support MN Bead Tube Holder pendant **3 minutes à vitesse maximale** et à **température ambiante**.

Dans les deux cas, nous recommandons vivement d'optimiser la procédure de broyage avec les billes (augmentation ou diminution du temps de broyage) en fonction de votre application et de votre matériel de départ afin d'obtenir un bon équilibre entre le rendement et l'intégrité de l'ARN.

Centrifuger le tube MN Bead Tubes Type B pendant 1 minute à 11,000 × g pour sédimenter les billes.

Récupérer le surnageant (lysate).

Passer à l'étape 4 du protocole NucleoSpin® RNA standard (paragraphe 5.1).

---

## 5.4 Préparation d'ARN à partir de tissus inclus en paraffine\*

Réactifs supplémentaires à fournir par l'utilisateur :

- Xylène

Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 et la rDNase ont été préparés conformément au chapitre 3.

---

**A** Introduire **10 mg** de tissu finement haché dans un microtube de 1,5 mL (non fourni).

Ajouter **300 µL de xylène** et incuber 5 min avec un mélange constant à température ambiante.

---

**B** Centrifuger à **vitesse maximale** (13 000 rpm) pendant **3 minutes** pour collecter le tissu. Jeter le xylène.

---

**C** Répéter les étapes A et B deux fois, pour un total de trois lavages au xylène.

---

**D** Ajouter **300 µL d'éthanol à 96 %** dans le tube et incuber **5 min** en mélangeant constamment à **température ambiante**.

---

**E** Centrifuger à **vitesse maximale** (13 000 rpm) pendant **3 minutes** pour collecter le tissu. Jeter l'éthanol.

---

**F** Répéter les étapes D et E, pour un total de deux lavages à l'éthanol.

---

Continuer avec l'étape 1 du protocole NucleoSpin® RNA standard (paragraphe 5.1).

*Note : Pour une extraction efficace de l'ARN à partir de tissus fixés à la formaline et inclus en paraffine, il est recommandé d'utiliser le kit NucleoSpin® totalRNA FFPE (REF 740982, voir les informations de commande, paragraphe 8.2) ou le kit NucleoSpin® totalRNA FFPE XS (REF 740969, voir les informations de commande, paragraphe 8.2).*

---

---

\*Veillez également vous référer à : Annunziata Gloghini, Barbara Canal, Ulf Klein, Luigino Dal Maso, Tiziana Perin, Riccardo Dalla-Favera, et Antonino Carbone **RT-PCR Analysis of RNA Extracted from Bouin-Fixed and Paraffin-Embedded Lymphoid Tissues** J Mol Diagn 2004 6 : 290–296 comme exemple de modification du protocole support mentionné ci-dessus.

## 5.5 Purification de l'ARN de mélanges réactionnels

### Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 a été préparé conformément au chapitre 3.
- 

#### 1 Préparer l'échantillon

Ramener à un volume de 100 µL d'échantillon avec de l'H<sub>2</sub>O RNase-free.

Si différents échantillons dont les volumes varient entre 100 et 200 µL sont purifiés, les échantillons d'ARN doivent être ramenés par exemple à 200 µL avec de l'H<sub>2</sub>O RNase-free pour uniformiser les volumes.

---

#### 2 Préparer du tampon de lyse-fixation

Préparer un mélange RA1 - éthanol avec un rapport de 1 :1.

Pour **chaque échantillon d'ARN de 100 µL**, mélanger **300 µL de tampon RA1 et 300 µL d'éthanol (96 – 100 %)**.

Si plusieurs échantillons sont traités, il est recommandé de préparer un prémix (par exemple, 2 mL de RA1 + 2 mL d'éthanol à 98 % pour environ 6 préparations de NucleoSpin® RNA ).

---

#### 3 Filtrer le lysat

Inutile !

---

#### 4 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN

À chaque **échantillon d'ARN de 100 µL**, ajouter **600 µL (6 volumes) de mélange de RA1 - éthanol**. Mélanger au vortex.

Si 200 µL d'échantillons d'ARN sont traités, ajouter 1200 µL de mélange RA1-éthanol.

