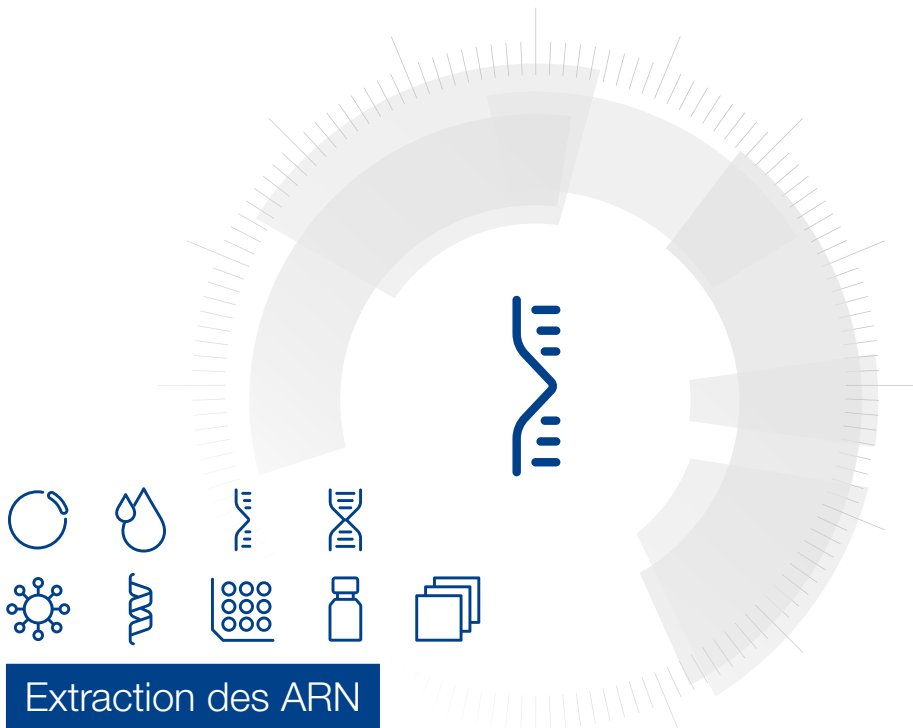


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation








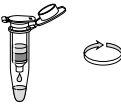
■ NucleoSpin® RNA Plus XS

Juillet 2025 / Rev. 08

Extraction des ARN

Résumé du protocole (Rev. 08)

NucleoSpin® RNA Plus XS

1 Homogénéiser et lyser l'échantillon		100 µL LB1 Homogénéiser 100 µL LB2
2 Éliminer l'ADNg et filtrer le lysat		100 x g, 2 min 11,000 x g, 10 s
3 Ajuster les conditions de fixation		150 µL BSXS Mélanger
4 Fixer l'ARN		Charger le lysat 300 x g, 1 min 11,000 x g, 10 s
5 Laver et sécher la membrane de silice		1 ^{er} lavage 100 µL MDB 11,000 x g, 10 s 2 ^{ème} lavage 500 µL WB2 11,000 x g, 10 s 3 ^{ème} lavage 200 µL WB2 < 20,000 x g, 2 min
6 Eluer l'ARN		10–20 µL RNase-free H ₂ O 11,000 x g, 1 min

Sommaire

1 Composants	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur	5
1.3 Environnement de travail exempt de RNases	5
1.4 A propos de ce manuel	6
2 Description du produit	7
2.1 Principe général	7
2.2 Caractéristiques du kit	7
2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons	9
2.4 Procédures d'élution	10
2.5 Stabilité de l'ARN purifié	10
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	11
4 Instructions de sécurité	12
4.1 Élimination des déchets	12
5 Protocole NucleoSpin® RNA Plus XS	13
6 Annexes	16
6.1 Élimination de l'ADN	16
6.2 Guide de résolution des problèmes	18
6.3 Informations de commande	21
6.4 Restrictions d'utilisation / garantie	22
6.5 Versions linguistiques et prédominance	22

1 Composants

1.1 Contenu du kit

NucleoSpin® RNA Plus XS			
REF	10 preps 740990.10	50 preps 740990.50	250 preps 740990.250
Tampon de lyse LB1	6 mL	6 mL	30 mL
Tampon de lyse LB2	6 mL	6 mL	30 mL
Solution de fixation BSXS	10 mL	10 mL	50 mL
Tampon de lavage MDB	10 mL	10 mL	30 mL
Tampon de lavage WB2 (concentré)	6 mL	12 mL	50 mL
H ₂ O RNase-free	13 mL	13 mL	13 mL
Colonnes NucleoSpin® gDNA Removal XS (anneau jaune)	10	50	250
Colonnes NucleoSpin® RNA Plus XS (anneau bleu clair plus tube collecteur)	10	50	250
Tube collecteur (2 mL)	20	100	500
Tube collecteur (1.5 mL)	10	50	250
Notice d'utilisation	1	1	1

