

## Micro kit de purification d'ARN/ADN

Produit # 50300

La trousse de purification de l'ARN et de l'ADN de Norgen fournit une méthode rapide pour l'isolement et la purification de l'ARN total et de l'ADN génomique séquentiellement à partir d'un seul échantillon de cellules animales en culture, d'échantillons de tissus (en particulier de tissus fibreux difficiles à extraire) ou de sang. L'ARN total et l'ADN génomique sont tous deux purifiés sur colonne en moins de 30 minutes. Les fractions d'ARN et d'ADN purifiées peuvent être élues en aussi peu que 20 L. Cette trousse est idéale pour les chercheurs qui s'intéressent à l'étude du génome et du transcriptome d'un échantillon unique, par exemple pour des études de profilage de microARN, d'expression génique, y compris des expériences de silençage génique ou des knockdowns d'ARNm, des études impliquant la découverte de biomarqueurs, et pour la caractérisation de lignées cellulaires en culture. La trousse de purification de l'ARN et de l'ADN de Norgen est particulièrement utile pour les chercheurs qui isolent des macromolécules à partir d'échantillons précieux, difficiles à obtenir ou de petits échantillons tels que des matériaux de biopsie ou des foyers uniques provenant de cultures cellulaires, car elle élimine le besoin de fractionner l'échantillon. De plus, l'analyse sera plus fiable puisque l'ARN et l'ADN proviennent du même échantillon, éliminant ainsi les résultats contradictoires. Les macromolécules purifiées sont d'une pureté maximale et peuvent être utilisées dans un certain nombre d'applications en aval différentes.

## Notice du produit

### Technologie de purification de Norgen

#### Purification de l'ARN et de l'ADN

La purification est basée sur la chromatographie sur colonne de spin. Le procédé implique d'abord la lyse des cellules ou du tissu d'intérêt avec le tampon SKP fourni. Pour les tissus fibreux difficiles à extraire (tels que le cœur et le muscle), une étape supplémentaire de digestion de la protéinase K est prévue pour une récupération maximale de l'ARN et de l'ADN. L'ADN du lysat est ensuite capturé et purifié sur une microcolonне de purification de l'ADNg. De l'éthanol est ensuite ajouté au flux de l'étape de purification de l'ADN et la solution est chargée sur une microcolonне de purification de l'ARN. La résine de Norgen lie les acides nucléiques d'une manière qui dépend des concentrations ioniques, ainsi seul l'ARN comprenant les microARN se liera à la colonne tandis que les protéines sont éliminées dans le flux. Ensuite, l'ARN lié est lavé avec la solution de lavage A fournie pour éliminer les impuretés, et l'ARN purifié est élue avec la solution d'élution A. La trousse purifie toutes les tailles d'ARN, des grands ARNm et ARN ribosomique jusqu'aux microARN (miARN) et petits ARN interférents (siARN). Les fractions d'ARN et d'ADN peuvent être élues dans aussi peu que 20 L, ce qui entraîne une concentration plus élevée d'acides nucléiques. L'ARN purifié est de la plus haute intégrité et peut être utilisé dans un certain nombre d'applications en aval, y compris la PCR en temps réel, la PCR par transcription inverse, le transfert de Northern, la protection RNase et l'extension d'amorces, et des dosages de réseau d'expression. L'ADN génomique est de la plus haute qualité et peut être utilisé dans les réactions PCR, le séquençage, le transfert de Southern, les études de méthylation et l'analyse SNP.

### Avantages

- L'ARN et l'ADN sont tous deux purifiés sur colonne
- L'ARN et l'ADN peuvent être élus en aussi peu que 20 L
- L'ARN et l'ADN sont isolés à partir d'un échantillon unique sans division du lysat, ce qui réduit les résultats et la variabilité contradictoires
- Isolement séquentiel de l'ARN et de l'ADN à partir d'un échantillon unique. Idéal pour les prélèvements précieux, difficiles à obtenir ou de petite taille tels que le matériel de biopsie ou les foyers uniques de cultures cellulaires.
- Isoler l'ARN total et l'ADN génomique d'un seul échantillon en moins de 30 minutes
- Protéinase K additionnelle fournie pour les tissus fibreux difficiles à extraire.
- Toutes les tailles d'ARN sont isolées, du grand ARNm au microARN
- L'ARN et l'ADN purifiés sont de la plus haute qualité et peuvent être utilisés dans plusieurs applications en aval

