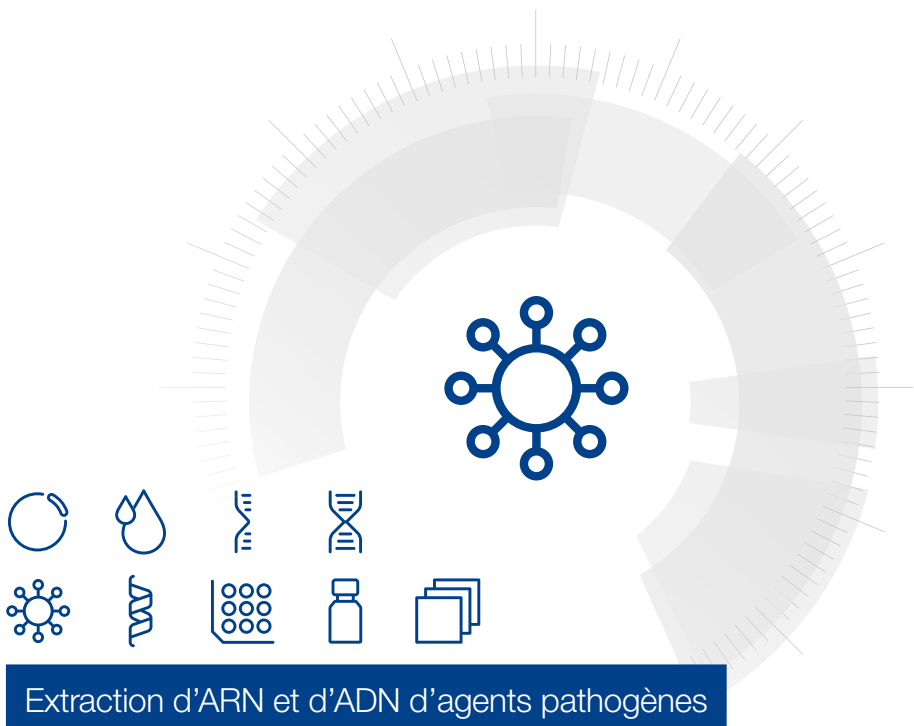


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



Extraction d'ARN et d'ADN d'agents pathogènes

- NucleoMag® Pathogen
- NucleoMag® Pathogen Prefilled Plates

Avril 2025 / Rev. 09

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 Matériel à fournir par l'utilisateur	5
1.3 A propos de ce manuel	6
2 Description du produit	7
2.1 Principe général	7
2.2 Caractéristiques du kit	7
2.3 Systèmes de séparation magnétique	8
2.4 Réglage des paramètres d'agitation	9
2.5 Manipulation des billes	9
2.6 Procédures d'éluion	10
3 Conditions de stockage et préparation des réactifs	11
4 Instructions de sécurité	12
4.1 Elimination des déchets	12
5 Protocole pour l'extraction d'ARN et d'ADN viraux et d'ADN microbien à partir de sang, de tissus homogénéisés, de sérum, de plasma, d'autres fluides corporels et de lavages	13
5.1 Préparation des échantillons	13
5.2 Résumé du protocole	14
5.3 Protocole détaillé	16
6 Protocole pour les plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen	18
6.1 Protocole détaillé pour IsoPure™ Mini et MagnetaPure 32 Plus	19
7 Annexes	21
7.1 Guide de résolution des problèmes	21
7.2 Informations de commande	23
7.3 Restrictions d'utilisation / garantie	24
7.4 Versions linguistiques et prédominance	24

1 Composants

1.1 Contenu du kit

NucleoMag® Pathogen		
REF	1 × 96 preps 744210.1	4 × 96 preps 744210.4
NucleoMag® B-Beads	2 × 1,5 mL	10 mL
Tampon de lyse NPL1	30 mL	100 mL
Tampon de fixation NPB2	110 mL	3 × 110 mL
Tampon de lavage NPW3	75 mL	300 mL
Tampon de lavage NPW4	75 mL	300 mL
Tampon d'éluion NPE5*	30 mL	125 mL
ARN Carrier **	400 µg	4 × 400 µg
Tampon ARN Carrier	500 µL	4 × 500 µL
Protéinase K (lyophilisée) **	75 mg	3 × 75 mg
Tampon de protéinase PB	8 mL	15 mL
Manuel d'utilisation	1	1

NucleoMag® Pathogen Prefilled Plates	
REF	6 × 16 preps 744211
Tampon de lyse NPL1	30 mL
Plaque 96 puits pré-remplies de réactifs NucleoMag® Pathogen	6 pièces
ARN Carrier*	400 µg
Tampon ARN Carrier	500 µL
Protéinase K liquide	2 mL
8-well Tip Combs	6 × 2 pièces
Notice d'utilisation	1

