

Nexxo-Prep RNA mini

Kit d'extraction d'ARN, par centrifugation sur colonne, pour la purification de jusqu'à 100 µg d'ARN total à partir de cultures cellulaires (max. 1.10⁷ cellules), de tissus (max. 20 mg), de tissus inclus en paraffine ou de sang (max. 1.50 ml).

L'ADN obtenu peut être directement utilisé dans les applications down stream (Northern blots, dot blots, RT-PCR, DDRT-PCR, librairies ADNc) ou être stocké pour une utilisation ultérieure.

Note : ce kit n'a pas été validé pour l'extraction de l'ARN viral, ni pour la purification à partir de sérum ou de plasma.

I. Composants du kit

	10 preps	50 preps	250 preps
Tampon d'éluion KL	2 ml	15 ml	30 ml
Tampon de lyse LT	10 ml	50 ml	250 ml
Tampon R1	30 ml (concentré)	30 ml (concentré)	4 x 30 ml (concentré)
Solution de lavage M1	15 ml (prêt à l'emploi)	20 ml (volume final 40 ml)	80 ml (volume final 160 ml)
Solution de lavage M2	15 ml (prêt à l'emploi)	2 x 12 ml (volume final 2 x 60 ml)	2 x 40 ml (volume final 2 x 200 ml)
Billes Z1	1	1	5
Billes Z2	1	1	5
Kit Filtres ARN	10	50	5 x 50
Filtres ADN	10	50	5 x 50
 Tubes receveurs 2,0 ml	20	2 x 50	10 x 50
 Tubes receveurs GS	10	50	5 x 50
 Tubes d'éluion	10	50	5 x 50
 Notice	1	1	1
 Réf. Catalogue	2034.10	2034.50	2034.250

Matériels et instruments non fournis

- DTT 1M
- Éthanol >96 %
- Ethanol 70°
- Octane/xylène, protéinase K, tampon TE (uniquement pour l'extraction d'échantillon tissulaire FFPE)
- Tubes pour la lyse des érythrocytes (ex. Falcon 15 ml)
- Microcentrifugeuse (min 11000 x g), réfrigérée (selon le cas)
- Centrifugeuse réfrigérée (uniquement pour l'extraction à partir d'échantillons sanguins)
- Pipettes et pointes de pipette (RNase-free, stérile)
- Gants à usage unique
- Flacon de 1 litre

Certains composants de ce kit sont livrés sous forme concentrée et sont à diluer avant utilisation (voir chapitre « Préparation des réactifs et tampons », page 2).

II. Conditions de stockage et durée de validité

L'ensemble des composants de ce kit, à l'exception du **Tampon R1** dilué, sont à stocker à température ambiante (15-30 °C).

- Stocker le **Tampon R1** dilué à +4 °C.
- Ce kit nécessite l'utilisation d'une solution de DTT 1M (non fourni). Le DTT est très instable en solution. Il est recommandé de le stocker à -20 °C.

Remarque : Ne pas multiplier les cycles de congélation-décongélation du DTT 1M. Aliquoter si nécessaire.

En respectant ces recommandations, le DTT 1M est stable pendant 12 mois.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

L'éthanol est un composé volatil. Bien refermer les flacons **Solution de lavage M1** et **Solution de lavage M2**.

Avant utilisation du kit, amener l'ensemble des composants à température ambiante et vérifier l'absence de précipités dans les solutions. Au besoin, chauffer avec précaution (< 30 °C) jusqu'à disparition du précipité.

Note : les composants du kit ont une durée de validité minimum de 12 mois (sous réserve de respecter les conditions de stockage).

III. Préparation des réactifs et tampons

Tous les tampons et solutions sont à préparer avec ddH₂O RNase-free (traitée au DEPC)

1. Kit 10 extractions :

- Verser le **Tampon R1 concentré** (30 ml), dans une bouteille contenant 970 ml de H₂O. Annoter la bouteille (« **Tampon R1 dilué** »), puis stocker à +4 °C.

