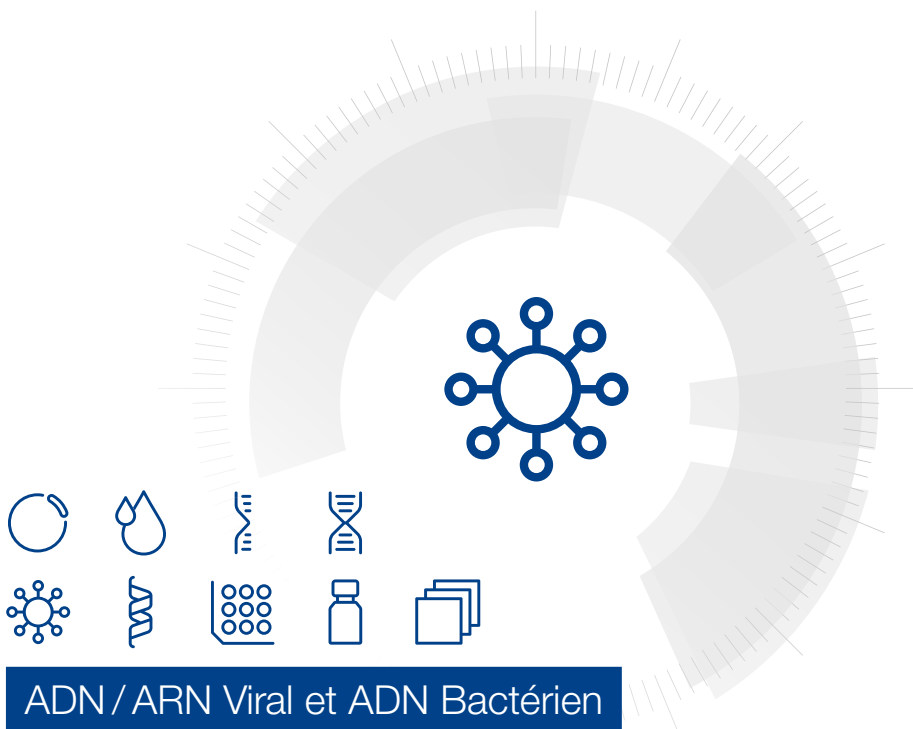


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



ADN / ARN Viral et ADN Bactérien

■ NucleoSpin® VET

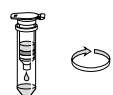
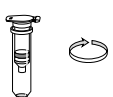

Mai 2023 / Rev. 02

NucleoSpin® VET – Extraction d'ARN/ADN Viral et ADN Bactérien à partir d'échantillons vétérinaires

Résumé du Protocole (Rev. 02)

Le résumé du protocole est utilisé pour un suivi rapide des étapes de la procédure. Nous recommandons vivement la lecture de la procédure détaillée incluse dans ce manuel avant la première utilisation du kit.

Note: le protocole FastTrack pour l'extraction à partir de plasma, sérum et solutions de lavages d'écouvillons, ainsi que les protocoles pour l'extraction d'acides nucléiques à partir d'échantillons stabilisés avec le NucleoProtect VET Blood ou Swab, ne sont décrits que dans les procédures détaillées du manuel d'utilisation.

	5.1 200 µL sérum ou plasma	5.2 100 µL sang animal	5.3 5–10 mg tissus	5.4 Ecouvillons secs	5.5 Ecouvillons humides	5.6 Fèces
1 Lyse des échantillons	10 µL PK Liquide 200 µL d'échantillon 200 µL SVL Agiter 10 min 1,400 rpm + 2.5 µL ARN Carrier Mélanger Incuber à TA 3 min Centrifuger rapidement	10 µL PK Liquide 100 µL de sang 100 µL PBS 200 µL SVL Agiter 10 min 1,400 rpm + 2.5 µL ARN Carrier Mélanger Incuber à TA 3 min	5–10 mg de tissus dans 'Bead Tube' 400 µL PBS Agiter Enlever les billes Transférer 200 µL de surnageant + 10 µL PK Liquide + 200 µL SVL Agiter 10 min à 1,400 rpm	400 µL PBS Insérer l'écouvillon 30 min à TA sous agitation Enlever l'écouvillon 1 min 2,000 x g Transférer 200 µL de surnageant + 10 µL PK Liquide + 200 µL SVL Agiter 10 min à 1,400 rpm + 2.5 µL ARN Carrier Mélanger 3 min TA	Sortir l'écouvillon du milieu Transférer 300–1000 µL de milieu 1 min 2,000 x g Transférer 200 µL de surnageant + 10 µL PK Liquide + 200 µL SVL Agiter 10 min 1,400 rpm + 2.5 µL ARN Carrier Mélanger 3 min TA	Mélanger les fèces avec 10 volumes de PBS 1 min 2,000 x g Transférer 250 µL + 250 µL SVL Mélanger + 10 µL PK Liquide Agiter 10 min 1,400 rpm opt. : + 2.5 µL ARN Carrier Mélanger 3 min TA 3 min 15,000 x g Prélever 400 µL de surnageant pour continuer
2 Ajuster les conditions de fixation	+ 200 µL d'éthanol Mélanger TA, 5 min Centrifuger rapidement					
3 Fixation des ARN/ADN viral	Déposer l'échantillon (~ 610 µL) 4,000 x g, 3 min					
4 Lavage de la membrane	 1^{er} Lavage 400 µL SWW1 11,000 x g, 30 s 2^{ème} Lavage 400 µL SWW2 11,000 x g, 30 s 3^{ème} Lavage 200 µL SWW2 20,000 x g, 5 min					
5 Séchage de la membrane	 56 °C, 5 min avec le bouchon ouvert					
6 Elution ARN/ADN	 100 µL H2O RNase-free (70 °C) TA, 3 min 20,000 x g, 3 min					

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennener 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
1.2	Réactifs, consommables et équipements nécessaires	4
1.3	A propos de ce manuel d'utilisation	5
2	Description du kit	6
2.1	Principe général	6
2.2	Caractéristiques du kit	6
2.3	Remarques sur la qualité et la préparation des échantillons biologiques	7
2.4	Remarques à propos de l'éluion	7
2.5	Remarques concernant le contrôle qualité des kits	7
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	8
4	Instructions de sécurité	9
4.1	Élimination des déchets	9
5	Protocole pour la purification d'ARN / ADN viral et d'ADN bactérien	10
5.1	Protocole standard pour le sérum, le plasma ou les fluides biologiques acellulaires	10
5.2	Prétraitement des échantillons de sang animal	14
5.3	Prétraitement des échantillons de tissus	15
5.4	Prétraitement des écouvillons secs	17
5.5	Prétraitement des écouvillons humides (en milieu de transport, VTM)	18
5.6	Prétraitement des Fèces	20
5.7	Prétraitement des écouvillons stabilisés dans le NucleoProtect® VET	22
5.8	Prétraitement d'échantillons de sang stabilisés dans le NucleoProtect® VET	23
6	Protocole FastTrack pour le plasma, le sérum et les solutions de lavage d'écouvillons	25
7	Annexes	27
7.1	Optimisation des performances	27
7.2	Informations de commande	27
7.3	Restrictions d'utilisation / garantie	28