* Composition du tampon d'éluion NPE5 : 5 mM Tris/HCl, pH 8,5

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

1.2 Matériel à fournir par l'utilisateur

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
Plaque de séparation pour séparer les billes magnétiques, p.e., Square-well Block (bloc 96 puits avec des puits carrés de 2,1 mL)	740481 740481.24	4 24
 Tubes de lyse pour l'incubation des échantillons et la lyse, p.e., Rack of Tubes Strips (1 set comprend 1 Rack, 12 barrettes de 8 tubes (puits de 1,2 mL) chacune, et 12 barrettes de bouchons)	740477 740477.24	4 sets 24 sets
Plaque d'éluion pour la collecte des acides nucléiques purifiés, p.e., Elution Plate U-bottom (microplaque de 96 puits avec des puits à fond en U de 300 µL)	740486.24	24
Pour l'utilisation du kit sur l'instrument KingFisher[®] Flex : p.e., KingFisher [®] Accessory Kit A (Deep-well Blocks, Deep-well tip combs, Elution Plates for 4 × 96 NucleoMag [®] Pathogen preps pour utiliser avec le KingFisher [®] Flex)	744950	1 set
Pour l'utilisation du kit sur MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure Mini : 96 Deep-well plates pour systèmes à barreaux magnétiques	744955	25 pièces
Pour l'utilisation du kit sur MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure Mini : 8-well Tip Combs pour systèmes à barreaux magnétiques	744960	25 × 2 pièces

Réactifs :

- 80 % d'éthanol

1.3 A propos de ce manuel

Il est fortement recommandé aux personnes qui utilisent le kit **NucleoMag® Pathogen** pour la première fois de lire les paragraphes du présent manuel d'utilisation consacrés au protocole détaillé. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole pour un suivi rapide de la succession des étapes 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.

2 Description du produit

2.1 Principe général

Le kit **NucleoMag® Pathogen** est conçu pour l'isolement de l'ARN et de l'ADN viraux et de l'ADN bactérien à partir de liquides acellulaires tels que le sérum ou le plasma, le sang, la salive, les suspensions d'échantillons de tissus homogénéisés, les suspensions d'échantillons de selles et les lavages d'écouvillons. Ce kit fournit des réactifs et des billes magnétiques pour l'extraction de 96 échantillons. La procédure est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques sur les billes paramagnétiques dans des conditions de tampons appropriées. La lyse des échantillons est réalisée par incubation avec un tampon de lyse NPL1 contenant des ions chaotropiques et soutenu par une digestion à la protéinase K. Pour la fixation des acides nucléiques sur les billes paramagnétiques, le tampon de fixation NPB2 et les NucleoMag® B-Beads sont ajoutés au lysat. Après la séparation magnétique, les billes paramagnétiques sont lavées pour éliminer les contaminants et les sels à l'aide des tampons de lavage NPW3, NPW4 et de l'éthanol à 80 %. L'éthanol résiduel des étapes de lavage précédentes est éliminé par séchage à l'air. Enfin, l'ARN et l'ADN pathogènes hautement purs sont élués à l'aide d'un tampon d'éluion à faible teneur en sel ou d'eau. L'ARN et l'ADN pathogènes purifiés peuvent être directement utilisés pour des applications en aval. Il est recommandé d'utiliser des contrôles appropriés pour les applications en aval (p.e. contrôles internes, contrôles d'extraction, contrôles positifs/négatifs). Le kit **NucleoMag® Pathogen** peut être utilisé manuellement ou automatiquement sur des robots pipeteurs ou des séparateurs magnétiques automatisés.

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

2.2 Caractéristiques du kit

Le kit **NucleoMag® Pathogen** est conçu pour la préparation rapide, manuelle et automatisée à petite échelle de l'ARN et de l'ADN viraux et de l'ADN de micro-organismes à partir de divers types d'échantillons cliniques. Le kit est conçu pour être utilisé avec la plaque de séparation magnétique NucleoMag® SEP (voir informations de commande, paragraphe 7.2) ou d'autres systèmes de séparation magnétique (voir paragraphe 2.3). Le temps de préparation manuel de 96 échantillons est d'environ 120 minutes. L'ARN et l'ADN purifiés peuvent être utilisés directement comme matrice pour la RT-PCR, la PCR ou tout type de réaction enzymatique. Réserver à l'usage de la recherche.

