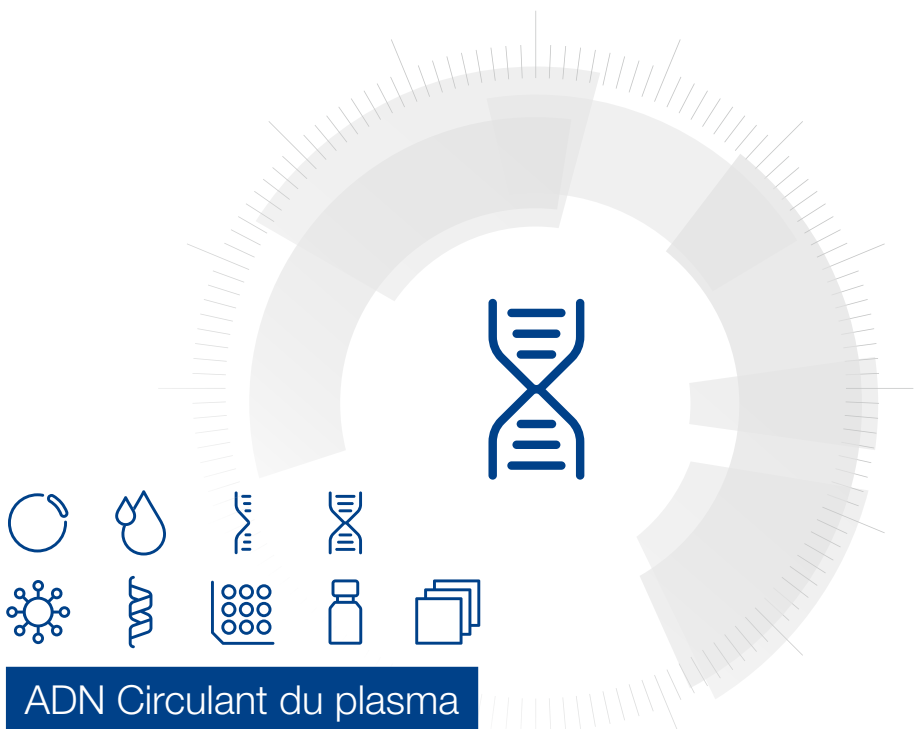


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



■ NucleoMag® cfDNA

Janvier 2023 / Rev. 04

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	Composition	4
1.1	Composants du kit	4
1.2	Consommables et équipement nécessaires	5
1.3	A propos de ce manuel d'utilisation	5
2	Description	6
2.1	Principe général	6
2.2	Caractéristiques du kit	6
2.3	Rendement et taille des fragments d'ADNlc à partir de plasma	7
2.4	Traitement des échantillons de plasma	8
2.5	Procédure d'éluion	8
2.6	Stabilité de l'ADN extrait	8
2.7	Systèmes de séparation magnétiques	9
2.8	Réglage de l'agitateur	9
2.9	Manipulation des billes	10
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	11
4	Instructions de sécurité	12
4.1	Elimination des déchets	12
5	Protocoles pour l'extraction d'ADNlc à partir de plasma	13
5.1	Résumé du protocole	13
5.2	Protocole détaillé	16
6	Annexes	19
6.1	Guide de résolution des problèmes	19
6.2	Information de commandes	21
6.3	Restrictions d'utilisation / Garantie	22

1 Composition

1.1 Composants du kit

NucleoMag [®] cfDNA		
REF	1 × 48 preps* 744550.1	4 × 48 preps* 744550.4
Tampon de Lyse MCF1	60 mL	2 × 125 mL
Tampon de Fixation MCF2	125 mL	4 × 125 mL
Tampon de Lavage MCF3	60 mL	250 mL
Tampon de Lavage MCF4**	25 mL	50 mL
Tampon d'éluion MCF5	13 mL	30 mL
Protéinase K Liquide	2 × 1.4 mL	2 × 6 mL
Billes NucleoMag [®] P-Beads	2 × 1.4 mL	6 × 1.4 mL
Manuel d'utilisation	1	1

* Le conditionnement des kits est calculé pour 1 × 48 preps ou 4 × 48 preps pour des échantillons de 2 mL de plasma. Lors de l'utilisation de volumes supérieurs de plasma, le nombre de preps varie (voir 2.2)