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

Réactifs

- Éthanol à 96–100 % (pour préparer le tampon de lavage WB2, il est recommandé d'utiliser de l'éthanol non dénaturé)

Consommables

- Tubes de 1,5 mL ou 2,0 mL ou tubes de réaction PCR (pour préparer les lysats)
- Micro pilon à usage unique (Optionnel, pour l'homogénéisation de l'échantillon)
- Cônes stériles exempts de RNases
- MN Bead Tubes Type A ou C (Optionnel, voir Informations de commande)

Équipement

- Pipettes manuelles
- Vortex
- Centrifugeuse pour microtubes
- Équipement pour le broyage et l'homogénéisation des échantillons (voir le chapitre 2.3).
- Équipements de protection individuelle (p.e., blouse, gants, lunettes)

Note : des agents réducteurs supplémentaires (p.e. β -mercaptoéthanol, DTT, TCEP) ne sont pas nécessaires pour les préparations NucleoSpin® RNA Plus XS.

1.3 Environnement de travail exempt de RNases

Les composants du kit ont été testés pour garantir l'absence de RNases. Cependant, un environnement de travail exempt de RNases est également un facteur critique pour la réussite de l'extraction et de la manipulation de l'ARN. Il convient donc de suivre les recommandations générales visant à éviter la contamination par les RNases :

- Maintenir une zone séparée, des pipettes et du matériel exempts de RNases lorsque l'on travaille avec de l'ARN.
- Porter des gants pour manipuler l'ARN et les réactifs afin d'éviter tout contact avec la peau, qui est une source de RNases. Changer fréquemment de gants.
- Utiliser des tubes en plastique stériles exempts de RNases. Des tubes collecteurs (2 mL, pour récupérer les filtrats et 1,5 mL pour l'élution) sont fournis dans le kit. Les tubes pour la préparation du lysat doivent être fournis par l'utilisateur.
- Utiliser l'eau RNase-free fournie avec le kit pour l'élution.
- Garder tous les composants du kit dans leur emballage et tous les contenants hermétiquement fermés en dehors des étapes de pipetage.

1.4 A propos de ce manuel

Il est fortement recommandé de lire les paragraphes détaillés du protocole de ce manuel d'utilisation si le kit **NucleoSpin® RNA Plus XS** est utilisé pour la première fois. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Le résumé du protocole est conçu pour être utilisé uniquement comme un outil supplémentaire de référence rapide pendant l'exécution de la procédure de purification.

Toute la documentation technique est disponible sur Internet à l'adresse suivante : **www.mn-net.com**.

Veuillez contacter le service technique pour obtenir des informations sur les modifications apportées au présent manuel d'utilisation par rapport aux révisions précédentes.

2 Description du produit

2.1 Principe général

Le kit **NucleoSpin® RNA Plus XS** est conçu pour purifier l'ARN à partir de petites quantités de divers types de cellules et de tissus. Ce kit contient la colonne NucleoSpin® gDNA Removal XS qui permet d'éliminer rapidement et efficacement l'ADN génomique sans étape de digestion à la DNase.

L'un des aspects les plus importants lors de l'extraction de l'ARN est d'empêcher la dégradation de l'ARN. Les cellules et les tissus sont d'abord lysés par incubation dans un tampon de lyse fortement concentré en ions chaotropiques (LB1 + LB2), qui inactive immédiatement les RNases. Le lysat est ajouté à la colonne NucleoSpin® gDNA Removal XS (anneaux jaunes) pour clarifier le lysat et éliminer l'ADNg contaminant. Après l'ajout de la solution de fixation BSXS au filtrat, l'ARN est fixé à la colonne **NucleoSpin® RNA Plus XS** (anneaux bleu clair). Les étapes de lavage ultérieures éliminent les sels, les métabolites et les composants cellulaires macromoléculaires. L'ARN de haute qualité est élué avec du H₂O RNase-free.

La préparation de l'ARN à l'aide des kits **NucleoSpin® RNA Plus XS** peut être effectuée à température ambiante.