Les plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen (REF 744211) sont des plaques 96 puits profonds pré-remplies spécialement conçues pour être utilisées sur les systèmes MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure™ Mini. Le tampon de fixation NPB2, les billes NucleoMag® B-Beads, le tampon de lavage NPW3, NPW4, l'éthanol à 80 % ainsi que le tampon d'éluion NPE5 sont pré-remplis dans leurs puits respectifs. La préparation et la lyse des échantillons sont effectuées conformément à la procédure standard du kit NucleoMag® Pathogen. Ensuite, les échantillons lysés sont transférés dans les puits de réactifs contenant le tampon de fixation NPB2 et les billes NucleoMag® B-Beads pour une procédure ultérieure sur les instruments MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure™ Mini. L'ARN/ADN purifié, élué dans 100 µL de VEL, peut être utilisé directement comme matrice pour la RT-PCR, la PCR ou tout type de réaction enzymatique.

Le kit **NucleoMag® Pathogen** 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. Typiquement, 96 échantillons peuvent être purifiés en moins de 120 minutes en utilisant le NucleoMag® SEP sur une plateforme d'automatisation.

2.3 Systèmes de séparation magnétique

Pour l'utilisation du **NucleoMag® Pathogen**, il est recommandé d'utiliser le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. La séparation est effectuée dans un Square-well Block (voir informations de commande, paragraphe 7.2). Le kit peut également être utilisé avec d'autres séparateurs 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 à fond en U
Tecan Te-MagS™	Tubes de 1,5 mL sans couvercle (Sarstedt)

Séparateurs à aimants fixes

Les séparateurs à aimants fixes, comme le NucleoMag® SEP (utilisable manuellement ou sur automates pipeteurs), sont recommandés en association avec un agitateur pour plaques, permettant une resuspension optimale des billes pendant les étapes de lavages et d'élution. Alternativement, les billes peuvent être resuspendues dans les tampons par plusieurs cycles de pipetage. Pour automatiser totalement la procédure sur un robot pipeteur, un bras manipulateur de plaques est nécessaire, afin de transférer la plaque du séparateur magnétique vers l'agitateur pour la resuspension des billes.

Systèmes magnétiques mobiles

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

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.

MagnetaPure 32 Plus et IsoPure™ Mini

Les plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen (REF 744211) sont spécifiquement conçues pour être utilisées sur les systèmes à barreaux magnétiques MagnetaPure 32 Plus et IsoPure™ Mini. Les réactifs sont pré-remplis dans les plaques colonne par colonne. La préparation et la lyse des échantillons sont effectuées sur la pailleuse et les échantillons lysés sont transférés dans les puits de la plaque pré-remplie contenant le tampon de fixation et les billes magnétiques.

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 :

Charger 600 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation. Placer la plaque sur l'agitateur et commencer à agiter avec un set de vitesse modérée pendant 30 s. Éteindre l'agitateur et vérifier la présence de petites gouttelettes d'eau colorée à la surface de la plaque.

Augmenter les paramètres de vitesse, agiter pendant 30 s 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 ensuite progressivement la vitesse, vérifier l'absence de projections et utiliser ce réglage pour les étapes de lavages.

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

Charger 100 µL d'eau teintée dans les puits de la plaque de collecte 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 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. Le fait de 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 sur les aimants 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 pipetage. Contrairement aux pipetages successifs, le mélange par agitation ou magnétique permet un lavage simultané de tous les échantillons. Cela permet de réduire le temps et la consommation du nombre de cônes nécessaires à la préparation. La remise en suspension par pipetages successifs est cependant plus efficace que le mélange par agitation ou magnétique.

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

2.6 Procédures d'élution

L'ARN et l'ADN de l'agent pathogène purifiés peuvent être élués directement avec le tampon d'élution fourni. L'élution peut être effectuée dans un volume $\geq 50 \mu\text{L}$. Il est essentiel de recouvrir complètement les billes NucleoMag[®] 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 élevés peuvent être nécessaires pour couvrir la totalité du culot.

Les plaques pré-remplies NucleoMag[®] Pathogen (REF 744211) contiennent $100 \mu\text{L}$ de tampon d'élution NPE5 additionné d'azide de sodium à 0,02 % comme conservateur.

Vous cherchez une solution d'automatisation pour votre flux de travail avec le kit NucleoMag[®] Pathogen ?

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

* Dispositif de pipetage à 8 canaux

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention :

NPL1, NPB2 et le tampon ARN Carrier contiennent du sel chaotropique ! Porter des gants et des lunettes !

Tous les composants du kit **NucleoMag® Pathogen** doivent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette de l'emballage.