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

1.2 Consommables et équipement nécessaires

Produit	REF	Conditionnement
Séparateur magnétique		
NucleoMag® SEP 24 (voir chapitre 2.7)	744903	1
NucleoMag® SEP Maxi (voir chapitre 2.7)	744902	1
Tubes de lyse pour l'incubation des échantillons		
Ex : Snap Tubes (Tubes 50 mL)	740822.10	10
	740822.50	50
Plaque de lyse pour l'incubation des échantillons		
Blocs 24 puits fonds carrés avec couvercle en silicone (24 puits de 10 mL fonds plats)	740679.4	4
Plaque d'éluion pour la collecte de l'ADN purifié		
Plaque d'éluion 96 puits fond en 'U' (puits de 300 µL) pour le stockage des éluats, avec films adhésifs en PE inclus	740486.24	24
Pour une utilisation sur l'automate KingFisher® :		
Ex. : Set d'accessoires 'KingFisher™ Accessory Kit B' (Blocs 96 puits, Tip combs, Plaques d'éluion pour 4 × 96 preps)	744951	1 set

1.3 A propos de ce manuel d'utilisation

Nous recommandons vivement la lecture du protocole détaillé aux nouveaux utilisateurs du kit **NucleoMag® cfDNA** avant la première utilisation. Les utilisateurs expérimentés, cependant, pourront se référer au résumé du protocole, conçu pour vérifier rapidement l'enchaînement des étapes de la procédure de purification

Toute la documentation technique est disponible en ligne : www.mn-net.com.

2 Description

2.1 Principe général

Le kit **NucleoMag® cfDNA** est conçu pour extraire efficacement l'ADN circulant à partir de plasma sanguin humain. L'ADN fragmenté de 50 pb et plus peut être purifié avec un rendement élevé grâce à l'adsorption réversible des acides nucléiques aux billes paramagnétiques, en présence des tampons adéquats.

La lyse des échantillons est effectuée lors de l'incubation des échantillons à 56 °C en présence de protéinase K et du tampon de lyse MCF1. Les conditions de fixation de l'ADN aux billes paramagnétiques sont créées en ajoutant au lysat le tampon de fixation MCF2 et les billes NucleoMag® P-Beads. Trois étapes de lavage permettent d'éliminer efficacement les substances contaminantes tels que les inhibiteurs de PCR. L'éthanol résiduel issu des lavages est éliminé lors d'une étape de séchage. L'ADN purifié est finalement élué dans 50–200 µL de tampon d'éluion MCF5, légèrement alcalin et de faible force ionique (5 mM Tris/HCl ; pH 8.5). L'ADN élué peut être directement utilisé pour les applications avalées. Le kit NucleoMag® cfDNA est utilisable manuellement, ou automatisable sur les robots pipeteurs ou les séparateurs magnétiques automatiques courants.

2.2 Caractéristiques du kit

- Le kit **NucleoMag® cfDNA** est recommandé pour l'extraction rapide, manuelle ou automatisée de l'ADN libre circulant (ADNlc) à partir de plasma sanguin humain traité EDTA. Le rendement d'ADN dépend fortement des échantillons, mais est généralement de l'ordre de 0.1 à 100 ng d'ADN par mL de plasma. Le kit **NucleoMag® cfDNA** permet d'obtenir des rendements d'extraction élevés pour l'ADN très fragmenté ≥ 50 bp. L'éluion est réalisable dans un volume réduit 50–200 µL de tampon d'éluion et l'ADN obtenu est utilisable directement pour les applications comme la PCR en temps réel, le NGS, etc.

Résumé des caractéristiques du kit

Paramètre	NucleoMag® cfDNA
Technologie	Technologie des billes magnétiques
Format	Billes superparamagnétiques hautement réactives
Echantillon	Plasma sanguin humain traité EDTA / tubes 'Cell-Free DNA BCT® plasma' (Streck)
Volume	1 – 10 mL par préparation
Rendement	Dépendant des échantillons, de leur stockage et qualité
Volume d'éluion	50 – 200 µL
Utilisation	Pour la recherche uniquement

- Le kit **NucleoMag® cfDNA** est conçu pour l'extraction de l'ADN d'échantillons de 2 mL de plasma, mais la procédure peut être adaptée pour des échantillon de 1 à 10 mL. Le tableau ci-dessous mentionne le nombre de preps réalisables avec les différents conditionnements du kit en fonction du volume d'échantillon de plasma utilisé :

Table 1: Estimation du nombre de preps réalisable en fonction du volume d'échantillon à extraire

Volume de plasma	Nombre d'extractions (1 × 48 preps REF 744550.1)	Nombre d'extractions (4 × 48 preps REF 744550.4)
1 mL	96	384
2 mL	48	192
4 mL	24	96
6 mL	16	64
8 mL	12	48
10 mL	10	40

Pour des informations détaillées concernant l'adaptation des volumes de tampons, de billes NucleoMag® P-Beads et de Protéinase K en fonction du volume de plasma, voir les chapitres 5.1 et 5.2.