Remarque : ce kit nécessite la préparation de DTT 1M (non fourni). Le DTT étant très instable en solution, il est préférable de préparer une solution fraîche avant chaque utilisation. Il est néanmoins possible de préparer un stock d'aliquotes de DTT 1M, qui sera à conserver selon les indications du chapitre « Conditions de stockage et durée de validité » en page 2.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

*Remarque : dans le kit 10 extractions la **Solution de lavage M1** et la **Solution de lavage M2** sont fournies prêtes à l'emploi.*

2. Kit 50 extractions :

- Verser le **Tampon R1 concentré** (30 ml), dans une bouteille contenant 970 ml de H₂O. Annoter la bouteille (« **Tampon R1 dilué** »), puis stocker à +4 °C.
- Ajouter 20 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage M1**, mélanger, puis stocker bouchon fermement serré.
- Ajouter 48 ml d'éthanol >96 % à chaque **Solution de lavage M2**, mélanger, puis stocker bouchon fermement serré.

Remarque : ce kit nécessite la préparation de DTT 1M (non fourni). Le DTT étant très instable en solution, il est préférable de préparer une solution fraîche avant chaque utilisation. Il est néanmoins possible de préparer un stock d'aliquotes de DTT 1M, qui sera à conserver selon les indications du chapitre « Conditions de stockage et durée de validité » en page 2.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

3. Kit 250 extractions :

- Verser chaque **Tampon R1 concentré** (30 ml), dans respectivement une bouteille contenant 970 ml de H₂O. Annoter les bouteilles (« **Tampon R1 dilué** »), puis stocker à +4 °C.
- Ajouter 80 ml d'éthanol >96 % à la **Solution de lavage M1**, mélanger, puis stocker bouchon fermement serré.
- Ajouter 160 ml d'éthanol >96 % à chaque **Solution de lavage M2**, mélanger, puis stocker bouchon fermement serré.

Remarque : ce kit nécessite la préparation de DTT 1M (non fourni). Le DTT étant très instable en solution, il est préférable de préparer une solution fraîche avant chaque utilisation. Il est néanmoins possible de préparer un stock d'aliquotes de DTT 1M, qui sera à conserver selon les indications du chapitre « Conditions de stockage et durée de validité » en page 2.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

IV. Protocole 1 : extraction de l'ARN total à partir de cultures cellulaires (jusqu'à 1.10^7 cellules)

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- La dernière étape nécessite de placer le tube d'éluion dans de la glace. Préparer la glace à temps.

Remarque : toujours utiliser des consommables RNase-free.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

- Supplémenter la quantité nécessaire en **Tampon de lyse LT** avec 1 % en volume final de DTT 1 M. (voir étape 1c ou 2)

Ex : $693 \mu\text{l}$ **Tampon de Lyse LT** + $7 \mu\text{l}$ DTT 1M = $700 \mu\text{l}$ de **Tampon de lyse LT** supplémenté en DTT

Attention : le mélange Tampon de lyse + DTT est instable, préparer uniquement les quantités nécessaires pour réaliser le protocole.

*Attention : le **Tampon de lyse LT** contient des particules se liant à l'ADN. Mélanger doucement avant utilisation, afin de remettre les particules en suspension. S'il y a formation de mousse, attendre la disparition de celle-ci.*

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement.

Selon le type d'échantillon démarrez avec l'étape :

- 1a) pour les suspensions cellulaires.
- 1b) pour les monocouches cellulaires, hormis les monocouches sur boîtes 6 à 96 puits, de \varnothing 35 mm ou en flacons de surf. 12.5 cm^2 .
- 1c) pour les monocouches cellulaires sur boîtes 6 à 96 puits, de \varnothing 35 mm ou en flacons de surf. 12.5 cm^2 .

1	Récolte des cellules, à partir d'une suspension cellulaire
a)	<ul style="list-style-type: none">• Centrifuger 5 min à $240 \times g$, la culture cellulaire contenant jusqu'à 1.10^7 cellules• Éliminer délicatement (sans perturber le culot) le surnageant et la totalité du milieu de culture• Poursuivre avec l'étape 2 « Lyse cellulaire »

1	Récolte des cellules, à partir d'une monocouche cellulaire
b)	<ul style="list-style-type: none">• Détacher les cellules par trypsinisation• Transférer les cellules dans un tube de centrifugation• Centrifuger 5 min à $240 \times g$, la culture cellulaire contenant jusqu'à 1.10^7 cellules• Éliminer délicatement (sans perturber le culot) le surnageant et la totalité du milieu de culture• Poursuivre avec l'étape 2 « Lyse cellulaire »

