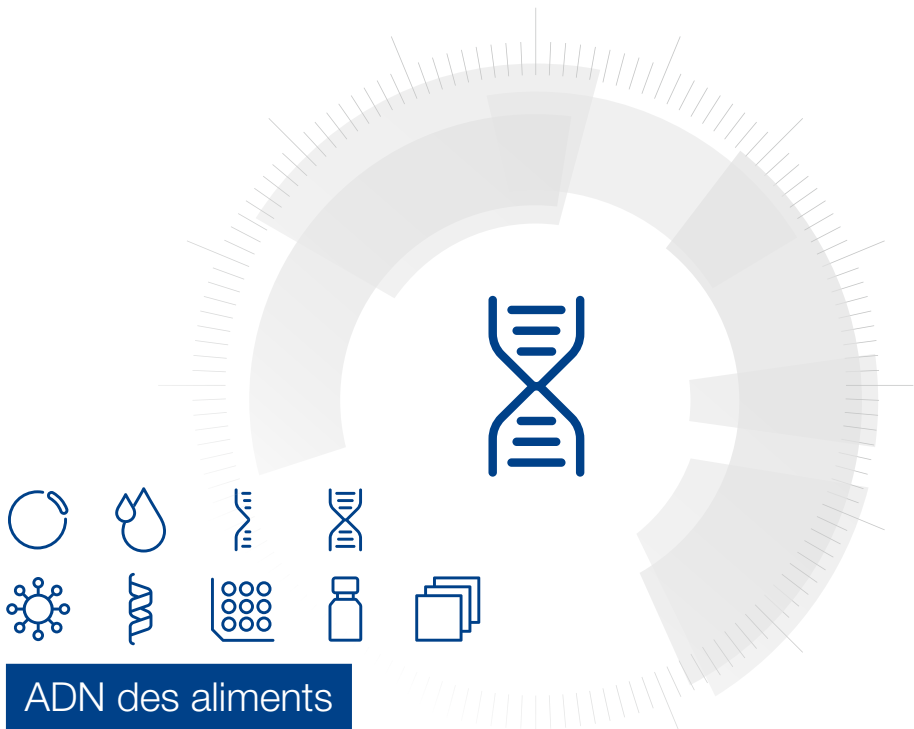


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



ADN des aliments

■ NucleoMag® DNA Food

Septembre 2024 / Rev. 05

Contact MN

Germany and international

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

Technical Support Bioanalysis

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

USA

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

France

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

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

Switzerland

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

Sommaire

1 Composants	4
1.1 Contenu du kit	4
1.2 Réactifs, consommables et équipements à fournir par l'utilisateur	4
1.3 A propos de ce manuel	5
1.4 Aide à l'automatisation	5
2 Description du produit	6
2.1 Principe général	6
2.2 Caractéristiques du kit	6
2.3 Systèmes de séparation magnétique	7
2.4 Réglage des paramètres d'agitation	8
2.5 Manipulation des billes	8
2.6 Procédures d'éluion	9
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	10
4 Safety instructions	10
4.1 Elimination des déchets	10
5 Remarques générales	11
5.1 Informations et conseils importants	11
6 Protocole pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de denrées alimentaires	13
6.1 Résumé du protocole	13
6.2 Protocole détaillé	15
7 Annexes	18
7.1 Guide de résolution des problèmes	18
7.2 Informations de commande	20
7.3 Restrictions d'utilisation /garantie	22
7.4 Versions linguistiques et prédominance	22

1 Composants

1.1 Contenu du kit

NucleoMag® DNA Food		
REF	1 × 96 preps 744945.1	4 × 96 preps 744945.4
NucleoMag® B-Beads	2 × 1.5 mL	12 mL
Tampon de lyse CF	100 mL	500 mL
Tampon de fixation CB	100 mL	300 mL
Tampon de lavage CMW	100 mL	300 mL
Tampon de lavage CQW	125 mL	2 × 250 mL
Tampon d'éluion CE	30 mL	125 mL
Protéinase K liquide	1 × 1250 µL	4,5 mL
Manuel d'utilisation	1	1

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

Réactifs

- 80 % d'éthanol
- Équipements de protection individuelle (p.e., blouse, gants, lunettes)