1 Composition

1.1 Composants des kits

REF	NucleoSpin® VET		
	10 preps 740842.10	50 preps 740842.50	250 preps 740842.250
Tampon de lyse SVL	13 mL	25 mL	125 mL
Tampon de lavage SWW1	6 mL	30 mL	125 mL
Tampon de lavage SWW2 (Concentré)*	6 mL	12 mL	50 mL
H ₂ O RNase-free	13 mL	13 mL	13 mL
ARN Carrier (lyophilisé)	300 µg	300 µg	300 µg
Protéinase K Liquide	120 µL	600 µL	2 × 1.5 mL
Colonnes NucleoSpin® VET (bagues rouges, avec tubes collecteurs)	10	50	250
Tubes collecteurs (2 mL)	30	150	750
Tubes collecteurs (1.5 mL) pour la lyse et l'élution	20	100	500

1.2 Réactifs, consommables et équipements nécessaires

Réactifs

- Ethanol 96 – 100 % (pour préparer le Tampon de lavage SWW2 et créer les conditions de fixation de l'ARN / ADN) ; il est recommandé d'utiliser de l'éthanol non-dénaturé.
- PBS (Tampon phosphate salin) pour l'extraction à partir de sang, de tissus, d'écouvillons et de fèces.

Consommables

- Cônes de pipette jetables (les cônes à filtres sont recommandés pour éviter les contaminations croisées).

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

Equipement

- Pipettes manuelles
- Centrifugeuse pour microtubes
- Agitateur vortex
- Bloc chauffant : 56 °C pour le séchage des colonnes et 70 °C pour le tampon d'éluion (inutile pour le protocole 'FastTrack')
- Equipement de protection personnelle (ex : blouse, gants, lunettes de protection)
- Tubes de broyage 'MN Bead Tubes Type D' (voir 'informations de commande') pour l'extraction à partir de tissus.

1.3 A propos de ce manuel d'utilisation

Nous recommandons vivement la lecture du protocole détaillé aux nouveaux utilisateurs du kit **NucleoSpin® VET**. Cependant, les utilisateurs expérimentés peuvent se référer au 'Résumé du Protocole', conçu pour un suivi rapide des différentes étapes de la procédure de purification.

Toute la littérature technique est disponible sur notre site web : www.mn-net.com.

2 Description du kit

2.1 Principe général

Le kit **NucleoSpin® VET** propose des protocoles pour différents échantillons vétérinaires (sérum, plasma, fluides biologiques acellulaires, sang, tissus, écouvillons, fèces). Les protocoles se différencient par les procédures de prétraitement et de lyse des échantillons contenant le virus afin de répondre aux différentes particularités des prélèvements. La lyse des échantillons et des virus est effectuée grâce au Tampon de lyse SVL, solution fortement concentrée en ions chaotropiques, combiné à la Protéinase K Liquide incluse dans le kit. Après la lyse, tous les protocoles suivent la même procédure. L'échantillon est déposé sur la colonne NucleoSpin® VET et les acides nucléiques fixés à la membrane. Les contaminants (potentiels inhibiteurs de PCR), comme les sels, les métabolites et les composants cellulaires macromoléculaires sont éliminés simplement lors d'étape de lavages avec les tampons à base d'alcool SVW1 et SVW2. Les acides nucléiques sont finalement élués dans de l'eau RNase-Free et sont directement utilisables pour les applications ultérieures.

L'ARN Carrier améliore la fixation et le rendement d'extraction pour les acides nucléiques faiblement concentrés mais il n'est pas systématiquement utilisé dans tous les protocoles.

2.2 Caractéristiques du kit

Le kit **NucleoSpin® VET** est conçu pour la préparation rapide d'acides nucléiques hautement purifiés (virus à ARN simple/double brin, virus à ADN simple/double brin et ADN bactériens) à partir d'échantillons vétérinaires comme le plasma, le sérum, les fluides biologiques acellulaires, le sang, les tissus, les écouvillons secs/humides et les fèces.

- Risque de contaminations croisées réduit grâce aux colonnes individuelles fermées par un bouchon. Tous les échantillons compatibles peuvent être traités selon le même **protocole standard** après le prétraitement adapté.
- Le kit **NucleoSpin® VET** permet d'extraire les acides nucléiques à partir de 200 µL de plasma / sérum, 100 µL de sang total, 5 – 10 mg de tissus, 1 écouvillon sec ou humide ou encore environ 100 mg de fèces.
- Les acides nucléiques purifiés sont compatibles avec les applications de type séquençage de l'ADN par fluorescence automatisé, les RT-PCR, la PCR ou tout autre type de réactions enzymatiques.
- La limite de détection pour les virus dépend de la procédure de détection utilisée, par exemple la PCR (ou RT-PCR) nichée ou la qRT-PCR. Nous recommandons fortement la mise en œuvre de contrôles internes, ainsi que des contrôles positifs et négatifs de manière à valider les procédures de purification, d'amplification et de détection.
- **ARN Carrier** (ARN-poly(A) : sel de potassium-poly(A), préparé à partir d'ADP avec la polynucléotide phosphorylase) est inclus dans les kits pour des performances optimales.
- **Protéinase K Liquide** est incluse dans le kit pour faciliter la lyse des protéines des échantillons.
- Le procédure s'effectue par centrifugation. Uniquement pour la recherche (RUO).

Tableau 1: Résumé des caractéristiques du kit

Paramètre	NucleoSpin® VET
Technologie	Technologie à membrane de silice
Format	Mini colonnes spin
Echantillons	200 µL de sérum, plasma, liquides biologiques acellulaires, 100 µL de sang, 5 – 10 mg de tissu, écouvillon sec ou humide, ou environ 100 mg de fèces.
Taille des fragments	environ 100 bp – 50 kb
Volume d'élution	100 µL
Temps de préparation	20 – 40 min

2.3 Remarques sur la qualité et la préparation des échantillons biologiques

Différents types d'échantillons vétérinaires peuvent être utilisés avec le kit **NucleoSpin® VET**. Pour une purification optimale, un mélange homogène, clair et non visqueux est indispensable avant de le charger sur la colonne **NucleoSpin® VET**. Aussi, veillez à vérifier l'absence de précipités dans chaque échantillon (en particulier les prélèvements anciens ou congelés). Éviter de clarifier les échantillons de plasma/sérum par centrifugation ou filtration avant l'étape de lyse avec le tampon SVL, les virus associés aux particules ou agrégats pourraient être éliminés.

