

MACHEREY-NAGEL

# Manuel d'utilisation



■ NucleoMag® RNA Blood

Avril 2024 / Rev. 02

## Contact MN

### Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG  
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany  
Tel.: +49 24 21 969-0  
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)  
E-mail: [info@mn-net.com](mailto:info@mn-net.com)

### Technical Support Bioanalysis

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

### USA

MACHEREY-NAGEL Inc.  
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA  
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)  
E-mail: [sales-us@mn-net.com](mailto:sales-us@mn-net.com)

### France

MACHEREY-NAGEL SAS  
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France  
Tel.: +33 388 68 22 68  
E-mail: [sales-fr@mn-net.com](mailto:sales-fr@mn-net.com)

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €  
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

### Switzerland

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

## Sommaire

1 Composants	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, équipements et consommables à fournir par l'utilisateur	4
1.3 Tampons, consommables et équipements supplémentaires à fournir pour la procédure de traitement des Tempus™ Blood RNA Tubes	6
1.4 Tampons supplémentaires à fournir pour la procédure de traitement des tubes collecteurs de sang EDTA/citrate	6
1.5 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	8
2.4 Systèmes de séparation magnétique	8
2.5 Réglage des paramètres d'agitation	10
2.6 Manipulation des billes	11
2.7 Procédures d'éluion	12
2.8 Assistance à l'automatisation	12
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	13
4 Instructions de sécurité	14
4.1 Elimination des déchets	14
5 Extraction d'ARN à partir de sang prélevé dans des tubes collecteurs S-Monovette® RNA Exact de SARSTEDT ou DNA/RNA Shield™Blood de Zymo Research.	15
6 Extraction d'ARN à partir de sang collecté dans des tubes Tempus™ Blood RNA	21
7 Extraction d'ARN à partir de sang prélevé dans des tubes collecteurs EDTA/Citrate	29
8 Annexes	35
8.1 Guide de résolution des problèmes	35
8.2 Informations de commande	37
8.3 Restrictions d'utilisation du produit/garantie	38
8.4 Versions linguistiques et prédominance	38

# 1 Composants

## 1.1 Contenu du kit

NucleoMag® RNA Blood		
REF	1 × 96 preps 744352.1	4 × 96 preps 744352.4
NucleoMag® B-Beads	1.8 mL	4 × 1.8 mL
Tampon de fixation MRB1	50 mL	200 mL
Tampon de lavage MRB2	125 mL	1 × 300 mL 1 × 125 mL
H <sub>2</sub> O RNase-free	30 mL	60 mL
Protéinase K liquide	1.8 mL	7 mL
rDNase, lyophilisée*	3 flacons (taille D)	12 flacons (taille D)
Tampon de réaction pour la rDNase	60 mL	3 × 60 mL
Notice d'utilisation	1	1

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

### Réactifs

- Éthanol à 80 % (v/v) pour les étapes de lavage (éthanol absolu ou non dénaturé)

### Échantillons

- Echantillons de sang, collectés dans des tubes collecteurs de sang EDTA/citrate ou dans l'un des tubes collecteurs de sang suivants (les tubes collecteurs de sang ne sont pas fournis avec le kit NucleoMag® RNA Blood) :

Tube collecteur de sang	Fournisseur
S-Monovette® RNA Exact	SARSTEDT (01.2048.001)
Tempus™ Blood RNA Tubes	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (4342792)
DNA/RNA Shield™ Blood Tubes	Zymo Research (R1150)

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

**Consommables**

- Cônes de pipette stériles RNase-free (recommandé)

<b>Produit</b>	<b>REF</b>	<b>Conditionnement</b>
<b>Système de séparation magnétique</b> p.e., NucleoMag <sup>®</sup> SEP (voir le paragraphe 2.3) ; il est également possible d'utiliser des dispositifs de manipulation des liquides ou des extracteurs à barreaux magnétique automatisés tels que IsoPure <sup>™</sup> Mini, MagnetaPure 32 Plus ou KingFisher <sup>®</sup> Flex*.	744900	1
<b>Plaques pour la séparation des billes magnétiques,</b> p.e., Square-well Block (bloc 96 puits avec des puits carrés de 2.1 mL)	740481 740481.24	4 24
<b>Consommables pour l'automate KingFisher<sup>®</sup> Flex :</b> ex. Kit d'accessoires '96-well Accessory Kit B' pour KingFisher <sup>™</sup> (Square-well Blocks, tip combs, plaques d'éluion pour 4 × 96 preps NucleoMag <sup>®</sup> RNA Blood).	744951	1 set
<b>Plaques 96 Deep-well pour les systèmes à barreaux magnétiques</b> p.e. pour MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure <sup>™</sup> Mini	744955	25
<b>Tip Combs 8 positions pour les systèmes à barreaux magnétiques</b> p.e. pour MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure <sup>™</sup> Mini	744960	50

\*Veuillez contacter MACHEREY-NAGEL pour une assistance technique.

### **1.3 Tampons, consommables et équipements supplémentaires à fournir pour la procédure de traitement des Tempus™ Blood RNA Tubes**

- Tampon de lyse DL (REF 740202.32 ; flacon de 100 mL ; voir les informations de commande)
- H<sub>2</sub>O RNase-free (REF 740378.1000 flacon de 1000 mL ; voir les informations de commande)
- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS)
- Tubes coniques de 50 mL avec bouchon à vis
- Vortex, p.e. Vortex-Genie®2 (Scientific Industries)
- Centrifugeuse avec rotor à godet pivotant et adaptateurs pour tubes coniques de 50 mL (capacité de 4 °C, 3000 à 4400 × g)

### **1.4 Tampons supplémentaires à fournir pour la procédure de traitement des tubes collecteurs de sang EDTA / citrate**

- Tampon de lyse DL (REF 740202.32 ; flacon de 100 mL ; voir les informations de commande)
- Tampon de lavage RAW (REF 740361.150 ; flacon de 150 mL ; voir les informations de commande)

### **1.5 A propos de ce manuel**

Il est fortement recommandé aux nouveaux utilisateurs de lire les paragraphes détaillés du protocole du kit NucleoMag® RNA Blood avant d'utiliser ce produit. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Le résumé du protocole est conçu pour être utilisé uniquement comme un outil de suivi rapide de la procédure de purification.