Produit	REF	Conditionnement
Aimant pour la séparation des billes magnétiques p.e NucleoMag® SEP	744900	1
NucleoMag® SEP Mini	744901	1
NucleoMag® SEP Maxi	744902	1
NucleoMag® SEP 24	744903	1
Plaquette de séparation pour la séparation des billes magnétiques, p.e. Square-well Block (bloc 96 puits avec puits carrés de 2.1 mL)	740481 740481.24	4 24

Produit	REF	Conditionnement
 Tubes de lyse pour l'incubation des échantillons et la lyse, p.e. Rack of Tubes Strips (1 set comprend 1 Rack, 12 barrettes avec 8 tubes chacune (puits de 1,2 mL), et 12 Cap Strips	740477	4 sets
	740477.24	24 sets
Plaque d'élu­tion pour collecter les acides nucléiques purifiés, p.e. Elution Plate U-bottom (microplaque 96 puits à fond en U de 300 µL)	740486.24	24
Pour l'utilisation du kit sur les instruments KingFisher® p.e. KingFisher® 96 Accessory Kit A (Square-well Blocks, Deep-well tip combs, Plaques pour 4 × 96 preps avec le NucleoMag® DNA Food	744950	1 set

1.3 A propos de ce manuel

Il est fortement recommandé aux personnes qui utilisent le kit NucleoMag® DNA Food pour la première fois de lire le protocole détaillé de ce manuel d'utilisation. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Le résumé du protocole est conçu pour être utilisé comme un outil de suivi rapide de l'exécution de la procédure de purification.

Toute la documentation technique est disponible sur le site 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.

1.4 Aide à l'automatisation

Les kits d'extraction MN sont conçus pour une facilité d'automatisation, offrant une compatibilité avec une gamme de systèmes robotiques ouverts reconnus. 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 processus d'extraction efficaces et fiables. Contactez-nous pour obtenir une assistance complète et des solutions d'automatisation sur mesure, afin de rendre votre expérience d'extraction transparente et sans effort.

Vous avez des questions sur l'assistance en matière de script ou sur le service d'automatisation de MACHEREY-NAGEL ?

Veuillez nous contacter pour une assistance personnalisée :

Téléphone : +49 2421 969-333

E-mail : support@mn-net.com

2 Description du produit

2.1 Principe général

Le kit **NucleoMag® DNA Food** est conçu pour l'extraction d'ADN génomique à partir d'échantillons de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux. La procédure est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques sur des billes paramagnétiques dans des conditions de tampons appropriées. La lyse des échantillons est réalisée par incubation des échantillons avec la protéinase K à 65 °C. Les lysats doivent être clarifiés par centrifugation ou filtration afin d'éliminer les contaminants et les débris cellulaires résiduels. Pour fixer les acides nucléiques aux billes paramagnétiques, le tampon de fixation CB et les NucleoMag® B-Beads sont ajoutés au lysat clarifié. Après la séparation magnétique, les billes paramagnétiques sont lavées pour éliminer les contaminants et les sels à l'aide des tampons de lavage CMW, CQW et de l'éthanol à 80 %. L'éthanol résiduel des étapes de lavage précédentes est éliminé par séchage à l'air. Ensuite, l'ADN hautement purifié est élué avec le tampon d'éluion (CE) à faible teneur en sel et peut être utilisé directement pour des applications en aval. Le kit **NucleoMag® DNA Food** peut être utilisé soit manuellement, soit de manière automatisée sur des robots pipeteurs standards et des séparateurs magnétiques automatisés.

Nous pouvons fournir une assistance personnalisée, des informations sur les protocoles ou des scripts vérifiés pour de nombreuses plateformes. Pour plus d'informations, veuillez contacter notre service d'assistance technique ou visiter le site www.mn-net.com/automation.