2.4 Remarques à propos de l'élution

- Les acides nucléiques purifiés sont finalement élués en conditions de faible force ionique avec de l'H₂O RNase-free.
- L'élution peut être réalisée en une seule étape selon la procédure du protocole standard, induisant l'élution d'au moins 80 % des acides nucléiques fixés. Pour améliorer la sensibilité, l'éluat peut être redéposé sur la membrane, ceci permettant d'augmenter légèrement l'efficacité d'élution et la concentration des acides nucléiques récupérés. Autrement, une seconde étape d'élution peut être effectuée avec un volume supplémentaire d'eau, permettant l'élution de la quasi-totalité des acides nucléiques fixés à la membrane, mais en impactant la concentration.
- Une concentration élevée en ARN/ADN est cruciale et souhaitable pour la plupart des applications avals. Ceci est particulièrement vrai si le volume total de réaction est réduit. En raison d'un volume d'élution élevé, les kits de purification ARN/ADN courants ne permettent pas d'obtenir des concentrations élevées, si l'échantillon biologique est faiblement chargé. De telles méthodes nécessitent souvent une étape de concentration supplémentaire avant les applications avals.

2.5 Remarques concernant le contrôle qualité des kits

En accord avec le système de management de la qualité de MACHEREY-NAGEL, les caractéristiques de chaque composant des kits NucleoSpin® VET sont vérifiés afin de garantir la constance des performances.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

Attention : les Tampons SVL et SVW1 contiennent des sels de guanidine ! Porter des gants et des lunettes de protection !

- Vérifier l'intégrité des contenants tels que les flacons ou emballages des colonnes à la réception du kit. Ne pas utiliser de composants si l'emballage est détérioré. Contacter MACHEREY-NAGEL.
- A réception, le kit **NucleoSpin® VET** doit être stocké à température ambiante (15–25 °C) et est stable jusqu'à : voir l'étiquette sur le kit. Il n'est PAS nécessaire d'ouvrir le kit à réception afin de stocker les composants séparément.
- Après ouverture, il est recommandé de stocker la Protéinase K Liquide à 4 °C ou à -20 °C.
- Utiliser des équipements exempts de RNases.

Avant de débiter la procédure **NucleoSpin® VET**, préparer les réactifs suivants :

- **ARN Carrier** (300 µg) : il est fourni sous forme lyophilisée. Dissoudre l'ARN Carrier dans de l'eau RNase-Free pour obtenir une solution de travail (100 ng/µL), voir le tableau ci-dessous. Stocker la solution obtenue à -20 °C. En raison du procédé de fabrication, l'ARN Carrier est souvent très peu visible dans le flacon.
- **Tampon de lavage SVW2** : ajouter le volume indiqué (sur le flacon ou dans le tableau ci-dessous) d'éthanol (96–100 % ; de l'éthanol non-dénaturé est recommandé) dans le flacon de **Tampon de lavage SVW2** Concentré. Indiquer sur le flacon que l'éthanol a bien été ajouté. Conserver le **Tampon de lavage SVW2** à température ambiante.
- **Protéinase K Liquide** est fournie prête à l'emploi. Après ouverture, stocker le flacon de Protéinase K liquide à 4 °C ou à -20 °C.

NucleoSpin® VET			
REF	10 preps 740842.10	50 preps 740842.50	250 preps 740842.250
Tampon SVW2 (Concentré)	6 mL Ajouter 24 mL d'éthanol	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol dans chaque bouteille	50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol
ARN Carrier	300 µg Ajouter 3 mL d'H ₂ O RNase-free	300 µg Ajouter 3 mL d'H ₂ O RNase-free	300 µg Ajouter 3 mL d'H ₂ O RNase-free

4 Instructions de sécurité

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



Les tampons SVL et SWW1, les **NucleoProtect® VET** Blood et Swab tubes ainsi que le réactif **NucleoProtect® VET** contiennent un sel chaotropique (par exemple, du chlorhydrate de guanidine et/ou du thiocyanate de guanidinium) qui peut former des composés hautement réactifs lorsqu'il est combiné avec de l'eau de Javel (hypochlorite de sodium) ! NE PAS ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets de préparation des échantillons.

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

L'absence de résidus de matériel infectieux dans les déchets générés lors de la procédure **NucleoSpin® VET** n'a pas été testée. Une contamination des déchets liquides avec du matériel infectieux résiduel est hautement improbable en raison de la nature fortement dénaturante du tampon de lyse et du traitement à la Protéinase K, mais ne peut être totalement exclu. Aussi, traiter les déchets liquides comme potentiellement infectieux et éliminer les en accord avec les réglementations locales en vigueur.

4.1 Elimination des déchets

Éliminer les substances dangereuses, infectieuses ou contaminées par du matériel biologique d'une manière sûre et en accord avec les réglementations locales en vigueur.

5 Protocole pour la purification d'ARN / ADN viral et d'ADN bactérien

Le protocole standard décrit la procédure pour un volume de 200 µL d'échantillon (homogénéisé). Pour la préparation à partir d'échantillons de diverses natures (ex : tissus, fèces, écouvillons), merci de consulter les chapitres 5.2 à 5.6.

Après la lyse, tous les protocoles suivent les mêmes étapes (à partir de l'étape 2 : ajout de 200 µL d'éthanol pour créer les conditions de fixation des acides nucléiques).

5.1 Protocole standard pour le sérum, le plasma ou les fluides biologiques acellulaires

Avant de débiter la procédure :

- Pour les échantillons de plasma et de sérum congelés, nous recommandons de ne pas décongeler plus d'une fois avant utilisation.
- Vérifier que le Tampon de lavage SVW2 a bien été préparé selon les instructions du chapitre 3.
- Vérifier que l'ARN Carrier a bien été dissout dans l'eau (solution de travail).
- La procédure doit être totalement réalisée à température ambiante.
- Préchauffer l'H₂O RNase-free (pour l'éluion) à 70 °C.

1 Lyse de l'échantillon

Déposer **10 µL de Protéinase K Liquide** dans un tube (1.5 mL, inclus).