Toute la documentation technique est disponible sur Internet à l'adresse suivante : **[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)**

## 2 Description du produit

### 2.1 Principe général

Le kit **NucleoMag® RNA Blood** permet d'extraire l'ARN à partir d'échantillons de sang. Les tubes collecteurs de sang avec stabilisation des ARN de SARSTEDT, Zymo Research et Thermo Fisher Scientific ainsi que les tubes collecteurs de sang EDTA/citrate peuvent être traités. La procédure **NucleoMag® RNA Blood** est basée sur l'adsorption réversible d'acides nucléiques sur des billes paramagnétiques dans des conditions de tampons appropriées. La lyse des échantillons est réalisée par une digestion à la protéinase K. Pour ajuster les conditions dans lesquelles les acides nucléiques se lient aux billes paramagnétiques, le tampon MRB1 et les NucleoMag® B-Beads sont ajoutés au lysat. Après la séparation magnétique et deux étapes de lavage, les billes paramagnétiques sont incubées avec une DNase recombinante pour éliminer l'ADN copurifié. Après une étape de refixation de l'ARN, les contaminants résiduels et les sels sont éliminés par une étape de lavage supplémentaire. L'éthanol résiduel de l'étape de lavage précédente est éliminé par séchage à l'air. Enfin, l'ARN hautement pur est élué avec de l'H<sub>2</sub>O RNase-free et l'ARN peut être directement utilisé pour des applications en aval. Le kit peut être utilisé manuellement ou automatiquement sur des robots pipeteurs standard ou des séparateurs magnétiques automatisés.

**Les tubes collecteurs de sang S-Monovette® RNA Exact de SARSTEDT et DNA/RNA Shield™ Blood de Zymo Research peuvent être traités avec le même protocole. Les tubes de prélèvement de sang dans EDTA/citrate et de Tempus™ Blood RNA de Thermo Fisher Scientific nécessitent une procédure avec un protocole adapté (voir paragraphe 5 ou paragraphe 6).**

### 2.2 Caractéristiques du kit

- Le kit **NucleoMag® RNA Blood** est conçu pour la préparation rapide, manuelle et automatisée à petite échelle d'ARN très pur à partir d'échantillons de sang stabilisés ou EDTA/citrate. Le kit est conçu pour être utilisé avec le séparateur magnétique NucleoMag® SEP (voir les informations de commande, paragraphe 8.2) ou d'autres systèmes de séparation magnétique (voir paragraphe 2.4). En règle générale, 96 échantillons peuvent être purifiés en 120 minutes lorsque la purification est effectuée manuellement à l'aide du NucleoMag® SEP, ou en 90 minutes environ avec les systèmes de barreaux magnétiques automatisés, selon le type et la configuration du système.
- L'ARN purifié peut être utilisé directement comme matrice pour la RT-PCR ou tout type de réaction enzymatique.
- Grâce à la DNase recombinante fournie avec le kit, l'ARN élué est pratiquement exempt d'ADN.
- Réserver à l'usage de la recherche.
- **NucleoMag® RNA Blood** permet une automatisation facile sur les instruments courants de manipulation des liquides ou les séparateurs magnétiques automatisés, par exemple les instruments MagnetaPure 32 Plus et IsoPure™ de MACHEREY-NAGEL ou les instruments KingFisher® de Thermo Fisher Scientific. Le

temps de préparation réel dépend de la configuration de l'instrument et du système de séparation magnétique utilisé.

- Le kit fournit des réactifs pour la purification de maximum 6 µg d'ARN pur à partir d'échantillons appropriés. Les rendements typiques se situent entre 3 µg et 4 µg d'ARN. Selon le volume d'élution utilisé, des concentrations de 40 à 80 ng/µL peuvent être obtenues.
- **Le NucleoMag® RNA Blood** peut être entièrement traité à température ambiante.
- **Les NucleoMag® B-Beads** sont des billes superparamagnétiques hautement réactives. La capacité de fixation est d'environ 0,4 µg/µL d'ARN pour 1 µL de suspension de NucleoMag® B-Beads.

## 2.3 Manipulation, préparation et stockage des échantillons

### *Environnement de travail*

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

### *Stockage des échantillons*

Le protocole est optimisé pour l'extraction de l'ARN à partir des tubes collecteurs de sang S-Monovette® RNA Exact de SARSTEDT, des DNA/RNA Shield™ Blood de Zymo Research. Les tubes Tempus™ Blood RNA de chez Thermo Fisher Scientific nécessitent cependant une adaptation du protocole.

Manipuler et conserver les tubes collecteurs de sang conformément aux instructions du fabricant. Inverser les tubes collecteurs de sang plusieurs fois avant de prélever une aliquote pour l'extraction. Décongeler les tubes de prélèvement sanguin congelés de SARSTEDT, Zymo Research ou Thermo Fisher Scientific juste avant l'extraction de l'ARN et les laisser s'équilibrer à température ambiante avant de prélever une aliquote pour l'extraction. La congélation des tubes collecteurs de sang EDTA ou citrate présente le risque de dégradation de l'ARN au cours de la procédure de décongélation.

Il est fortement recommandé de procéder à la procédure des échantillons de sang EDTA / citrate dans les quelques heures qui suivent leur collecte. Les échantillons doivent être conservés à 4 °C pendant 24 heures au maximum. Les ARNm contenus dans les cellules sanguines ont des stabilités différentes. Par conséquent, afin de s'assurer que l'ARN isolé contient une distribution représentative des ARNm, les échantillons de sang ne doivent pas être stockés pendant de longues périodes avant d'isoler l'ARN.

Porter des gants en permanence pendant la préparation. Changer fréquemment de gants.

## 2.4 Systèmes de séparation magnétique

Pour l'utilisation du NucleoMag® RNA Blood, il est recommandé d'utiliser le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. La séparation est effectuée dans un Square-well Blocks (voir les informations de commande, paragraphe 8.2). Le kit peut également être utilisé avec d'autres séparateurs courants. Voir les informations de commande des fournisseurs pour les plaques de séparation appropriées.

Séparateur magnétique	Plaque ou tube de séparation
NucleoMag® SEP (MN REF 744900)	Square-well Block (MN REF 740481/.24)
Tecan Te-MagS™	Tubes de 1,5 mL sans couvercle (Sarstedt)

### Séparation à aimants statiques

Les séparateurs à aimants statiques, par exemple, NucleoMag® SEP (pour une utilisation manuelle et sur les stations de travail de manipulation des liquides) sont recommandés en combinaison avec un agitateur de microplaques approprié pour une remise en suspension optimale des billes pendant les étapes de lavage et d'élution. Alternativement, les billes peuvent être remises en suspension dans le tampon par pipetages successifs. Pour une utilisation entièrement automatisée sur les stations de travail de manipulation des liquides, un bras manipulateur est nécessaire. La plaque est transférée vers le séparateur magnétique pour la séparation des billes et transférée vers le module agitateur pour la remise en suspension des billes.