2.2 Caractéristiques du kit

- Le kit **NucleoMag® DNA Food** est conçu pour la préparation rapide, manuelle et automatisée à petite échelle de l'ADN à partir d'échantillons de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux. Pour l'extraction de l'ADN des bactéries présentes dans les échantillons de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux, veuillez suivre les recommandations du paragraphe 5.1 page 11.
- Le kit **NucleoMag® DNA Food** peut être utilisé pour l'identification de l'ADN d'OGM ou de composants d'origine animale dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux.
- Le kit fournit des réactifs pour la purification jusqu'à 200 mg de matériel. En fonction de l'échantillon, les rendements typiques pour le kit **NucleoMag® DNA Food** sont de l'ordre de 0,1 à 10 µg d'ADN.
- L'ADN élué est prêt à être utilisé pour des réactions ultérieures telles que la PCR en temps réel, la détection d'OGM, etc.
- Le kit **NucleoMag® DNA Food** est conçu pour être utilisé avec la plaque à aimant magnétique NucleoMag® SEP (voir informations de commande) ou tout autre système de séparation magnétique (voir paragraphe 2.3 page 7). Le temps de préparation manuel de 96 échantillons est d'environ 120 minutes.
- **NucleoMag® DNA Food** permet une automatisation facile sur les instruments courants de manipulation des liquides ou les séparateurs magnétiques automatisés. Le temps de préparation réel dépend de la configuration de l'instrument et du système de séparation magnétique utilisé. Généralement, 96 échantillons peuvent être purifiés en moins de 120 minutes en utilisant le NucleoMag® SEP sur une plateforme d'automatisation. Pour plus d'informations sur le processus d'automatisation et la disponibilité de programmes

prêts à l'emploi pour certaines plateformes, veuillez contacter votre distributeur local ou MN directement.

- Réserver à l'usage de la recherche

2.3 Systèmes de séparation magnétique

Pour l'utilisation de **NucleoMag® DNA Food**, il est recommandé d'utiliser le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. La séparation est effectuée dans un Square-well Block (voir informations de commande). Le kit peut également être utilisé avec d'autres séparateurs magnétiques courants.

Séparateur magnétique	Plaque ou tube de séparation
NucleoMag® SEP (MN REF 744900)	Square-well Block (MN REF 740481)
NucleoMag® SEP Mini (MN REF 744901)	Tubes de réaction de 1,5 mL ou 2 mL (Sarstedt)
NucleoMag® SEP Maxi (MN REF 744902)	Tubes de 50 mL (Falcon)
NucleoMag® SEP 24 (MN REF 744903)	24 Square-well Block U-bottom (MN REF 740448.4/.24)
Tecan Te-MagS™	Tubes de 1,5 mL sans couvercle (Sarstedt)

Séparation à aimants statiques

Les séparateurs avec aimants statiques, par exemple le NucleoMag® SEP ou d'autres séparateurs magnétiques courants, conviennent à une utilisation manuelle et sur les stations de travail de manipulation des liquides : ce type de séparateur est recommandé 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 d'agitation pour la remise en suspension des billes.

Systèmes à aimants mobiles

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

Séparateurs automatisés

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

2.4 Réglage des paramètres d'agitation

Lors de l'utilisation d'un agitateur de plaques pour les étapes de lavage et d'élution, les réglages des paramètres d'agitation doivent être soigneusement ajustés pour chaque plaque de séparation spécifique 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 fixation et de lavage :

- Déposer 600 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation. Placer la plaque sur l'agitateur et commencer à agiter à 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 d'agitation pendant 30 secondes supplémentaires et vérifier à nouveau la présence de gouttelettes à la surface de la plaque.
- Continuer à augmenter la vitesse d'agitation jusqu'à ce que vous observiez des gouttelettes sur le dessus de la plaque de séparation. Réduire progressivement la vitesse, vérifier l'absence de projections et utiliser ce réglage pour l'étape de lavage.

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

- Déposer 100–200 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation et procéder comme décrit ci-dessus.

2.5 Manipulation des billes

Distribution des billes

Une distribution homogène des billes magnétiques dans les différents puits de la plaque de séparation est essentielle pour une bonne reproductibilité. Par conséquent, avant d'utiliser 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. Lors de l'automatisation, une étape de mélange des billes au préalable avant d'aspirer les billes du réservoir est recommandée pour garder 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 les parois des puits et les aimants ainsi que 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 des 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	Rapidité	Petit volume d'élution possible	Nombre de cônes nécessaires
Magnétique	+	++	+	Faible
Agitateur	++	++	+++	Faible
Pipetage	+++	+*	++	Haut

+ : acceptable, ++ : bon, +++ : excellent, * Dispositif de pipetage à 8 canaux

2.6 Procédures d'élution

L'ADN purifié peut être élué directement avec le tampon d'élution CE fourni. L'élution peut être effectuée dans un volume $\geq 50 \mu\text{L}$. Il est essentiel de recouvrir complètement les NucleoMag[®] B-Beads avec le tampon d'élution pendant l'étape d'élution. Le volume de tampon d'élution distribué 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 le tampon d'élution. Pour certains séparateurs, des volumes d'élution plus élevés peuvent être nécessaires pour recouvrir la totalité du culot.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention : Les tampons CB, CMW et CQW contiennent des sels chaotropiques ! Porter des gants et des lunettes !

