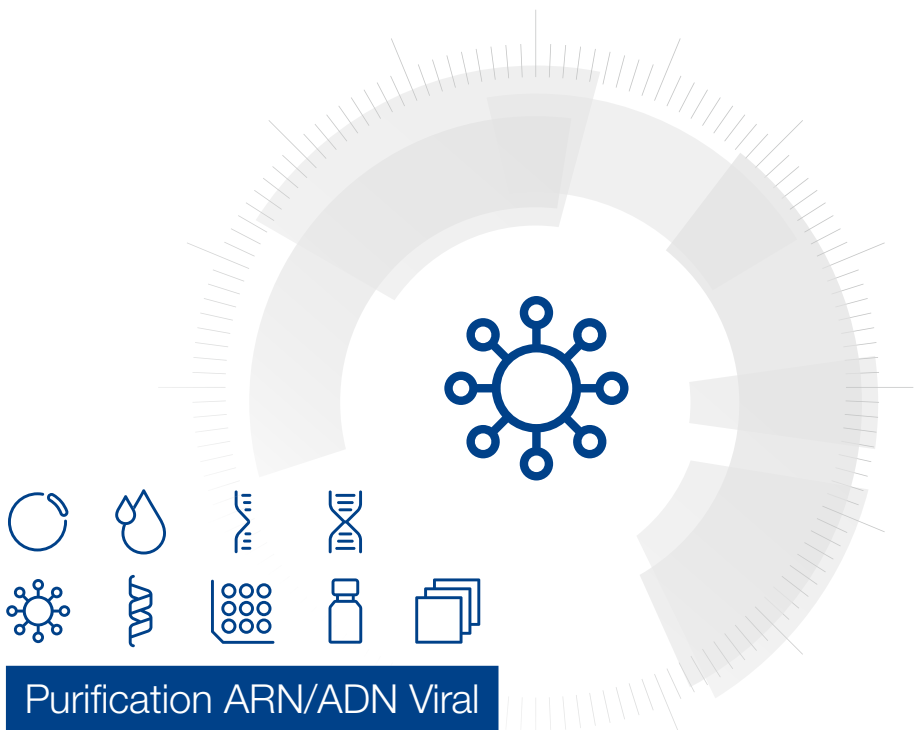


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



■ NucleoMag® VET

Février 2024 / Rev. 11

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	Matériels à fournir par l'utilisateur	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	Systèmes de séparation magnétique	7
2.4	Réglage des paramètres d'agitation	8
2.5	Manipulation des billes	9
2.6	Procédures d'élution	9
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	10
4	Instructions de sécurité	11
4.1	Élimination des déchets	11
5	Préparation des échantillons biologiques	12
6	Protocoles pour une utilisation manuelle ou sur un robot pipeteur	14
6.1	Purification d'ARN/ADN viral et d'ADN bactérien à partir de sang, de tissus homogénéisés, de sérum, de plasma, d'autres liquides corporels, d'écouillons et d'écouillons stabilisés (NucleoProtect® VET-).	14
6.2	Purification de l'ARN/ADN viral à partir d'échantillons de sang stabilisés grâce au NucleoProtect® VET	19
7	Protocoles pour les systèmes avec des barreaux magnétiques	20
7.1	Configuration générale des systèmes avec barreaux magnétiques	20
7.2	Configuration pour la purification des ARN/ADN viraux à partir d'échantillons de sang stabilisés grâce au NucleoProtect® VET	22
7.3	Protocole détaillée pour KingFisher™ Flex	23
8	Protocoles complémentaires	25
8.1	Purification du virus à ARN (PRRSV) d'échantillon de sperme porcin	25
9	Annexes	26
9.1	Guide de résolution de problèmes	26
9.2	Informations de commande	28
9.3	Restrictions d'utilisation / garantie	29

1 Composition

1.1 Composants du kit

NucleoMag® VET			
REF	1 × 96 preps 744200.1	4 × 96 preps 744200.4	100 × 96 preps 744200.100
Billes NucleoMag® B-Beads	2 × 1.25 mL	10 mL	22 × 10 mL
Tampon de Lyse VL1	30 mL	100 mL	4 × 500 mL
Tampon de Fixation VEB	110 mL	3 × 110 mL	7 × 1000 mL
Tampon de Lavage VEW1	75 mL	300 mL	7 × 1000 mL
Tampon de Lavage VEW2	75 mL	300 mL	7 × 1000 mL
Tampon d'Elution VEL	30 mL	125 mL	3 × 500 mL
ARN Carrier*	400 µg	4 × 400 µg	85 × 400 µg
Tampon ARN Carrier	500 µL	4 × 500 µL	3 × 15 mL
Protéinase K (lyophilisée)*	75 mg	3 × 75 mg	65 × 75 mg
Tampon Protéinase PB	8 mL	15 mL	18 × 15 mL
Résumé du protocole	1	1	1