### Systèmes magnétiques mobiles

Pour les séparateurs à aimants mobiles, les aimants/tiges magnétiques sont déplacés d'un côté à l'autre du puits et vice versa. Les billes suivent ce mouvement et sont ainsi entraînées à travers le tampon pendant les étapes de lavage et d'élution. La séparation a lieu lorsque le système s'arrête.

### Séparateurs automatisés

Pour ce type de séparateurs à aimants mobiles, les billes magnétiques sont transférées dans des plaques ou des tubes appropriés. Les billes sont remises en suspension à partir des aimants recouverts de protection. Après chaque étape de fixation, de lavage ou d'élution, les billes sont collectées et transférées automatiquement dans le réactif correspondant à l'étape suivante.

## 2.5 Réglage des paramètres d'agitation

Lors de l'utilisation d'un agitateur de plaques pour les étapes de lavage et d'élution, les paramètres d'agitation doivent être soigneusement réglés pour chaque plaque de séparation et chaque agitateur afin d'éviter toute contamination croisée d'un puits à l'autre. Procéder comme suit :

### Réglage de la vitesse de l'agitateur pour les étapes de lavage :

- Charger 900 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation. Placer la plaque sur l'agitateur et commencer à agiter avec une vitesse modérée pendant 30 secondes. Éteindre l'agitateur et vérifier la présence de petites gouttelettes d'eau colorée à la surface de la plaque.
- Augmenter la vitesse, agiter pendant 30 secondes supplémentaires et vérifier à nouveau la présence de gouttelettes à la surface de la plaque.
- Continuer à augmenter la vitesse jusqu'à ce que vous observiez des gouttelettes sur le dessus de la plaque de séparation. Réduire la vitesse, vérifier à nouveau et utiliser ce réglage pour l'étape de lavage.

### Réglage de la vitesse de l'agitateur pour l'étape d'élution :

- Charger 100 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de collecte et procéder comme décrit ci-dessus.

## 2.6 Manipulation des billes

### Distribution des billes

Une distribution homogène des billes magnétiques dans les différents puits de la plaque de séparation est essentielle pour assurer une grande cohérence d'un puits à l'autre. Par conséquent, avant de distribuer les billes, s'assurer que les billes sont complètement remises en suspension. Bien agiter le flacon de stockage ou le placer brièvement sur un vortex. Mélanger au préalable les billes magnétiques avec le tampon de fixation permet une distribution plus homogène des billes dans les différents puits de la plaque de séparation. Lors de l'automatisation, il est recommandé de procéder à une étape de prémélange avant d'aspirer le mélange billes / tampon de fixation du réservoir afin de maintenir les billes remises en suspension.

### Durée de séparation magnétique

L'attraction des billes magnétiques sur les aimants dépend de la force magnétique des aimants, de la plaque de séparation choisie, de la distance entre la plaque de séparation et les aimants et du volume à traiter. Les temps d'aimantation des billes doivent être vérifiés et ajustés pour chaque système. Il est recommandé d'utiliser les plaques ou tubes de séparation spécifiés par le fournisseur du séparateur magnétique.

### Lavage des billes

Le lavage des billes peut être réalisé par agitation ou par pipetage. Contrairement au mélange par pipetages successifs, le mélange par agitation permet de mélanger simultanément tous les échantillons. Cela permet de réduire le temps et le nombre de cônes nécessaires à la préparation. La remise en suspension par pipetages successifs est cependant plus efficace que l'agitation de la plaque ou l'agitation magnétique.

Méthode	Efficacité de la remise en suspension	Vitesse	Nombre de cônes nécessaires
Mélange magnétique	+	++	Faible
Agitateur	++	++	Faible
Pipetage	+++	+*	Haut

+ : acceptable, ++ : bon, +++ : excellent, \*pipette 8-canaux

## 2.7 Procédures d'élution

L'ARN purifié peut être élué directement avec l'H<sub>2</sub>O RNase-free fourni. L'élution peut être effectuée dans un volume de  $\geq 50 \mu\text{L}$  jusqu'à  $100 \mu\text{L}$ . Il est essentiel de recouvrir complètement les NucleoMag® B-Beads avec de l'H<sub>2</sub>O RNase-free pendant l'étape d'élution. Le volume de RNase-free H<sub>2</sub>O utilisé dépend du système de séparation magnétique (p.e., la position du culot à l'intérieur de la plaque de séparation). Pour une élution efficace, le culot de billes magnétiques doit être entièrement remis en suspension dans l'H<sub>2</sub>O RNase-free.

## 2.8 Assistance à l'automatisation

Les kits d'extraction MN sont conçus pour une automatisation rationalisée, offrant une compatibilité avec une gamme de systèmes robotiques ouverts. Que vous utilisiez des systèmes à barreaux magnétiques ou des manipulateurs de liquides comme Hamilton, Tecan, Eppendorf ou d'autres plateformes, nos kits garantissent des procédures d'extraction efficaces et fiables. Contactez-nous pour obtenir une assistance complète et des solutions d'automatisation sur mesure, afin que votre expérience d'extraction se déroule sans problème.

Des questions pour l'assistance à la programme ou au service d'automatisation de MACHEREY-NAGEL ?

Veillez nous contacter pour une assistance personnalisée :

Téléphone : +49 2421 969 333

Courriel : support@mn-net.com

Pour plus d'informations, visitez notre site web : [www.mn-net.com/automation](http://www.mn-net.com/automation)