Les plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen doivent être conservées en position verticale à une température comprise entre 15 et 25 °C, sans exposition directe aux rayons UV ou à la lumière du soleil. Ne pas conserver les plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen à des températures supérieures à 25 °C ou inférieures à 15 °C. Vérifier que les tampons précipitent et préchauffer la plaque afin de dissoudre les précipités. Lorsqu'elles sont conservées correctement, les plaques préremplies sont stables jusqu'à : voir l'étiquette du kit.

Tous les tampons sont livrés prêts à l'emploi.

Avant de débiter une procédure **NucleoMag® Pathogen**, préparez les éléments suivants :

Protéinase K : Avant la première utilisation du kit, ajouter 3,35 mL de tampon de protéinase PB à chaque flacon de **protéinase K lyophilisée**. La solution de protéinase K dissoute doit être conservée à -20 °C. (Note : Les plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen sont livrées avec de la protéinase K liquide, prête à l'emploi).

ARN Carrier : Avant la première utilisation du kit, ajouter 500 µL de tampon pour ARN Carrier à chaque flacon d'**ARN Carrier lyophilisé**. Dissoudre l'ARN Carrier et conserver la solution d'ARN Carrier dissoute dans des aliquotes à -20 °C jusqu'à 6 mois.

Note : En raison de la procédure de production et de la faible quantité d'ARN Carrier contenue dans le flacon, l'ARN Carrier peut difficilement être visible.

NucleoMag® Pathogen		
REF	1 × 96 preps 744210.1	4 × 96 preps 744210.4
Protéinase K (lyophilisée)	1 flacon (75 mg) Ajouter 3,35 mL de tampon protéinase	3 flacons (75 mg/flacon) Ajouter 3,35 mL de tampon protéinase dans chaque flacon.
ARN Carrier (lyophilisé)	1 flacon (400 µg) Ajouter 500 µL de tampon ARN Carrier	4 flacons (400 µg/vial) Ajouter 500 µL de tampon ARN Carrier dans chaque flacon.

NucleoMag® Pathogen Prefilled Plates	
REF	1 × 96 preps 744210.1
ARN Carrier (lyophilisé)	1 flacon (400 µg) Ajouter 500 µL de tampon ARN Carrier

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoMag® Pathogen** ou avec les **plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen**, portez des vêtements de protection appropriés (p.e. une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection). Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité appropriées (FDS disponibles en ligne sur www.mn-net.com/msds).



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans le tampon NPL1 et le thiocyanate de guanidinium dans le tampon ARN Carrier peuvent former des composés très réactifs lorsqu'ils sont combinés à de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

Les déchets générés par le kit **NucleoMag® Pathogen** ou les **plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen** 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 tampon de lyse fortement dénaturant et du traitement à la protéinase K, 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 Protocole pour l'extraction d'ARN et d'ADN viraux et d'ADN microbien à partir de sang, de tissus homogénéisés, de sérum, de plasma, d'autres fluides corporels et de lavages

5.1 Préparation des échantillons

a) Échantillons de sang / salive

Un volume d'échantillon de 100 à 200 µL de sang est recommandé. Ne pas utiliser de volumes plus élevés. Lors de la procédure de traitement d'un échantillon de moins de 200 µL, ajuster avec du tampon PBS jusqu'à un volume final de 200 µL.

b) Échantillons de tissus

Homogénéiser les échantillons de tissus. En général, 5 à 10 mg d'échantillon peuvent être homogénéisés dans 400 µL de tampon PBS à l'aide d'un broyeur à billes. Si nécessaire, des quantités plus importantes d'échantillon peuvent être utilisées (jusqu'à 25 mg). Il convient de tenir compte du fait que les acides nucléiques totaux copurifiés peuvent provoquer une inhibition dans les essais PCR ultérieurs. Centrifuger l'échantillon homogénéisé et utiliser jusqu'à 200 µL de surnageant clarifié pour la suite de la procédure. Si l'on utilise moins de 200 µL, ajuster avec du tampon PBS pour obtenir un volume final de 200 µL.