*La capacité de chargement maximale des colonnes NucleoSpin® RNA est de 750 µL. Répéter la procédure si des volumes plus importants doivent être traités.*

*Après l'ajout d'éthanol, un léger précipité peut apparaître, ce qui n'affectera pas la purification de l'ARN. Veiller à bien mélanger et à appliquer l'échantillon sous forme de solution homogène sur la colonne. Pour la capacité de fixation des colonnes, voir le tableau 1.*

---

Procéder aux étapes 5, 8 et 9 du protocole NucleoSpin® RNA standard (paragraphe 5.1). Les étapes 6 et 7 des protocoles respectifs peuvent être omises dans ce cas.

*Comme produits alternatifs pour la purification de l'ARN, NucleoSpin® RNA Clean up et NucleoSpin® RNA Clean up XS sont recommandés (voir les informations de commande, paragraphe 8.2).*

---

## 5.6 Extraction d'ARN à partir d'insectes

---

### 1 Prélèvement d'échantillons

Utiliser des échantillons frais, surgelés (-70 °C.) ou stabilisés grâce au NucleoProtect® RNA\* (environ 1 – 10 mg d'insecte).

\* Veiller à éliminer l'excès de solution NucleoProtect® RNA de l'échantillon avant de commencer la procédure d'extraction de l'ARN.

---

### 2 Remise en suspension

Ajouter 350 µL de tampon de lyse RA1 sans β-mercaptoéthanol ni TCEP dans un tube MN Bead Tubes Type G et ajouter l'échantillon d'insecte.

---

### 3 Homogénéisation et lyse

Broyer l'échantillon grâce aux billes à l'aide d'un broyeur Retsch (30 Hz, 1 – 3 min) ou d'un support MN Bead Tube Holder (pleine vitesse, 10 min).

---

### 4 Sédimentation des billes

Retirer les billes d'acier du tube de billes (par exemple à l'aide d'un aimant), récupérer le lysat et l'appliquer sur le NucleoSpin® Filter (bague violette) conformément à l'étape 3 du paragraphe 5.1 du manuel d'utilisation.

---

## 6 Protocoles NucleoSpin® RNA Midi

### 6.1 Extraction d'ARN à partir de cellules cultivées et de tissus

Avant de débiter la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 et la rDNase ont été préparés conformément au chapitre 3.
- For centrifugation, a centrifuge with a **swing-out rotor** and appropriate buckets capable of reaching 4,000–4,500 × g is required.

#### 1 Homogénéiser l'échantillon

Broyer jusqu'à 100 mg de tissu (pour les quantités d'échantillons, voir le paragraphe 2.2 ; pour les méthodes d'homogénéisation, voir le paragraphe 2.3).



**Broyer  
l'échantillon**

Jusqu'à **5 × 10<sup>7</sup> cellules** eucaryotes cultivées sont collectées par centrifugation et lysées par addition directe du tampon RA1.

*Pour choisir une quantité appropriée de produit de départ, voir le chapitre 2.2.*

#### 2 Lyse des cellules

Ajouter **1,8 mL de tampon RA1** et **18 µL de β-mercaptoéthanol (β-ME)** à l'échantillon broyé dans un tube à centrifuger de 15 mL (non fourni) et vortexer vigoureusement (utiliser 3,6 mL de tampon RA1 et 36 µL de β-mercaptoéthanol pour les grandes quantités d'échantillons ; voir paragraphe 2.2.)



**+ 1,8 mL RA1  
+ 18 µL β-ME**

*Note : L'agent réducteur DTT ou TCEP peut être utilisé à la place du β-ME. Utiliser une concentration finale de 10–20 mM de DTT ou de TCEP dans le tampon de lyse RA1.*

**3 Filtrer le lysat**

Appliquer le lysat sur un **NucleoSpin® Filter Midi** placé dans un tube de collecte et centrifuger l'échantillon pendant 10 minutes à **4 500 x g**. Cette étape permet d'homogénéiser l'échantillon en éliminant le matériel insoluble résiduel et en réduisant simultanément la viscosité du lysat.



**4,500 x g,  
10 min**

*En cas de formation d'un culot visible (en fonction de la quantité et de la nature de l'échantillon), transférer le surnageant sans aucun culot formé dans un nouveau tube à centrifuger de 15 mL (non fourni).*



*Si l'on travaille avec de petites quantités de cellules cultivées (par exemple,  $< 1 \times 10^7$  cellules HeLa), l'étape 3 peut être remplacée par un mélange vigoureux de l'échantillon.*

**4 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN**

Jeter le NucleoSpin® Filter Midi et ajouter **1,8 mL d'éthanol (70 %)** au lysat dans le tube de collecte et mélanger en vortexant  $2 \times 5$  s (utiliser 3,6 mL d'éthanol 70 % si l'on travaille avec de grandes quantités d'échantillons, voir l'étape 2 et le paragraphe 2.2).