### 3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

**Attention :** Le tampon MRB2 contient du sel chaotropique ! Porter des gants et des lunettes !

- Vérifier que tous les composants ne sont pas endommagés après avoir reçu le kit. Si le contenu du kit, comme les bouteilles de tampon, est endommagé, contactez l'assistance technique et le service client de MACHEREY-NAGEL ou votre distributeur local.
- N'utiliser pas les composants du kit endommagés.
- La rDNase lyophilisée est expédiée à température ambiante dans le kit. Conserver la rDNase lyophilisée (RNase-free) à 4 °C dès son arrivée (stable jusqu'à : voir l'étiquette du kit).
- Tous les autres composants du kit doivent être conservés à une température comprise 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.
- Après la première utilisation, conserver la protéinase K liquide à 4 °C ou -20 °C.
- Tous les tampons sont livrés prêts à l'emploi.
- Avant de débiter le protocole **NucleoMag® RNA Blood**, préparer les éléments suivants : Éthanol à 80 % (pour les étapes de lavage)
- **Solution de travail de la rDNase :** Ajouter 800 µL d'H<sub>2</sub>O RNase-free à chaque flacon de rDNase et incuber pendant 1 min à température ambiante. Agiter doucement les flacons pour dissoudre complètement la rDNase. Veiller à ne pas mélanger vigoureusement la rDNase car elle est sensible à l'agitation mécanique. Si elle n'est pas complètement utilisée, cette solution de travail peut être conservée à -20 °C pendant au moins 6 mois. Ne pas congeler/décongeler la solution de travail de la rDNase plus de trois fois.
- **Mélange réactionnel pour la rDNase :** Ajouter 9,2 mL de tampon de réaction pour la rDNase à 800 µL de solution de travail de rDNase et mélanger. Le mélange réactionnel pour la rDNase résultante sera suffisant pour 32 extractions et devra être utilisé dans sa totalité. Si vous effectuez moins de 32 réactions, préparer une plus petite quantité du mélange réactionnel. Pour chaque extraction, combiner 276 µL de tampon de réaction pour la rDNase avec 24 µL de solution de travail pour la rDNase.

#### NucleoMag® RNA Blood

REF	1 × 96 preps 744352.1	4 × 96 preps 744352.4
rDNase (lyophilized)	3 flacons (taille D) Ajouter 800 µL d'H <sub>2</sub> O RNase-free à chaque flacon.	12 flacons (taille D) Ajouter 800 µL d'H <sub>2</sub> O RNase-free à chaque flacon.

## 4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoMag® RNA Blood**, portez des vêtements de protection appropriés (p.e., blouse de laboratoire, gants jetables et lunettes de protection). Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (les FDS sont disponibles en ligne sur [www.mn-net.com/msds](http://www.mn-net.com/msds)).



Ce manuel fournit des instructions détaillées spécifiques à l'utilisation du kit NucleoMag® RNA Blood. Pour les consignes de sécurité relatives aux tubes collecteurs de sang utilisés, veuillez-vous référer au manuel d'utilisation correspondant. En outre, consultez les fiches de données de sécurité fournies pour prendre connaissance de tous les produits chimiques contenus dans les tubes. Les instructions générales de sécurité et de manipulation se trouvent dans le manuel d'utilisation correspondant au tube collecteur de sang.

Attention : Les échantillons biologiques sont susceptibles de transmettre des maladies infectieuses. Les déchets générés par le kit **NucleoMag® RNA Blood** 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 des conditions de lyse rigoureuses, mais elle ne peut être totalement exclue. Par conséquent, les déchets liquides doivent être considérés comme infectieux et doivent être manipulés et éliminés conformément aux réglementations de sécurité locales.

### 4.1 Elimination des déchets

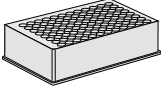
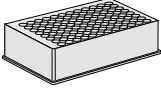
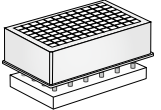
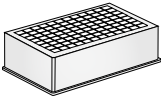
Elimination des matériaux dangereux, infectieux ou biologiquement contaminés de manière sûre et conforme aux dispositions réglementaires locales.


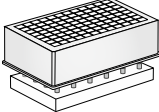
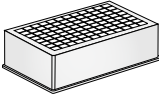

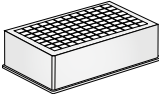
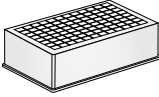

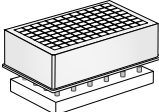

## 5 Extraction d'ARN à partir de sang prélevé dans des tubes collecteurs S-Monovette® RNA Exact de SARSTEDT ou DNA/RNA Shield™ Blood de Zymo Research.

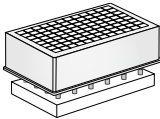
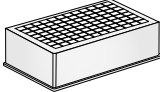

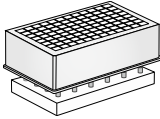
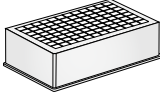

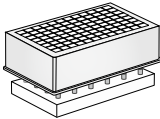
- Pour les exigences supplémentaires en matière d'équipement et de matériel, voir les paragraphes 1.2 et 2.3, respectivement.
- Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir page 17.

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que la rDNase a été préparée conformément au chapitre 3.

<p><b>1 Lyse</b> de l'échantillon</p>	<p><b>820 µL de sang de tubes collecteurs S-Monovette® RNA Exact ou DNA/RNA Shield™ Blood.</b></p> <p><b>15 µL de protéinase K liquide</b></p> <p><b>Mélanger par pipetages successifs ou par agitation.</b></p> <p><b>Incuber pendant 15 min à température ambiante</b></p>	
<p><b>2 Fixation de l'ARN</b> aux NucleoMag® B-Beads</p>	<p><b>15 µL NucleoMag® B-Beads</b></p> <p><b>140 µL MRB1</b></p> <p><b>Mélanger en agitant pendant 5 min à TA.</b></p> <p><i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>	
	<p><b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b></p>	
<p><b>3 Lavage</b> avec le tampon MRB2</p>	<p>Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP</p> <p><b>900 µL MRB2</b></p>	

	<p><b>Remettre en suspension :</b>  <b>Agiter 5 min à TA</b>  <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>	
	<p><b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b></p>	
<b>4</b>	<p><b>Lavage</b> avec le tampon à 80 % d'éthanol</p>	
	<p>Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP</p> <p><b>900 µL d'éthanol 80 %</b></p>	
	<p><b>Remettre en suspension :</b>  <b>Agiter 5 min à TA</b>  <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>	
	<p><b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b></p> <p><b>Sécher pendant 5 min à TA</b></p>	
<b>5</b>	<p><b>Digestion de l'ADN</b></p>	
	<p>Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP</p> <p><b>300 µL de mélange réactionnel rDNase</b></p>	
	<p><b>Mélanger</b></p> <p><b>Incuber 15 min à TA</b></p>	
<b>6</b>	<p><b>Re-fixation</b></p> <p><b>250 µL MRB1</b></p>	
	<p><b>Mélanger en agitant pendant 5 min à TA.</b></p> <p><i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>	