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

1.2 Matériels à fournir par l'utilisateur

Produit	REF	Conditionnement
Blocs pour la séparation magnétique des billes,	740481	4
Ex : Blocs 96 puits carré ('Square-well Block', 2.1 mL)	740481.24	24
 Tubes de lyse pour la lyse et l'incubation des échantillons,	740477	4 sets
	740477.24	24 sets
Ex : Rack de barrettes de tubes 'Tube Strips' (1 set comprend 1 support, 12 barrettes de 8 tubes chacun (1.2 mL par puits) et 12 barrettes de bouchons)		
Plaque d'élution pour la collecte des acides nucléiques,	740486.24	24
Ex : Plaque d'élution 'fond en U' (microplaques 96 puits de 300 µL à fond rond)		
Ex : Plaque d'élution 'fond plat' (microplaques 96 puits de 300 µL à fond plat)	740673	20
Consommables pour automate KingFisher™ Flex :	744950	1 set
Ex : Set d'accessoires '96-well Accessory Kit A' pour automate KingFisher™ (Square-well Blocks, Deep-well Tip Combs, plaques d'élution pour 4 × 96 preps NucleoMag® VET)		

Réactifs:

- Ethanol 80 %

1.3 A propos de ce manuel d'utilisation

Il est recommandé de lire attentivement les instructions de ce manuel avant d'utiliser le kit. Toute la documentation technique est également disponible sur Internet à l'adresse suivante : www.mn.net.com.

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

2 Description

2.1 Principe général

Le kit **NucleoMag® VET** est conçu pour la purification d'ADN ou d'ARN viral et d'ADN bactérien à partir de fluides corporels exempts de cellules, tels que le sérum ou le plasma, d'écouvillon, de sang ou d'échantillons provenant de suspensions de tissus homogénéisés. Ce kit fournit des réactifs et des billes magnétiques pour la purification de 96 échantillons de 100 à 200 µL. La procédure est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques sur les billes paramagnétiques dans des conditions tampons appropriées. La lyse des échantillons est réalisée par incubation avec un tampon de lyse VL1 contenant des ions chaotropiques, soutenu par une digestion à la Protéinase K. Pour la fixation des acides nucléiques sur les billes paramagnétiques, le tampon de fixation VEB et les billes 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 VEW1 et VEW2 et d'éthanol à 80 %. L'éthanol résiduel des étapes de lavage précédentes est éliminé par séchage à l'air. Enfin, l'ARN/ADN viral ultrapur est élué avec le tampon d'éluion VEL à faible teneur en sel ou avec de l'eau. L'ARN / ADN viral purifié peut être directement utilisé pour des applications en aval. Le kit **NucleoMag® VET** peut être utilisé manuellement ou automatiquement sur des instruments de manipulation de liquide standard ou des séparateurs magnétiques automatisés.

2.2 Caractéristiques du kit

Le kit **NucleoMag® VET** est conçu pour la préparation rapide, manuelle et automatisée à petite échelle d'ARN / ADN viral à partir de fluides corporels acellulaires comme le sérum ou le plasma, de sang, de suspensions de tissus homogénéisés ou d'échantillons tels que décrits dans le chapitre 5. Le kit est conçu pour être utilisé avec un bloc pour la séparation magnétique des billes NucleoMag® SEP (voir les informations de commande) ou d'autres systèmes de séparation magnétique (voir le paragraphe 2.3). Le temps pour la préparation manuelle de 96 échantillons est d'environ 120 minutes. L'ARN / ADN purifié peut être utilisé directement comme matrice pour la RT-PCR, la PCR ou tout autre type de réaction enzymatique.

Le kit **NucleoMag® VET** permet une automatisation facile sur des robots pipeteurs courants ou sur des séparateurs magnétiques automatisés. Le temps de traitement 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 installé sur un robot pipeteur.

Le kit **NucleoMag® VET** est destiné à des professionnels tels que les techniciens et les médecins expérimentés qui sont formés aux techniques de biologie moléculaire ainsi qu'à l'utilisation d'écouvillons et d'autres échantillons vétérinaires potentiellement infectieux. Le produit est destiné uniquement à la recherche.

2.3 Systèmes de séparation magnétique

Pour le kit **NucleoMag® VET**, nous recommandons l'utilisation du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Les étapes de séparation sont effectuées dans un bloc 96 puits carrés (voir 'Informations de commandes' paragraphe 6.2). Le kit est aussi utilisable sur d'autres séparateurs magnétiques combinés aux consommables adéquats.

Séparateur magnétique	Plaque ou tubes de séparation
NucleoMag® SEP (MN REF 744900)	Blocs à puits carré 'Square-well Block' (MN REF 740481)
Tecan Te-MagS™	Tubes de 1.5 mL sans bouchons (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'éluion. 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.

Système 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 magnétiques automatisés

Ces séparateurs possèdent des aimants mobiles, permettant de resuspendre les billes. Après chaque étape de fixation, de lavage ou d'éluion, les billes sont collectées et transférées automatiquement dans le réactif correspondant à l'étape suivante.

2.4 Réglage des paramètres d'agitation

Lors de l'utilisation d'un agitateur pour plaques pour les étapes de lavages et d'élution, la vitesse d'agitation doit être rigoureusement ajustée afin de permettre la resuspension optimale des billes sans risque de contaminations croisées. Procéder ainsi :

Réglage de l'agitation pour les étapes de lavages :

- Déposer 600 µL d'eau colorée dans les puits de la plaque de séparation. Placer la plaque sur l'agitateur et démarrer l'agitation à vitesse modérée pendant 30 secondes. Stopper l'agitateur et vérifier l'absence de projections.
- Augmenter la vitesse, agiter pendant 30 secondes et vérifier à nouveau l'absence de projections.
- Continuer ainsi en augmentant la vitesse jusqu'à voir apparaître des projections en haut de la plaque de séparation. Réduire la vitesse, vérifier à nouveau l'absence de projections et déterminer la vitesse idéale pour les étapes de lavage.