2.3 Rendement et taille des fragments d'ADNlc à partir de plasma

Généralement, les concentrations en ADN des échantillons de plasma se situent entre 0,1 et plusieurs centaines de ng par mL. La quantité d'ADNlc dans le plasma dépend de l'état de santé du donneur, des méthodes de collecte et de conservation du sang, de la procédure de préparation du plasma, de la méthode d'extraction de l'ADN, etc.

Une part significative de l'ADNlc du plasma provient de l'apoptose des cellules. Ainsi, un pourcentage considérable de cet ADN circulant est hautement fragmenté. Cependant, le degré de fragmentation de l'ADN et la proportion d'ADN fragmenté par rapport à l'ADN de haut poids moléculaire est variable en fonction de plusieurs paramètres comme l'origine de l'ADN (fœtal, tumoral, microbien), des conditions de santé des donneurs, de la méthode de collecte du sang et de la conservation des échantillons.

2.4 Traitement des échantillons de plasma

Le rendement et la qualité de l'ADN circulant sont fortement influencés par la méthode de collecte du sang, sa conservation et la procédure de préparation du plasma. Il est recommandé d'uniformiser au mieux ces étapes de manière à obtenir une reproductibilité maximale.

Le plasma peut être préparé selon les recommandations suivantes :

Préparation du plasma à partir de sang humain traité EDTA

- 1 Centrifuger les échantillons de sang frais pendant 10 min à 2,000 x *g*.
- 2 Transférer le plasma sans perturber les cellules et particules sédimentés dans un nouveau tube
- 3 Congeler le plasma à -20 °C pour le stocker jusqu'à extraction de l'ADN.
- 4 Décongeler les échantillons de plasma et centrifuger pendant 3 min \geq à 11,000 x *g* dans une petite centrifugeuse de paillasse (pour les petits volumes) ou 10 min à 4,500 x *g* dans une centrifugeuse adaptée pour les volumes plus importants pour éliminer les cellules résiduelles, les débris cellulaires et les particules. Utiliser le surnageant pour la procédure d'extraction de l'ADN.

Préparation du plasma à partir des tubes Cell-Free DNA BCT®

Suivre les recommandations du manuel d'utilisation des tubes Cell-Free DNA BCT® (Streck).

2.5 Procédure d'élution

Le volume d'élution standard recommandé est de 100 μ L. Réduire le volume d'élution à 50 μ L permet d'augmenter la concentration finale de l'ADN. Il est essentiel que les billes NucleoMag® P-Beads soient complètement recouvertes par le tampon à l'étape d'élution. Le volume de tampon nécessaire dépend du système de séparation utilisé (la position des culots dans la plaque de séparation peut différer selon le matériel utilisé). Pour une élution efficace, les culots de billes doivent être totalement resuspendus dans le tampon d'élution. Avec certains séparateurs magnétiques, des volumes d'élution plus importants peuvent être nécessaires afin de recouvrir la totalité des culots.

Note : l'élution est réalisable à température ambiante. Le rendement peut être accru de 15–20 % si l'élution est effectuée à 56 °C.

2.6 Stabilité de l'ADN extrait

Les éluats doivent être conservés sur la glace pour un stockage à court terme et congelés à -20 °C pour un stockage à long terme, en raison de la faible teneur en ADN des échantillons de plasma, de la faible quantité extraite d'ADN purifié, ainsi que de la fragmentation et de l'absence d'inhibiteurs de DNases (le tampon d'élution NE contient PAS d'EDTA).

2.7 Systèmes de séparation magnétiques

Pour utiliser le kit **NucleoMag® cfDNA**, le séparateur NucleoMag® SEP 24 est recommandé. La séparation est effectuée en blocs 24 puits à fond 'en U' (voir 'informations de commande'). Le séparateur magnétique NucleoMag® SEP Maxi peut être utilisé pour effectuer la séparation en tubes 50 mL. Le kit est également utilisable avec d'autres séparateurs courants.

Séparateur magnétiques à aimants fixes

Les séparateurs magnétiques comme le NucleoMag® SEP 24 ou d'autres séparateurs courants sont utilisables manuellement ou sur des automates de pipetage. Le séparateur NucleoMag® SEP 24 doit être utilisé avec des blocs 24 puits adéquats permettant une resuspension optimale des billes par agitation pendant les étapes de lavages et l'éluion. Alternativement, les billes peuvent être remises en suspension par pipetages répétés. Pour une automatisation complète de la procédure, un bras manipulateur de plaques est nécessaire afin de transférer le bloc 24 puits de l'agitateur (pour les étapes de resuspension) vers le séparateur magnétique (pour les étapes de séparation 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

Les billes magnétiques sont transférées successivement dans des tubes ou blocs contenant les différents tampons. Les billes sont resuspendues par le mouvement des protections des aimants (aimants rétractés) et les billes sont collectées lors de la pénétration des aimants dans leur protection ('tip combs'). Les billes sont alors transférées dans le tube ou le bloc suivant.