		<b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b>	
<b>7</b>	Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol	Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP <b>900 µL d'éthanol 80 %</b>	
		<b>Remettre en suspension : Agiter 5 min à TA</b> <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i>	
		<b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b>	
<b>8</b>	<b>Séchage de l'échantillon</b>	<u>Laisser le Square-well Blocks sur le NucleoMag® SEP</u> <b>Sécher à l'air 10 – 15 min à TA</b>	
<b>9</b>	<b>Elution de l'ARN</b>	Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP <b>50 – 100 µL H<sub>2</sub>O RNase-free</b>	
		<b>Agiter 5 – 10 min à TA</b> <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i>	
		<b>Séparer 2 min et transférer l'ARN dans une plaque d'éluion / tubes.</b>	

## Protocole détaillé

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques à aimants statiques (par exemple, NucleoMag® SEP) et les agitateurs de plaques adaptés (voir paragraphe 2.3). Il est recommandé d'utiliser un Square-well Blocks pour la séparation (voir paragraphe 1.2). L'extraction de l'ARN peut également être réalisée dans des tubes de réaction avec des séparateurs magnétiques appropriés. Ce protocole est destiné à une utilisation manuelle et sert de ligne directrice pour l'adaptation du kit aux instruments robotisés. Pour plus d'informations sur l'automatisation, veuillez-vous référer au chapitre 2.8.

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que la rDNase a été préparée conformément au chapitre 3.
- 

#### 1 Lyse de l'échantillon

Prélever à la pipette 820 µL de sang dans un tube **collecteur S-Monovette® RNA Exact de SARSTEDT** ou **DNA/RNA Shield™ Blood de Zymo Research** et ajouter 15 µL de protéinase K liquide.

Mélanger par pipetages successifs 6 fois ou par agitation.

Incuber 15 min à température ambiante

---

#### 2 Fixation de l'ARN aux NucleoMag® B-Beads

Ajouter **15 µL de NucleoMag® B-Beads remises en suspension et 140 µL de tampon MRB1** à l'échantillon lysé. Mélanger en agitant pendant 5 min à température ambiante ou par pipetages successifs 6 fois, et incuber pendant 5 min à température ambiante.

*Veiller à remettre en suspension les NucleoMag® B-Beads avant de les prélevés du flacon de conservation. Vortexer brièvement le flacon de conservation jusqu'à ce qu'une suspension homogène se forme.*

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette. Éliminer complètement le surnageant.

***Note :** Ne pas perturber les billes sur l'aimant lors de l'aspiration du surnageant. Le culot de billes n'est pas visible lors de cette étape. Prélever le surnageant de l'autre côté du puits.*

---

### 3 Lavage avec le tampon MRB2

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL** de tampon MRB2 dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (5 min). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

### 4 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**5 min**). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

Sécher les billes pendant **5 min** à **température ambiante**. Maintenir le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP pour l'étape de séchage.

---

### 5 Digestion de l'ADN

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter **300 µL de mélange réactionnel rDNase** et remettre les billes en suspension par pipetages successifs. Incuber pendant **15 min** à **température ambiante**. Ne pas séparer les billes !

---

### 6 Re-fixation

Ajouter **250 µL de tampon MRB1** à chaque échantillon. **Mélanger** en agitant pendant 5 min à température ambiante ou par pipetages successifs 6 fois et incuber pendant 5 min à température ambiante.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 7 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**5 min**). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 8 Séchage de l'échantillon

Sécher les billes à l'air pendant **10 à 15 min** à **température ambiante**. Laisser le Square-well Blocks sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

---

## 9 Elution de l'ARN

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter le volume défini d'**H<sub>2</sub>O RNase-free (50–100 µL)** et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce qu'elles soient complètement remises en suspension (5 min). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois).

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

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Transférer le surnageant contenant l'ARN purifié dans une plaque de collecte appropriée (voir les informations de commande, paragraphe 8.2).






---


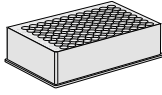
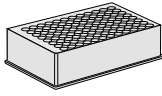

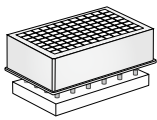
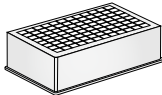

## 6 Extraction d'ARN à partir de sang collecté dans des tubes Tempus™ Blood RNA

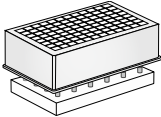
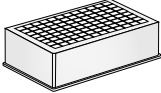

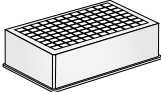
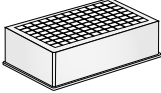

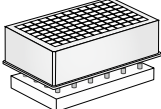

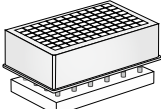
- Du tampon de lyse DL (REF 740202.32, voir les informations de commande) et de l'eau RNase-free (p.e. REF 740378.1000) supplémentaires sont nécessaires et ne sont pas inclus dans le kit NucleoMag® RNA Blood.
- Pour les exigences supplémentaires en matière d'équipement et de matériel, voir les paragraphes 1.2 et 1.3.
- Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir page 24.

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que la rDNase a été préparée conformément au chapitre 3.

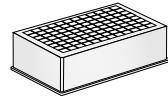
<p><b>1 Dilution de l'échantillon</b></p>	<p>Verser tout le contenu du tube Tempus™ Blood RNA dans un tube conique de 50 mL.</p> <p>Ajouter 3 mL de PBS dans le tube, fermer le couvercle.</p>	
<p>Mélanger pendant 30 secondes en vortexant vigoureusement.</p>		
<p><b>2 Concentration de l'ARN</b></p>	<p>Centrifuger pendant 30 min à 3000 à 4400 × g à 4 °C</p>	 
<p>Éliminer doucement le surnageant</p> <p>Laisser le tube renversé sur un papier absorbant pendant 1 min, éponger le liquide restant sur les bords du tube.</p> <p><i>Note :</i> Manipuler chaque tube avec précaution pour éviter de perturber le culot d'ARN non purifié déposé au fond du tube.</p>		

<p><b>3 Redissoudre l'ARN</b></p>	<p>Ajouter 620 µL de tampon DL</p> <p>Vortexer ou remettre en suspension l'ARN du fond du tube par pipetage.</p>	
<p><b>4 Lyse de l'échantillon</b></p>	<p>Prédispenser 200 µL d'eau RNase-free (non fournie dans le kit)</p> <p>620 µL de culot d'ARN remis en suspension</p> <p>Mélanger par pipetages successifs ou par agitation.</p> <p><b>15 µL de protéinase K liquide</b></p> <p><b>Mélanger par pipetages successifs ou par agitation.</b></p> <p><b>Incuber pendant 15 min à température ambiante</b></p>	
<p><b>5 Fixation de l'ARN aux NucleoMag® Beads</b></p>	<p><b>15 µL NucleoMag® B-Beads</b></p> <p><b>140 µL MRB1</b></p> <p><b>Mélanger en agitant pendant 5 min à TA.</b></p> <p><i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p> <p><b>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</b></p>	   
<p><b>6 Lavage avec le tampon MRB2</b></p>	<p>Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP</p> <p><b>900 µL MRB2</b></p> <p><b>Remettre en suspension : Agiter 5 min à TA</b></p> <p><i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>	  

		Retirer le surnageant après 2 min de séparation.	
7	Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol	Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP  900 µL d'éthanol 80 %	
		Remettre en suspension : Agiter 5 min à TA <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i>	
		Retirer le surnageant après 2 min de séparation. Sécher pendant 5 min à TA	
8	Digest DNA	Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP  300 µL de mélange réactionnel rDNase	
		Mélanger Incuber 15 min à TA	
9	Re-fixation	250 µL MRB1	
		Mélanger en agitant pendant 5 min à TA.  <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i>	
		Retirer le surnageant après 2 min de séparation.	