Réglage de l'agitation pour l'étape d'élution

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

2.5 Manipulation des billes

Distribution des billes

Une distribution homogène des billes magnétiques dans les puits de la plaque de séparation est essentielle afin de garantir la reproductibilité d'un puits à l'autre. Ainsi, avant de pipeter les billes, veiller à leur total resuspension. Secouer ou vortexer le flacon de stockage des billes. Mélanger au préalable les billes avec le tampon de fixation permet aussi une distribution plus aisée des billes dans les puits de la plaque de séparation. Lors de la procédure automatisée, une étape de mélange avant l'aspiration/distribution des billes est recommandée afin de remettre en suspension les billes.

Temps de séparation magnétique

L'attraction des billes magnétiques par les aimants dépend de la force de ceux-ci, de la plaque de séparation utilisée, de la distance entre la plaque et les aimants et du volume contenu dans les puits. La durée nécessaire à une séparation complète des billes par les aimants doit être vérifiée pour chaque système. Il est recommandé d'utiliser les plaques ou tubes de séparation recommandés par le fournisseur du séparateur magnétique.

Lavage des billes

Le lavage des billes peut s'effectuer par agitation ou pipetage des billes. Contrairement au pipetage, l'agitation permet de resuspendre les billes dans la totalité des puits simultanément. Ceci réduit le temps de la procédure et la consommation de cônes. La resuspension des billes par pipetage est cependant plus efficace que l'agitation de la plaque de séparation ou le mélange par mise en mouvement des aimants.

Méthode	Efficacité de resuspension	Rapidité	Consommation de cônes
Mélange magnétique	+	++	Faible
Agitateur	++	++	Faible
Pipetage	+++	+	Elevée

2.6 Procédures d'élution

L'ARN/ADN viral purifié peut être élué directement avec le tampon d'élution VEL fourni. L'élution peut être effectuée dans un volume $\geq 50 \mu\text{L}$. Il est essentiel de recouvrir complètement les billes NucleoMag[®] Beads avec le tampon d'élution pendant l'étape d'élution. Le volume de tampon d'élution distribué dépend du système de séparation magnétique (par exemple, 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 recouvrir la totalité du culot.

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

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention:

VL1, VEB, VEW1, VEW2, le tampon ARN Carrier, les tubes NucleoProtect® VET Blood / Swab ainsi que le réactif NucleoProtect® VET contiennent des sels chaotropiques (par ex. chlorhydrate de guanidine, thiocyanate de guanidine et/ou perchlorate de sodium) qui peuvent former des composés très réactifs lorsqu'ils sont combinés avec de l'eau de Javel (hypochlorite de sodium) ! NE PAS ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons. Porter des équipements de protection appropriés, des gants et des lunettes de protection !

- Tous les composants du kit **NucleoMag® VET** doivent être conservés à une température comprise entre 15 et 25 °C et sont stables jusqu'à : voir l'étiquette du kit.
- Tous les tampons sont livrés prêts à l'emploi.

Le tampon VIA, nécessaire au traitement des échantillons de sang stabilisés par du NucleoProtect® VET, peut former des précipités pendant le stockage. Vérifier l'absence de précipités dans le tampon VIA et incuber à 25–30 °C pendant environ 30 minutes pour redissoudre tout précipité. Agiter doucement le flacon jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

Avant de commencer un protocole **NucleoMag® VET**, préparer les réactifs suivants :

- **Protéinase K** : Avant la première utilisation du kit, ajouter 3,35 mL de tampon protéinase PB à chaque flacon de **protéinase K lyophilisée**. La solution de protéinase K dissoute doit être conservée en aliquotes à -20 °C.
- **ARN Carrier** : Avant la première utilisation du kit, ajouter 500 µL de tampon d'ARN Carrier à chaque flacon **d'ARN Carrier lyophilisé**. Conserver la solution d'ARN Carrier dissoute dans des aliquotes à -20 °C.

Remarque : en raison de la procédure de production et de la faible quantité d'ARN Carrier contenue dans le flacon, l'ARN Carrier est difficilement visible.

NucleoMag®VET			
REF	1 × 96 preps 744200.1	4 × 96 preps 744200.4	100 × 96 preps 744200.100
Protéinase K (lyophilisée)	1 tube (75 mg) Ajouter 3.35 mL de tampon Protéinase PB	3 tubes (75 mg/tube) Ajouter 3.35 mL de tampon Protéinase PB dans chaque tube	65 tubes (75 mg/tube) Ajouter 3.35 mL de tampon Protéinase PB dans chaque tube
ARN Carrier (lyophilisée)	1 tube (400 µg) Ajouter 500 µL de tampon ARN Carrier	4 tubes (400 µg/vial) Ajouter 500 µL de tampon ARN Carrier dans chaque tube	85 tubes (400 µg/vial) Ajouter 500 µL de tampon ARN Carrier dans chaque tube

4 Instructions de sécurité

Lors de l'utilisation du kit **NucleoMag® VET**, porter des équipements de protection individuelle (ex : blouse, gants jetables et lunettes de protection). Pour plus d'informations, consulter les Fiche de Données de Sécurité correspondantes (FDS disponibles en ligne : www.mn-net.com/msds).