L'éluat doit être traité avec soin car l'ARN est très sensible aux traces de contamination par les RNases, souvent présentes sur le matériel de laboratoire, les doigts et la poussière. Garder l'ARN congelé à -20 °C pour un stockage à court terme ou à -70 °C pour un stockage à long terme afin de garantir la stabilité de l'ARN.

2.2 Caractéristiques du kit

- Les kits **NucleoSpin® RNA Plus XS** sont recommandés pour l'extraction d'ARN à partir de petites quantités de cellules en culture et de tissus. Les kits **NucleoSpin® RNA Plus XS** permettent la purification d'ARN de haute qualité. Le rapport ARN A_{260}/A_{280} est généralement supérieur à 1,9 (mesuré dans un tampon TE, pH 7,5).
- L'ARN purifié est prêt à être utilisé dans diverses applications en aval.
- L'ARN purifié avec le kit **NucleoSpin® RNA Plus XS** est d'une grande intégrité. L'indice d'intégrité de l'ARN (RIN) ou l'indice de qualité de l'ARN (RQN) de l'ARN purifié à partir d'échantillons frais de haute qualité (p.e. cellules eucaryotes ou foie de souris frais) est généralement supérieur à 8. Toutefois, l'intégrité de l'ARN dépend fortement de la qualité de l'échantillon et d'une concentration suffisante d'ARN.
- Les molécules d'ARN purifiées avec le kit **NucleoSpin® RNA Plus XS** sont d'une taille supérieur à 100 nucléotides. Ainsi, le kit **NucleoSpin® RNA Plus XS** permet un enrichissement en ARNm et en ARNr. L'ARN purifié avec les kits **NucleoSpin® RNA Plus XS** peut contenir d'infimes quantités d'ADN génomique en raison du relarguage de ces molécules de la colonne NucleoSpin® gDNA Removal XS. La probabilité de détection de l'ADN contaminant par PCR augmente avec :
 1. Le nombre de copies d'ADN par préparation : cible à copie unique < cible plasmidiale / mitochondriale < plasmides transfectés dans les cellules.
 2. la diminution de la taille de l'amplicon PCR.

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques du kit

Paramètres	NucleoSpin® RNA Plus XS
Technologie	Système avec 2 colonnes à membrane de silice : 1. colonne XS pour l'élimination de l'ADN 2. colonne XS pour l'extraction de l'ARN
Utilisation	Réserver à l'usage de la recherche
Format	Mini colonne à centrifuger - Modèle XS
Procédure	Manipulation manuelle et centrifugation
Échantillon	< 10 ⁵ cellules en culture < 5 mg de tissu
Taille du fragment	> 100 nt
Rendement typique	10 ⁵ cellules HeLa : environ 500–2000 ng 10 ⁴ cellules HeLa : environ 50–200 ng 10 ³ cellules HeLa : environ 5–20 ng 10 ² cellules HeLa : environ 0,5–2 ng 10 ¹ cellules HeLa : environ 0,05–0,2 ng 1 cellule HeLa : environ 0,005–0,02 ng 5000 µg de foie : environ 300–500 ng 500 µg de foie : environ 300–500 ng 50 µg de foie : environ 100–250 ng 5 µg de foie : environ 25–70 ng 0,5 µg de foie : environ 2,5–8 ng 0,05 µg de foie : environ 0,25–1,2 ng 0,005 µg de foie : 0,025–0,2 ng
A_{260}/A_{280}	1.9–2.2*
A_{260}/A_{230}	1.5–2.5*
Niveau d'intégrité de l'ARN (RIN)	> 8*
Volume d'élution	5–30 µL
Temps de préparation	18 min/6 preps
Capacité de fixation	110 µg

*La qualité de la détermination des rapports dépend fortement d'une quantité suffisante d'ARN mesurée. Veiller à utiliser une quantité suffisante d'ARN qui a été validée pour permettre une détermination significative du rapport !

2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons

La quantité maximale d'échantillon pouvant être utilisée avec le kit **NucleoSpin® RNA Plus XS** dépend du type d'échantillon et de sa teneur en ARN et en ADN.

Quantité maximale d'échantillon à utiliser par préparation (valeurs approximatives) :

- Cellules eucaryotes (p.e., cellules HeLa) : 10⁵ cellules
- Tissu animal : 5 mg (poids humide) p.e. foie, rein, ou 1 mg rate (poids humide)

Stockage des échantillons et inhibition des RNases

Les RNases dégradent rapidement l'ARN contenu dans les échantillons si ceux-ci ne sont pas protégés de l'activité des RNases après la collecte.