Étapes 1 à 7 →

1 c)	Récolte et lyse cellulaire , à partir d'une monocouche
	<ul style="list-style-type: none"> Éliminer la totalité du milieu de culture Ajouter directement la quantité requise(*) de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation) à la monocouche cellulaire
	<p>(*) Monocouche sur boîte 12, 24 et 96 puits : 350 µl Tampon de lyse LT supplémenté en DTT.</p> <p>Monocouche sur boîte 6 puits, Ø 35 mm ou flacons de surf. 12.5 cm² : 700 µl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Rassembler les cellules à l'aide d'un grattoir en caoutchouc Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer), jusqu'à disparition complète du culot et des fragments de culot Poursuivre directement avec l'étape 3 « Élimination de l'ADN »

2	Lyse cellulaire
	<ul style="list-style-type: none"> Détacher le culot en tapotant sur le tube Ajouter la quantité requise(*) de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation)
	<p>(*) Culot avec moins de 5 x 10⁶ cellules : 350 µl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT.</p> <p>Culot avec 5 x 10⁶ à 1 x 10⁷ cellules : 700 µl de de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer), jusqu'à disparition complète du culot et des fragments de culot

3	Élimination de l'ADN
	<ul style="list-style-type: none"> Placer un Filtre ADN dans un tube receveur 2.0 ml à couvercle Transférer le lysat résultant de l'étape 1c) ou 2 (selon le cas), dans le Filtre ADN Incuber 1 min. à température ambiante Centrifuger 2 min. à 11000 x g Jeter le Filtre ADN <p>Remarque : conserver le filtre si l'extraction simultanée de l'ADN est envisagée.</p>

4	Fixation de l'ARN au Filtre ARN
	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter la quantité requise(*) en éthanol 70° au filtrat obtenu à l'étape 4
	<p>(*) Moins de 5 x 10⁶ cellules : 250 µl d'éthanol 70°.</p> <p>De 5 x 10⁶ à 1 x 10⁷ cellules : 500 µl d'éthanol 70°.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer plusieurs fois) Transférer le mélange filtrat + éthanol dans un Filtre ARN (placé dans son tube receveur) Incuber 1 min. à température ambiante Centrifuger 1 min. à 11000 x g Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS <p>Remarque : si le volume de l'échantillon dépasse 700 µl, centrifugez le mélange filtrat + éthanol par étapes successives.</p>

Remarque : forcer le passage du lysat à travers une aiguille de gauge 20 améliore le rendement de l'extraction de l'ARN. (L'ADN y subit des forces de frictions dommageables)

Étapes 5 à 7 →

5	Lavage ARN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage M1 au Filtre ARN • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u> • Placer le Filtre ARN dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

6	Lavage ARN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 700 µl de Solution de lavage M2 au Filtre ARN • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Réitérer 1 X cette étape de lavage-centrifugation • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

7	Elution de l'ARN total
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre ARN dans un tube d'éluion RNase-free • Ajouter 40 – 100 µl (selon la concentration et le rendement souhaité) de Tampon d'éluion KL • Incuber 2 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le Filtre ARN et <u>placer immédiatement le tube contenant l'ARN élué dans la glace</u>

L'ARN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que les Northern blots, les dot blots, la RT-PCR, la DDRT-PCR, la réalisation de bibliothèques d'ADNc, etc. ou peut être stocké à -80 °C pendant plusieurs semaines.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O RNase-free.

V. Protocole 2 : extraction de l'ARN total à partir de sang total (0.5 ml à 1.5 ml, $<1.10^7$ leucocytes)

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- La première et la dernière étape nécessitent de placer un tube dans la glace. Préparer la glace à temps.

Remarque : toujours utiliser des consommables RNase-free.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

- Supplémenter la quantité nécessaire en **Tampon de lyse LT** avec 1 % en volume final de DTT 1 M. (voir étape 2)

Ex : 693 μ l **Tampon de Lyse LT** + 7 μ l DTT 1M = 700 μ l de **Tampon de lyse LT** supplémenté en DTT

Attention : le mélange Tampon de lyse + DTT est instable, préparer uniquement les quantités nécessaires pour réaliser le protocole.

*Attention : le **Tampon de lyse LT** contient des particules se liant à l'ADN. Mélanger doucement avant utilisation, afin de remettre les particules en suspension. S'il y a formation de mousse, attendre la disparition de celle-ci.*

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement.