Tous les composants du kit NucleoMag® DNA Food doivent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables jusqu'au : voir étiquette du kit.

Tous les tampons sont livrés prêts à l'emploi.

4 Safety instructions

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



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans le tampon CMW et le tampon CQW peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, ne pas ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

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

5.1 Informations et conseils importants

- En raison de la faible teneur en ADN des aliments transformés, il convient de commencer ce protocole avec un maximum de 0,2 g de matériel.
- Des tampons de lyse ont été testés (voir liste à la page suivante) pour l'extraction d'ADN à partir de divers types d'échantillons, notamment des aliments d'origine végétale ou animale et des bactéries. Pour détecter l'ADN bactérien dans les échantillons alimentaires, nous recommandons une pré-culture d'une nuit de l'échantillon dans un milieu de culture approprié. Centrifuger une aliquote de la culture et commencer la préparation avec le culot bactérien.
- L'ajout de RNase A (non incluse dans le kit, voir les informations de commande) peut être recommandé pour les échantillons riches en ARN. Ajouter 10 µL (solution mère de 20 mg/mL) par 550 µL de tampon de lyse à l'étape 2 du protocole ou effectuer une digestion à la RNase A dans l'éluat avant toute autre utilisation.
- Le ketchup, les sauces et les échantillons de liquides similaires (équivalents à 0,2 g) peuvent être mélangés avec du tampon de lyse (500 – 1000 µL chacun) et incubés avec de la protéinase K liquide comme décrit dans le protocole (voir les informations de commande pour du tampon de lyse CF supplémentaire).
- Pour les échantillons hygroscopiques en poudre, il est possible d'utiliser plus de tampon de lyse que ce qui est indiqué dans le protocole jusqu'à ce que la solution de lyse soit au moins semi-liquide et puisse être pipetée (voir les informations de commande pour le tampon de lyse CF). L'extraction peut être améliorée par une préincubation de l'échantillon avec le tampon de lyse pendant 1 à 2 heures.
- Selon les réglementations locales, différentes quantités d'échantillons doivent être analysées pour la détection des OGM, par exemple, jusqu'à 1 – 2 g d'échantillons peuvent être utilisés avec des volumes de tampon de lyse ajustés. Nous recommandons d'utiliser une seule aliquote de 400 µL maximum (étape 3) du surnageant clarifié pour la procédure avec le kit NucleoMag® DNA Food. Sinon, il vous faudra augmenter proportionnellement les quantités respectives de tampons de fixation et de lavage.
- Pour la procédure de volumes d'échantillons plus importants, il est nécessaire d'augmenter le volume du tampon de lyse et la quantité de protéinase K. Pour chaque 0,1 g d'échantillon, ajouter 275 µL de tampon CF et 5 µL de protéinase K liquide. Après incubation et clarification du lysat, passer à l'étape 3 du protocole et traiter jusqu'à 400 µL du lysat clarifié.
- Pour les jus de fruits ou les échantillons similaires ayant une faible valeur pH, un ajustement du pH à 8 (p.e. par NaOH) peut améliorer de manière significative la récupération des acides nucléiques.
- Pour la procédure d'échantillons complexes ou difficiles, il est possible d'utiliser une plus grande quantité de tampon de lyse que celle indiquée dans le protocole. Transférer le surnageant clarifié après centrifugation dans un récipient de réaction approprié et ajouter 1,5 vol de tampon de fixation et la quantité respective de NucleoMag® B-Beads

Échantillons testés positivement (PCR)

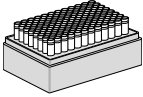


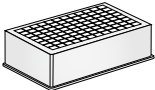

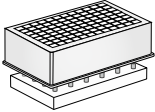
Aliments (d'origine végétale)	Produits bruts : maïs, soja, colza, etc. (poudre ou huile) Produits à base de chocolat : cacao, produits de nougat Céréales pour petit-déjeuner, muesli, pâte à tartiner aux noix/au chocolat Confitures et concentrés de fruits Pollen / miel Lécithine Épices Pain Semences diverses
Aliments (d'origine animale)	Produits bruts et transformés (viande, saucisse, tourte)
Cosmétiques	Ingrédients végétaux et animaux (p.e., en crème ou en poudre)
Bactéries	Cultures starter, etc.