Attention : Le chlorhydrate de guanidine dans le tampon de lyse VL1, le perchlorate de sodium dans les tampons VEB, VEW1, VEW2 et le thiocyanate de guanidine dans le tampon ARN Carrier, **les tubes NucleoProtect® VET Blood / Swab** ainsi que **le réactif NucleoProtect® VET** peuvent former des composés très réactifs lorsqu'ils sont combinés avec de l'eau de Javel ! Par conséquent, il ne faut pas ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation d'échantillons.

La capacité d'inactivation du réactif **NucleoProtect® VET** a été démontrée pour diverses matrices et virus connus pour avoir des structures d'enveloppe ainsi que des sensibilités différentes aux désinfectants : FMDV (petit virus non enveloppé), BTV-5 (grand virus non enveloppé), LSDV (grand virus enveloppé), PPRV et BCoV (virus enveloppé). Aucune revendication d'inactivation d'autres virus ou matrices ne peut être faite. Les échantillons doivent être incubés pendant au moins 30 minutes pour une inactivation complète.

Les déchets générés par le kit **NucleoMag® VET** 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 de la forte dénaturation du tampon de lyse 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 Élimination des déchets

Éliminer le matériel dangereux, infectieux ou contaminé biologiquement de manière sûre et en accord avec les réglementations locales.

5 Préparation des échantillons biologiques

a) Echantillons de sang et de sérum / plasma

Un volume d'échantillon de 100–200 µL de sang peut être utilisé. Ne pas utiliser des volumes plus importants. Pour des échantillons avec des volumes inférieurs à 200 µL, ajuster à 200 µL avec du tampon PBS.

b) Echantillons de sang stabilisés avec le réactif NucleoProtect® VET

Vortexer le tube NucleoProtect® VET Blood Tube ou le tube contenant un échantillon de sang stabilisé dans le réactif NucleoProtect® VET Reagent pendant 30 secondes. Centrifuger brièvement le tube pendant 10 secondes à 200 x *g* pour éliminer les gouttes qui se forment à l'intérieur du bouchon. Transférer 200 µL d'échantillon de sang stabilisé. Optionnel : refermer le tube NucleoProtect® VET Blood Tube avec un bouchon de fermeture complémentaire (voir les informations de commande).

c) Echantillons de tissus

Homogénéiser les échantillons de tissus. Typiquement, 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'échantillons peuvent être utilisées (jusqu'à 25 mg). Il faut tenir compte du fait que l'acide nucléique total copurifié peut provoquer une inhibition dans les essais PCR ultérieurs. Après homogénéisation du tissu, centrifuger et utiliser jusqu'à 200 µL de surnageant clarifié pour le protocole de purification. Si vous utilisez moins de 200 µL, ajuster avec du tampon PBS pour obtenir un volume final de 200 µL.

Pour la purification de l'ARN viral :

Les échantillons de tissus peuvent également être broyés dans un tampon contenant du sel chaotropique (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).

d) Écouvillons / écouvillons stabilisés avec du NucleoProtect® VET

Incuber les écouvillons avec du PBS, du chlorure de sodium ou du milieu de culture cellulaire pendant 30 minutes en agitant. Retirer et presser l'écouvillon. Poursuivre la procédure de purification avec 200 µL de tampon sans particules ou du milieu.

Vortexer soigneusement le tube NucleoProtect® VET Swab Tube ou le tube contenant un échantillon d'écouvillon stabilisé dans le réactif NucleoProtect® VET Reagent pendant 30 secondes. Centrifuger brièvement le tube pendant 10 secondes à 200 x *g* pour éliminer les gouttes qui se forment à l'intérieur du bouchon. Poursuivre la procédure avec 200 µL d'échantillon provenant de l'écouvillon stabilisé.

e) Fèces

Mélanger 1 volume de fèces (par exemple, 500 µL) avec un volume égal de tampon PBS. Mélanger vigoureusement au vortex pendant 1 minute. Laisser les particules se déposer ou centrifuger à faible vitesse (par exemple, à 500 x g). Pour les bactéries difficiles à lyser, il peut être nécessaire de procéder à un broyage mécanique (par exemple, traitement à l'aide de billes de verre appropriées). Prélever le surnageant et utiliser 200 µL pour le protocole de purification.

f) Lyse au TRIzol®

Pour les échantillons tels que le sperme, une lyse TRIzol® peut être nécessaire. Homogénéiser 10–30 mg de tissu ou jusqu'à 250 µL de sang avec 1 mL de réactif TRIzol® selon les instructions du fabricant. Après séparation des phases par centrifugation, prélever la phase (supérieure) aqueuse et incolore soit environ 400 µL. Pour la suite du traitement, commencer par l'étape 2 du protocole de purification en mélangeant 400 µL de la phase aqueuse avec 600 µL de tampon VEB et 20 µL de billes NucleoMag® B.

g) Echantillons de lait

Un volume d'échantillon supérieur à 200 µL est généralement utilisé. Typiquement, 1 mL d'un échantillon de lait normal est centrifugé (par exemple, 11 000 x g pendant 3 minutes). Jeter le surnageant et remettre le culot en suspension dans 400 µL de PBS. Procéder avec 200 µL d'échantillon pour le protocole de purification.