Pour l'extraction de l'ARN viral :

Le tissu peut également être broyé dans un tampon contenant du sel chaotrope (par exemple, le tampon RA1, voir les informations de commande) et du bêta-mercaptoéthanol ou de l'agent réducteur TCEP (voir les informations de commande, paragraphe 7.2).

c) Écouvillons

Incuber les écouvillons dans du PBS, du chlorure de sodium ou du milieu de culture cellulaire pendant 30 min sous agitation. Retirer ensuite l'écouvillon en le pressant contre les parois du tube pour faire sortir la plus grande partie du liquide ou utiliser nos NucleoSpin® Forensic Filters (filtres à centrifuger simples). Pour la clarification des lysats en format 96 puits, utiliser la plaque NucleoSpin® Trace Filter (voir les informations de commande, paragraphe 7.2).

d) Fèces

Mélanger 1 volume de fèces (p.e., 500 µL) avec un volume égal de tampon PBS. Mélanger vigoureusement en vortexant pendant 1 min. Laisser les particules se déposer ou centrifuger à faible vitesse (p.e. à 500 x g). Procéder avec le surnageant clarifié. Pour les bactéries difficiles à lyser, un broyage mécanique ou un traitement à l'aide de billes appropriées peut être nécessaire (p.e. tubes de billes de type A, voir les informations de commande au paragraphe 7.2).

e) Purification des échantillons extraits par TRIzol®.

Après la séparation des phases par centrifugation, procéder avec la phase aqueuse (la phase supérieure incolore ; environ 400 µL). Pour la suite de la procédure, commencer par l'étape 2 du protocole de purification en mélangeant 400 µL de la phase aqueuse avec 600 µL de tampon NPB2 et 20 µL de NucleoMag® B-Beads.

Dans la procédure du **NucleoZOL**, la phase aqueuse peut être utilisée de la même manière que celle décrite ci-dessus.

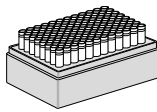
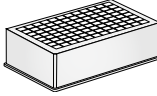

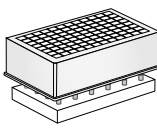
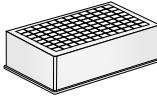

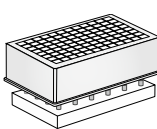
5.2 Résumé du protocole

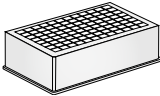

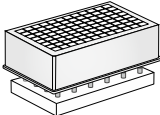
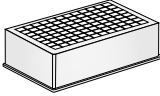

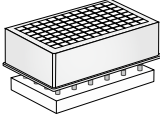
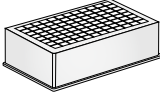
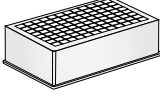

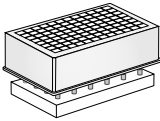
Pour les exigences en matière de matériel, voir le paragraphe 2.3.

Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir page 16.

Avant de débiter la procédure :

Vérifier si la protéinase K et l'ARN Carrier ont été préparés conformément au paragraphe 3.

1	Lyse de l'échantillon	<p>200 µL d'échantillon (homogénéisé)</p> <p>20 µL Protéinase K</p> <p>4 µL ARN Carrier</p> <p>180 µL NPL1</p> <p>Mélanger</p> <p>TA, 15 min ou 56 °C, 15 min</p>	
2	Fixer les acides nucléiques aux NucleoMag® B-Beads	<p>600 µL NPB2</p> <p>20 µL B-Billes</p>	
		<p>Mélanger par agitation pendant 5 à 10 min à TA.</p> <p><i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i></p>	
		<p>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</p>	
3	Lavage avec le tampon NPW3	<p>Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP</p> <p>600 µL NPW3</p>	
		<p>Remettre en suspension : Agiter 1 min à TA</p>	
		<p>Retirer le surnageant après 2 min de séparation.</p>	

4	Lavage avec le tampon NPW4	Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP 600 µL NPW4	
		Remettre en suspension : Agiter 1 min à TA	
		Retirer le surnageant après 2 min de séparation.	
5	Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol	Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP 600 µL d'éthanol 80 %	
		Remettre en suspension : Agiter 1 min à TA	
		Retirer le surnageant après 2 min de séparation.	
6	Étape de séchage	Sécher à l'air libre pendant 10 min à température ambiante	
7	Elution de l'ARN et de l'ADN	Retirer le Square-well Block du NucleoMag® SEP 50-100 µL NPE5	
		Agitation 5 min à TA <i>(Optionnel : mélanger par pipetages successifs)</i>	
		Séparer 2 min et transférer l'ARN et l'ADN dans la plaque / les tubes d'éluion.	

5.3 Protocole détaillé

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques à aimants statiques (p.e. NucleoMag® SEP) et les agitateurs de plaques adaptés. Il est recommandé d'utiliser un Square-well Block pour la séparation (voir les informations de commande, paragraphe 7.2). L'extraction de l'ARN et de l'ADN des pathogènes 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 guide pour l'adaptation du kit aux instruments robotisés.

1 Lyse de l'échantillon

Prédispenser **20 µL de protéinase K** et **200 µL d'échantillon** dans un tube de réaction approprié. Ajouter **180 µL de tampon de lyse NPL1** au tube de réaction.