6 Protocole pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de denrées alimentaires

6.1 Résumé du protocole

- 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 15.

Avant de débiter la procédure :

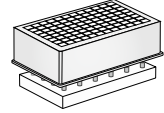
<p>1 Homogénéiser les échantillons</p>	<p>0,2 g d'échantillon 550 µL de CF préchauffé (65 °C) 10 µL de protéinase K liquide</p> <p>Mélanger 65 °C, 30 min</p>	
<p>2 Clarifier le lysat</p>	<p>5 600 x g, 20 min</p>	 
<p>3 Fixer l'ADN aux NucleoMag® B-Beads</p>	<p>Jusqu'à 400 µL de lysat clarifié 25 µL NucleoMag® B-Beads 600 µL CB</p> <p>Mélanger par agitation pendant 10 min à TA. <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>	 
<p>4 Laver avec le tampon CMW</p>	<p>Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP</p> <p>600 µL CMW</p>	

Remettre en suspension : Agiter 2 min à TA



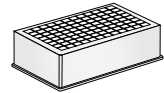
(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)

Retirer le surnageant après 2 min de séparation.



5 Laver avec le tampon CQW

Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP



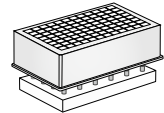
600 µL CQW

Remettre en suspension : Agiter 2 min à TA



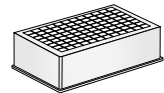
(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)

Retirer le surnageant après 2 min de séparation.



6 Laver avec le tampon 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP



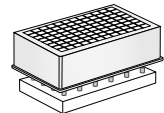
600 µL d'éthanol 80 %

Remettre en suspension : Agiter 2 min à TA



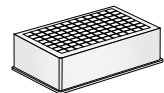
(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)

Remove supernatant after 2 min separation



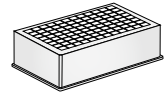
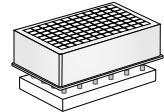
7 Sécher les billes

15 min à TA



8 Eluer l'ADN

Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP

50 – 100 µL CE*(Optionnel : élution à 56 °C)***Agiter 5 min à TA***(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)***Séparer 2 min et transférer l'ADN dans la plaque d'élution.**

6.2 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 page 7). Il est recommandé d'utiliser un Square-well Block pour la séparation (voir paragraphe 1.2 page 4). L'extraction d'ADN peut également être réalisée dans des tubes de réaction avec des séparateurs magnétiques appropriés. Ce protocole est destiné pour une utilisation manuelle et sert de guide pour l'adaptation du kit aux systèmes automatisés.

- Pour les exigences matérielles, voir le paragraphe 2.3 page 7.

Avant de débiter la procédure :

- Préchauffer le tampon CF à 65 °C.

Pour chaque préparation, recueillir jusqu'à 200 mg d'échantillon dans un contenant approprié pour la lyse (p.e., Rack of Tubes Strips).

1 Homogénéiser les échantillons

Homogénéiser jusqu'à 200 mg d'échantillon à l'aide d'un broyeur commercial. Transférer les échantillons homogénéisés dans un rack de Tubes Strips et ajouter 550 µL de Tampon de Lyse CF préchauffé à 65 °C. Ajouter 10 µL de Protéinase K liquide. Fermer les barrettes de tubes à l'aide des barrettes de bouchons et mélanger par agitation vigoureuse pendant 15 à 30 s. Centrifuger brièvement pendant 30 s à 1 500 x g pour recueillir tout l'échantillon au fond des barrettes de tubes.

Si le volume du tampon de lyse n'est pas suffisant pour dissoudre complètement l'échantillon, ajouter du tampon (et de la protéinase K liquide proportionnellement) jusqu'à ce que l'échantillon soit totalement remis en suspension.

Incuber à 65 °C pendant 30 min. Pour une lyse optimale, incuber avec agitation.

Optionnel : Si l'ADN sans ARN est crucial pour les applications en aval, une digestion RNase peut être effectuée : Après incubation à 65 °C pendant 30 min, ajouter 10 µL de RNase A (solution mère de 10 mg/mL, non fournie, voir les informations de commande) par 550 µL de tampon de lyse, bien mélanger et incuber à TA (18–25 °C) pendant 30 min. Poursuivre le protocole avec l'étape de centrifugation.