**+ 1.8 mL  
d'éthanol  
à 70 %  
+ 1,8 mL  
d'éthanol  
à 70**

*Après l'ajout d'éthanol, un précipité filandreux peut devenir visible, ce qui n'affectera pas la suite de la procédure. Bien remettre en suspension les précipités avant de les charger sur la colonne NucleoSpin® RNA Midi.*



**Mélanger**

**5 Fixer l'ARN**

**Charger le mélange lysat-éthanol (maximum 3,8 mL)** sur une **colonne NucleoSpin® RNA Midi**. Centrifuger pendant **3 minutes à 4,500 x g**.

*Si vous travaillez avec de grandes quantités d'échantillons, appliquez le reste du mélange lysat-éthanol (max. 3,8 mL) sur la colonne et centrifugez à nouveau.*

*Si le lysat n'a pas traversé la colonne, centrifuger à nouveau à 4,500 x g pendant 10 minutes.*

*En cas de surcharge de la colonne, un écoulement incomplet de l'échantillon peut être observé, par exemple si la membrane est encore humide ou si une partie du lysat n'est pas passée. Retirer le lysat qui n'a pas traversé la colonne et passer à l'étape suivante du protocole. La prochaine fois, utiliser moins de matériel de départ et éliminer soigneusement le matériel insoluble à l'étape 3.*



**Charger max.  
3,8 mL de  
lysate**

**4,500 x g,  
3 min**



**6 Dessaler la membrane de silice**

Ajouter **2,2 mL de MDB** (Membrane Desalting Buffer) à la colonne NucleoSpin® RNA Midi. Centrifuger pendant 3 minutes à **4,500 x g**. Jeter le filtrat.

Si la membrane de silice n'est pas complètement sèche après la centrifugation, centrifuger à nouveau à 4,500 x g pendant 10 minutes. Cette étape permet d'obtenir les conditions de réaction optimales pour la rDNase.



+ 2.2 mL  
MDB

4,500 x g,  
3 min

**7 Digérer l'ADN**

Préparer le mélange réactionnel pour la DNase : dans un microtube stérile, mélanger **235 µL de tampon de réaction** pour la rDNase et 25 µL de rDNase reconstituée (voir chapitre 3) par colonne NucleoSpin® RNA Midi. Mélanger soigneusement mais délicatement.

**Digérer avec la rDNase**

Appliquer **250 µL de mélange réactionnel de rDNase** directement au centre de la membrane de silice. Incuber à température ambiante pendant **15 minutes**.



+ 250 µL  
de mélange  
réactionnel  
rDNase

RT,  
15 min

**8 Laver et sécher la membrane de silice****1<sup>er</sup> lavage**

Ajouter **2,6 mL de tampon RAW2** à la colonne NucleoSpin® RNA Midi. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes. Centrifuger pendant **3 minutes à 4 500 x g**. Jeter le filtrat et replacer la colonne dans le tube collecteur (15 mL).

*Le tampon RAW2 inactive la rDNase.*



+ 2.6 mL  
RAW2

4,500 x g,  
3 min

**2<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter **2,6 mL de tampon RA3** à la colonne NucleoSpin® RNA Midi. Centrifuger pendant **3 minutes à 4 500 x g**.

*Le filtrat ne doit pas être jeté lors de cette étape. Laisser la colonne NucleoSpin® RNA Midi dans le tube collecteur.*



+ 2.6 mL RA3

4,500 x g,  
3 min

**3<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter **2,6 mL de tampon RA3** à la colonne NucleoSpin® RNA Midi. Centrifuger pendant 5 minutes à **4 500 x g** pour sécher complètement la membrane. Placer la colonne dans un nouveau tube de collecte (15 mL, fourni).



+ 2.6 mL RA3

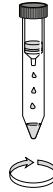
4,500 x g,  
5 min



**9 Eluer l'ARN**

Pipeter **500 µL d'H<sub>2</sub>O RNase-free** (fourni) directement au centre de la membrane de silice. Incuber à **température ambiante** pendant **2 min** et centrifuger pendant **3 min** à **4 500 x g**.