2.8 Réglage de l'agitateur

Lors de l'utilisation d'un agitateur à plaques pour la resuspension des billes lors des lavages et de l'éluion, la vitesse d'agitation doit être précisément ajustée pour chaque combinaison de bloc/agitateur, afin de prévenir tout risque de contaminations croisées induites par des projections de liquides entre les puits. Procéder ainsi :

Réglage de l'agitateur pour les étapes de fixation et de lavages :

- Déposer 5 mL et 1 mL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation. Placer le bloc sur l'agitateur et agiter à vitesse modérée pendant 30 secondes. Stopper l'agitation et vérifier l'absence de projections de liquide coloré en surface du bloc.
- Accroître la vitesse d'agitation, pendant 30 s et vérifier à nouveau la surface du bloc.
- Continuer à augmenter la vitesse d'agitation jusqu'à observer des projections en surface du bloc. Réduire la vitesse d'agitation, vérifier à nouveau et utiliser ce réglage pour les étapes de lavages.

Réglage de l'agitateur pour l'étape d'éluion :

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

Note : les réglages de l'agitateur doivent prendre en compte les volumes réellement présents dans les puits en cas d'utilisation d'échantillons de volume supérieur à 2 mL.

2.9 Manipulation des billes

Distribution des billes

Une distribution homogène des billes NucleoMag® P-Beads dans les puits est essentielle pour optimiser la reproductibilité des résultats. Ainsi avant de distribuer les billes, veiller à leur resuspension complète. Agiter le flacon de stockage ou placer le sur un vortex brièvement. Mélanger au préalable les billes et le tampon de fixation permet de faciliter la distribution homogène des billes dans les puits de la plaque de séparation. Lors de l'automatisation du kit, il est recommandé d'effectuer une étape de mélange des billes avant de les aspirer afin de les déposer dans les échantillons. Veiller à prévoir cette étape de mélange lors de la programmation de l'automate.

Durée des étapes de séparation des billes

L'attraction des billes magnétiques par les aimants dépend de la force des aimants, du modèle de plaque de séparation utilisé, de la distance entre la plaque et les aimants, et du volume contenu dans les puits. Vérifier les temps d'aimantation nécessaire pour chaque étape en fonction du matériel utilisé. Il est recommandé d'utiliser des plaques de séparation validées pour le séparateur magnétique à disposition.

Lavage des billes

Les étapes de lavage des billes peuvent s'effectuer par agitation ou mélange par pipetage. Contrairement au pipetage, l'utilisation d'un agitateur à plaques ou magnétique permet de resuspendre les billes de tous les puits simultanément. Ceci réduit la durée de la procédure et le nombre de cônes nécessaires. La resuspension des billes par pipetage est, cependant, plus efficace que l'agitation mécanique ou magnétique du bloc.

Méthode	Efficacité de resuspension	Rapidité	Faible volume d'éluion possible	Nombre de cônes requis
Agitation magnétique	+	++	+	Faible
Agitation mécanique	++	++	+++	Faible
Pipetage	+++	+*	++	Elevé

+ : acceptable, ++ : bon, +++ : excellent

* en fonction du système de pipetage utilisé (nombre et volume des canaux)

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention : les tampons MCF1, MCF2 et MCF3 contiennent des sels chaotropiques ! Porter des gants et des lunettes de protection !

ATTENTION : les tampons MCF1, MCF2 et MCF3 contiennent du chlorhydrate de guanidine/ du thiocyanate de guanidine pouvant former des composés hautement réactifs en présence d'eau de javel (hypochlorite de sodium). **NE PAS ajouter d'eau de javel ou de solutions acides dans les déchets liquides issus de la procédure.**

Conditions de stockage :

- Tous les composants du kit peuvent être stockés à 15–25 °C et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette de l'emballage.
- En cas d'apparition de précipité dans les tampons, réchauffer les solutions à 25–37 °C pour les dissoudre avant utilisation.
- L'absence de résidus de matériel infectieux dans les déchets issus de la procédure NucleoMag® cfDNA n'a pas été testée. Une contamination des déchets liquides par du matériel infectieux est cependant hautement improbable en raison des propriétés fortement dénaturantes du tampon de lyse et de l'utilisation de Protéinase K, mais ne peut pas totalement être exclue. Ainsi, les déchets liquides doivent être considérés comme potentiellement infectieux et donc manipulés et éliminés selon les normes locales en vigueur.