## Spécifications

Spécifications du kit	
Capacité de liaison de colonne maximale	35 g pour ARN 10 g pour l'ADN
Volume de chargement de colonne maximal	650 l
Taille de l'ARN purifié	Toutes tailles, y compris petit ARN (<200 nt)
Quantité maximale de produit de départ : Cellules Animales Tissus Animaux Sang	5 x 10 <sup>5</sup> cellules 5 mg (pour la plupart des tissus) 50 L
Temps nécessaire pour effectuer 10 purifications	30 minutes
Rendements moyens* Foie (5 mg) Foie (5 mg)	10 - ARN 12 g 1 à 2 g d'ADN

\* les rendements moyens varieront en fonction d'un certain nombre de facteurs, dont l'espèce, les conditions de croissance utilisées et le stade de développement.

## Composants du kit

Composant	Utilisé pour		Produit n° 50300 (50 échantillons)
Tampon SKP	Lyse de l'ARN		40 ml
Solution de lavage A	Lavage ARN	Lavage de l'ADNg	2 x 38 ml 1 stylo de 18 ml
Solution d'élution A	Élution de l'ARN		6 ml
Tampon d'élution F	Élution d'ADNg		6 ml
Eau exempte de RNase	Traitement De Tissu Fibreux		40 ml
Protéinase K	Traitement De Tissu Fibreux		2 x 12 mg
Microcolonnes de purification d'ADNg	Purification d'ADNg		50
Micro colonnes de purification d'ARN	Purification de l'ARN		50
Tubes de collecte			10
Tubes d'élution (1,7 mL)			10
Notice du produit			1

## Conditions d'entreposage et stabilité du produit

Conserver la protéinase K à -20°C à l'arrivée. Toutes les autres solutions doivent être conservées dans des récipients hermétiques et à température ambiante. Ce kit est stable pendant 1 an après la date d'expédition.

## **Précautions et dénis de responsabilité**

Cette trousse est conçue à des fins de recherche seulement. Il n'est pas destiné à un usage humain ou diagnostique. Assurez-vous de porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection appropriés lorsque vous utilisez des produits chimiques. Pour de plus amples renseignements, veuillez consulter les fiches signalétiques (FS) appropriées. Ces documents sont disponibles en format PDF à l'adresse [www.norgenbiotek.com](http://www.norgenbiotek.com).

**Le tampon SKP** contient des sels de guanidinium et doit être manipulé avec précaution.

### Guanidinium

Les sels forment des composés hautement réactifs lorsqu'ils sont associés à l'eau de Javel; il faut donc prendre soin d'éliminer adéquatement l'une de ces solutions

Le sang de tous les sujets humains et animaux est considéré comme potentiellement infectieux. Toutes les précautions nécessaires recommandées par les autorités compétentes du pays d'utilisation doivent être prises lors de l'utilisation de sang total.

## **Réactifs et équipement fournis par le client**

Vous devez avoir les éléments suivants afin d'utiliser la trousse de purification de l'ARN/ADN :

### *Pour tous les protocoles*

- Microcentrifugeuse de paillasse
- -mercaptopropanoïlique (facultatif)
- 96-100 % éthanol
- Eau de qualité biologie moléculaire (eau Milli-Q®)

### *Pour le protocole de cellules animales*

- PBS (sans RNase)