*La réduction du volume d'élution n'entraîne généralement pas une augmentation de la concentration de l'acide nucléique élué avec le kit NucleoSpin® RNA Midi (voir paragraphe 2.4 pour les procédures d'élution alternatives).*



**+ 500 µL  
RNase-free  
H<sub>2</sub>O**

**RT,  
2 min**

**4,500 x g,  
3 min**

## 6.2 Préparation d'ARN à partir d'un maximum de $5 \times 10^9$ cellules bactériennes

Réactif supplémentaire à fournir par l'utilisateur :

- Lysozyme ou
- MN Bead Tubes Type B (voir informations de commande, paragraphe 8.2)

### Avant de commencer la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 et la rDNase ont été préparés conformément au chapitre 3.

### 1 Homogénéiser

#### A) Homogénéisation par digestion enzymatique

Remettre en suspension le culot de cellules bactériennes (souches Gram négatif) dans **200  $\mu$ L de tampon TE** (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA ; pH 8) contenant **1 mg/mL de lysozyme** en vortexant vigoureusement. Incuber à **37 °C** pendant **10 minutes**.

*Pour la préparation de l'ARN des bactéries Gram-positives, remettre en suspension les cellules dans 200  $\mu$ L de TE contenant 2 mg/mL de lysozyme. Il peut être nécessaire d'optimiser le temps d'incubation et la concentration en lysozyme, en fonction de la souche bactérienne.*

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

Ajouter **1,8 mL de tampon RA1** et **1,8  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoéthanol** à la suspension et vortexer vigoureusement.

Pour les quantités appropriées d'échantillon et de tampon de lyse, voir le paragraphe 2.2

*Note : L'agent réducteur DTT ou TCEP peut être utilisé à la place du  $\beta$ -ME. Utiliser une concentration finale de 10–20 mM de DTT ou de TCEP dans le tampon de lyse RA1.*

#### B) Homogénéisation par rupture mécanique

Concentrer les cellules par centrifugation et éliminer le surnageant.

Ajouter des billes de verre (par exemple, MN Bead Type B1 (en vrac), 40–70  $\mu$ m ou MN Bead Type B2 (en vrac), 0,3–0,4 mm, voir les informations de commande).

Agiter les échantillons dans un broyeur à 30 Hz pendant **15 minutes**.

*Remarque : les agents réducteurs tels que le  $\beta$ -mercaptoéthanol, le DTT et le TCEP peuvent être dispensés (en fonction de l'échantillon).*

*Note : Nous recommandons vivement d'optimiser la procédure de broyage des billes (augmentation ou diminution du temps de broyage) en fonction de votre application et de votre matériel de départ afin d'obtenir un bon équilibre entre le rendement et l'intégrité de l'ARN.*

---

**1 Filtrer le lysat**

Réduire la viscosité et la turbidité de la solution par filtration à travers le NucleoSpin® Filter Midi. Placer le NucleoSpin® Filter Midi dans un tube collecteur, appliquer le mélange et centrifuger pendant **10 minutes** à **4 500 x g**.

En cas de formation d'un culot visible (en fonction de la quantité et de la nature de l'échantillon), transférer le surnageant sans le culot dans un nouveau tube à centrifuger de 15 mL (non fourni).

---

**2 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN**

Ajouter **1,8 mL d'éthanol (70 %)** au lysat et mélanger au vortex.

Passer à l'étape 5 du protocole standard NucleoSpin® RNA Midi (paragraphe 6.1).

---

### **6.3 Préparation d'ARN à partir d'un maximum de $3 \times 10^8$ cellules de levure**

**Les réactifs et composants supplémentaires doivent être fournis par l'utilisateur :**

- Agent réducteur [ $\beta$ -mercaptoéthanol, ou DTT (dithiothréitol), ou TCEP (BisTris (Bis-(2-hydroxyéthyl)-imino-tris(hydroxyméthyl)-méthane)].
- Sorbitol et lyticase (ou zymolase) pour l'homogénéisation par digestion enzymatique ou broyeur et billes de verre pour l'homogénéisation par rupture mécanique.

**Avant de commencer la préparation :**

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 et la rDNase ont été préparés conformément au chapitre 3.

## 1 Homogénéiser l'échantillon

Deux protocoles alternatifs sont proposés pour l'homogénéisation des cellules de levure. Les utilisateurs peuvent choisir entre une digestion enzymatique (A) ou une homogénéisation mécanique (B), en fonction de l'équipement du laboratoire et de leurs préférences personnelles. L'homogénéisation par digestion enzymatique n'est recommandée que pour les cellules fraîchement récoltées. L'homogénéisation par rupture mécanique peut également être réalisée avec des culots de cellules de levure, conservés à -70 °C pendant plusieurs mois.