Les échantillons de lait fermenté (acidulé) nécessitent une étape de prétraitement supplémentaire. Par conséquent, incuber les particules / les morceaux de lait acidulé dans une quantité appropriée de tampon de lyse pendant 1 à 3 heures à 56 °C (idéalement en agitant). Culoter les particules résiduelles et procéder avec 400 µL du lysat à l'étape 2 du protocole de purification.

6 Protocoles pour une utilisation manuelle ou sur un robot pipeteur

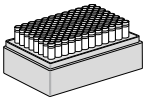
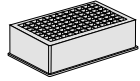

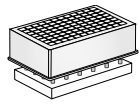
6.1 Purification d'ARN/ADN viral et d'ADN bactérien à partir de sang, de tissus homogénéisés, de sérum, de plasma, d'autres liquides corporels, d'écouvillons et d'écouvillons stabilisés (NucleoProtect® VET-).

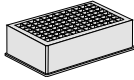

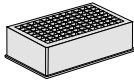

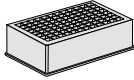

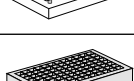

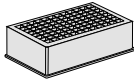


Préparation des échantillons

Le protocole standard se rapporte à un volume de 200 µL d'échantillon (homogénéisé). Pour la préparation de différents échantillons (par exemple, tissus, écouvillons, fèces), consulter les indications du Chapitre 5.

Résumé du protocole

- Pour les exigences en matière de matériel, voir le paragraphe 2.3.
- Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir la page 16.
- Avant de commencer la préparation :
- Vérifier que la protéinase K et l'ARN Carrier ont été préparés conformément au Chapitre 3.

1	Lyse de l'échantillon	200 µL échantillon (homogénéisé) 20 µL Protéinase K 4 µL ARN Carrier 180 µL VL1 Mélanger TA, 15 min	
2	Fixation des acides nucléiques aux billes NucleoMag® B-Beads	20 µL de B-Beads 600 µL VEB Mélanger par agitation pendant 5 – 10 min à TA (Optionnel: Mélanger par pipetage répété) Éliminer le surnageant après 2 min de séparation	  

3	Lavage avec VEW1	Enlever le bloc 96 puits carrés du NucleoMag® SEP	
		600 µL VEW1	
		Resuspendre : Agiter 1 min à TA	
4	Lavage avec VEW2	Enlever le bloc 96 puits carrés du NucleoMag® SEP	
		600 µL VEW2	
		Resuspendre : Agiter 1 min à TA	
5	Lavage avec de l'éthanol 80 %	Enlever le bloc 96 puits carrés du NucleoMag® SEP	
		600 µL d'éthanol 80 %	
		Resuspendre : Agiter 1 min à TA	
6	Séchage à l'air des billes magnétiques	Enlever le bloc 96 puits carrés du NucleoMag® SEP	
		600 µL d'éthanol 80 %	
		Resuspendre : Agiter 1 min à TA	
7	Elution des ADN / ARN	Enlever le bloc 96 puits carrés du NucleoMag® SEP	
		50-100 µL VEL	
		Mélanger par agitation pendant 5 min à TA (Optionnel: Mélanger par pipetage)	
		Séparer 2 min et transférer l'ARN / ADN dans la plaque d'élution / les tubes	

Protocole détaillé

Ce protocole est conçu pour les séparateurs magnétiques à aimants fixes (par exemple, NucleoMag® SEP) et les agitateurs de plaques appropriés. Il est recommandé d'utiliser un bloc 96 puits carrés pour la séparation (voir les informations de commande, chapitre 6.2). La purification de l'ARN/ADN peut également être effectuée dans des microtubes avec des séparateurs magnétiques appropriés. Ce protocole est destiné à une utilisation manuelle et sert de guide pour l'adaptation du kit sur des systèmes automatisés.

1 Lyse de l'échantillon

Distribuer au préalable **20 µL de protéinase K** et **200 µL d'échantillon** dans un microtube approprié. Ajouter **180 µL de tampon VL1** au microtube. Optionnel : ajouter **4 µL de la solution mère d'ARN Carrier** au microtube. Bien mélanger par pipetage répété et incubé à **température ambiante** pendant **15 min** en agitant. Alternativement, l'étape de lyse peut être réalisée dans des barrettes de tubes (voir les informations de commande).

Après l'incubation de la lyse, centrifuger pour collecter tout échantillon des couvercles des tubes de lyse et transférer chaque lysat dans les puits d'un bloc 96 puits carrés.

2 Fixation de l'acide nucléique sur les billes magnétiques

Ajouter **20 µL de billes B-Beads** remises en suspension et **600 µL de tampon VEB** à l'échantillon lysé.

Mélanger par pipetage répété 6 fois et **agiter** pendant **5 min à température ambiante**. Alternativement, lors du traitement du kit sans agitateur, mélanger par pipetage répété 10 fois et incubé pendant 5 min à température ambiante.

Les billes NucleoMag® B-Beads et le tampon VEB peuvent être mélangés au préalable.