**10 Lavage** avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP



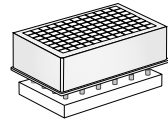
**900 µL d'éthanol 80 %**

**Remettre en suspension : Agiter 5 min à TA**



*(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)*

**Retirer le surnageant après 2 min de séparation.**



**11 Séchage de l'échantillon**

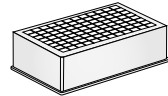
**Laisser le Square-well Blocks sur le**

**NucleoMag® SEP**

**Sécher à l'air 10 – 15 min à TA**

**12 Elution de l'ARN**

Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP



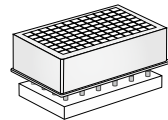
**50 – 100 µL H2O RNase-free**

**Agiter 5 – 10 min à TA**



*(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)*

**Séparer 2 min et transférer l'ARN dans une plaque d'éluion / tubes.**



## Protocole détaillé

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques à aimants statiques (par exemple, NucleoMag® SEP) et les agitateurs de plaques adaptés (voir paragraphe 2.3). Il est recommandé d'utiliser un Square-well Blocks pour la séparation (voir paragraphe 1.2). Alternativement, l'extraction de l'ARN peut être effectuée dans des tubes de réaction avec des séparateurs magnétiques appropriés. Ce protocole est destiné à une utilisation manuelle et sert de ligne directrice pour l'adaptation du kit aux instruments robotisés. Pour plus d'informations sur l'automatisation, veuillez-vous référer au chapitre 2.8.

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que la rDNase a été préparée conformément au chapitre 3.
- 

#### 1 Dilution des échantillons

Verser la totalité du contenu - environ 9 mL - d'un tube Tempus™ Blood RNA dans un tube conique de 50 mL.

Ajouter 3 mL de PBS au tube pour obtenir un volume total de 12 mL, fermer le couvercle.

Mélanger pendant 30 secondes en vortexant vigoureusement.

---

#### 2 Concentration de l'ARN

Centrifuger pendant 30 min à 3000 à 4400 x g à 4 °C à l'aide d'un rotor oscillant afin de concentrer l'ARN au fond du tube.

Éliminer le surnageant

*Note :* Le culot d'ARN est invisible. Éliminer le surnageant très soigneusement afin de ne pas perdre le culot d'ARN. Éliminer les déchets conformément à la réglementation locale.

Poser le tube à l'envers sur un papier absorbant et le laisser reposer pendant 1 min. Épongez le liquide restant sur le bord du tube en le tamponnant très soigneusement sur le papier.

---

#### Redissoudre l'ARN

Ajouter 620 µL de tampon DL au fond du tube

Vortexer ou remettre en suspension l'ARN au fond du tube par pipetage.

---

### 3 Lyse de l'échantillon

Distribuer au préalable 200 µL d'eau RNase-free dans un nouveau tube de réaction (non fourni).

Transférer le culot d'ARN de 620 µL remis en suspension dans le tampon DL dans le nouveau tube de réaction.

Mélanger par pipetages successifs ou agiter avant d'ajouter la protéinase K liquide.

Ajouter 15 µL de protéinase K liquide.

Mélanger par pipetages successifs ou par agitation.

Incuber pendant 15 min à température ambiante

---

### 4 Fixation de l'ARN aux NucleoMag® B-Beads

Ajouter **15 µL de NucleoMag® B-Beads remises en suspension et 140 µL de tampon MRB1** à l'échantillon lysé. Mélanger par agitation pendant 5 min à température ambiante ou par pipetages successifs 6 fois, et incuber pendant 5 min à température ambiante.

Veiller à remettre en suspension les NucleoMag® B-Beads avant de prélever dans le flacon de stockage. Vortexer brièvement le flacon de stockage jusqu'à ce qu'une suspension homogène soit obtenue.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette. Éliminer complètement le surnageant.

*Note :* Ne pas perturber les billes attirées lors de l'aspiration du surnageant. Le culot de billes n'est pas visible lors de cette étape. Prélever le surnageant de l'autre côté du puits.

---

### 5 Lavage avec le tampon MRB2

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL de tampon MRB2** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**5 min**). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 6 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**5 min**). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

Sécher les billes pendant **5 min** à **température ambiante**. Maintenir le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP pour l'étape de séchage.

---

## 7 Digestion de l'ADN

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter **300 µL de mélange réactionnel rDNase** et remettre les billes en suspension par pipetages successifs. Incuber pendant **15 min** à **température ambiante**. Ne pas séparer les billes !

---

## 8 Re-fixation

Ajouter **250 µL de tampon MRB1** à chaque échantillon. **Mélanger** par agitation pendant **5 min** à température ambiante ou par pipetages successifs 6 fois et incubé pendant 5 min à température ambiante.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 9 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**5 min**). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

**10 Séchage de l'échantillon**

Sécher les billes à l'air pendant **10 à 15 min** à **température ambiante**. Laisser le Square-well Blocks sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

---

**11 Elution de l'ARN**

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter le volume désiré d'**H<sub>2</sub>O RNase-free (50 – 100 µL)** et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (5 min). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois).

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

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Transférer le surnageant contenant l'ARN purifié dans une plaque de collecte appropriée (voir les informations de commande, paragraphe 2.6).