*Note : En raison de la concentration beaucoup plus élevée d'équivalents génomiques dans une préparation d'acide nucléique de levures par rapport à des cellules cultivées ou à du matériel tissulaire, il peut être nécessaire d'utiliser une quantité plus faible de cellules pour la préparation.*

### A) Homogénéisation par digestion enzymatique

Récolter une quantité appropriée de cellules de la culture **YPD (5,000 × g ; 10 min)**. Resuspendre le culot dans une quantité appropriée de tampon sorbitol/lyticase fraîchement préparé (50 – 100 U de lyticase ou de zymolase dans 1 M de sorbitol / 100 mM d'EDTA) et incubé à **30 °C** pendant 30 minutes. Concentrer les sphérobates obtenus par centrifugation (**1,000 × g ; 10 min**).

Jeter soigneusement le surnageant.

*Il peut être nécessaire d'optimiser le temps d'incubation et la concentration en lyticase/zymolase, en fonction de la souche de levure.*

Poursuivre avec l'étape 2.

**OU**

### B) Homogénéisation par rupture mécanique

Récolter une quantité appropriée de cellules de la culture **YPD (5,000 × g ; 10 min)** et laver avec de l'eau glacée. Remettre en suspension le culot cellulaire dans un mélange de 3,6 mL de tampon RA1 et 36 µL de β-mercaptoéthanol.

Ajouter les billes de broyage (par exemple, MN Bead Type B (en vrac) ou C (en vrac), voir les informations de commande).

Agiter les échantillons dans un broyeur à 30 Hz pendant **15 minutes**.

Passer à l'étape 3 Filtrer le lysat.

---

*Remarque : les agents réducteurs tels que le β-mercaptoéthanol, le DTT et le TCEP peuvent être dispensés (en fonction de l'échantillon).*

*Note : Nous recommandons vivement d'optimiser la procédure de broyage des billes (augmentation ou diminution du temps de broyage) en fonction de votre application et du matériel de départ afin d'obtenir un bon équilibre entre le rendement et l'intégrité de l'ARN.*

---

## 2 Lyse des cellules

Ajouter **3,6 mL de tampon RA1** et **36 µL de β-mercaptoéthanol** et vortexer vigoureusement pour lyser les sphéroplastés.

**Pour les quantités appropriées d'échantillon et de tampon de lyse, voir la section 2.2.**

*Note : L'agent réducteur DTT ou TCEP peut être utilisé à la place du β-ME. Utiliser une concentration finale de 10–20 mM de DTT ou de TCEP dans le tampon de lyse RA1.*

---

## 3 Filtrat lysat

Réduire la viscosité et la turbidité de la solution par filtration à travers **NucleoSpin® Filter Midi**. Placer NucleoSpin® Filter Midi dans les tubes collecteurs et centrifuger pendant **10 minutes** à **4 500 x g**.

*En cas de formation d'un culot visible (en fonction de la quantité et de la nature de l'échantillon), transférer le surnageant sans le culot dans un nouveau tube à centrifuger de 15 mL (non fourni).*

---

## 4 Ajuster les conditions de fixation des ARN

Jeter le NucleoSpin® Filter Midi et ajouter **3,6 mL d'éthanol à 70 %** au lysat dans le tube collecteur et mélanger au vortex.

---

Passer à l'étape 5 du protocole standard NucleoSpin® RNA Midi (paragraphe 6.1).

---

---

## 6.4 Purification de l'ARN de mélanges réactionnels

Avant de commencer la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 a été préparé conformément au chapitre 3.

---

### 1 Préparer l'échantillon

Compléter les échantillons d'ARN < à 500 µL avec de l'H<sub>2</sub>O RNase-free jusqu'à 500 µL.

---

### 2 Préparer le prémix de tampon de lyse et de fixation

Préparer un prémix de tampon RA1 - éthanol avec un rapport de 1 :1.

**Pour chaque échantillon d'ARN de 500 µL, mélanger 1500 µL de tampon RA1 et 1500 µL d'éthanol (96 – 100 %).**

Si plusieurs échantillons sont traités, il est recommandé de préparer un master-prémix (par exemple, 2 mL de RA1 + 2 mL d'éthanol à 98 % pour environ 6 préparations de NucleoSpin® RNA ).