Optionnel : Ajouter 4 µL de la solution mère d'ARN Carrier dans le tube de réaction.

Bien mélanger par pipetages successifs et incuber à température ambiante pendant 15 min avec agitation. L'étape de lyse peut également être réalisée dans des barrettes de tubes (voir informations de commande, paragraphe 7.2).

Après l'incubation de la lyse, centrifuger pour collecter l'échantillon des couvercles des tubes de lyse et transférer chaque lysat dans les puits d'un Square-well Block.

L'incubation de la lyse peut être effectuée à 56 °C pour augmenter l'efficacité de la lyse, p.e. pour l'extraction d'ADN bactérien à partir de bactéries difficiles à lyser.

Optionnel : la lyse peut être soutenue par un prétraitement de l'échantillon avec des billes appropriées pour le broyage mécanique des bactéries difficiles à lyser.

2 Fixer les acides nucléiques aux billes magnétiques

Ajouter **20 µL de NucleoMag® B-Beads** remises en suspension et **600 µL de tampon de fixation NPB2** à l'échantillon lysé.

Mélanger par pipetages successifs 6 fois et **agiter** pendant **5 min** à **température ambiante**.

Alternativement, lors de la procédure du kit sans agitateur, pipeter de haut en bas 10 fois et incuber pendant 5 min à température ambiante.

Les billes NucleoMag® B-Beads et le tampon NPB2 peuvent être mélangés préalablement.

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 soit formée.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le Square-well Block sur le NucleoMag® SEP un séparateur magnétique. 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.

Ne pas perturber les billes attirées lors de l'aspiration du surnageant.

3 Lavage avec le tampon NPW3

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

Ajouter **600 µL de tampon NPW3** 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.

4 Lavage avec le tampon NPW4

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter **600 µL de tampon NPW4** 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.

5 Lavage avec le tampon à 80 % d'éthanol

Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter **600 µL d'éthanol à 80 %** 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 Sécher les billes magnétiques à l'air libre

Sécher à l'air le culot de billes magnétiques pendant 10 min à température ambiante.

7 Elution de l'ARN et de l'ADN

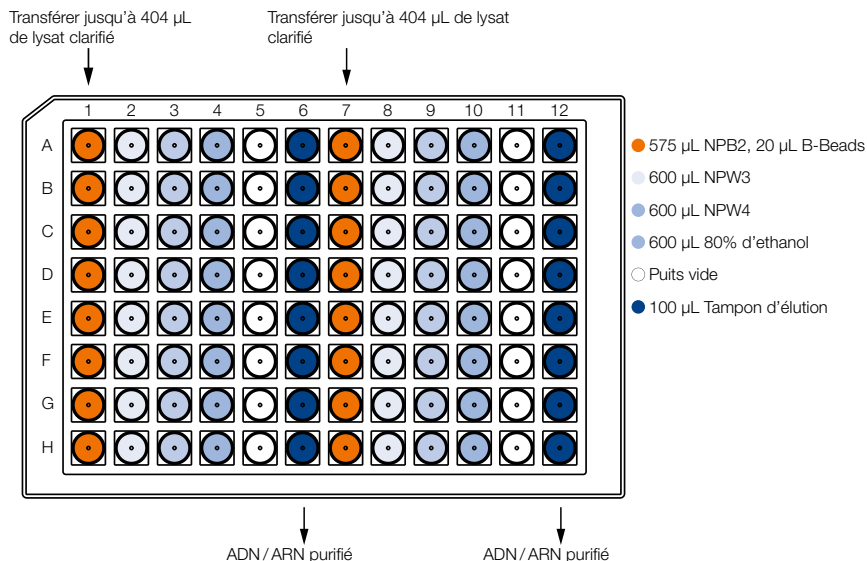
Retirer le Square-well Block du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter le volume souhaité de **NPE5 (50 – 100 µL)** dans chaque puits du Square-well Block et remettre les billes en suspension par agitation pendant 5 min à température ambiante. Alternativement, remettre les billes en suspension complètement par pipetages successifs et incubé pendant **5 min 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 aient été attirées par les aimants. Transférer le surnageant contenant les acides nucléiques purifiés dans des microtubes ou des barrettes de tubes (voir informations de commande, paragraphe 7.2).

6 Protocole pour les plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen

Les plaques pré-remplies NucleoMag® Pathogen sont spécifiquement conçues pour être utilisées sur les instruments MagnetaPure 32 Plus ou IsoPure™ Mini uniquement. Veuillez contacter notre support technique pour toute question concernant la compatibilité sur d'autres instruments.