- Utiliser l'échantillon fraîchement collecté pour une lyse immédiate et une purification de l'ARN.
- Conserver les échantillons dans le tampon de lyse après broyage à -70 °C jusqu'à un an, à 4 °C jusqu'à 24 heures ou à température ambiante jusqu'à plusieurs heures. Les échantillons congelés dans le tampon de lyse doivent être décongelés comme suit avant de commencer l'extraction de l'ARN.
Placer les tubes congelés dans un bain-marie avec de l'eau tiède (maximum 37 °C) ou dans un thermocycleur réglé à 37 °C (avec agitation). Rester à proximité et vérifier les tubes toutes les 30 secondes jusqu'à ce qu'ils soient complètement décongelés. Dès que les échantillons sont décongelés, retirer rapidement les tubes du bain et placer les à température ambiante. Vous pouvez ensuite passer à l'étape 2 du protocole standard.
- 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.
- Submerger et conserver les échantillons dans la solution de stabilisation NucleoProtect® RNA ou RNAlater®. Veiller à une imprégnation complète de l'échantillon avec la solution de stabilisation avant de le congeler. Retirer l'excès de solution de stabilisation de l'échantillon avant l'extraction de l'ARN conformément au manuel d'utilisation de la solution de stabilisation.

Broyage et homogénéisation de l'échantillon

Cellules adhérentes

Aspirer complètement le milieu de culture cellulaire et ajouter immédiatement le tampon de lyse LB1 dans la boîte de culture cellulaire. L'élimination de milieu doit être complète afin de permettre une activité de lyse optimale du tampon de lyse. Pour la lyse, vortexer vigoureusement les cellules.

Trypsiniser les cellules adhérentes en croissance :

Aspirer le milieu de culture cellulaire et ajouter une quantité équivalente de PBS afin de laver les cellules en culture. 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 le milieu de culture cellulaire, transférer les cellules dans un

tube approprié (non fourni) et les culotter par centrifugation pendant 5 min à 300 x *g*. Retirer le surnageant et poursuivre l'ajout du tampon de lyse au culot cellulaire.

Cellules en suspension

Centrifuger les cellules pendant 5 min à 300 x *g*, éliminer complètement le surnageant et ajouter directement le tampon de lyse LB1 au culot cellulaire. Vortexer vigoureusement pour la remise en suspension et la lyse.

Échantillons de tissus

- Le broyage peut être effectué par des billes MN Bead Tubes Type A ou C (voir informations de commande). En combinaison avec un Vortex-Genie® 2, les tubes peuvent être montés sur un MN Bead Tube Holder (voir informations de commande). Ajouter l'échantillon et le tampon de lyse LB1 dans le tube de billes et agiter pendant 5 min. Les MN Bead Tubes Type A peuvent également être utilisés avec un broyeur à billes. Il n'est pas recommandé d'utiliser les MN Bead Tubes Type C avec un broyeur à billes. Cela peut être nécessaire pour certains types de tissus (p.e., poumon, tissu cardiaque). La durée et la fréquence optimales doivent être déterminées expérimentalement. Il est recommandé de réduire la quantité de billes dans le tube d'environ 400 µL à environ 70 µL-100 µL de billes afin de permettre un retrait efficace du lysat du tube de billes.
- Les pistons pour microtubes peuvent être utilisés pour homogénéiser du matériel congelé ou du matériel frais dans le tampon de lyse LB1 directement dans un tube de microcentrifugeuse.

Pour les échantillons de tissus, le lysat doit être clarifié par centrifugation pendant 3 min à 5000 x *g*. Le surnageant est prêt à être utilisé pour le protocole **NucleoSpin® RNA Plus XS**. Pour les cellules cultivées, une clarification n'est généralement pas nécessaire

2.4 Procédures d'élution

Il est recommandé d'utiliser des volumes d'élution compris entre 5 et 30 µL. Le volume d'élution par défaut est de 10–20 µL.

2.5 Stabilité de l'ARN purifié

L'ARN élué doit toujours être conservé sur de la glace pendant le travail pour une stabilité optimale. La contamination par des RNases presque omniprésentes (sur du matériel de laboratoire, les doigts, la poussière) peut entraîner la dégradation de l'ARN purifié. Pour un stockage à court terme, congeler l'ARN à -20 °C, pour un stockage à long terme, congeler à -70 °C.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention :

Les tampons LB1, LB2 et MDB contiennent du sel chaotropique. Porter des gants et des lunettes !