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 contre la paroi des puits en plaçant le bloc 96 puits carrés sur le séparateur magnétique, NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par les aimants. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

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

3 Lavage avec le tampon VEW1

Enlever le bloc 96 puits carrés du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter **600 µL de tampon VEW1** et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (1–3 min). Alternativement, remettre complètement en suspension les billes par pipetage répété.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc 96 puits carrés sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

4 Lavage avec le tampon VEW2

Enlever le bloc 96 puits carrés du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter **600 µL de tampon VEW2** et remettre les billes en suspension en agitant jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension (1–3 min). Alternativement, remettre complètement en suspension les billes par pipetage répété.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc 96 puits carrés sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

5 Lavage avec l'éthanol 80 %

Enlever le bloc 96 puits carrés 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 en suspension les billes complètement par pipetage répété.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc 96 puits carrés sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **2 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes soient attirées par l'aimant. Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

6 Séchage à l'air des billes magnétiques

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

7 Élu­tion de l'ARN/ADN

Retirer le bloc 96 puits carrés du séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Ajouter le volume souhaité de **tampon VEL (50 – 100 µL)** dans chaque puits du bloc 96 puits carrés et remettre les billes en suspension en agitant pendant **5 min** à **température ambiante**. Alternativement, remettre les billes complètement en suspension par pipetage répété et incuber pendant **5 min** à **56 °C**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant le bloc 96 puits carrés 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 les acides nucléiques purifiés dans des plaques d'élu­tion ou des barrettes de tubes (voir les informations de commande).

6.2 Purification de l'ARN/ADN viral à partir d'échantillons de sang stabilisés grâce au NucleoProtect® VET

Protocole pour la purification de l'ARN et de l'ADN viral à partir de tubes NucleoProtect® VET Blood Tube ou d'échantillons de sang stabilisés dans le réactif NucleoProtect® VET Reagent.

Pour la préparation des échantillons de sang stabilisés, voir le chapitre 5.

Note : Les purifications d'acide nucléique à partir d'échantillons de sang stabilisés et non stabilisés par du NucleoProtect® VET peuvent être effectuées en parallèle. La modification du protocole pour les échantillons de sang stabilisé se limite à la lyse de l'échantillon et à l'ajustement des conditions de fixation.

Résumé du protocole

Pour les exigences en terme de matériel, voir le chapitre 2.3.

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

Avant de commencer la préparation :

Pour le traitement des échantillons de sang stabilisés par NucleoProtect® VET, un tampon VIA supplémentaire est nécessaire (REF 744206, voir les informations de commande). Vérifier l'absence de précipités dans le tampon VIA, voir chapitre 3.

1	Lyse de l'échantillon	200 µL de sang stabilisé
		350 µL VIA
		20 µL Protéinase K
		Mélanger
		TA, 15 min
2	Fixation des acides nucléiques aux billes NucleoMag® B-Beads	20 µL B-Beads
		450 µL VEB
		Mélanger par agitation pendant 5 – 10 min à TA (optionnel : Mélanger par pipetage répété)
		Éliminer le surnageant après 2 min de séparation
3	Lavage avec VEW1	Procéder à l'étape 3 du protocole standard du chapitre 6.1

7 Protocoles pour les systèmes avec des barreaux magnétiques

Ces protocoles sont conçus pour l'utilisation du kit NucleoMag® VET sur des systèmes de barreaux magnétiques (par exemple, les systèmes KingFisher™, MagnetaPure 32 / 32 Plus ou d'autres instruments avec des barreaux magnétiques).

Pour des informations détaillées concernant chaque étape, voir la page 16.

Contactez notre support technique Bioanalyse (tech-bio@mn.net.com) pour obtenir des fichiers de méthodes ou des informations plus détaillées sur des plateformes d'automatisation spécifiques.

7.1 Configuration générale des systèmes avec barreaux magnétiques

Cette synthèse sert de guide pour la configuration générale des plaques, des colonnes ou des réservoirs de réactifs de l'instrument respectif pour le kit NucleoMag® VET.

Selon l'instrument, la lyse de l'échantillon peut être effectuée sur l'instrument ou à l'extérieur.

Les positions peuvent représenter différents formats définis par le protocole et l'instrument (par exemple, des plaques complètes (dispositifs au format 96 puits), des rangées individuelles (format de 12 puits), des colonnes individuelles (format de 8 puits), des puits individuels ou systèmes basés sur des cartouches).

Lyse externe - la lyse n'est pas effectuée sur l'instrument lui-même (pour les échantillons qui nécessitent une manipulation avancée ou une clarification par centrifugation)

Position	Étape	Tampon	Volume
1	Lyse / Fixation	Lysat*	404 µL
		B-Beads	20 µL
		VEB	575 µL
2	Lavage 1	VEW1	600 µL
3	Lavage 2	VEW2	600 µL
4	Lavage 3	Ethanol 80 %	600 µL
5	Elution	VEL	100 µL

* Comprend 200 µL d'échantillon, 180 µL de tampon VL1, 20 µL de protéinase K et 4 µL d'ARN Carrier.

Lyse On-deck (sur le robot) - la lyse est effectuée sur l'instrument ; pour les échantillons liquides ou entièrement homogénéisés.