Aperçu schématique de la plaque de réactifs pré-remplie.



Note: Les fichiers de méthode nécessaires à la procédure de traitement des plaques préremplies NucleoMag® Pathogen sur les instruments IsoPure™ Mini ou MagnetaPure 32 Plus peuvent être demandés à l'adresse suivante : support@mn-net.com.

6.1 Protocole détaillé pour IsoPure™ Mini et MagnetaPure 32 Plus

La préparation (voir paragraphe 5) et la lyse des échantillons doivent être effectuées en dehors de l'instrument. Avant de débiter la procédure :

- Porter des lunettes de protection et des vêtements de protection appropriés
- Vérifier si l'ARN Carrier a été préparé conformément au chapitre 3.
- Vérifier l'absence de précipités dans les tampons conformément au chapitre 3.
- Vérifier si le bon programme est installé sur votre instrument.
 - IsoPure™ Mini : NMPathogen (durée d'exécution d'environ 30 min)
 - MagnetaPure 32 Plus : NMPathogen (durée d'exécution d'environ 30 min)

1 Lyse des échantillons

Prédispenser **20 µL de protéinase K** et **200 µL d'échantillon** dans un tube de réaction approprié. Ajouter 180 µL de tampon NPL1 au tube de réaction. Optionnel : ajouter **4 µL** de la solution mère d'**ARN Carrier** au tube de réaction. Bien mélanger par pipetages successifs ou par agitation et incubé à **température ambiante** pendant **15 min** avec agitation. Alternativement, l'étape de lyse peut être réalisée dans des barrettes de tubes (voir informations de commande).

Pendant ce temps, préparer la plaque 96 puits pré-remplie NucleoMag® Pathogen.

Après l'incubation de la lyse, centrifuger pour recueillir les échantillons des couvercles des tubes de lyse.

Note : Consultez le paragraphe 5 pour la préparation de l'échantillon.

2 Préparer la/les plaque(s) de réactifs

Centrifuger brièvement (par exemple 10 à 15 s à 1 000 × g) la plaque 96 puits pré-remplie NucleoMag® Pathogen dans une centrifugeuse appropriée pour éliminer les gouttelettes de la face intérieure du film.

3 Retirer le(s) film(s)

Retirez délicatement le film de la plaque de réactifs en tirant sur le film d'un côté avec une force égale.

Note : Vérifier qu'il n'y a pas de résidus de film sur la plaque et l'enlever avec une pince à épiler si nécessaire.

4 Transférer les lysats clarifiés

Transférer jusqu'à 400 µL de l'échantillon clarifié et lysé de l'étape 1 dans les puits respectifs des colonnes 1 et 7 des plaques utilisées.

Note : Ne pas souiller le bord supérieur de la plaque 96 Deep-well.

Note : Jusqu'à 404 µL de lysat clarifié peuvent être transférés si l'ARN Carrier est utilisé.

5 Sélectionner le protocole et lancer le run

Charger la (les) plaque(s) sur l'instrument.

Insérer les Tip combs sur les rainures de montage.

Lancer le run.

Note : Equiper tous les barreaux magnétiques avec des Tip combs même pour les puits non utilisés.

6 Transférer l'éluat

L'instrument s'arrête après la dernière étape d'éluion. Retirer et jeter les Tip Comb.. Décharger la/les plaque(s) de l'instrument et transférer l'éluat pour une procédure ultérieure dans une plaque ou des tubes appropriée (és).

7 Annexes

7.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Causes possibles et suggestions
Faible rendement / faible sensibilité	<i>Lyse des échantillons incomplète</i>
	<ul style="list-style-type: none"> L'échantillon mélangé avec le tampon de lyse et la protéinase K n'a pas été complètement homogénéisé et mélangé avec le tampon de lyse, la protéinase K. Le mélange doit être agité en permanence. Sinon, prolonger le temps d'incubation avec la protéinase K.
	<i>Volume de tampon d'éluion insuffisant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Le culot de billes doit être entièrement recouvert de tampon d'éluion et doit être entièrement remis en suspension.
	<i>Performance insuffisante du tampon d'éluion pendant l'étape d'éluion</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Retirer complètement le tampon du culot de billes après les étapes de fixation et de lavage. Le tampon restant diminue l'efficacité des étapes suivantes.
	<i>Aspiration d'une partie des billes présents sur l'aimant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Ne pas perturber les billes attirées lors de l'aspiration du surnageant. Il faut être particulièrement prudent lors de l'élimination du lysat des billes, car le lysat est généralement trop opaque pour permettre un contrôle visuel du culot.
	<i>Aspiration et perte de billes</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Durée de séparation magnétique trop courte ou vitesse d'aspiration trop élevée.
Pureté insuffisante / faible sensibilité	<i>Procédure de lavage insuffisante</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Utiliser uniquement les combinaisons appropriées de séparateur et de plaque, par exemple, Square-well Block en combinaison avec NucleoMag® SEP. 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 des tubes appropriée(s).