1	Concentration des leucocytes
	<ul style="list-style-type: none"> Mélanger délicatement l'échantillon par inversion jusqu'à l'obtention d'un échantillon complètement homogène (min. 15 à 20 inversions) Transférer 0.5 à 1.5 ml de l'échantillon dans un tube 15 ml (non fourni) et ajouter 10 ml de Tampon R1 dilué frais (4 °C) Mélanger brièvement, mais soigneusement, par inversion Incuber 15 - 20 min. dans la glace et mélanger brièvement, pendant la phase d'incubation, en réalisant 2 inversions <p><i>Remarque : pour le sang frais (< 3 heures) augmenter la durée d'incubation à 45 min.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifuger 5 min., à 4 °C, à 960 x g Enlever, délicatement, la totalité du surnageant, afin que ne reste plus que le culot Ajouter 5 ml de Tampon R1 dilué frais (4 °C) au culot Mélanger en tapotant le tube avec les doigts Centrifuger 5 min., à 4 °C, à 960 x g Enlever, délicatement, la totalité du surnageant (y compris l'interface rouge), afin que ne reste plus que le culot blanc (de petite taille).

2	Extraction des acides nucléiques
	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 900 µl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation) Mélanger à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer plusieurs fois) jusqu'à disparition complète du culot et des fragments de culot <p><i>Remarque : les particules d'aspect gélatineux issus de l'interaction ADN/Tampon de lyse LT, ne sont pas à solubiliser</i></p>

3	Elimination de l'ADN
	<ul style="list-style-type: none"> Transférer la solution résultante de l'étape 2 dans un tube receveur 2.0 ml Vortexer 10 sec. Incuber 5 min. à température ambiante et vortexer 3 à 5 fois pendant cette incubation Centrifuger 1 min. à 11000 x g Transférer le surnageant dans un nouveau tube receveur 2.0 ml. Ne pas prendre le culot, les parties gélatineuses ou les particules minérales Ajouter 750 µl d'éthanol >96 % tube contenant le surnageant Mélanger avec une pipette (aspirer/refluer plusieurs fois)

4	Fixation par étapes de L'ARN au Filtre ARN
	<ul style="list-style-type: none"> Transféré les premiers 800 µl de la solution obtenue à l'étape précédente (surnageant + éthanol), au centre d'un Filtre ARN (placé dans son tube) Incuber 1 min. à température ambiante Centrifuger 1 min. à 11000 x g Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans son tube Transféré le restant de la solution obtenue à l'étape 3 (surnageant + éthanol), au centre du même Filtre ARN Incuber 1 min. à température ambiante Centrifuger 1 min. à 11000 x g Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans son tube

Étapes 5 à 7 →

5	Lavage ARN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage M1 • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u> • Placer le Filtre ARN dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

6	Lavage ARN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 700 µl de Solution de lavage M2 • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Réitérer 1 X cette étape de lavage-centrifugation • Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

7	Elution de l'ARN total
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre ARN dans un tube d'éluion RNase-free • Ajouter 30 – 60 µl (selon la concentration et le rendement souhaité) de Tampon d'éluion KL • Incuber 2 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le Filtre ARN et <u>placer immédiatement le tube contenant l'ARN élué dans la glace</u>

L'ARN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que les Northern blots, les dot blots, la RT-PCR, la DDRT-PCR, la réalisation de bibliothèques d'ADNc, etc. ou peut être stocké à -80 °C pendant plusieurs semaines.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O RNase-free.

Remarque : passez directement à l'étape 2 « Extraction des acides nucléiques », pour l'extraction à partir de culots obtenus par centrifugation de la couche leuco-plaquettaire (veillez à ce que le culot soit complètement débarrasser du surnageant).

VI. Protocole 3 : extraction de l'ARN à partir de jusqu'à 20 mg de tissus

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- La dernière étape nécessite de placer le tube d'éluion dans de la glace. Préparer la glace à temps.

Remarque : toujours utiliser des consommables RNase-free.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

- Supplémenter la quantité nécessaire en **Tampon de lyse LT** avec 1 % en volume final de DTT 1 M. (voir étape 1 ou 1 bis)

Ex : 693 μ l **Tampon de Lyse LT** + 7 μ l DTT 1M = 700 μ l de **Tampon de lyse LT** supplémenté en DTT

Attention : le mélange Tampon de lyse + DTT est instable, préparer uniquement les quantités nécessaires pour réaliser le protocole.

*Attention : le **Tampon de lyse LT** contient des particules se liant à l'ADN. Mélanger doucement avant utilisation, afin de remettre les particules en suspension. S'il y a formation de mousse, attendre la disparition de celle-ci.*

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement.