**10 µL
Protéinase K**

La Protéinase K peut être déposée sur les parois internes des tubes. Vérifier visuellement que la Protéinase K a bien été déposée dans le tube !

Ajouter **200 µL d'échantillon** et mélanger modérément.

**+200 µL
d'échantillon**

Ajouter **200 µL de Tampon de lyse SVL** dans le tube.

+200 µL SVL

Agiter pendant **10 min à 1,400 rpm** (par exemple sur un Thermoshaker (Eppendorf)) à température ambiante.

**Agiter, 10 min
1,400 rpm**

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour collecter les gouttes présentes sur les bouchons (centrifugation courte uniquement).

**~ 1 s,
~ 2,000 x g**

Ajouter **2.5 µL de solution d'ARN Carrier** (100 ng/µL).

**+2.5 µL
ARN Carrier**

Mélanger le contenu du tube en vortexant ou par pipetage.

Mélanger

Incuber pendant **3 min à température ambiante**.

TA, 3 min

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour collecter les gouttes présentes sur les bouchons (centrifugation courte uniquement).

**~ 1 s,
~ 2,000 x g**

2 Ajuster les conditions de fixation

Ajouter **200 µL d'éthanol** (96 – 100 %) dans le tube et mélanger en vortexant (10 – 15 s).

**+200 µL
d'éthanol**

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

TA, 5 min

Centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour collecter les gouttes présentes sur les bouchons (centrifugation courte uniquement).

**~ 1 s,
~ 2,000 x g**

Ne pas centrifuger à une vitesse supérieure, à cette étape !

3 Fixer l'ARN/l'ADN viral

Déposer le lysat (610 µL) sur une **colonne NucleoSpin® VET** et centrifuger pendant **3 min à 4,000 x g**.

**Déposer
l'échantillon
3 min,
4,000 x g**

Si le lysat n'est pas totalement passé à travers la membrane, répéter la centrifugation à vitesse supérieure (15,000 – 20,800 x g pendant 1 min). Si le lysat n'est toujours pas passé, vérifier que l'échantillon n'a pas été utilisé en quantité excessive.

Placer la **colonne NucleoSpin® VET** dans un nouveau tube collecteur (2 mL, fourni) et jeter le tube collecteur contenant le filtrat issu de l'étape précédente.

4 Lavage et séchage de la membrane de silice**1^{er} Lavage****+400 µL SVW1**

Ajouter **400 µL de Tampon de lavage SVW1** sur la colonne NucleoSpin® VET.

**30 s,
11,000 x g**

Centrifuger **30 s à 11,000 x g**.

Placer la colonne **NucleoSpin® VET** dans un nouveau tube de collection (2 mL, fourni) et jeter le filtrat issu de l'étape précédente.

2^{ème} lavage**+400 µL SVW2**

Ajouter **400 µL de Tampon de lavage SVW2** sur la colonne NucleoSpin® VET.

**30 s,
11,000 x g**

Centrifuger **30 s à 11,000 x g**.

Placer la colonne **NucleoSpin® VET** dans un nouveau tube de collection (2 mL, fourni) et jeter le filtrat issu de l'étape précédente.

Note : veiller à éliminer les résidus de tampon de l'étape précédente avec le Tampon SVW2, en particulier si le lysat est entré en contact avec la partie supérieure de la colonne où se positionne le bouchon. Pour un lavage efficace, rincer cette partie de la colonne avec le Tampon SVW2.

3^{ème} lavage**+200 µL SVW2**

Ajouter **200 µL de Tampon de lavage SVW2** sur la colonne NucleoSpin® VET.

**5 min,
20,000 x g**

Centrifuger **5 min à 20,000 x g**.

Placer la colonne **NucleoSpin® VET** dans un nouveau tube de collection (2 mL, fourni) et jeter le filtrat issu de l'étape précédente.

56 °C, 5 min

Incuber l'ensemble pendant **5 min à 56 °C** avec le bouchon de la colonne ouvert.

5 Eluer l'ARN/ADN

Ajouter **100 µL d'H₂O RNase-free** (préchauffée à 70 °C) sur la membrane de la colonne.

**+100 µL
H₂O RNase-
free (70 °C)**

Note : Un volume d'élution inférieur au 100 µL recommandé ou l'utilisation du tampon d'élution à température ambiante sont possible mais réduisent significativement l'efficacité de l'élution.

TA, 3 min

Incuber **3 min** à **température ambiante**.

**3 min,
20,000 x g**

Centrifuger **3 min** à **20,000 x g** pour éluer les acides nucléiques de la colonne.

Conserver l'ARN/ADN élué sur la glace ou congeler pour un stockage à long terme.

5.2 Prétraitement des échantillons de sang animal

Avant de débiter la procédure :

Pour le sang animal, des tubes de collecte courant contenant un anticoagulant (ex : EDTA) sont recommandés. Les sangs traités à l'EDTA, au citrate ou à l'héparine sont compatibles. Les échantillons peuvent être utilisés frais ou congelés. Décongeler les sangs plus d'une fois peut impacter la qualité des extractions. Nous recommandons une prise d'essais de 100 µL pour les sangs issus d'espèces aux érythrocytes anucléés. Cependant, un nombre de cellules élevé en raison d'une réponse inflammatoire ou de pathologies néoplasiques, peut induire un contenu élevé en acides nucléiques. Dans ce cas, nous recommandons de réduire le volume d'échantillon à 50 µL. Pour les sangs contenant des érythrocytes nucléés (ex : sangs de poissons, oiseaux, reptiles), utiliser moins de 50 µL.

- Vérifier la disponibilité de PBS.
- Vérifier que le Tampon de lavage SVW2 a été préparé selon les instructions du chapitre 3.
- Vérifier que l'ARN Carrier a bien été dissout dans l'eau (solution de travail).
- La procédure est à effectuer à température ambiante.
- Préchauffer l'H₂O RNase-free (pour l'élution) à 70 °C.

1 Lyse de l'échantillon

Déposer **10 µL de Protéinase K Liquide** dans un tube (1.5 mL, fourni).

**10 µL
Protéinase K
Liquide**

La Protéinase K peut être déposée sur les parois internes des tubes. Vérifier visuellement que la Protéinase K a bien été déposée dans le tube !

Ajouter **100 µL de sang animal** et **100 µL de PBS** dans le tube. Si un volume inférieur à 100 µL doit être traité, augmenter le volume de PBS pour ramener le volume de mélange sang-PBS à 200 µL.

**+100 µL de
sang
+100 µL PBS**

Ajouter **200 µL de Tampon de lysis SVL** dans le tube.