---

### 3 Filtrer le lysat

Inutile !

---

### 4 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN

**À 500 µL d'échantillon d'ARN, ajouter 3000 µL (6 volumes) de prémix de tampon RA1-éthanol.** Mélanger l'échantillon avec le prémix par vortex.

*La capacité de chargement maximale des colonnes NucleoSpin® RNA Midi est de 4 000 µL. Répéter la procédure si des volumes plus importants doivent être traités.*

*Après l'ajout d'éthanol, un précipité filandreux peut devenir visible, ce qui n'affectera pas la purification de l'ARN. Veiller à bien mélanger et à appliquer l'échantillon sous forme de solution homogène sur la colonne. Pour la capacité de fixation des colonnes, voir le Tableau 1.*

---

Passer aux étapes 5, 8 et 9 du protocole standard NucleoSpin® RNA Midi (paragraphe 6.1). Les étapes 6 et 7 des protocoles respectifs peuvent être omises dans ce cas.

*Les produits NucleoSpin® RNA Clean up et NucleoSpin® RNA Clean up XS sont recommandés comme produits alternatifs pour la purification de l'ARN (voir les informations de commande).*

---

## 7 Protocoles NucleoSpin® RNA / NucleoSpin® RNA Midi

### 7.1 Préparation d'ARN à partir d'échantillons traités avec du NucleoProtect® RNA ou du RNAlater®

Avant de commencer la préparation :

- Vérifier que le tampon de lavage RA3 et la rDNase ont été préparés conformément au chapitre 33.

#### 1 Préparer l'échantillon

Retirer la solution NucleoProtect® RNA/RNALater®. Couper une quantité appropriée de tissu.

#### 2 Lyse des cellules

Ajouter **350 µL** (NucleoSpin® RNA) / **1,8 mL** (NucleoSpin® RNA Midi) de **tampon RA1** et 3,5 µL (NucleoSpin® RNA) / 18 µL (NucleoSpin® RNA Midi) de **β-mercaptoéthanol** à l'échantillon. Broyer l'échantillon en utilisant, par exemple, des homogénéisateurs à rotor-stator (pour les méthodes d'homogénéisation, voir le paragraphe 2.3).

Passer à l'étape 3 (filtrer le lysat) des protocoles standards NucleoSpin® RNA (paragraphe 5.1) ou NucleoSpin® RNA Midi (paragraphe 6.1).

### 7.2 Digestion rDNase en solution

La digestion à la rDNase sur colonne dans le protocole standard est très efficace et produit un minimum d'ADN résiduel. Cet ADN ne sera pas détectable dans la plupart des applications en aval. Malgré cela, certaines applications requièrent des teneurs en ADN résiduel encore plus faibles. L'élimination de l'ADN à un niveau totalement indétectable est un défi et l'efficacité d'une digestion de l'ADN sur colonne n'est parfois pas suffisante pour les applications en aval exigeant une teneur résiduelle en ADN la plus faible possible.

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

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

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

La DNase recombinante RNase-free (rDNase) de haute qualité contenue dans les kits NucleoSpin® RNA facilite cette digestion en solution afin d'éliminer même les traces d'ADN contaminant.

**A Digérer l'ADN (Condition réactionnelle)**

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

(Alternativement, prémix 100 µL de tampon de réaction rDNase et 10 µL de rDNase et ajouter 1/10 de volume à un volume d'éluat d'ARN).

Agiter doucement le tube afin de mélanger la solution. Centrifuger doucement (environ 1 s à 1,000 × g) pour recueillir toutes les gouttelettes de la solution au fond du tube.

---

**B Incuber l'échantillon**

Incuber pendant **10 minutes** à **37 °C**.

---

**C Repurifier l'ARN**

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

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

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

Incuber **quelques minutes** à **quelques heures** à **-20 °C** ou **4 °C**.

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

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

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

Sécher les culots d'ARN et remettre l'ARN en suspension dans du H<sub>2</sub>O RNase-free.