Selon le type et les caractéristiques de l'échantillon le broyage automatisé (1) ou manuel (1 bis) est à privilégier

	Broyage automatisé de l'échantillon
1	<ul style="list-style-type: none">• Transférer l'échantillon de départ dans un récipient (non fourni) permettant le broyage/homogénéisation à l'aide d'un vortex, d'un broyeur homogénéiseur...• Ajouter 6 Billes Z1 et 3 Billes Z2• Ajouter 600 μl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation)• Broyer et homogénéiser l'échantillon• Transférer l'échantillon dans un tube receveur 2.0 ml• Poursuivre avec l'étape 2 « Élimination de l'ADN »

	Broyage manuel de l'échantillon
1 bis	<ul style="list-style-type: none">• Broyage, à l'aide d'un pilon et d'azote liquide, de l'échantillon de départ• Transférer la poudre résultante dans un tube receveur 2.0 ml <p><i>Attention : ne pas décongeler l'échantillon</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Ajouter 600 μl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation)• Incuber sous agitation à température ambiante jusqu'à obtention d'un lysat homogène

Remarque : forcer le passage du lysat à travers une aiguille de gauge 20 améliore le rendement de l'extraction de l'ARN. (L'ADN y subit des forces de frictions dommageables).

Étape 2 à 6 →

2	Élimination de l'ADN (et des billes le cas échéant)
	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuger 2 min. à vitesse maximale • Transférer délicatement env. 500 µl du surnageant dans un nouveau tube receveur 2.0 ml (non fourni) • Ajouter 330 µl d'éthanol >96 % au nouveau tube receveur 2.0 ml • Mélanger vigoureusement avec une pipette (aspirer/refluer plusieurs fois)

3	Fixation de l'ARN au Filtre ARN
	<ul style="list-style-type: none"> • Transférer la totalité de la solution obtenue à l'étape précédente dans un Kit filtre ARN • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre ARN dans le Tube receveur

4	Lavage ARN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage M1 • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u> • Placer le Filtre ARN dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

5	Lavage ARN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 700 µl de Solution de lavage M2 • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Répéter 1 X cette étape de lavage-centrifugation • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

6	Élution de l'ARN total
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre ARN dans un tube d'élution RNase-free • Ajouter 30 – 60 µl (selon la concentration et le rendement souhaité) de Tampon d'élution KL • Incuber 2 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le Filtre ARN et <u>placer immédiatement le tube contenant l'ARN élué dans la glace</u>

L'ARN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que les Northern blots, les dot blots, la RT-PCR, la DDRT-PCR, la réalisation de bibliothèques d'ADNc, etc. ou peut être stocké à -80 °C pendant plusieurs semaines.

Remarque : l'élution peut également être réalisée avec ddH₂O RNase-free.

VII. Protocole 4 : extraction de l'ARN total à partir de tissus fixé au formol et inclus en paraffine

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- Supplémenter la quantité nécessaire en **Tampon de lyse LT** avec 1 % en volume final de DTT 1 M. (voir étape 1 ou 1 bis du protocole 3, page 10)

Remarque : toujours utiliser des consommables RNase-free.

- Préparer en temps utile l'octane ou le xylène (non fourni).
- Préparer en temps utile la protéinase K (40 mg/ml) (non fourni).
- Préparer en temps utile le DTT 1mM (non fourni).
- Préparer en temps utile un tampon TE RNase-free (non fourni).
- La dernière étape nécessite de placer le tube d'éluion dans de la glace. Préparer la glace à temps.

Ex : 693 μ l Tampon de Lyse LT + 7 μ l DTT 1M = 700 μ l de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT

Attention : le mélange Tampon de lyse + DTT est instable, préparer uniquement les quantités nécessaires pour réaliser le protocole.

Attention : le Tampon de lyse LT contient des particules se liant à l'ADN. Mélanger doucement avant utilisation, afin de remettre les particules en suspension. S'il y a formation de mousse, attendre la disparition de celle-ci.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement.

1	Déparaffinage
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer l'échantillon dans un microtube 1.5 ml (non fourni) • Ajouter 0.5 ml d'octane ou de xylène • Vortexer délicatement afin de dissoudre la paraffine • Centrifuger 2 min. à vitesse maximale • Enlever délicatement le surnageant du culot <p><i>Remarque : répéter la manipulation au besoin pour éliminer complètement la paraffine.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Laver le culot à l'éthanol >96 %, puis sécher • Centrifuger brièvement • Enlever l'éthanol à l'aide d'une pipette • Incuber à 52 °C (tube ouvert) afin laisser s'évaporer l'éthanol résiduel

2	Lyse cellulaire préliminaire
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 10 μl de protéinase K (40 mg/ml), 90 μl de tampon TE RNase-free et du DTT à hauteur de 10 mM (env. 1μl de DTT 1M) <p><i>Remarque : un broyage mécanique avant ou pendant la lyse est recommandé</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette (aspirer/refluer) • Incuber 10 min. à 48 °C • Incuber 10 min. sous agitation à 80 °C

Continuer avec l'étape 1 du protocole 3 « extraction de l'ARN à partir de jusqu'à 20 mg de tissus » (page 10) en utilisant la totalité de l'échantillon.