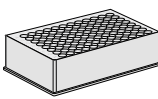
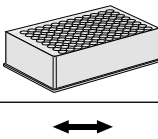
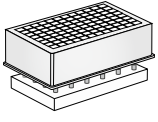
---

## 7 Extraction d'ARN à partir de sang prélevé dans des tubes collecteurs EDTA / Citrate

- Des tampons de lyse DL (REF 740202.32, voir les informations de commande) et de lavage RAW (REF 740361.150) supplémentaires sont nécessaires et ne sont pas inclus dans le kit NucleoMag® RNA Blood.
- Pour les exigences supplémentaires en matière d'équipement et de matériel, voir les paragraphes 1.2 et 1.3.
- Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir page 24.

### Avant de débiter la procédure

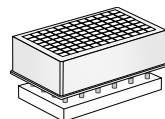
- Vérifier que la rDNase a été préparée conformément au chapitre 3.

1 Lyse de l'échantillon	<p>260 µL de sang provenant de tubes collecteurs EDTA ou citrate</p> <p>540 µL DL</p> <p>15 µL de protéinase K liquide</p> <p>Mélanger par pipetages successifs ou par agitation</p> <p>Incuber pendant 15 min à température ambiante</p>	
2 Fixation de l'ARN aux NucleoMag® B-Beads	<p>15 µL NucleoMag® B-Beads</p> <p>160 µL MRB1</p> <p>Mélanger en agitant pendant 5 min à TA.</p> <p><i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p> <p>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</p>	  



6 Re-fixation

250 µL MRB1

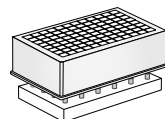


Mélanger en agitant pendant 5 min à TA.

*(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)*



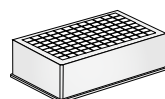
Retirer le surnageant après 2 min de séparation.



7 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP

900 µL d'éthanol à 80 %

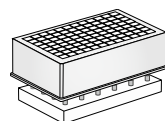


Remettre en suspension : Agiter 5 min à TA

*(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)*



Retirer le surnageant après 2 min de séparation.



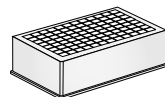
8 Séchage de l'échantillon

Laisser le Square-well Blocks sur le NucleoMag® SEP

Sécher à l'air 10–15 min à TA

**9 Elution de l'ARN**

Retirer le Square-well Blocks du NucleoMag® SEP



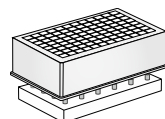
**50 – 100 µL H<sub>2</sub>O RNase-free**

**Agiter 5 – 10 min à TA**



*(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)*

**Séparer 2 min et transférer l'ARN dans une plaque d'éluion / tubes.**



## Protocole détaillé

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques à aimants statiques (par exemple, NucleoMag® SEP) et les agitateurs de plaques adaptés (voir paragraphe 2.3). Il est recommandé d'utiliser un Square-well Blocks pour la séparation (voir paragraphe 1.2). L'extraction de l'ARN peut également être réalisée dans des tubes de réaction avec des séparateurs magnétiques appropriés. Ce protocole est destiné à une utilisation manuelle et sert de ligne directrice pour l'adaptation du kit aux instruments robotisés. Pour plus d'informations sur l'automatisation, veuillez-vous référer au chapitre 2.8.

### Avant de débiter la procédure :

- Vérifier que la rDNase a été préparée conformément au chapitre 3.

### 1 Lyse de l'échantillon

Prélever à la pipette 260 µL de sang dans **un tube collecteur EDTA ou citrate** et ajouter 540 µL de tampon DL et 15 µL de protéinase K liquide.

Mélanger par pipetages successifs 6 fois ou par agitation.

Incuber 15 min à température ambiante

## 2 Fixation de l'ARN aux NucleoMag® B-Beads

Ajouter **15 µL** de **NucleoMag® B-Beads** remises en suspension et **160 µL de tampon MRB1** à l'échantillon lysé. **Mélanger** en agitant pendant 5 min à température ambiante ou par pipetages successifs 6 fois et incubé pendant 5 min à température ambiante.

*Veiller à remettre en suspension les NucleoMag® B-Beads avant de les prélever du flacon de stockage. Vortexer brièvement le flacon de stockage jusqu'à ce qu'une suspension homogène soit obtenue.*

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette. Éliminer complètement le surnageant.

*Note : Ne pas perturber les billes attirées lors de l'aspiration du surnageant. Le culot de billes n'est pas visible lors de cette étape. Prélever le surnageant de l'autre côté du puits.*

---

## 3 Lavage avec le tampon RAW

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL** de **tampon RAW** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (5 min). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 4 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**5 min**). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

Sécher les billes pendant 5 min à température ambiante. Maintenir le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP pour l'étape de séchage.

---

## 5 Digestion de l'ADN

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter **300 µL de mélange réactionnel rDNase** et remettre les billes en suspension par pipetages successifs. Incuber pendant **15 min** à **température ambiante**. Ne pas séparer les billes !

---

## 6 Re-fixation

Ajouter **250 µL de tampon MRB1** à chaque échantillon. **Mélanger** par agitation pendant 5 min à température ambiante ou par pipetages successifs 6 fois et incuber pendant **5 min** à température ambiante.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 7 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **900 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**5 min**). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois). Incuber pendant **1 min**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

---

## 8 Séchage de l'échantillon

Sécher les billes à l'air pendant **10 à 15 min** à **température ambiante**. Laisser le Square-well Blocks sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

---

## 9 Elute RNA

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter le volume désiré d'**H<sub>2</sub>O RNase-free (50 – 100 µL)** et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (5 min). Alternativement, remettre en suspension les billes par pipetages successifs (15 fois).

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

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Transférer le surnageant contenant l'ARN purifié dans une plaque de collecte appropriée (voir les informations de commande, paragraphe 8.2).

---

## 8 Annexes

### 8.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
L'ARN est dégradé/ aucun ARN n'est obtenu	<i>Contamination par la RNase</i>
	<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 ou des plaques en polypropylène stériles et jetables. La verrerie doit être cuite au four pendant au moins 2 heures à 250 °C avant d'être utilisée.</li> </ul>
Faible rendement en ARN	<i>Volume de tampon d'éluion insuffisant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le culot des billes doit être entièrement recouvert de tampon d'éluion.</li> </ul>
	<i>Performance insuffisante du tampon d'éluion pendant l'étape d'éluion.</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Éliminer complètement les tampons résiduels lors des étapes de séparation. Les tampons résiduels diminuent l'efficacité des étapes de lavage et d'éluion suivantes.</li> </ul>
	<i>Séchage excessif des billes</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne pas laisser sécher les billes excessivement, car cela pourrait entraîner une baisse de l'efficacité de l'éluion.</li> </ul>
	<i>Aspiration d'une partie des billes présents sur l'aimant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne pas perturber les billes sur l'aimant lors de l'aspiration du surnageant, en particulier lorsque le culot de billes magnétiques n'est pas visible dans le lysat.</li> </ul>
	<i>Aspiration et perte de billes</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durée de séparation magnétique trop courte ou vitesse d'aspiration trop élevée.</li> <li>• Perte du culot d'ARN (<b>Tempus™ Blood RNA Tube</b>)</li> <li>• S'assurer que la force g et la durée de centrifugation sont suffisantes et que la température est ajustée à 4 °C. Faire très attention au surnageant. Laisser le tube inversé seulement pendant 1 min sur le papier absorbant.</li> </ul>