ATTENTION : Les tampons LB1, LB2 et MDB contiennent du sel chaotropique qui peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec 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.

- Tous les composants du kit doivent être conservés entre 15 et 25 °C et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette du kit. Le stockage à des températures inférieures peut entraîner la précipitation de sels.

Avant de débiter une procédure **NucleoSpin® RNA Plus XS**, préparer les éléments suivants :

- Tampon de lavage WB2 :** ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96–100 % (voir tableau ci-dessous) au tampon WB2 concentré. Marquer l'étiquette du flacon pour indiquer que de l'éthanol a été ajouté. Le tampon de lavage WB2 peut être conservé à 15–25 °C pendant au moins un an.
- Si nécessaire, aliquoter l'eau RNase-free dans des tubes de 1,5 mL exempt de RNases (non fournis) afin d'éviter une contamination accidentelle de l'eau par la RNases en cas d'ouverture répétée du flacon.

NucleoSpin® RNA Plus XS			
REF	10 preps 740990.10	50 preps 740990.50	250 preps 740990.250
Tampon de lavage WB2 (concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol	50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoSpin® RNA Plus XS**, porter des vêtements de protection appropriés (p.e. 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).



Attention : Le thiocyanate de guanidinium contenu dans les tampons LB1 et LB2 peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné à de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

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

4.1 Elimination des déchets

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

5 Protocole NucleoSpin® RNA Plus XS

Avant de débiter la procédure :

Vérifier si le tampon de lavage WB2 a été préparé conformément au chapitre 3.

1 Homogénéiser et lyser l'échantillon

Broyer et clarifier l'échantillon selon l'une des méthodes décrites au chapitre 2.3 en utilisant **100 µL de tampon de lyse LB1**.



100 µL LB1
Homogénéiser
100 µL LB2

Cellules

Ajouter LB1 et vortexer vigoureusement.

Tissus

Homogénéiser en présence de LB1 en utilisant un pilon de microtube ou par broyage avec des billes.

Clarifier les lysats de tissus par centrifugation pendant **3 min à 5000 x g**. Si un culot visible est observé, il est recommandé de transférer le surnageant dans un tube frais et de jeter le culot.

Note : Le tube de lyse n'est pas inclus dans le kit. L'ajout d'un agent réducteur (p.e. β-mercaptoéthanol, DTT ou TCEP) n'est pas nécessaire.

Ajouter **un volume de tampon de lyse LB2** au lysat (typiquement 100 µL) et mélanger.

Note : 100 µL de LB1 suffisent pour la lyse d'échantillons d'un volume < 20 µL (p.e., 1 mg de tissu ou des suspensions de cellules à faible titre). Pour la procédure d'échantillons plus importants (p.e. suspensions cellulaires de > 20 µL) ou si un volume de lysat plus important est souhaité (p.e. pour le broyage avec les billes), augmenter proportionnellement les volumes de tampon de fixation LB1, LB2 et de solution de fixation BSXS. Attention, il ne faut pas dépasser 180 µL de LB1 (+ 180 µL de LB2 + 270 µL de BSXS) en raison du volume restreint de la colonne et du tube collecteur. Si des volumes plus importants de LB1 (REF 740368.30) et LB2 (REF 740369.30) sont utilisés, du tampon supplémentaire doit être commandé séparément, voir 6.3 Informations de commande.

2 Éliminer l'ADNg et filtrer le lysat

Placer une **colonne NucleoSpin® gDNA Removal XS** (anneau jaune) dans un tube collecteur (2 mL, fourni), **transférer** le **lysat** homogénéisé (~200 µL) dans la colonne et centrifuger pendant **2 min** à **100 x g** suivi de **10 s** à **11 000 x g**.

100 x g,
2 min11,000 x g,
10 s

Jeter la colonne et **poursuivre le filtrat**.

Note : S'assurer qu'il ne reste plus de liquide sur la membrane de la colonne après la centrifugation. Si nécessaire, répéter la centrifugation jusqu'à ce que tout le liquide ait traversé la membrane. La faible vitesse de centrifugation permet une élimination performante de l'ADN génomique..

3 Ajuster les conditions de fixation de l'ARN

Ajouter **150 µL de solution de fixation BSXS** (1,5 volume par rapport au LB1) au filtrat et bien mélanger par en vortexant de manière modérée ou par pipetages successifs.