+200 µL SVL

Agiter le tube pendant 10 min à 1,400 rpm (par exemple sur un Thermoshaker Eppendorf) à température ambiante.

**Agiter 10 min
1,400 rpm**

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

**~1 s
~2,000 x g**

**+2,5 µL d'ARN
Carrier**

Ajouter **2.5 µL de solution de travail d'ARN Carrier** (100 ng/µL) dans le tube.

Mélanger le contenu du tube en vortexant ou par pipetage.

**Mélanger
TA, 3 min
~ 1 s,
~ 2,000 x g**

Incuber pendant **3 min à température ambiante**.

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

Après le prétraitement de l'échantillon, continuer avec la procédure du protocole standard paragraphe 5.1 étape 2 (page 11) :

Ajuster les conditions de fixation (qui correspond à l'ajout de 200 µL d'éthanol).

5.3 Prétraitement des échantillons de tissus

Avant de débiter la procédure :

- *Note :* l'importante quantité d'acides nucléiques co-purifiés (ADN/ARN des cellules hôtes) peut entraîner l'inhibition de la polymérase dans les réactions de PCR ultérieures. Dans ce cas, nous recommandons de réduire la quantité initiale de tissus à extraire.
- *Note :* l'ajout d'ARN Carrier est déconseillé pour les échantillons de tissus, ceux-ci contenant déjà une grande quantité d'ADN.
- *Note :* les échantillons de tissus peuvent différer grandement en terme de texture, de rigidité, de types de cellules et de contenu en acides nucléiques et en substances inhibitrices. Par ailleurs, la localisation des acides nucléiques des pathogènes peut varier selon le type de tissus, les pathogènes et de l'étape de l'infection. Ainsi, les protocoles de prétraitement proposés ci-dessous devront être validés pour chaque couple tissu / cibles pathogènes. Par exemple, pour les échantillons de rate, contenant une forte quantité d'acides nucléiques de l'hôte, l'utilisation de 5 – 10 mg de tissus est recommandée.
- Vérifier la disponibilité de tampon PBS.
- Vérifier la disponibilité des tubes de broyage 'MN Bead Tubes Type D'.
- Vérifier que le Tampon de lavage SVW2 a bien été préparé selon les instructions du chapitre 3.
- La procédure est effectuée à température ambiante.
- Préchauffer l'H₂O RNase-Free (pour l'élution) à 70 °C.

1 Lyse des tissus et des virus

Transférer **5–10 mg de tissu** (ex. : foie de volailles) dans un tube de broyage **MN Bead Tube Type D** (voir 'Informations de commande').

Ajouter **400 µL de PBS** dans le tube et refermer.

Agiter le tube dans le broyeur pour homogénéiser l'échantillon. Pour un broyeur Retsch 'mixer-mill' une durée d'homogénéisation d'environ 30 secondes à une fréquence de 30 Hertz est recommandée. D'autres appareils de broyage sont également compatibles, mais peuvent nécessiter des réglages différents.

Enlever les billes du tube (par ex., au moyen d'un aimant pour attirer les billes dans le bouchon du tube).

Centrifuger le tube pendant **1 min à 2,000 x g** afin d'éliminer les débris de tissus.

Note : ne pas centrifuger plus longtemps ou plus vite afin d'éviter la sédimentation des particules virales.

**Transférer
5–10 mg de
tissus dans
un Bead Tube**

**+400 µL PBS
Broyer**

**Enlever les
billes**

**1 min,
2,000 x g**

Transférer **200 µL de surnageant** clarifié dans un nouveau tube.

Ajouter **10 µL de Protéinase K Liquide** dans le tube et mélanger modérément

La protéinase K peut être déposée sur la paroi interne du tube. Vérifier visuellement que la Protéinase K a bien été déposée dans le tube !

Ajouter **200 µL de Tampon de lyse SVL** dans le tube.

Agiter le tube pendant **10 min** à **1,400 rpm** (par ex., avec un Thermoshaker Eppendorf) à température ambiante.

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s** à **~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

Note : l'utilisation d'ARN Carrier n'est pas recommandée, l'échantillon de tissus contenant déjà une grande quantité d'acides nucléiques.

Transférer
200 µL de surnageant
+10 µL Protéinase K

+200 µL SVL

Agiter 10 min
1,400 rpm

~ 1 s,
~ 2,000 x g

Continuer avec la procédure décrite à l'étape 2 du paragraphe 5.1 (page 11) : *Ajuster les conditions de fixation (qui correspond à l'ajout de 200 µL d'éthanol).*

5.4 Prétraitement des écouvillons secs

Avant de débiter la procédure :

- Différents types d'écouvillons utilisés pour la collecte des échantillons vétérinaires sont compatibles (ex : écouvillons cloacaux).
- Vérifier la disponibilité de tampon PBS.
- Vérifier que le Tampon de lavage SVW2 a bien été préparé selon les recommandations du chapitre 3.
- Vérifier que l'ARN Carrier a bien été dissout dans l'eau (solution de travail).
- La procédure est effectuée à température ambiante.
- Préchauffer l'H₂O RNase-free (pour l'éluion) à 70 °C.

1 Lyse de l'échantillon

Ajouter **400 µL de PBS** (Tampon phosphate salin) dans un tube 2 mL (non fourni)

400 µL PBS

Note : pour les écouvillons absorbant plus qu'environ 200 µL de solution, il est recommandé d'augmenter le volume de PBS afin de récupérer un volume final de 200 µL après incubation de l'écouvillon sec et son retrait de la solution de PBS.

Après prélèvement de l'échantillon sur un écouvillon sec (ex : prélèvement cloacal), **insérer l'écouvillon** dans le tube contenant le PBS.

Insérer l'écouvillon

Incuber à température ambiante sous agitation pendant 30 minutes.

Incuber à TA pendant 30 min

Retirer l'écouvillon du tube.

Enlever l'écouvillon

Centrifuger le tube pendant **1 min à 2,000 x g** afin d'éliminer les débris solides.

1 min 2,000 xg

Note : ne pas centrifuger plus longtemps ou plus fort afin d'éviter la sédimentation des particules virales.

Transférer 200 µL de surnageant dans un nouveau tube.

Transférer 200 µL de surnageant +10 µL Protéinase K

Ajouter **10 µL de Protéinase K Liquide** dans un tube et mélanger modérément.

La Protéinase K peut être déposée sur la paroi interne du tube. Vérifier visuellement que la Protéinase K a bien été déposée dans le tube !

Ajouter **200 µL de Tampon de lyse SVL** dans le tube.

+200 µL SVL Agiter, 10 min 1,400 rpm

Agiter le tube pendant 10 min à 1,400 rpm (par ex., sur un Thermoshaker Eppendorf) à température ambiante.