Avant de débiter la procédure **NucleoMag® cfDNA**, préparer :

- Tampon de lavage MCF4 : Ajouter le volume indiqué d'éthanol (96–100 %) au tampon MCF4 concentré avant utilisation. Indiquer sur le flacon que l'éthanol a été rajouté. Conserver le tampon de lavage MCF4 reconstitué à 15–25 °C pendant un an maximum.

NucleoMag® cfDNA		
REF	1 x 48 preps 744550.1	4 x 48 preps 744550.4
Tampon de lavage MCF4 (Concentré)	25 mL Ajouter 100 mL d'éthanol	50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol

- **La Protéinase K Liquide** est prête à l'emploi. Après ouverture, stocker la **Protéinase K Liquide** à 4 °C ou à -20 °C.
- **Les billes NucleoMag® P-Beads** sont prêtes à l'emploi. Après ouverture, stocker les NucleoMag® P-Beads à 4 °C. **NE PAS stocker les billes NucleoMag® P-Beads à -20 °C.**

4 Instructions de sécurité

Lorsque vous travaillez avec le kit **NucleoMag[®] cfDNA**, portez des vêtements de protection appropriés (par exemple : une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection). Pour plus d'informations, consultez 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 MBL1 et le perchlorate de sodium dans les tampons MBL2 et MBL3 peuvent former des composés hautement réactifs lorsqu'ils sont combinés avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, n'ajoutez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets liquides issus de la procédure.

Les déchets générés par le kit **NucleoMag[®] cfDNA** n'ont pas été testés pour 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 Protocoles pour l'extraction d'ADNlc à partir de plasma

5.1 Résumé du protocole

La procédure ci-dessous décrit le protocole d'extraction de l'ADNlc à partir de 2 mL de plasma humain traité EDTA. Des échantillons de 1 – 10 mL de plasma sont utilisables en adaptant les volumes de Protéinase K, de billes magnétiques et de tampons :

Volume de plasma [mL]	Protéinase K [µL]	Tampon MCF1 [mL]	Tampon MCF2 [mL]	NucleoMag® P-Beads [µL]	Tampons de lavage [mL]
1	25	0.45	1	15	0.5
2	50	0.9	2	30	1
4	100	1.8	4	60	1
6	150	2.7	6	60	2
8	200	3.6	8	60	2
10	250	4.5	10	90	2

Avant de débiter la préparation :

- Préparer les échantillons de plasma selon les recommandations du chapitre 2.4
- Vérifier que le tampon de lavage MCF4 a bien été préparé selon les indications du chapitre 3.
- Régler un bain marie ou un bloc chauffant à 56 °C (pour l'incubation des lysats).

Protocole pour 2 mL de plasma

1 Lyse de l'échantillon Ajouter 50 µL de Protéinase K Liquide à 2 mL de plasma

Mélanger

TA, 15 min

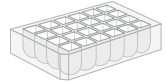
Ajouter 900 µL de MCF1

Mélanger

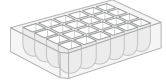
56 °C, 30 min

2 Fixation des ADN aux billes NucleoMag[®] P-Beads

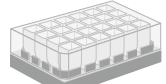
Ajouter 30 µL de NucleoMag[®] P-Beads
Ajouter 2 mL de MCF2



Mélanger en agitant 10 min à TA
(Option : Mélanger par pipetage)

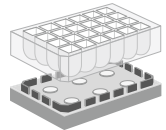


Éliminer le surnageant après 5 min de séparation sur le NucleoMag[®] SEP 24

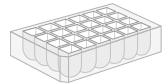


3 Lavage avec MCF3

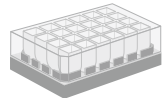
Enlever le bloc du NucleoMag[®] SEP 24
Ajouter 1 mL de MCF3



Resuspendre : agiter 2 min à TA
(Option : Mélanger par pipetage)

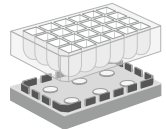


Éliminer le surnageant après 2 min de séparation sur le NucleoMag[®] SEP 24

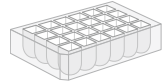


4 Lavage avec MCF4 (1er)

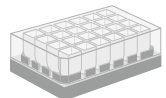
Enlever le bloc du NucleoMag[®] SEP 24
Ajouter 1 mL de MCF4



Resuspendre : agiter 2 min à TA
(Option : Mélanger par pipetage)

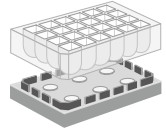


Éliminer le surnageant après 2 min de séparation sur le NucleoMag[®] SEP 24

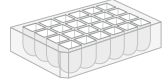


5 Lavage avec MCF4
(2ème)

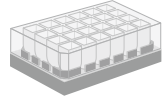
Enlever le bloc du NucleoMag® SEP 24
Ajouter 1 mL de MCF4



Resuspendre : agiter 2 min à TA
(Option : Mélanger par pipetage)