Position	Etape	Tampon	Volume
1	Lyse	Echantillon	200 µL
		Protéinase K	20 µL
		VL1	180 µL
		ARN Carrier	4 µL
	Fixation	B-Beads	20 µL
	[à ajouter après la lyse]	VEB	575 µL
2	Lavage 1	VEW1	600 µL
3	Lavage 2	VEW2	600 µL
4	Lavage 3	Ethanol 80 %	600 µL
5	Elution	VEL	100 µL

7.2 Configuration pour la purification des ARN/ADN viraux à partir d'échantillons de sang stabilisés grâce au NucleoProtect® VET

Purification des ARN/ADN viraux à partir de tubes de sang NucleoProtect® VET Blood Tubes ou de sang stabilisé avec le NucleoProtect® VET Reagent.

Note : la purification d'acide nucléique à partir d'échantillons de sang stabilisés et d'autres échantillons peut être effectuée au cours du même cycle d'extraction. La modification du protocole pour les échantillons de sang stabilisé se limite à la lyse de l'échantillon et à l'ajustement des conditions de fixation.

Avant de commencer la préparation :

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

Pour le traitement des échantillons de sang stabilisé avec le NucleoProtect® VET, un tampon VIA supplémentaire est nécessaire (REF 744206, voir les informations de commande au chapitre 9.2). Vérifier l'absence de précipités dans le tampon VIA, voir chapitre 3.

Lyse On-deck (sur le robot) - la lyse est effectuée sur l'instrument ; pour les échantillons liquides ou entièrement homogénéisés.

Position	Etape	Tampon	Volume
1	Lyse	Echantillon	200 µL
		VIA	330 µL
		Protéinase K	20 µL
	Fixation	B-Beads	20 µL
	[Ajout après la lyse]	VEB	425 µL
2	Lavage 1	VEW1	600 µL
3	Lavage 2	VEW2	600 µL
4	Lavage 3	Ethanol 80 %	600 µL
5	Elution	VEL	100 µL

7.3 Protocole détaillée pour KingFisher™ Flex

Note : Le fichier de méthode requis 'NucleoMag®_VET_lyse_Flex' ou d'autres fichiers de méthode pour l'instrument sont disponibles auprès du support technique Bioanalysis (tech-bio@mn.net.com).

Important : Toujours préparer le bloc 96 puits profonds avec les échantillons en premier et ajouter les réactifs exactement dans l'ordre indiqué ci-dessous.

- Avant de commencer la préparation :
- Vérifier que la protéinase K et l'ARN Carrier ont été préparés conformément au chapitre 3.
- Kit d'accessoires A Blocs 96 puits pour KingFisher™ (voir les informations de commande)

1 Préparation de l'échantillon / plaque de lyse (partie I)

Distribuer **20 µL de solution de protéinase K** dans chaque puits du bloc 96 puits profonds. Ajouter **200 µL d'échantillon de sang / échantillon de tissu homogénéisé** à chaque puits du bloc 96 puits profonds, mélanger par pipetage répété. Ajouter **180 µL de tampon VL1** et mélanger par pipetage répété 3 fois.

Optionnel : Agiter à 1 000 rpm pendant 15 min à température ambiante.

Poursuivre par la préparation des plaques de lavage et d'élution avant d'ajouter les billes magnétiques et le tampon de fixation à la plaque d'échantillons.

2 Préparation des plaques de lavage et d'élution

Plaques de lavage :

Remplir **600 µL de tampon VEW1** dans chaque puits d'une plaque 96 Deep well Thermo vide.

Remplir **600 µL de tampon VEW2** dans chaque puits d'une plaque 96 Deep well Thermo vide.

Remplir **600 µL d'éthanol à 80 %** dans chaque puits d'une plaque 96 Deep well Thermo vide.

Plaque d'élution :

Remplir **100 µL de tampon VEL** dans chaque puits d'une plaque 96 200 µL-well Thermo vide.

3 Préparation de l'échantillon / de la plaque de lyse (partie II)

Ajouter **20 µL de B-Beads** et **575 µL de tampon VEB** dans chaque puits de la plaque d'échantillon / de lyse.

4 Exécuter le protocole de purification sur l'instrument

Démarrer la purification des acides nucléiques sur l'instrument KingFisher™ Flex.

Démarrer le fichier de méthode 'NucleoMag® VET'.

Insérer les plaques comme indiqué sur l'écran de l'instrument KingFisher™.

La méthode commence par une étape de mélange (étape combinée de lyse et de fixation) après la mise en place de la dernière plaque sur l'instrument.

5 Retirer les acides nucléiques élués

L'instrument s'arrête après l'étape d'éluion finale. Suivre les instructions sur l'écran de l'instrument et sortir les plaques de l'instrument.

L'ARN / ADN purifié peut être utilisé pour d'autres analyses comme la PCR.

8 Protocoles complémentaires

8.1 Purification du virus à ARN (PRRSV) d'échantillon de sperme porcine

Avant de commencer la préparation :

- Le tampon de lyse RA1 additionnel est nécessaire (voir information de commande 9.2).

1 Précipitation

Centrifuger 1 mL d'échantillon de sperme pendant 4 min à 12.000 x *g*.

Jeter le surnageant après centrifugation.

2 Lyse de l'échantillon

Ajouter 400 µL de tampon de Lyse RA1 et mélanger en pipetant.

Incuber pendant 10 min à 70° C.

3 Clarifier le lysat

Centrifuger l'échantillon lysé pendant 1 min. à 15.000 x *g*

Utiliser 400 µL du lysat clarifié et passer à l'étape 2 du protocole standard, voir chapitre 6.2.