150 µL BSXS
Mélanger

Note : Si le mélange se fait par vortex, il faut faire attention à ne pas renverser de liquide, car le tube collecteur ne dispose pas de couvercle.

4 Fixer l'ARN

Transférer la totalité du **lysat** (~350 µL) dans la **colonne NucleoSpin® RNA Plus XS** (anneau bleu clair) préassemblée avec un tube collecteur.



Charger le lysat

300 x g,
1 min

Centrifuger pendant **1 min** à **300 x g** suivi de **10 s** à **11 000 x g**.

11,000 x g,
10 s

Note : Le filtrat peut rester dans le tube collecteur.

5 Laver et sécher la membrane de silice**1er lavage**

Ajouter **100 µL de tampon de lavage MDB** sur la colonne.

Centrifuger pendant **10 s à 11 000 x g**.

Jeter le filtrat avec le tube collecteur et placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL (fourni).



100 µL MDB

11,000 x g,
10 s**2ème lavage**

Ajouter **500 µL de tampon WB2** sur la colonne.

Centrifuger pendant **10 s à 11 000 x g**.

Jeter le filtrat et réutiliser le tube collecteur.



500 µL WB2

11,000 x g,
10 s**3ème lavage**

Ajouter **200 µL de tampon WB2** sur la colonne.

Centrifuger pendant **2 min à pleine vitesse** (< 20 000 x g) pour sécher la membrane.

Placer la colonne dans un **tube collecteur** (1,5 mL, fourni).



200 µL WB2

< 20,000 x g,
2 min

Note : Si, pour une raison quelconque, le niveau de liquide dans le tube collecteur a atteint la colonne après la centrifugation, jeter le filtrat et centrifuger à nouveau.

6 Eluer l'ARN

Ajouter **10–20 µL de H₂O RNase-free** et centrifuger **1 min à 11 000 x g**.

Note : Le volume d'éluion peut varier de 5 µL à 30 µL.

10–20 µL
RNase-free
H₂O11,000 x g,
1 min

6 Annexes

6.1 Élimination de l'ADN

Si les échantillons à forte teneur initiale en ADN sont analysés par des applications en aval très sensibles à la contamination par l'ADN, une digestion supplémentaire de l'ADN peut s'avérer nécessaire. Le protocole pour les traitements à la DNase est donné ci-dessous.

Protocole A : digestion de l'ADN en solution

1 Digérer l'ADN (préparation de la réaction)

Ajouter **1 µL de tampon de réaction pour la rDNase** et **0,1 µL de rDNase** à **10 µL d'ARN élué**.

Note : On peut aussi mélanger au préalable 100 µL de tampon de réaction pour la 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 x g) pour recueillir chaque gouttelette de la solution au fond du tube.

2 Incuber l'échantillon

Incuber pendant **10 min à 37 °C**.

3 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 ou NucleoSpin® RNA Clean-up XS (voir 6.3 Informations de 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 de **quelques minutes à quelques heures à -20 °C ou 4 °C**.

Note : Choisir 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 min à vitesse maximale**.

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

Sécher le culot d'ARN et remettre l'ARN en suspension dans du H₂O RNase-free.

Protocole B : digestion de l'ADN sur colonne

1 Reconstitution de la rDNase

Ajouter 4 mL de tampon de réaction pour la rDNase dans un flacon de rDNase de taille F et dissoudre la DNase.

2 Digestion sur colonne

Suivre la procédure de purification conformément au paragraphe 5 jusqu'à ce que la colonne ait été lavée avec 100 µL de tampon de lavage MDB (étape 5).

Appliquer **95 µL de mélange réactionnel rDNase** directement au centre de la membrane de silice de la colonne.

Incuber à température ambiante pendant 15 min.

Poursuivre la procédure 5.1, étape 5, en ajoutant 200 µL de tampon WB2 sur la colonne.