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (~ **1 s à ~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

Ajouter **2.5 µL de solution de travail d'ARN Carrier** (100 ng/µL) dans le tube.

Mélanger le contenu du tube en vortexant ou par pipetage.

Incuber pendant **3 min** à **température ambiante**.

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s** à **~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

~ 1 s,
~ 2,000 x g

+2.5 µL ARN
Carrier

Mélanger
TA, 3 min

~ 1 s,
~ 2,000 x g

Continuer avec l'étape 2 du paragraphe 5.1 (page 11) : *Ajuster les conditions de fixation (qui correspond à l'ajout de 200 µL d'éthanol).*

5.5 Prétraitement des écouvillons humides (en milieu de transport, VTM)

Avant de débiter la procédure :

- *Note : le milieu de transport ou de stabilisation peut être de composition chimique variable selon le fabricant. La compatibilité avec le kit NucleoSpin® VET doit être vérifiée préalablement.*
- Vérifier que le Tampon de lavage SVW2 a bien été préparé selon les recommandations du chapitre 3.
- Vérifier que l'ARN Carrier a bien été dissout dans l'eau (solution de travail).
- La procédure est effectuée à température ambiante.
- Préchauffer l'H₂O RNase-free (pour l'élution) à 70 °C.

1 Lyse de l'échantillon

Enlever l'écouvillon du tube contenant le milieu de transport (ex. : Sigma-Virocult®).

Enlever l'écouvillon du milieu

Transférer approximativement **300–1000 µL de milieu de transport** dans un nouveau tube (non fourni).

Transférer 300–1000 µL de milieu

Centrifuger le tube pendant **1 min à 2,000 x g** afin d'éliminer les débris solides.

1 min 2,000 x g

Note : ne pas centrifuger plus longtemps ou plus fort afin d'éviter la sédimentation des particules virales.

Transférer 200 µL de surnageant dans un nouveau tube.

Transférer 200 µL

Ajouter **10 µL de Protéinase K Liquide** dans un tube et mélanger modérément.

+10 µL Protéinase K

La Protéinase K peut être déposée sur la paroi interne du tube. Vérifier visuellement que la Protéinase K a bien été déposée dans le tube !

Ajouter **200 µL Tampon de lyse SVL** dans le tube.

+200 µL SVL

Agiter le tube pendant **10 min à 1,400 rpm** (par exemple, sur un Thermoshaker Eppendorf) à température ambiante.

Agiter, 10 min 1,400 rpm

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

~ 1 s, ~ 2,000 x g

Ajouter 2.5 µL de solution de travail d'ARN Carrier (100 ng/µL) dans le tube.

+2.5 µL ARN Carrier

Mélanger le contenu du tube en vortexant ou par pipetage.

Mélanger TA, 3 min

Incuber pendant **3 min à température ambiante**.

~ 1 s, ~ 2,000 x g

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

Continuer avec l'étape 2 du paragraphe 5.1 (page 11) : *Ajuster les conditions de fixation (qui correspond à l'ajout de 200 µL d'éthanol).*

5.6 Prétraitement des Fèces

Avant de débiter la procédure :

- *Note* : les échantillons fécaux sont très variables quant à leur texture, rigidité, contenu en eau, en acides nucléiques issus des pathogènes et en substances inhibitrices. Ainsi, les performances des protocoles de prétraitement proposés ci-dessous doivent être évaluées pour chaque combinaison échantillon fécal et pathogène ciblé. Les fèces dures et/ou séchées peuvent nécessiter un broyage mécanique et/ou un volume supérieur de PBS de manière à obtenir une masse assez liquide.
- *Note* : les fèces varient grandement en terme de contenu en inhibiteurs. Pour certains échantillons très riches en inhibiteurs, il peut s'avérer nécessaire de réduire la quantité de matériel initial. Pour les échantillons difficiles, il est recommandé de ne pas utiliser plus de 100 mg de fèces dans 1 mL de PBS.
- Vérifier que le Tampon de lavage SVW2 a bien été préparé selon les recommandations du chapitre 3.
- Vérifier que l'ARN Carrier a bien été dissout dans l'eau (solution de travail).
- La procédure est effectuée à température ambiante.
- Préchauffer l'H₂O RNase-free (pour l'élution) à 70 °C.

1 Lyse de l'échantillon

Mélanger l'échantillon de fèces avec 10 volumes de PBS (10 x le volume ou 10 x la masse de fèces), par ex., mélanger 100 mg ou 100 µL de fèces avec 1 mL de PBS et mélanger vigoureusement pour resuspendre les particules et obtenir une suspension de matières fécales.

Mélanger les fèces avec 10 vol. de PBS

Centrifuger le tube pendant **1 min à 2,000 x g** afin d'éliminer les débris solides.

1 min 2,000xg

Note : ne pas centrifuger plus longtemps ou plus fort afin d'éviter la sédimentation des particules virales.

Transférer 250 µL de surnageant dans un tube neuf.

Transférer 250 µL

Note : les particules flottantes ne doivent pas être prélevées mais éliminées avec le reste des sédiments.

Ajouter 250 µL de Tampon de lyse **SVL** dans le tube contenant le surnageant.

+250 µL SVL

Mélanger vigoureusement pendant 30 secondes en vortexant.

Mélanger

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

**~ 1 s,
~ 2,000 x g**

Ajouter 10 µL de **Protéinase K liquide**.

**+10 µL
Protéinase K
Mélanger,
10 min 1,400 rpm**

Agiter le tube pendant **10 min à 1,400 rpm** (par exemple, sur un Thermoshaker Eppendorf) à température ambiante.

Optionnel : **Ajouter 2.5 µL de solution de travail d'ARN Carrier** (100 ng/µL) dans le tube et mélanger le contenu du tube en vortexant ou par pipetage.

**opt. : +2.5 µL
ARN Carrier**

Incuber pendant **3 min à température ambiante**.

Mélanger

Centrifuger le tube pendant **3 min** à environ **15,000 x g** afin d'éliminer les débris non lysés.

TA, 3 min

**~ 3 min,
~ 15,000 x g**

Récupérer 400 µL de surnageant et transférer dans un nouveau tube.

Récupérer et continuer avec 400 µL de surnageant

Note : cette étape élimine les résidus d'échantillon non lysé ; utiliser uniquement le surnageant et jeter les sédiments !