Problème

Causes possibles et suggestions

Mauvaise performance de l'ADN/ARN dans les applications en aval

Élimination de l'éthanol des tampons de lavage

- Veillez à éliminer toute la solution de lavage éthanolique à 80 % du lavage final, car l'éthanol résiduel interfère avec les applications en aval.

Évaporation de l'éthanol des tampons de lavage

- 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

Durée de séparation magnétique trop courte

- Augmenter la durée de séparation pour permettre aux billes d'être complètement attirées par les aimants avant d'aspirer tout liquide du puits.

Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'élution)

- 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.
-

7.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® Pathogen	744210.1	1 × 96 preps
	744210.4	4 × 96 preps
NucleoMag® Pathogen Prefilled Plates	744211	6 × 16 preps
NucleoMag® SEP Mini	744901	1
NucleoMag® SEPMaxi	744902	1
NucleoMag® SEP 24	744903	1
Square-well Blocks	740481	4
	740481.24	24
Film PE auto-adhésif	740676	50 feuilles
Rack de Tubes Strips (le set se compose d'un rack, de 12 Tubes Strips de 8 tubes chacune, et 12 barrettes de 8 bouchons)	740477	4 sets
	740477.24	24 sets
NucleoSpin® Forensic Filters (mini-filtre à centrifuger semi-perméable ; sous blister individuel)	740988.50	50
	740988.250	250
NucleoSpin® Forensic Filters (Bulk) (mini-filtre à centrifuger semi-perméable ; conditionné en vrac)	740988.50B	50
	740988.250B	250
	740988.1000B	1000
NucleoSpin® Trace Filter Plate (plaque 96 puits de filtration pour p.e. séparer les écouvillons du lysat)	740677	20
MN Bead Tubes Type A	740786.50	50
96-well Accessory Kit A pour KingFisher Square-well Blocks, Deep-well tip Combs, Plaques d'éluion pour 4 × 96 NucleoMag® Pathogen preps avec la plateforme KingFisher® Flex	744950	1 set
Tampon RA1 (60 mL)	740961	60 mL
Agent réducteur TCEP	740395.107	107 mg
96 Deep-well plates pour systèmes à barreaux magnétiques	744955	25
8-well Tip Combs pour système à barreaux magnétiques	744960	50
Kit d'accessoires pour 8 puits systèmes à barreaux magnétiques	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
Tel. : +49 24 21 969-333
support@mn-net.com

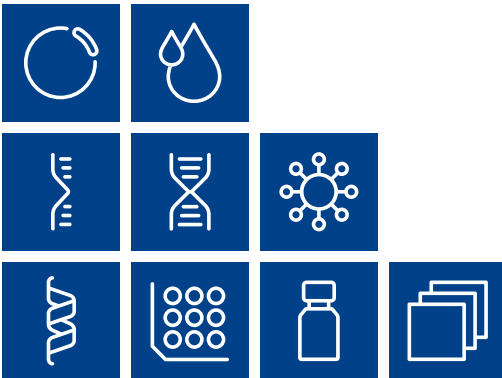
7.4 Versions linguistiques et prédominance

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

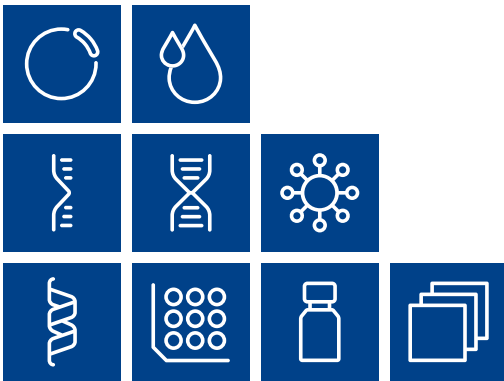
Marques déposées :

TRIZol[®] est une marque déposée de Molecular Research Center, Inc.
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 de leur propriétaire respectif - même s'il ne s'agit pas d'une dénomination spéciale. La mention de produits et de marques n'est qu'une forme d'information (c'est-à-dire qu'elle ne porte pas atteinte aux marques et ne peut être considérée comme une forme de recommandation ou d'évaluation). En ce qui concerne ces produits ou services, nous ne pouvons donner aucune garantie quant au choix, à l'efficacité ou au 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