6.2 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
ARN dégradé / Pas d'ARN	<p><i>Contamination par des RNases</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Créer un environnement de travail exempt de RNases. Porter des gants pendant toutes les étapes de la procédure. Changer de gants fréquemment. 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 autoclavée pendant au moins 2 heures à 250 °C avant d'être utilisée.
	<p><i>Qualité insuffisante de l'échantillon</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Contrôler la collecte, le stockage et la lyse des échantillons. Veiller à ce que les échantillons soient récoltés, stockés et lysés de manière adéquate afin de préserver l'intégrité de l'ARN. Voir le chapitre 3.
Faible qualité ou rendement de l'ARN	<p><i>Mauvaise utilisation ou stockage inadéquat des réactifs</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Les réactifs n'ont pas été correctement préparés. Ajouter le volume indiqué d'éthanol à 96 % au tampon WB2 concentré et mélanger. L'échantillon et les réactifs n'ont pas été complètement mélangés. Toujours vortexer vigoureusement après l'ajout de chaque réactif. Aucune solution de fixation BSXS n'a été ajoutée après la lyse. La liaison de l'ARN à la membrane de silice n'est efficace qu'en présence de la solution de fixation.
	<p><i>Stockage du kit</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Conserver les composants du kit à température ambiante. Le stockage à basse température peut provoquer une précipitation de sel. Garder les bouteilles bien fermées afin d'éviter l'évaporation ou la contamination.

Ajuster le rendement et la pureté de vos acides nucléiques



www.mn-net.com/de/nucleic-acid-fine-tune

La force ionique et le pH influencent l'absorption de l' A_{260} ainsi que le rapport A_{260}/A_{280} .

Pour les mesures d'adsorption, utiliser 5 mM Tris pH 8.5 comme diluant. Voir aussi :

- Manchester, K L. 1995. Valeur des rapports A_{260}/A_{280} pour la mesure de la pureté des acides nucléiques. *Biotechniques* 19, 208–209.
- Wilfinger, W W, Mackey, K et Chomczynski, P. 1997. Effet du pH et de la force ionique sur l'évaluation spectrophotométrique de la pureté des acides nucléiques. *Biotechniques* 22, 474–481.

Faible qualité
ou rendement
de l'ARN (suite)

Échantillons

- L'échantillon n'a pas été stocké correctement. 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 de lyse LB1. Effectuer le broyage des échantillons dans de l'azote liquide. Il est également possible d'utiliser des solutions de stabilisation de l'ARN pour protéger l'ARN de la dégradation (p.e. NucleoProtect® RNA ; voir informations de commande).
- Broyage et/ou homogénéisation insuffisants des échantillons. Assurer un broyage complet de l'échantillon.

Contamination de thiocyanate de guanidinium

- Charger soigneusement le lysat dans la colonne NucleoSpin® RNA Plus XS et éviter une contamination de la partie supérieure de la colonne et du couvercle de la colonne.
- S'assurer qu'une quantité / concentration suffisante d'ARN est utilisée pour la quantification afin que la valeur A_{230} soit significativement plus élevée que le bruit de fond.
- La mesure d'une faible quantité / concentration d'ARN entraînera des valeurs instables du rapport A_{260}/A_{230} .

Faible rapport
 A_{260}/A_{230}

Échantillon

Colonne
NucleoSpin®
colmatée /
Faible qualité
ou rendement
de l'ARN

- Utilisation d'une trop grande quantité d'échantillons. Une surcharge peut entraîner une diminution du rendement global. Réduire la quantité d'échantillon ou utiliser un plus grand volume de tampon de lyse.
 - Broyage et/ou homogénéisation insuffisants du matériel de départ. Veiller à un broyage complet de l'échantillon et utiliser la colonne NucleoSpin® gDNA Removal XS pour l'élimination de l'ADN et pour faciliter l'homogénéisation du matériel de départ broyé.
 - Augmenter la *force g* et la durée de centrifugation si nécessaire.
-

Trop de matériel cellulaire utilisé

- Réduire la quantité de cellules ou de tissus utilisés.

Le système de détection de l'ADN est trop sensible

Contamination
de l'ARN
par l'ADN
génomique

- La colonne NucleoSpin® gDNA Removal XS permet de réduire efficacement la contamination par l'ADN. Toutefois, il n'est pas possible de garantir que l'ARN purifié est exempt à 100 % d'ADN ; par conséquent, dans des applications très sensibles, il peut encore être possible de détecter de l'ADN. La probabilité de détection de l'ADN par PCR augmente avec :
 - le nombre de copies d'ADN par préparation : cible à copie unique < cible plasmidiale / mitochondriale < plasmide transfecté dans les cellules
 - diminution de la taille de l'amplicon PCR.
- Utiliser si possible des cibles PCR plus grandes (p.e. > 500 bp) ou des amorces encadrant des introns.
- **Utiliser le protocole additionnel 6.1 pour la digestion de la rDNase en solution.**

Contamination par de l'éthanol ou du sel

Performance
sous-optimale
de l'ARN
dans les
expériences en
aval

- Ne pas laisser le filtrat toucher la sortie de la colonne après le deuxième lavage au tampon WB2. Veiller à centrifuger à la vitesse correspondante pendant la durée correspondante afin d'éliminer complètement le tampon éthanolique WB2.
- Vérifier que le tampon WB2 a été équilibré à la température ambiante avant utilisation. Le lavage à des températures plus basses réduit l'efficacité de l'élimination des sels par le tampon WB2.