---

## 8 Annexes

### 8.1 Guide de résolution des problèmes

Problèmes	Causes possible et suggestions
ARN dégradé / rendement nul	<p><i>Contamination par les RNases</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Créer un environnement de travail RNase-free. Porter des gants pendant toutes les étapes de la procédure. Changer de gants fréquemment. Il est recommandé d'utiliser des tubes en polypropylène stériles et jetables. Garder les tubes fermés dans la mesure du possible pendant la préparation. La verrerie doit être soumise à un traitement thermique pendant au moins 2 heures à 250 °C avant d'être utilisée.</li> </ul>
	<p><i>Mauvaise utilisation ou préparation erronée des réactifs</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les réactifs n'ont pas été correctement préparés. Ajouter le volume indiqué d'H<sub>2</sub>O RNase-free au flacon de rDNase et d'éthanol 96 % au tampon concentré RA3 et mélanger. Reconstituer et stocker la rDNase lyophilisée conformément aux instructions données au chapitre 3.</li> <li>• L'échantillon et les réactifs ont été mal homogénéisés. Toujours vortexer vigoureusement après l'ajout de chaque réactif.</li> <li>• L'éthanol n'a été ajouté après la lyse. La fixation de l'ARN à la membrane de silice n'est efficace qu'en présence d'éthanol.</li> </ul> <p><i>Stockage du kit</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reconstituer et stocker la rDNase lyophilisée selon les instructions données au chapitre 3.</li> <li>• Stocker les autres composants du kit à température ambiante. Le stockage à des températures inférieures peut provoquer une précipitation de sel.</li> <li>• Garder les flacons bien fermés afin d'éviter l'évaporation ou la contamination des solutions.</li> </ul> <p><i>Influence de la force ionique et du pH sur l'absorption <math>A_{260}</math> sur le rapport <math>A_{260}/A_{280}</math>.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pour les mesures d'absorption, utiliser 5 mM Tris 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 et 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>
ARN de faible qualité / rendement faible	

---

**Problèmes**                      **Causes possible et suggestions**


---

ARN de faible qualité / rendement faible ( <i>suite</i> )	<p><i>Echantillon</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mauvaises conditions de stockage des échantillons. Dans la mesure du possible, utiliser du matériel frais. Si ce n'est pas possible, congeler rapidement les échantillons dans de l'azote liquide. Les échantillons doivent toujours être conservés à -70 °C. Ne jamais laisser les tissus décongeler avant l'ajout du tampon RA1. Effectuer le broyage des échantillons dans de l'azote liquide. Il est également possible de conserver les tissus dans du NucleoProtect®RNA ou des réactifs de protection similaires.</li> <li>• Broyage et/ou homogénéisation insuffisante de l'échantillon. Veiller à ce que l'échantillon soit bien broyé et utiliser les filtres NucleoSpin® Filters / Filters Midi pour faciliter l'homogénéisation du lysat.</li> </ul>
---	--

Faible ratio $A_{260}/A_{230}$	<p><i>Contamination par du thiocyanate de guanidinium</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Déposer soigneusement le lysat sur la colonne NucleoSpin® RNA et essayer d'éviter toute contamination de la partie supérieure de la colonne et de son couvercle.</li> <li>• S'assurer qu'une quantité/concentration suffisante d'ARN est utilisée pour la quantification afin que la valeur <math>A_{230}</math> soit significativement plus élevée que la ligne de base.</li> </ul>
--------------------------------	---

Colonne NucleoSpin® RNA colmatée / faible rendement et/ou qualité	<p><i>Echantillons</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantité excessive de matériel initial. Une surcharge peut entraîner une diminution du rendement global. Réduire la quantité d'échantillon de départ ou utiliser un plus grand volume de tampon RA1.</li> <li>• Broyage et/ou homogénéisation insuffisante de l'échantillon. Veiller à ce que l'échantillon soit bien broyé et utiliser les filtres NucleoSpin® Filters / Filters Midi pour faciliter l'homogénéisation du lysat.</li> </ul>
---	--

Contamination de l'ARN par l'ADN génomique	<p><i>rDNase inactive</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reconstituer et conserver la rDNase lyophilisée selon les instructions données au chapitre 3.</li> </ul> <p><i>Solution de rDNase mal appliquée</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Déposer la solution de rDNase directement au centre de la membrane de silice.</li> </ul> <p><i>Trop d'échantillon de départ</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Réduire la quantité de cellules ou de tissus utilisés.</li> </ul>
--	--

---

**Problèmes**

**Causes possible et suggestions**

---

Contamination de l'ARN par l'ADN génomique (*suite*)