VIII. Protocole 5 : extraction de l'ARN à partir de jusqu'à 20 mg de tissus de poumon, de rate ou de reins

Avant de commencer

- Vérifier que la préparation du kit, telle que décrite dans le chapitre « Préparation des réactifs et tampons », a été réalisée (voir page 2).
- La dernière étape nécessite de placer le tube d'éluion dans de la glace. Préparer la glace à temps.

Remarque : toujours utiliser des consommables RNase-free.

Remarque : le DTT 1M peut être remplacé par du β -mercaptoéthanol 1M.

- Supplémenter la quantité nécessaire en **Tampon de lyse LT** avec 1 % en volume final de DTT 1 M. (voir étape 1 ou 1 bis)

Ex : 693 μ l **Tampon de Lyse LT** + 7 μ l DTT 1M = 700 μ l de **Tampon de lyse LT** supplémenté en DTT

Attention : le mélange Tampon de lyse + DTT est instable, préparer uniquement les quantités nécessaires pour réaliser le protocole.

*Attention : le **Tampon de lyse LT** contient des particules se liant à l'ADN. Mélanger doucement avant utilisation, afin de remettre les particules en suspension. S'il y a formation de mousse, attendre la disparition de celle-ci.*

Remarque : Afin d'éviter la contamination des liquides, changer de pointe de pipette après chaque prélèvement

Selon le type et les caractéristiques de l'échantillon le broyage automatisé (1) ou manuel (1 bis) est à privilégier

	Broyage automatisé de l'échantillon
1	<ul style="list-style-type: none"> • Transférer l'échantillon de départ dans un récipient (non fourni) permettant le broyage/homogénéisation à l'aide d'un vortex, d'un broyeur homogénéiseur... • Ajouter 6 Billes Z1 et 3 Billes Z2 • Ajouter 900 μl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger avant utilisation) • Broyer et homogénéiser l'échantillon • Transférer l'échantillon dans un tube receveur 2.0 ml • Poursuivre avec l'étape 2 « Elimination de l'ADN »

	Broyage manuel de l'échantillon
1 bis	<ul style="list-style-type: none"> • Broyage, à l'aide d'un pillon et d'azote liquide, de l'échantillon de départ • Transférer la poudre résultante dans un tube receveur 2.0 ml <p><i>Attention : ne pas décongeler l'échantillon</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 900 μl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation) • Incuber sous agitation à température ambiante jusqu'à obtention d'un lysat homogène

Remarque : forcer le passage du lysat à travers une aiguille de gauge 20 améliore le rendement de l'extraction de l'ARN. (L'ADN y subit des forces de frictions dommageables).

Étapes 2 à 6 →

2	Elimination de l'ADN (et des billes le cas échéant)
	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuger 2 min. à vitesse maximale • Transférer délicatement env. 800 µl du surnageant dans un nouveau tube receveur 2.0 ml (non fourni) • Ajouter 500 µl d'éthanol >96 % au nouveau tube receveur 2.0 ml • Mélanger vigoureusement avec une pipette (aspirer/refluer plusieurs fois)

3	Fixation de L'ARN au Filtre ARN
	<ul style="list-style-type: none"> • Transférer 750 µl de la solution obtenue à l'étape précédente dans un Kit filtre ARN • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre ARN dans le Tube receveur

4	Lavage ARN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage M1 • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u> • Placer le Filtre ARN dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

5	Lavage ARN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 700 µl de Solution de lavage M2 • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Répéter 1 X cette étape de lavage-centrifugation • Jeter le filtrat et remplacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

6	Elution de l'ARN total
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre ARN dans un tube d'éluion RNase-free • Ajouter 30 – 60 µl (selon la concentration et le rendement souhaité) de Tampon d'éluion KL • Incuber 2 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le Filtre ARN et <u>placer immédiatement le tube contenant l'ARN élué dans la glace</u>

L'ARN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que les Northern blots, les dot blots, la RT-PCR, la DDRT-PCR, la réalisation de bibliothèques d'ADNc, etc. ou peut être stocké à -80 °C pendant plusieurs semaines.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O RNase-free.