2 Clarifier le lysat

Centrifuger les échantillons pendant 20 min à pleine vitesse (5 600–6 000 x g) pour culotter les contaminations et les débris cellulaires. Retirer les barrettes de 8 bouchons. Après homogénéisation et traitement de l'échantillon avec du tampon de lyse, les mélanges peuvent être clarifiés facilement et efficacement soit par centrifugation, soit avec la plaque filtrante NucleoSpin® 96 Filter (voir informations de commande).

3 Fixer l'ADN aux NucleoMag® B-Beads

Transférer **jusqu'à 400 µL de lysat clarifié dans un Square-well Block**. Ajouter **25 µL de NucleoMag® B-Beads** et **600 µL de tampon de fixation CB**. Mélanger par pipetages successifs 6 fois et agiter pendant 5 min à température ambiante. Alternativement, lors de la procédure du kit sans agitateur, pipeter successivement 10 fois et incubé pendant 5 min à température ambiante.

Veiller à remettre en suspension les NucleoMag® B-Beads avant de les retirer du flacon de stockage. Vortexer brièvement le flacon de stockage 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 5 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.

Note : Ne pas perturber les culots de billes attirés lors de l'aspiration du surnageant. Le culot de billes peut ne pas être visible lors de cette étape. Prélever le surnageant de l'autre côté du puits.

4 Laver avec le tampon CMW

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

Ajouter **600 µL de tampon CMW** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**1–3 min**). Il est également possible de remettre les billes en suspension par pipetages successifs.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre **au moins 2–5 min** jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

5 Laver avec le tampon CQW

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

Ajouter **600 µL de tampon CQW** dans chaque puits et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (**1–3 min**). Alternativement, remettre les billes en suspension complètement par pipetages successifs.

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 l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

6 Laver avec le tampon à 80 % d'éthanol

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

Ajouter 600 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 (**1 – 3 min**). Alternativement, remettre les billes en suspension complètement par pipetages successifs.

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 l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

7 Sécher les billes magnétiques à l'air

Sécher à l'air les billes magnétiques pendant **10 à 15 min** à température ambiante.

8 Eluer l'ADN

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

Ajouter le volume souhaité de **tampon CE (50 – 100 µL)** à chaque puits du Square-well Block et remettre les billes en suspension par agitation pendant 5 min à température ambiante. Il est également possible de remettre les billes en suspension en les pipétant successivement puis incubé pendant **5 à 10 min à température ambiante ou à 56 °C**.

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 soient attirées par les aimants. Transférer le surnageant contenant l'ADN purifié dans des plaques d'éluion ou des barrettes de tubes (voir informations de commande).

7 Annexes

7.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
Faible rendement en ADN	<p><i>L'homogénéisation des denrées alimentaires n'est pas suffisante</i></p> <ul data-bbox="441 376 981 501" style="list-style-type: none"> • Pour la plupart des échantillons, nous recommandons le broyage avec des billes d'acier (voir paragraphe 2.5 page 8 du kit NucleoSpin® Food) ou l'utilisation de systèmes commerciaux permettant le broyage, le mélange ou l'homogénéisation.
	<p><i>Extraction d'ADN à partir de matériel alimentaire insuffisante</i></p> <ul data-bbox="441 560 981 635" style="list-style-type: none"> • Pour obtenir des rendements plus élevés d'ADN, le temps d'incubation dans le tampon de lyse peut être prolongé (jusqu'à une nuit).
	<p><i>Echantillon riche en ARN</i></p> <ul data-bbox="441 695 981 794" style="list-style-type: none"> • Ajouter 10–20 µL de solution de RNase A (10 mg/mL) au tampon de lyse avant l'incubation à chaud. En cas d'échec, ajouter l'enzyme au lysat clarifié et incubé pendant 30 min à 37 °C.
	<p><i>Volume de tampon d'élution insuffisant</i></p> <ul data-bbox="441 855 981 903" style="list-style-type: none"> • Le culot des billes doit être entièrement recouvert de tampon d'élution.
	<p><i>Performance insuffisante du tampon d'élution pendant l'étape d'élution</i></p> <ul data-bbox="441 983 981 1062" style="list-style-type: none"> • Éliminer complètement les tampons résiduels lors des étapes de séparation. Les tampons résiduels diminuent l'efficacité des étapes de lavage et d'élution.
	<p><i>Aspiration d'une partie des billes présents sur l'aimant</i></p> <ul data-bbox="441 1123 981 1197" style="list-style-type: none"> • Ne pas perturber les billes attirées lors de l'aspiration du surnageant, en particulier lorsque le culot magnétique n'est pas visible dans le lysat.
<p><i>Aspiration et perte de billes</i></p> <ul data-bbox="441 1257 981 1305" style="list-style-type: none"> • Durée de séparation magnétique trop courte ou vitesse d'aspiration trop élevée. 	