Problème	Causes possibles et suggestions
Pureté insuffisante	<p data-bbox="309 212 624 234"><i>Procédure de lavage insuffisante</i></p> <ul data-bbox="309 252 972 480" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="309 252 972 331">• Utiliser uniquement les combinaisons appropriées de séparateur et de plaque, par exemple Square-well Block en combinaison avec NucleoMag® SEP.</li> <li data-bbox="309 352 972 480">• S'assurer que les billes sont remises en suspension complètement pendant la procédure de lavage. Si l'agitation n'est pas suffisante pour remettre les billes en suspension complètement, mélanger en effectuant des pipetages successifs.</li> </ul>
Faible performance de l'ARN dans les applications en aval	<p data-bbox="309 507 766 529"><i>Élimination de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul data-bbox="309 547 927 598" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="309 547 927 598">• Veillez à éliminer toute la solution de lavage éthanolique, car l'éthanol résiduel interfère avec les applications en aval.</li> </ul> <p data-bbox="309 619 488 641"><i>Pureté insuffisante</i></p> <ul data-bbox="309 659 488 683" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="309 659 488 683">• <i>Voir ci-dessus.</i></li> </ul>
Perte des billes	<p data-bbox="309 722 743 745"><i>Durée de séparation magnétique trop courte</i></p> <ul data-bbox="309 762 978 845" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="309 762 978 845">• Augmenter la durée de séparation pour permettre aux billes d'être complètement attirées par les aimants avant d'aspirer tout le liquide du puits.</li> </ul> <p data-bbox="309 863 775 885"><i>Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'élution)</i></p> <ul data-bbox="309 903 945 986" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="309 903 945 986">• Une vitesse d'aspiration élevée pendant l'étape d'élution peut entraîner une perte des billes. Réduire la vitesse d'aspiration pour l'étape d'élution.</li> </ul>
Contamination croisée	<p data-bbox="309 1010 790 1032"><i>Contaminations des parties supérieures des puits</i></p> <ul data-bbox="309 1050 972 1185" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="309 1050 972 1185">• Ne pas souiller les bords du Square-well Blocks lors du transfert du lysat tissulaire. Si le bord des puits est contaminé, sceller le Square-well Block avec une feuille PE auto-adhésive (voir les informations de commande, paragraphe 6.2) avant de mettre l'agitateur en marche.</li> </ul>

## 8.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® RNA Blood	744352.1 744352.4	1 × 96 preps 4 × 96 preps
Tampon de lyse DL	740202.32	100 mL
Tampon de lavage RAW	740361.150	150 mL
H <sub>2</sub> O RNase-free	740378.1000	1000 mL
NucleoMag® SEP	744900	1
Square-well Blocks	740481.4 740481.24	4 24
Pour l'utilisation du kit sur l'instrument KingFisher® Flex :	744951	1 set
<p>p.e., 96-well Accessory Kit B for KingFisher® (Square-well Blocks, Deep-well tip combs, Plaques d'éluion pour 4 × 96 NucleoMag® RNA preps avec la plateforme KingFisher® Flex)</p>		
Tip combs 8 positions pour systèmes à barreaux magnétiques (Pour l'utilisation du kit NucleoMag® RNA Blood sur l'instrument MagnetaPure 32 Plus ou l'instrument IsoPure™ Mini).	744960	50 pièces
Plaques 96 Deep-Well pour systèmes à barreaux magnétiques (Pour l'utilisation du kit NucleoMag® RNA Blood sur l'instrument MagnetaPure 32 Plus ou l'instrument IsoPure™ Mini).	744955	25 pièces

Pour toute commande ou demande de renseignements concernant le Magnetapure 32 Plus ou l'appareil IsoPure™ Mini, veuillez contacter le service technique MACHEREY-NAGEL.

Visitez le site [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) pour obtenir des informations plus détaillées sur le produit.

### **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 Équipe Service Technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur local pour obtenir des informations scientifiques à caractère général. Les descriptions figurant dans la documentation MACHEREY-NAGEL sont fournies à titre d'information uniquement.

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

### **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 :**

NucleoMag® est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL.

KingFisher® est une marque déposée de Thermo Scientific Inc.

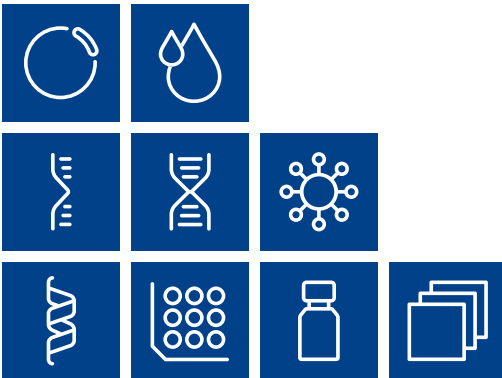
Tempus™ est une marque déposée d'Applied Biosystems par Thermo Fisher Scientific.

DNA/RNA Shield™ est une marque déposée de Zymo Research Corporation.

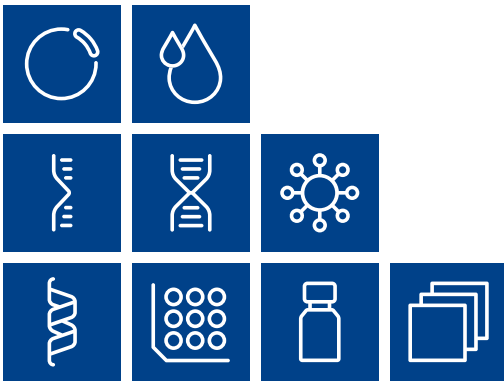
Monovette® est une marque déposée de SARSTEDT.

IsoPure™ est une marque d'Accuris Instruments.

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



Plasmid DNA  
Clean up  
RNA  
DNA  
Viral RNA and DNA  
Protein  
High throughput  
Accessories  
Auxiliary tools



**MACHERY-NAGEL**

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

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

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