Continuer avec l'étape 2 du paragraphe 5.1 (page 11) : *Ajuster les conditions de fixation (qui correspond à l'ajout de 200 µL d'éthanol).*

5.7 Prétraitement des écouvillons stabilisés dans le NucleoProtect® VET

Note : L'extraction d'acides nucléiques à partir d'écouvillons non stabilisés et stabilisés avec du NucleoProtect® VET peut être réalisée en parallèle. La modification du protocole pour les écouvillons stabilisés est limitée au prétraitement de l'échantillon uniquement.

Avant de débiter la procédure :

- Pour le traitement des échantillons d'écouvillons stabilisés avec le NucleoProtect® VET, un tampon supplémentaire PFN est nécessaire (REF 740121.5, voir les Informations de commande).
- Vérifier que le tampon de lavage SWW2 a été préparé conformément au chapitre 3.
- Vérifier que l'ARN Carrier est dissous dans l'eau (solution de travail).
- La procédure complète doit être effectuée à température ambiante (18–25 °C).
- Préchauffer l'H₂O sans RNase (pour l'élution) à 70 °C.

1 Lyse de l'échantillon

Vortexer le NucleoProtect® VET Swab Tube ou le tube contenant un écouvillon stabilisé dans le réactif NucleoProtect® VET pendant 30 secondes. Centrifuger brièvement le tube pendant 10 secondes à 200 x g pour éliminer les gouttes qui se retrouvent dans le couvercle.

Prélever **200 µL de la solution** et transférer dans un tube propre (par ex. 1,5 mL).

Ajouter **100 µL de tampon de lyse SVL, 100 µL d'eau, 2 µL de tampon PFN** et agiter au vortex pendant 10 à 15 s.

Note : le tampon SVL, l'eau et le PFN peuvent être mélangés pour obtenir un pré-mix. Pour 10 échantillons, mélanger 1000 µL de SVL, 1000 µL d'eau et 20 µL de PFN.

Ajouter **10 µL de Protéinase K Liquide** dans le tube et mélanger modérément.

Mélanger le tube pendant 10 min à 1 400 rpm (p.e. en utilisant un Thermomixer Eppendorf) à température ambiante.

Ajouter **2,5 µL de solution de travail d'ARN Carrier** (100 ng/µL) dans le tube.

Mélanger le contenu du tube par vortex ou en pipettant à plusieurs reprises.

Incuber pendant 3 minutes à température ambiante.

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (~ 1 s à ~ 2.000 x g) pour enlever les gouttes du couvercle (centrifugation courte seulement).

**transférer
200 µL de
solution dans
un tube propre**

+100 µL SVL

+100 µL eau

+2 µL PFN

**+10 µL
Protéinase K
Liquide**

**opt. : +2.5 µL
ARN Carrier**

Mélanger

TA, 3 min

**~ 1 s,
~ 2,000 x g**

- 2 Après le prétraitement de l'échantillon, continuer avec la procédure du protocole standard au chapitre 5.1 et l'étape 2 (page 11) : Ajuster les conditions de fixation (qui consiste à ajouter de 200 µL d'éthanol).
-

5.8 Prétraitement d'échantillons de sang stabilisés dans le NucleoProtect® VET

Note : L'extraction d'acides nucléiques à partir de sang non stabilisés et stabilisés avec du NucleoProtect® VET peut être réalisée en parallèle. La modification du protocole pour les échantillons de sang stabilisés est limitée au prétraitement de l'échantillon uniquement.

Avant de débiter la procédure :

- Pour le traitement des échantillons de sang stabilisé avec le NucleoProtect® VET, un tampon supplémentaire PFN est nécessaire (REF 740121.5, voir les Informations de commande).
- Vérifier que le tampon de lavage SVW2 a été préparé conformément au chapitre 3.
- Vérifier que l'ARN Carrier est dissous dans l'eau (solution de travail).
- La procédure complète doit être effectuée à température ambiante (18–25 °C).
- Préchauffer l'H₂O sans RNase (pour l'élution) à 70 °C.

1 Lyse de l'échantillon

Vortexer le NucleoProtect® VET Blood Tube ou le tube contenant du sang stabilisé dans le réactif NucleoProtect® VET pendant 30 secondes. Centrifuger brièvement le tube pendant 10 secondes à 200 x g pour éliminer les gouttes qui se retrouve dans le couvercle.

**transférer
200 µL de
solution dans
un tube propre**

Prélever **200 µL de la solution** (contenant approximativement 57 µL de sang) et transférer dans un tube propre (p. e. 1,5 mL).

**+100 µL SVL
+100 µL eau
+2 µL PFN**

Ajouter **100 µL de tampon de lyse SVL, 100 µL d'eau, 2 µL de tampon PFN** et agiter au vortex pendant 10 à 15 s.

Note : le tampon SVL, l'eau et le PFN peuvent être mélangés pour obtenir un pré-mix. Pour 10 échantillons, mélanger 1000 µL de SVL, 1000 µL d'eau et 20 µL de PFN.

Ajouter **10 µL de Protéinase K Liquide** dans le tube et mélanger modérément.

**+10 µL
Protéinase K
Liquide**

Mélanger le tube pendant 10 min à 1 400 rpm (p.e. en utilisant un Thermomixer Eppendorf) à température ambiante.

Ajouter **2,5 µL de solution de travail d'ARN Carrier** (100 ng/µL) dans le tube.

**opt. : +2,5 µL
ARN Carrier**

Mélanger le contenu du tube par vortex ou en pipettant à plusieurs reprises.

Incuber pendant 3 minutes à température ambiante.

Mélanger

Si nécessaire, centrifuger brièvement le tube (~ 1 s à ~ 2.000 x g) pour enlever les gouttes du couvercle (centrifugation courte seulement).

**TA, 3 min
~ 1 s,
~ 2,000 x g**

- 2** Après le prétraitement de l'échantillon, continuer avec la procédure du protocole standard au chapitre 5.1 et l'étape 2 (page 11) : Ajuster les conditions de fixation (qui consiste à ajouter de 200 µL d'éthanol).

6 Protocole FastTrack pour le plasma, le sérum et les solutions de lavage d'écouvillons

Certains échantillons, comme le plasma, le sérum, les solutions de lavage d'écouvillons et d'autres fluides biologiques peuvent être traités selon une procédure optimisant la rapidité et la simplicité du protocole. Cette procédure est dénommée 'FastTrack'. Le rendement en acides nucléiques pourra cependant être impacté par rapport à la procédure standard.

Pour des échantillons plus complexes ou riches en inhibiteurs, comme le sang, les fèces et les tissus, nous recommandons de suivre les procédures du chapitre 5.