Problème	Causes possibles et suggestions
Pureté insuffisante / Faible sensibilité	<p data-bbox="436 207 739 231"><i>Procédure de lavage insuffisante</i></p> <ul data-bbox="436 247 990 510" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 247 990 327">• Utiliser uniquement les combinaisons appropriées de séparateur et de plaque, par exemple, le Square-well Block en combinaison avec le NucleoMag® SEP. <li data-bbox="436 343 990 470">• 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 par pipetages successifs. <li data-bbox="436 486 990 510">• Répéter le lavage avec de l'éthanol à 80 %.
Mauvaise performance de l'ADN lors des applications avales	<p data-bbox="436 526 739 550"><i>Procédure de lavage insuffisante</i></p> <ul data-bbox="436 566 990 829" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 566 990 646">• Utiliser uniquement les combinaisons appropriées de séparateur et de plaque, par exemple, le Square-well Block en combinaison avec le NucleoMag® SEP. <li data-bbox="436 662 990 790">• 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 par pipetages successifs. <li data-bbox="436 805 990 829">• Répéter le lavage avec de l'éthanol à 80 %. <p data-bbox="436 845 990 901"><i>Contamination par l'éthanol provenant des tampons de lavage</i></p> <ul data-bbox="436 917 990 997" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 917 990 997">• Veillez à éliminer toute la solution de lavage éthanolique, car l'éthanol résiduel interfère avec les applications en aval. <p data-bbox="436 1013 990 1037"><i>Évaporation de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul data-bbox="436 1053 990 1149" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 1053 990 1149">• Fermer hermétiquement les flacons de tampons, éviter l'évaporation de l'éthanol des flacons de tampons ainsi que des tampons remplis dans les réservoirs. Ne pas réutiliser les tampons des réservoirs de tampons.
Perte des billes	<p data-bbox="436 1173 990 1197"><i>Durée de séparation magnétique trop courte</i></p> <ul data-bbox="436 1212 990 1292" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 1212 990 1292">• Augmenter la durée de séparation pour permettre aux billes d'être complètement attirées par les aimants avant d'aspirer tout liquide du puits. <p data-bbox="436 1308 990 1332"><i>Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'éluion)</i></p> <ul data-bbox="436 1348 990 1420" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="436 1348 990 1420">• Une vitesse d'aspiration élevée pendant l'étape d'éluion peut entraîner une perte des billes. Réduire la vitesse d'aspiration pour l'étape d'éluion.

Problème	Causes possibles et suggestions
Contamination croisée	<i>Contaminations des parties supérieures des puits</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Ne pas souiller les bords du Square-well Block lors du transfert du lysat. Si le bord des puits est contaminé, sceller le Square-well Block avec une feuille PE auto-adhésive (voir informations de commande) avant de démarrer l'agitateur.
Qualité de l'ADN faible	<i>Présence dans l'échantillon de contaminants dégradant l'ADN (p.e. composés phénoliques, métabolites).</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Répéter l'étape de lavage avec le tampon CMW.

7.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® DNA Food	744945.1	1 × 96 preps
	744945.4	4 × 96 preps
Plaque NucleoSpin® 96 Filter	740663.2	20
Tampon CF	740946	1 L
Protéinase K (lyophilisée)	740506	100 mg
Protéinase K liquide	740396	5 mL
RNase A	740505.50	50 mg
	740505	100 mg
Plaque NucleoSpin® Trace Filter	740677	20
NucleoMag® SEP	744900	1
NucleoMag® SEP Mini	744901	1
NucleoMag® SEP Maxi	744902	1
NucleoMag® SEP 24	744903	1
Square-well Blocks	740481	4
	740481.24	24
Film PE auto-adhésif	740676	50 feuilles
Rack of Tube Strips (le set comprend 1 rack, 12 barrettes de 8 tubes chacune, et 12 barrettes de bouchons)	740477	4 sets
	740477.24	24 sets
Barrettes de 8 bouchons	740638	30 barrettes