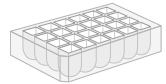


Éliminer le surnageant après 2 min de séparation sur le NucleoMag® SEP 24



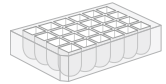
6 Séchage des billes
magnétiques

15 min à TA
(Option : sécher à 56 °C)

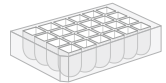


7 Elution de l'ADN

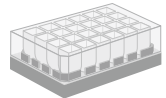
Ajouter 50–200 µL de MCF5
(Option : Eluer à 56 °C)



Agiter 5 min à TA
(Option : Mélanger par pipetage)



Séparer les billes 2 min sur le NucleoMag® SEP 24 et transférer l'ADN dans une plaque / des tubes



5.2 Protocole détaillé

La procédure ci-dessous décrit le protocole d'extraction de l'ADNc à partir de 2 mL de plasma humain traité EDTA. Des échantillons de 1 – 10 mL de plasma sont utilisables en adaptant les volumes de Protéinase K, de billes magnétiques et de tampons :

Volume de plasma [mL]	Protéinase K [μ L]	Tampon MCF1 [mL]	Tampon MCF2 [mL]	NucleoMag® P-Beads [μ L]	Tampons de lavage [mL]
1	25	0.45	1	15	0.5
2	50	0.9	2	30	1
4	100	1.8	4	60	1
5	125	2.25	5	60	2
6	150	2.7	6	60	2
8	200	3.6	8	60	2
10	250	4.5	10	90	2

Avant de débiter la préparation :

- Préparer les échantillons de plasma selon les recommandations du chapitre 2.4
- Vérifier que le tampon de lavage MCF4 a bien été préparé selon les indications du chapitre 3.
- Régler un bain marie ou un bloc chauffant à 56 °C (pour l'incubation des lysats).

Protocole pour 2 mL de plasma

1 Préparer l'échantillon

Éliminer les cellules sanguines résiduelles : Centrifuger le plasma pendant au moins 10 min à **4,500 x g** afin d'éliminer les cellules résiduelles et débris cellulaires. Utiliser le surnageant pour la suite de la procédure. Jeter les sédiments.

Note : les sédiments doivent être écartés pour le reste de la procédure. Cependant, si le surnageant contient encore des matières en suspension (ex : des lipides), la procédure ne sera pas impactée.

2 Lyse des échantillons

Pré-distribuer **50 µL de Protéinase K** dans un tube ou un bloc de lyse adapté et ajouter **2 mL de plasma**. Mélanger vigoureusement.

Incuber 15 min à température ambiante. Ajouter **900 µL de tampon MCF1**. **Mélanger vigoureusement** en vortexant, en agitant ou par pipetages répétés, puis incuber à 56 °C pendant 30 min, idéalement sous agitation.

Laisser les échantillons refroidir pendant 5 min et transférer le lysat dans un bloc 24 puits en 'U' ou tout autre tube / bloc adapté au séparateur magnétique utilisé.

Note : allonger la durée d'incubation à 56 °C à 60 min pour les échantillons de plasma conservés en tubes Streck Cell-Free DNA BCT®.

3 Fixation de l'ADN

Resuspendre et ajouter **30 µL de billes P-Beads** et **2 mL de tampon MCF2** à l'échantillon lysé (**les billes NucleoMag® P-Beads et le tampon MCF2 peuvent être préalablement mélangés**).

Mélanger en pipétant 6 fois et agiter pendant **5–10 min à température ambiante**. Alternativement, lors de l'utilisation du kit sans agitateur, vortexer ou pipeter le mélange 10 fois, puis incuber pendant 5–10 min à température ambiante.

Note : veiller à resuspendre les billes NucleoMag® P-Beads avant de les prélever dans le flacon. Vortexer le flacon de manière à obtenir une suspension parfaitement homogène.

Séparer les billes magnétiques contre les parois des puits en plaçant le bloc 24 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP 24. Attendre au moins 5 min jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Prélever et jeter les surnageants.

Note : ne pas perturber les culots de billes pendant l'aspiration des surnageants. Les culots de billes sont très peu visibles à cette étape. Pipeter les surnageants du côté opposé des puits.

4 Lavage avec MCF3

Enlever le bloc 24 puits du séparateur magnétique NucleoMag® SEP 24.

Ajouter 1 mL de tampon MCF3 dans chaque puits et resuspendre totalement les billes par agitation (**2–3 min**). Alternativement, resuspendre les billes par pipetages répétés.

Séparer les billes magnétiques contre les parois des puits du bloc 24 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP 24. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes les billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant par pipetage.

5 Lavage avec MCF4 (1er)

Enlever le bloc 24 puits du séparateur magnétique NucleoMag® SEP 24.