IX. Variante I : extraction simultanée de l'ARN total et des protéines

Les protéines peuvent être récupérés au niveau du **filtrat** obtenu à l'issu de :

- L'étape 3 « **Fixation de l'ARN au Filtre ARN** » du protocole 1. (Page 5)
- L'étape 3 « **Fixation de l'ARN au Filtre ARN** » du protocole 3. (Page 11)

	Précipitation des protéines
1	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 3 volume d'acétone froid au filtrat• Vortexer• Centrifuger 10 min. à 4 °C, à 11000 x g• Enlever le surnageant (attention à ne pas emporter le culot)

	Dissolution des protéines
3	<ul style="list-style-type: none">• Reprendre le culot/ les protéines dans une solution tampon adaptée aux applications ultérieurs <p>(ex : tampon Laemmli puis chauffer à 99 °C pendant 5 min.)</p>

	Lavage des protéines
2	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 500 µl d'éthanol froid >96 %• Centrifuger 4 min. à 4 °C, à vitesse maximale• Enlever le surnageant (attention à ne pas emporter le culot)

Attention : ne jamais réaliser une précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA)

X. Variante II : extraction simultanée de l'ARN total et de l'ADN dans le protocole 1

- L'ADN peut être récupéré à partir du **Filtre ADN** de l'étape 3 « **Elimination de l'ADN** », du protocole 1. (page 5)

1	Lavage ADN, étape I
	<ul style="list-style-type: none">• Placer le Filtre ADN dans un nouveau tube receveur 2.0 ml (non fourni)• Ajouter 600 µl de Solution de lavage M1 au Filtre ADN• Centrifuger 1 min. à 11000 x g• Jeter le filtrat <u>et le tube receveur 2.0 ml</u>• Placer le Filtre ADN dans un <u>nouveau</u> tube receveur 2.0 ml

2	Lavage ADN, étape II
	<ul style="list-style-type: none">• Ajouter 700 µl de Solution de lavage M2 au Filtre ADN• Centrifuger 1 min. à 11000 x g• Jeter le filtrat et replacer le Filtre ADN dans le tube receveur 2.0 ml• Répéter 1 X cette étape de lavage-centrifugation• Jeter le filtrat et replacer le Filtre ADN dans le tube receveur 2.0 ml• Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

3	Elution de l'ADN génomique
	<ul style="list-style-type: none">• Placer le Filtre ADN dans un tube d'élution 1.5 ml• Ajouter 40 – 100 µl (selon la concentration et le rendement souhaité) de Tampon d'élution KL• Incuber 2 min. à température ambiante• Centrifuger 1 min. à 11000 x g• Jeter le Filtre ADN et placer le tube d'élution, contenant l'ADN, à +4 °C <p><i>Remarque : l'ADN peut aussi être élué avec H₂O</i></p>

Remarque : ce protocole nécessite une plus grande quantité en solutions et tubes. L'utilisation de ce protocole réduit le nombre d'extractions ARN de ce kit

XI. Variante III : purification de l'ARN à partir de la phase aqueuse de Trizol

1	Élimination de l'ADN
	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter, dans un tube receveur 2.0 ml, à jusqu'à 350 µl de phase aqueuse de Trizol un volume équivalent de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation) Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette (aspirer/ refluer en conséquent) Incuber 1 min. à température ambiante Centrifuger 2 min. à 11000 x g Transférer le surnageant dans un nouveau tube receveur 2.0 ml

2	Fixation de l'ARN au Filtre ARN
	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 1 volume d'éthanol >96 % au surnageant récupéré à l'étape précédente Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette (aspirer/ refluer en conséquent) Transférer le mélange dans un Filtre ARN (placé dans son tube receveur) Incuber 1 min. à température ambiante Centrifuger 1 min. à 11000 x g Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le tube receveur <p><i>Remarque : si le mélange éthanol + surnageant dépasse 700 µl, procéder par étapes en utilisant le même filtre ARN.</i></p>

3	Lavage ARN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 600 µl de Solution de lavage M1 Centrifuger 1 min. à 11000 x g Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u> Placer le Filtre ARN dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

4	Lavage ARN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 700 µl de Solution de lavage M2 Centrifuger 1 min. à 11000 x g Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS Réitérer 1 X cette étape de lavage-centrifugation Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