Conserver correctement l'ARN purifié

- L'ARN élué doit toujours être conservé sur de la glace pour une stabilité optimale, car les traces de contamination par les RNases omniprésentes (sur le matériel de laboratoire, les doigts, la poussière) seront susceptibles de dégrader l'ARN purifié. Pour un stockage à court terme, congeler à -20 °C, pour un stockage à long terme, congeler à -70 °C.

Trop d'échantillons

Contamination
excessive en
ADNg

- A : Utiliser 150 µL de LB1 et 50 µL de LB2 au lieu d'un rapport 1 :1. Ceci réduira la contamination par l'ADNg, mais également le rendement ARN. Cependant le ratio ARN/ADN sera amélioré.
- B : Effectuer une digestion de l'ADN en solution ou sur colonne conformément au paragraphe 6.1.

Conserver correctement l'ARN purifié

LB2 non appliqué

Pas de rendement en ARN

- Pour des résultats optimaux, la lyse doit être effectuée dans le LB1, puis le lysat doit être mélangé avec un volume de LB2. Si seule la LB1 est utilisée, l'ADN et l'ARN se fixeront à la colonne NucleoSpin® gDNA Removal XS.

6.3 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® RNA Plus XS	740990.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® RNA Plus	740984.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoZOL	740404.200	200 mL
NucleoSpin® RNA Set for NucleoZOL	740406.50	50
NucleoSpin® RNA Clean-up	740948.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoSpin® RNA Clean-up XS	740903.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
rDNase Set	740963	1
Tubes collecteurs	740600	1000
Tampon de lyse LB1	740368.30	30 mL
Tampon de lyse LB2	740369.30	30 mL
MN Bead Tubes Type A	740786.50	50
MN Bead Tubes Type C	740813.50	50
MN Bead Tube Holder	740469	1
NucleoProtect® RNA	740400.50 / .250 / .500	50 / 250 / 500 mL

6.4 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
Tél.: +49 24 21 969-333
support@mn-net.com

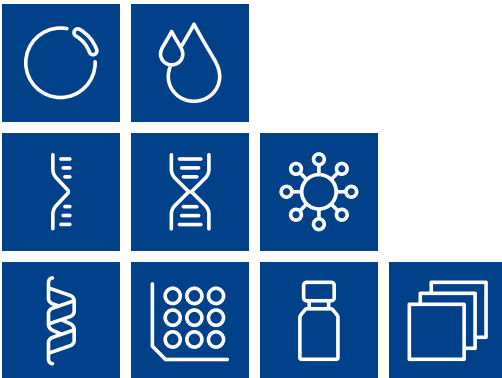
6.5 Versions linguistiques et prédominance

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

Marques déposées / clause de non-responsabilité :

RNAlater[®] est une marque déposée d'AMBION, Inc.
NucleoSpin[®] est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG
Vortex-Genie[®] 2 est une marque déposée de Scientific Industries.

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



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

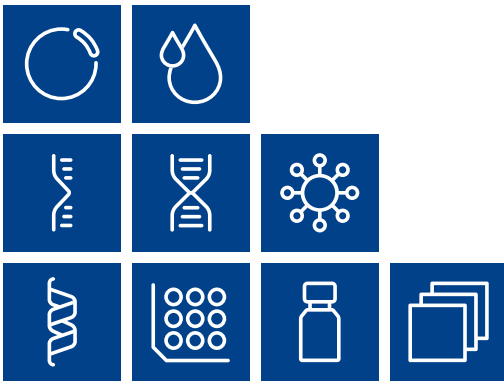
Viral RNA and DNA

Protein

High throughput

Accessories

Auxiliary tools



MACHEREY-NAGEL

www.mn-net.com

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

DE +49 24 21 969-0 info@mn-net.com

CH +41 62 388 55 00 sales-ch@mn-net.com

FR +33 388 68 22 68 sales-fr@mn-net.com

US +1 888 321 62 24 sales-us@mn-net.com