Ajouter **1 mL de tampon MCF4** dans chaque puits et resuspendre totalement les billes par agitation (**2–3 min**). Alternativement, resuspendre les billes par pipetages répétés.

Séparer les billes magnétiques contre les parois des puits du bloc 24 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP 24. Attendre au moins **2 min** jusqu'à ce que toutes billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant par pipetage.

6 Lavage avec MCF4 (2ième)

Ajouter **1 mL de tampon MCF4** dans chaque puits et resuspendre totalement les billes par agitation (**2–3 min**). Alternativement, resuspendre les billes par pipetages répétés.

Séparer les billes magnétiques contre les parois des puits du bloc 24 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP 24. Attendre au moins 2 min jusqu'à ce que toutes billes aient été attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant par pipetage.

7 Séchage des billes NucleoMag® P-Beads

Enlever le bloc du séparateur magnétique NucleoMag® SEP 24 et sécher les culots à l'air pendant **10–15 min** à **température ambiante**. Alternativement, sécher les billes magnétiques en plaçant les culots de billes à **56 °C** sous agitation modérée.

Note : veiller à bien éliminer les tampons de lavage pour sécher les billes.

8 Elution de l'ADN

Déposer **le volume approprié de tampon d'éluion MCF5 (50–200 µL)** dans chaque puits du bloc 24 puits et resuspendre les billes en agitant pendant **5 min** à **température ambiante**. Alternativement, resuspendre les billes totalement par pipetages répétés, et incuber pendant **5–10 min** à **température ambiante** ou à **56 °C**.

Séparer les billes en les plaçant sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP 24. Attendre au moins **2 min** jusqu'à attraction totale des billes magnétiques par les aimants. Transférer les surnageants contenant l'ADN purifié dans une plaque / des tubes de collecte (voir 'Informations de commande').

Stocker l'ADN purifié à 4 °C pour une conservation à court terme et à -20 °C pour le long terme.

Note : pour des procédures alternatives d'éluion, voir le chapitre 2.5.

6 Annexes

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Cause possible et suggestions
	<p><i>Echantillon avec un faible contenu d'ADN</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Le contenu en ADNic des plasmas humains peut varier énormément, de 0.1 – 1000 ng d'ADN par mL de plasma (voir 2.3). <p><i>Méthode de quantification imprécise</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Si la concentration en ADN est mesurée au moyen d'une méthode spécifique de l'ADN double brin, par exemple PicoGreen®, veillez à ne pas chauffer l'ADN élué avant la mesure. En raison de la dénaturation de l'ADN induite par la température, la mesure peut s'avérer inexact. <p><i>Lyse de l'échantillon incomplète</i></p> <ul style="list-style-type: none"> L'échantillon n'a pas été bien homogénéisé avec le tampon de lyse et la protéinase K. Le mélange doit être sous agitation constant. Autrement, prolonger la durée de l'incubation avec la Protéinase K. <p>Réactifs mal préparés</p> <ul style="list-style-type: none"> Préparer le tampon MCF4 selon les instructions (chapitre 3). <p>Volume d'éluion insuffisant</p> <ul style="list-style-type: none"> Le culot de billes doit être totalement recouvert avec le tampon d'éluion. <p>Elution inefficace</p> <ul style="list-style-type: none"> Éliminer tous tampons résiduels pendant les étapes de séparations magnétiques. Des tampons résiduels impactent négativement l'efficacité des étapes de lavages et de l'éluion. <p>Aspiration de billes à partir des culots</p> <ul style="list-style-type: none"> Ne pas perturber les culots de billes aimantées lors de l'aspiration de surnageant, en particulier lorsque les culots de billes magnétiques sont peu visibles dans le lysat. <p>Aspiration et perte de billes</p> <ul style="list-style-type: none"> Durée de séparation magnétique trop faible ou vitesse d'aspiration excessive.
Faible rendement	