5	Élution de l'ARN total
	<ul style="list-style-type: none"> Placer le Filtre ARN dans un tube d'élution RNase-free Ajouter 40 – 100 µl (selon la concentration et le rendement souhaité) de Tampon d'élution KL Incuber 2 min. à température ambiante Centrifuger 1 min. à 11000 x g Jeter le Filtre ARN et <u>placer immédiatement le tube contenant l'ARN élué dans la glace</u>

L'ARN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que les Northern blots, les dot blots, la RT-PCR, la DDRT-PCR, la réalisation de bibliothèques d'ADNc, etc. ou peut être stocké à -80 °C pendant plusieurs semaines.

Remarque : l'élution peut également être réalisée avec ddH₂O RNase-free.

XII. Variante IV : purification de l'ARN à partir de divers liquides

Selon le type d'échantillon (contaminé en ADN ou non) démarrez avec l'étape 1 ou 1bis

1	<p>Préparation de l'échantillon, non contaminé en ADN</p> <ul style="list-style-type: none"> • Transférer la quantité requise (*) en Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation) dans un Filtre ADN (placé dans son tube receveur) <hr/> <p>(*) pour 100 µl d'échantillon : 350 µl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT</p> <p>pour 200 µl d'échantillon : 700 µl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuger 2 min à 13400 x g • Jeter le Filtre ADN • Ajouter l'échantillon (selon le cas 100 µl ou 200 µl) au filtrat • Continuer avec l'étape 2 « Fixation de l'ARN au filtre ARN »
----------	--

1 bis	<p>Préparation de l'échantillon, contaminé en ADN</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajouter la quantité requise (*) en Tampon de lyse LT supplémenté en DTT (mélanger brièvement avant utilisation) à l'échantillon <hr/> <p>(*) pour 100 µl d'échantillon : 350 µl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT</p> <p>pour 200 µl d'échantillon : 700 µl de Tampon de lyse LT supplémenté en DTT</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> • Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette (aspirer/ refluer en conséquent) • Transférer la totalité du mélange (y compris l'éventuel précipité) dans un Filtre ADN (placé dans son tube receveur) • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g <p><i>Remarque : si le mélange dépasse 700 µl procéder par étapes en utilisant le même filtre ADN</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Jeter le Filtre ADN
--------------	--

Étapes 2 à 5 →

2	Fixation de l'ARN au filtre ARN
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter la quantité requise (*) en éthanol >96 % au tube receveur <hr/> <p>(*) pour l'échantillon de 100 µl : ajouter 250 µl d'éthanol >96 %</p> <p>Pour l'échantillon de 200 µl : ajouter 500 µl d'éthanol >96 %</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> • Mélanger exhaustivement à l'aide d'une pipette (aspirer/ refluer en conséquent) • Transférer la totalité de la suspension dans un Filtre ARN (placé dans son tube receveur) • Incuber 1 min. à température ambiante • Centrifuger 2 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le tube receveur <p><i>Remarque : si la suspension dépasse 700 µl procéder par étapes en utilisant le même filtre ARN</i></p>

3	Lavage ARN, étape I
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 600 µl de Solution de lavage M1 • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat <u>et le tube receveur</u> • Placer le Filtre ARN dans un <u>nouveau</u> Tube receveur GS

4	Lavage ARN, étape II
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 700 µl de Solution de lavage M2 • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Répéter 1 X cette étape de lavage-centrifugation • Jeter le filtrat et replacer le Filtre ARN dans le Tube receveur GS • Centrifuger 4 min. à vitesse maximale, afin d'éliminer l'éthanol résiduel

5	Elution de l'ARN total
	<ul style="list-style-type: none"> • Placer le Filtre ARN dans un tube d'éluion RNase-free • Ajouter 40 – 100 µl (selon la concentration et le rendement souhaité) de Tampon d'éluion KL • Incuber 2 min. à température ambiante • Centrifuger 1 min. à 11000 x g • Jeter le Filtre ARN et <u>placer immédiatement le tube contenant l'ARN élué dans la glace</u>

L'ARN ainsi obtenu peut être utilisé directement dans les applications Down-stream courantes, telles que les Northern blots, les dot blots, la RT-PCR, la DDRT-PCR, la réalisation de bibliothèques d'ADNc, etc. ou peut être stocké à -80 °C pendant plusieurs semaines.

Remarque : l'éluion peut également être réalisée avec ddH₂O RNase-free.