Produit	REF	Conditionnement
Elution Plate U-bottom (microplaque de 96 puits avec des puits de 300 µL à fond en U)	740486.24	24
Pour l'utilisation du kit sur les instruments KingFisher® : p.e., 96-well Accessory Kit A pour KingFisher (Square Well Blocks, Deep-well tip combs, Plaques pour 4 × 96 preps)	744950	1 set
Plaque 96 Deep-well pour système à barreaux magnétiques	744955	25
Tip Combs 8-puits pour système à barreaux magnétiques	744960	50
Kit accessoires 8-puits pour système à barreaux magnétiques - IsoPure Mini ou MagnetaPure 32 Plus. Le kit contient 5 plaques 96 Deep-well et 10 Tip Combs 8-puits.	744961	1 set

Visitez le site www.mn-net.com pour obtenir des informations plus détaillées sur le produit.

7.3 Restrictions d'utilisation / garantie

Tous les produits MACHEREY-NAGEL sont conçus uniquement pour l'usage auquel ils sont destinés. Ils ne sont pas destinés à être utilisés pour un autre usage. La description de l'usage prévu des produits est disponible dans les notices originales des produits MACHEREY-NAGEL. Avant d'utiliser nos produits, veuillez lire attentivement le mode d'emploi et les consignes de sécurité figurant dans la Fiche de Données de Sécurité du produit.

Ce produit MACHEREY-NAGEL comporte une documentation énonçant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La garantie fournie est limitée aux spécifications et descriptions des données indiquées dans la documentation originale MACHEREY-NAGEL.

Aucune autre déclaration, verbale ou écrite, par des employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL n'est autorisée, à l'exception des déclarations écrites signées par un représentant dûment habilité de MACHEREY-NAGEL. Le client ne doit pas s'y fier et elles ne font pas partie d'un contrat de vente ou de la présente garantie.

La responsabilité pour tous les dommages éventuels survenant en lien avec nos produits est limitée au strict minimum, comme indiqué dans les conditions générales de vente de MACHEREY-NAGEL, dans leur dernière version, disponibles sur le site internet de la société. MACHEREY-NAGEL n'assume aucune autre garantie.

Les produits et leur application sont susceptibles de modifications. Par conséquent, veuillez contacter notre Equipe Service Technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur local pour obtenir des informations scientifiques à caractère général. Les descriptions figurant dans la documentation MACHEREY-NAGEL sont fournies à titre d'information uniquement.

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

7.4 Versions linguistiques et prédominance

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

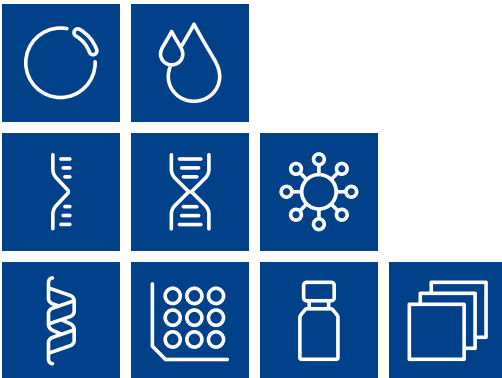
Marques déposées :

KingFisher[®] est une marque déposée de Thermo Fisher Scientific.

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

Te-MagS[™] est une marque déposée de Tecan Group Ltd, Suisse.

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



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

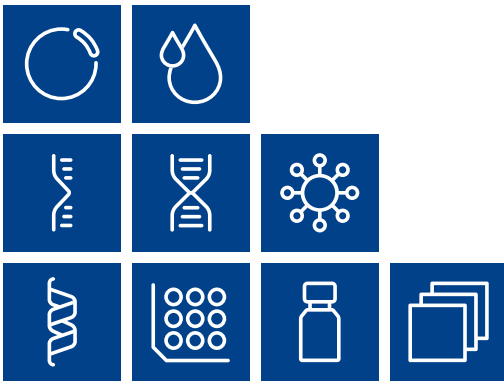
Viral RNA and DNA

Protein

High throughput

Accessories

Auxiliary tools



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