Problème	Cause possible et suggestions
Eluats turbides / faibles	<p><i>L'échantillon contenait des cellules résiduelles ou des débris cellulaires</i></p> <ul style="list-style-type: none"> L'échantillon de plasma peut contenir des cellules ou débris résiduels. Veiller à centrifuger les plasmas pour les éliminer (voir 2.3). Autrement, augmenter le volume de tampon de fixation MCF2. <p><i>Séchage insuffisant des billes magnétiques.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Veiller à pipeter la totalité des tampons de lavage afin de sécher efficacement les culots de billes. Autrement, prolonger le séchage à l'air des culots à 56 °C.
Performance insuffisante de l'ADN dans les applications avales	<p><i>Contamination par de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Veiller à éliminer tous tampons de lavage résiduels contenant de l'éthanol, l'éthanol impactant négativement les applications avales. <p><i>Evaporation de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Veiller à conserver les tampons en contenants bien clos pour éviter l'évaporation de l'éthanol, aussi bien concernant les flacons que les réservoirs de tampons. Ne pas réutiliser les restes de tampons déposés en excès dans les réservoirs. <p><i>Séchage insuffisant des billes magnétiques.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Veiller à bien prélever le tampon lors du lavage final avant de sécher les culots de billes. Autrement, sécher les culots plus longtemps ou en chauffant à 56 °C.
Aspiration des billes	<p><i>Séparation magnétique trop courte</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Augmenter la durée de séparation magnétique pour permettre aux billes d'être totalement attirées par les aimants avant d'aspirer les liquides des puits. <p><i>Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'éluion)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Une vitesse d'aspiration élevée lors de l'éluion peut induire une perte de billes. Réduire la vitesse d'aspiration pour l'étape d'éluion.
Contaminations croisées	<p><i>Contamination des parties supérieures des puits</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Ne pas souiller les parties supérieures des puits du bloc lors du transfert des lysats. Le cas échéant, sceller le bloc avec un film adhésif en PE (voir 'Informations de commande') avant de débiter l'agitation.
Ratio A_{260}/A_{280} incohérent	<p><i>Mesure hors de la limite de détection</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Afin d'obtenir des mesures correctes du ratio A_{260}/A_{280}, il est nécessaire que les valeurs mesurées de A_{260} et A_{280} soient au-delà du seuil de détection du photomètre utilisée.

6.2 Information de commandes

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® cfDNA	744550.1	1 × 48 preps
	744550.4	4 × 48 preps
NucleoMag® SEP 24	744903	1
NucleoMag® SEP Maxi	744902	1
Blocs 24 puits carrés avec couvercle en silicone (blocs 24 puits carrés de 10 mL, fond plat)	740679.4	4
Plaque d'éluion, fond en 'U' (microplaque 96 puits, fond en 'U' de 300 µL pour le stockage des éluats, films adhésifs en PE inclus)	740486.24	24 sets
Films adhésifs en PE	740676	50 sheets
Snap Tubes (tubes de 50 mL)	740822.10	10
	740822.50	50
Protéinase K Liquide	740396	5 mL

Note : ce produit était précédemment distribué sous le nom 'NucleoMag® DNA Plasma'. La référence et le contenu du kit sont inchangés.

Visiter notre site web www.mn-net.com pour des informations plus détaillées.

6.3 Restrictions d'utilisation / Garantie

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

Ce produit MACHEREY-NAGEL comporte une documentation énonçant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La garantie fournie est limitée aux spécifications et descriptions des données indiquées dans la documentation originale MACHEREY-NAGEL. Aucune autre déclaration, verbale ou écrite, par des employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL n'est autorisée, à l'exception des déclarations écrites signées par un représentant dûment habilité de MACHEREY-NAGEL. Le client ne doit pas s'y fier et elles ne font pas partie d'un contrat de vente ou de la présente garantie.

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

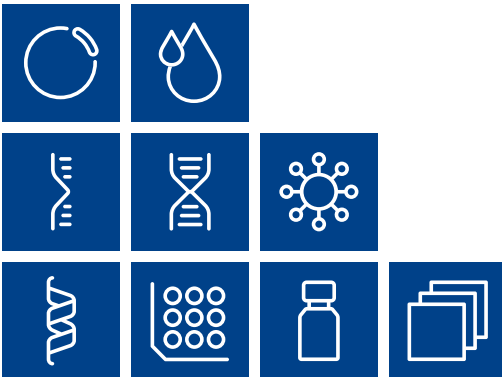
Les produits et leur application sont susceptibles de modifications. Par conséquent, veuillez contacter notre Equipe Service Technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur local pour obtenir des informations scientifiques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

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

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

Marques déposées

NucleoMag[®] est une marque déposée de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG.
Cell-Free DNA BCT est une marque déposée de Streck, Inc.
PicoGreen[®] et KingFisher[®] sont des marques déposées de Thermo Fisher Scientific.



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

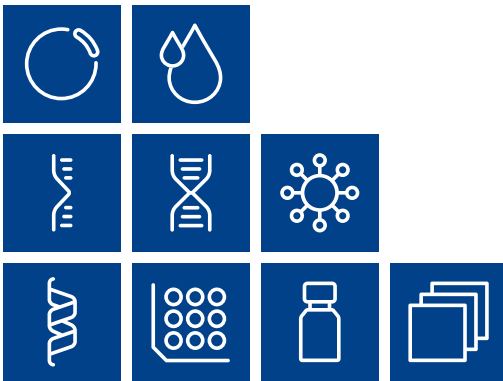
Viral RNA and DNA

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