9 Annexes

9.1 Guide de résolution de problèmes

Problèmes	Causes possible et suggestions
Faible rendement	<i>Volume de tampon d'éluion insuffisant</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Les billes doivent être recouvertes totalement par le tampon.
	<i>Performance insuffisante du tampon d'éluion</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Éliminer complètement les tampons résiduels à chaque étape de séparation. Les tampons résiduels restant diminuent l'efficacité des lavages et de l'éluion.
Faible rendement	<i>Billes séchées excessivement</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Ne pas trop sécher les billes, l'éluion en serait impactée.
	<i>Aspiration des billes sur l'aimant</i>
Faible rendement	<ul style="list-style-type: none"> Ne pas perturber les billes sur l'aimant en aspirant les surnageants, en particulier lorsque les billes magnétiques sur l'aimant ne sont pas visibles dans le lysat. Temps de séparation magnétique trop court ou vitesse d'aspiration trop élevée.
	<i>Procédure de lavage insuffisante</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Utiliser des plaques prévues pour le séparateur magnétique, par exemple les blocs 96 puits carrés 'Square-well Block' avec le NucleoMag® SEP. Resuspendre totalement les billes pendant les lavages. Pipeter plusieurs fois si l'agitation est insuffisante.
Pureté insuffisante	
Mauvaise performance de l'ADN lors des applications avals	<i>Contamination par de l'éthanol des tampons de lavage</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Veiller à éliminer l'éthanol 80 % provenant des étapes de lavage, l'éthanol résiduel impactant négativement les applications avals.
	<i>Évaporation de l'éthanol des tampons de lavage</i>
Mauvaise performance de l'ADN lors des applications avals	<ul style="list-style-type: none"> 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.

Problèmes

Causes possible et suggestions

Perte de billes

Temps de séparation magnétique trop court

- Augmenter la durée de la séparation magnétique pour permettre aux billes d'être attirées par les aimants avant d'aspirer les liquides.

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

- Une vitesse d'aspiration trop élevée au cours de l'étape d'élution peut entraîner l'aspiration de billes. Réduire la vitesse d'aspiration.
-

9.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® VET	744200.1	1 × 96 preps
	744200.4	4 × 96 preps
	744200.100	100 × 96 preps
NucleoProtect® VET stabilization and inactivation reagent	740750.50	50 mL
	740750.500	500 mL
NucleoProtect® VET Blood Tubes	740755	50
Bouchons complémentaires pour les NucleoProtect® VET Blood Tubes	740756	100
Tampon VIA	744206	150 mL
NucleoMag® SEP	744900	1
Bloc 96 puits carrés 'Square-well Blocks'	740481	4
	740481.24	24
Films adhésifs en PE	740676	50 sheets
Rack de barrettes de tubes 'Tube Strips' (set comprenant 1 support, 12 barrettes de 8 tubes chacun et 12 barrettes de bouchons)	740477	4 sets
	740477.24	24 sets
Plaque d'éluion fond en 'U'	740486.24	24
Kit accessoires A 96 puits pour KingFisher™ (le set comprend 16 blocs 96 puits carrés 'Square-well Blocks', 4 Tip Combs pour Deep-well et 4 plaques d'éluion pour 96 preps NucleoMag® VET pour utilisation avec la plateforme KingFisher™ Flex)	744950	1 set
Tampon RA1 (60 mL)	740961	60 mL
Agent réducteur TCEP	740395.107	107 mg
NucleoSpin® VET	740842.10	1 × 10 preps
	740842.50	1 × 50 preps
	740842.250	1 × 250 preps

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

9.3 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

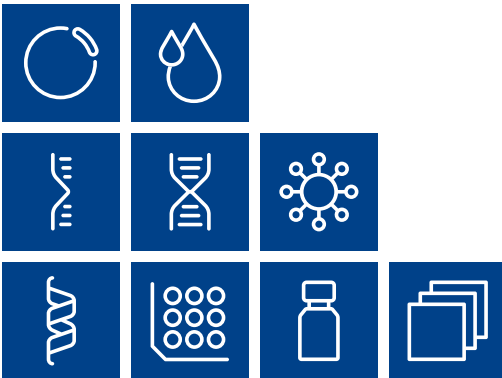
KingFisher est une marque déposée de Thermo Fisher Scientific.

NucleoMag®, NucleoSpin® et NucleoProtect® sont des marques déposées de MACHEREY NAGEL GmbH & Co KG.

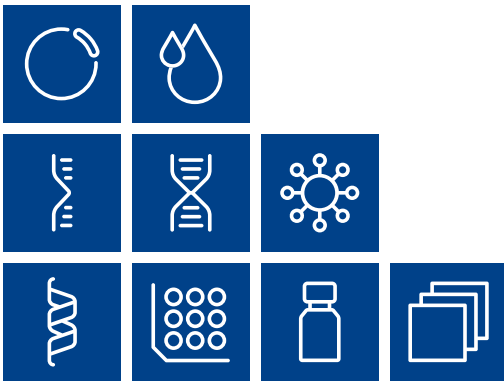
Te-MagS est une marque déposée de Tecan Group Ltd, Suisse

TRIZol est une marque déposée de Molecular Research Center, Inc.

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