*Système de détection de l'ADN trop sensible*

- La contamination en ADN est efficacement réduite par la digestion à la rDNase effectuée sur la membrane. Cependant, il est difficile de garantir l'élimination complète de l'ADN et, pour des applications très sensibles, il peut parfois s'avérer que de l'ADN résiduel soit détecté.
- Le système NucleoSpin® RNA est vérifié par la procédure suivante : un million de cellules HeLa sont soumises à l'extraction d'ARN conformément au protocole. L'éluat d'ARN est utilisé comme modèle pour la détection par PCR d'un fragment de 1 kb dans une réaction de 30 cycles. En général, aucun produit PCR n'est obtenu, tandis que l'omission de la digestion par la rDNase conduit habituellement à des résultats PCR positifs.
- La probabilité de détection de l'ADN par PCR augmente avec :
  - le nombre de copies d'ADN par préparation : cible monocopie < cible plasmidiale / mitochondriale < plasmide transfecté dans les cellules
  - diminution de la taille de l'amplicon PCR.
- Utiliser des cibles de PCR plus grandes (par exemple, > 500 pb) ou des amorces couvrant des introns si possible.
- Utiliser le protocole de support 7.2 pour une digestion complémentaire en solution avec de la rDNase.

Performance suboptimale de l'ARN dans les applications avals

*Contamination par de l'éthanol ou des sels*

- Ne pas laisser l'embout de sortie de la colonne entrer en contact avec le filtrat après le second lavage avec le tampon RA3. Veiller à centrifuger à la vitesse et pendant la durée recommandée afin d'éliminer totalement le tampon éthanolique RA3.
- Vérifier que le tampon RA3 a été équilibré à la température ambiante avant de l'utiliser. Le lavage à des températures plus basses réduit l'efficacité de dessalage par le tampon RA3.

*Stocker correctement l'ARN isolé*

- L'ARN élué doit être conservé sur la glace pour garantir sa stabilité en raison de l'omniprésence des traces de RNases (matériel du laboratoire, traces de doigts, poussières) susceptibles de dégrader l'ARN purifié. Pour un stockage à court terme, stocker à -20 °C et à -70 °C pour une conservation à long terme.
-

## 8.2 Informations pour la commande

Produit	REF	Paquet de
NucleoSpin® RNA	740955.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® RNA Midi	740962.20	20
NucleoSpin® miRNA	740971.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® ARN / Protein	740933.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® TriPrep	740966.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® RNA Clean up (purification de l'ARN)	740948.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® RNA XS	740902.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® RNA Clean up XS	740903.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set	740944	Convient pour 100 préparations
Tampon RA1	740961 / .500	60 / 500 mL
Set rDNase	740963	1 set
TCEP	740395.107	107 mg
NucleoProtect® RNA	740400.50 / .250	50 / 250 / 500
MN Bead Tubes Type B	740812.50	50
MN Bead Type B1 (en vrac) 40–70 mm billes de verre	740809.B.5000	750 g
MN Bead Type B2 (Bulk) 0.3–0.4 mm billes de verre	740812.B.1000	750 g
MN Bead Tubes Type C	740813.50	50
MN Bead Type C (en vrac) Billes de corindum de 1 mm	740813.B.250	200 g
MN Bead Tube Holder pour tubes de billes	740469	1
NucleoSpin® Filters	740606	50
Tubes collecteurs (2 mL)	740600	1000

Visitez notre site [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) pour plus d'informations sur nos produits

### 8.3 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.

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

Veuillez contacter :  
MACHEREY NAGEL GmbH & Co. KG  
Tel. : +49 24 21 969 333  
support@mn-net.com

### 8.4 Versions linguistiques et prédominance

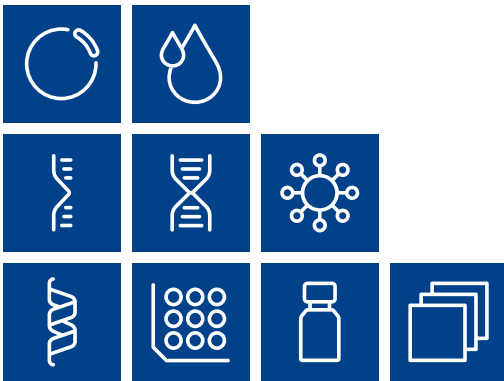
Ce document est disponible en plusieurs langues. En cas de divergence ou de problème d'interprétation, la version anglaise prévaut.

---

**Marques déposées :**

**NucleoSpin® est une marque déposée de MACHEREY NAGEL GmbH & Co KG**

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.



# MACHEREY-NAGEL

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