Avant de débiter la procédure :

- Pour les échantillons de plasma et de sérum congelés, effectuer, si possible, un seul cycle de congélation / décongélation.
- Vérifier que le Tampon de lavage SVW2 a bien été préparé selon les recommandations du chapitre 3.
- Vérifier que l'ARN Carrier a bien été dissout dans l'eau (solution de travail).
- La procédure est effectuée à température ambiante.
- Il n'est pas nécessaire de disposer d'un bloc chauffant.

Préparer le mélange de Protéinase K – ARN Carrier

En fonction du nombre d'échantillons de la série à extraire, préparer un mélange de Protéinase K Liquide et de solution d'ARN Carrier selon le tableau suivant. Après préparation du mélange, conserver sur la glace et utiliser dans l'heure.

Nombre de preps	Volume de Protéinase K	Volume d'ARN Carrier
1	10 µL	2,5 µL
2	22 µL	5,5 µL
3	33 µL	8,25 µL
4	44 µL	11 µL
5	55 µL	13,75 µL
6	66 µL	16,5 µL
7	77 µL	19,25 µL
8	88 µL	22 µL
9	99 µL	24,75
10	110 µL	27,5 µL
11	121 µL	30,25 µL
12	132 µL	33 µL

1 Lyse de l'échantillon

Déposer **12.5 µL de mélange Protéinase K Liquide – ARN Carrier dans un tube (1.5 mL, fourni)**.

Ajouter **200 µL d'échantillon** dans le tube et mélanger modérément.

Ajouter **200 µL de Tampon de lyse SVL** dans le tube.

Agiter le tube pendant **10 min à 1,400 rpm** (par ex. sur un Thermoshaker Eppendorf) à température ambiante.

Si nécessaire, **centrifuger** brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

2 Ajuster les conditions de fixation des acides nucléiques

Ajouter **200 µL d'éthanol** (96 – 100 %) dans le tube et mélanger en vortexant (10 – 15 s).

Incuber pendant **2 min à température ambiante**.

Centrifuger brièvement le tube (**~ 1 s à ~ 2,000 x g**) pour éliminer les gouttes du bouchon (centrifugation brève uniquement).

3 Fixation des ARN/ADN viraux

Déposer le lysat (environ 610 µL) sur une colonne NucleoSpin® VET.

Centrifuger **1 min à 11,000 x g**.

Placer la colonne NucleoSpin® VET dans un nouveau tube collecteur (2 mL, fourni) et jeter le tube contenant le filtrat issu de l'étape précédente.

4 Lavage et séchage de la membrane de silice

Ajouter **400 µL de Tampon de lavage SVW1** à la colonne NucleoSpin® VET.

Centrifuger 1 min à 11,000 x g.

Placer la colonne NucleoSpin® VET dans un nouveau tube collecteur (2 mL, fourni) et jeter le tube contenant le filtrat issu de l'étape précédente.

Ajouter **200 µL de Tampon de lavage SVW2** à la colonne NucleoSpin® VET.

Centrifuger **1 min à 11,000 x g.**

Placer la colonne NucleoSpin® VET dans un tube d'éluion (1.5 mL, fourni) et jeter le tube collecteur contenant le filtrat issu de l'étape précédente.

5 Elution de l'ARN/ADN

Ajouter **100 µL d'H₂O RNase-free sur la membrane de silice.**

Incuber **1 min à TA.**

Centrifuger **1 min à 11,000 x g.**

Conserver l'ARN / ADN élué sur la glace ou congeler pour le stockage.

7 Annexes

7.1 Optimisation des performances

Problème	Causes possibles et suggestions
Rendement en acides nucléiques viraux faible ou nul	<p><i>Problèmes avec l'ARN Carrier</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Omission de l'ARN Carrier.
	<p><i>Acides nucléiques viraux dégradés</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Les échantillons doivent être traités immédiatement. Veiller à bien conserver les échantillons avant de les traiter. Vérifier que les tampons ont été préparés et conservés correctement. En cas de doute, utiliser un nouvel aliquot de Tampon SVL, d'ARN Carrier et d'H₂O RNase-free.
Problèmes de détection	<p><i>Sensibilité réduite</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Changer le volume d'éluat ajouter dans les réactions PCR/RT-PCR.
	<p><i>Contamination par de l'éthanol</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Prolonger la centrifugation pour éliminer le Tampon SWW2 totalement
	<p><i>Interférence de l'ARN Carrier avec la méthode de détection</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Vérifier que l'ARN Carrier est compatible avec la méthode de détection. Certaines méthodes peuvent ne tolérer qu'une quantité limitée d'ARN Carrier.
Problèmes généraux	<p><i>Colmatage de la membrane</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifuger les lysats de plasma avant l'ajout d'éthanol et le dépôt sur les colonnes NucleoSpin® VET.

7.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoSpin® VET	740842.10 / .50 / .250	10 / 50 / 250
NucleoMag® VET	744200.1 / .4	1 × 96 / 4 × 96
Collection Tubes (2 mL)	740600	1000
MN Bead Tubes Type D	740814.50	pack of 50
Buffer PFN	740121.5	5 mL
NucleoProtect® Vet stabilization and inactivation reagent	740750.50 740750.500	50 mL 500 mL
NucleoProtect® VET Blood Tubes	740755	50

Produit	REF	Conditionnement
Bouchons d'étanchéité complémentaires pour NucleoProtect® VET Blood Tubes	740756	100
NucleoProtect® VET Swab Tubes	740760	50
Bouchons d'étanchéité complémentaires pour NucleoProtect® VET Swab Tubes	740761	100

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

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.

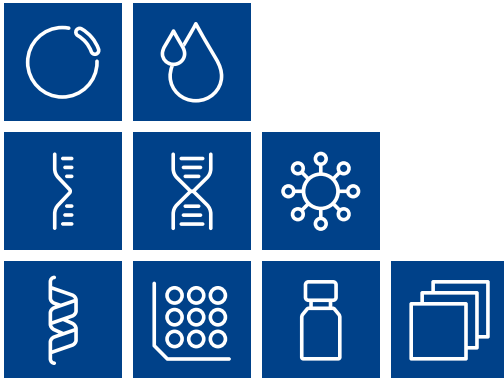
Ce produit MACHEREY-NAGEL comporte une documentation énonçant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La garantie fournie est limitée aux spécifications et descriptions des données indiquées dans la documentation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

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



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennner Str. 11
52355 Düren · Germany

DE	Tel.: +49 24 21 969-0	info@mn-net.com
CH	Tel.: +41 62 388 55 00	sales-ch@mn-net.com
FR	Tel.: +33 388 68 22 68	sales-fr@mn-net.com
US	Tel.: +1 888 321 62 24	sales-us@mn-net.com