### *Protocole relatif aux tissus d'origine animale*

- Azote liquide
- Mortier et pilon

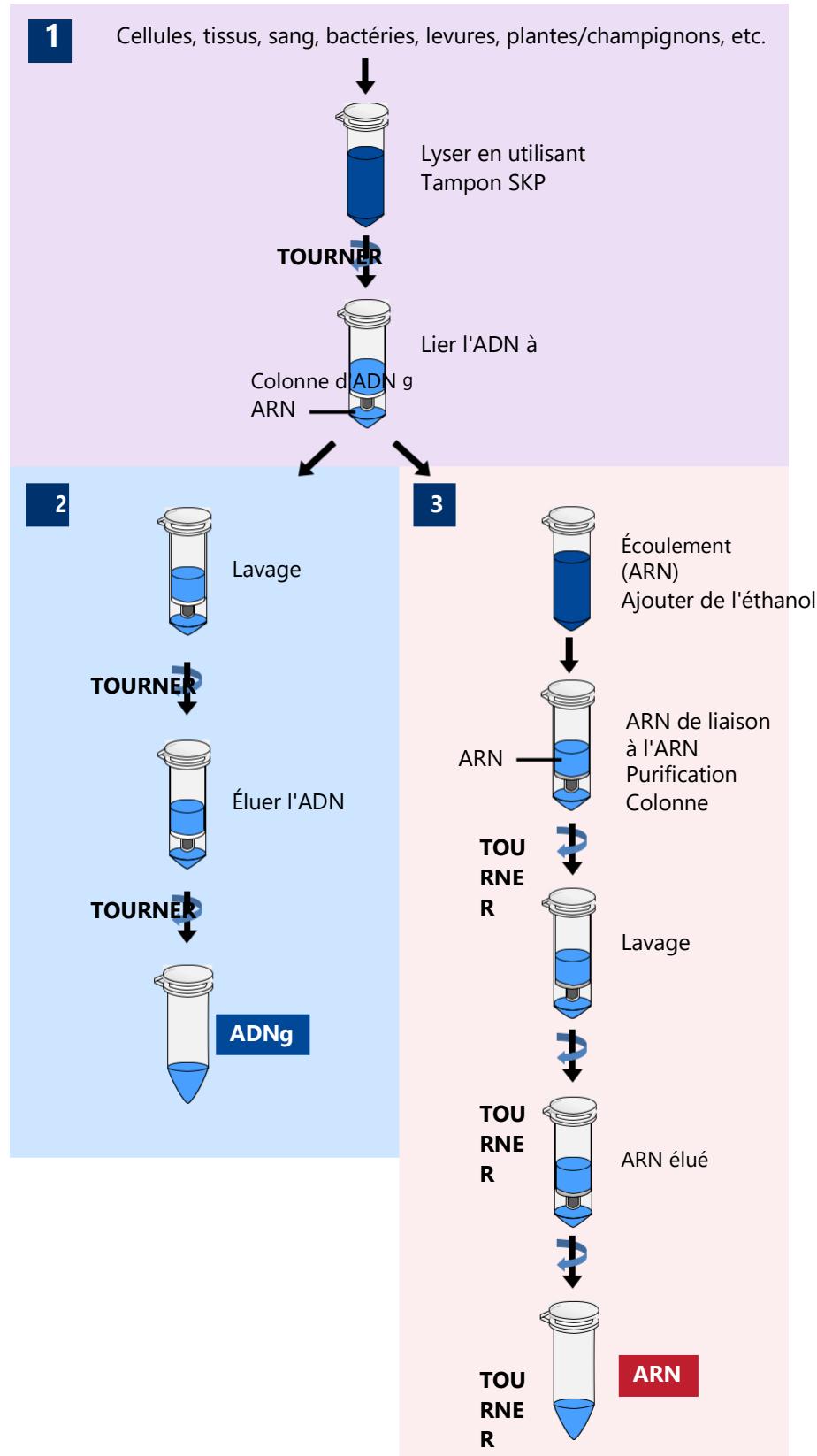
## **Utilisation de l'ARN**

Les RNases sont des enzymes très stables et robustes qui dégradent l'ARN. Les solutions d'autoclavage et la verrerie ne sont pas toujours suffisantes pour éliminer activement ces enzymes. La première étape pour se préparer à travailler avec l'ARN est de créer un environnement exempt de RNase. Les précautions suivantes sont recommandées comme meilleure défense contre ces enzymes.

- La zone ARN doit être située loin des postes de travail microbiologiques
- Porter en tout temps des gants propres et jetables pour manipuler les réactifs, les échantillons, les pipettes, les tubes jetables, etc. Il est recommandé de changer fréquemment de gants pour éviter toute contamination
- Les solutions, les embouts, les tubes, les concentrés de laboratoire, les pipettes, etc. doivent être désignés pour l'ARN seulement
- Toutes les solutions d'ARN doivent être préparées en utilisant de l'eau autoclavée traitée avec au moins 0,05 % de DEPC ou de l'eau dépourvue de nucléases de qualité biologie moléculaire
- Nettoyer toutes les surfaces avec les solutions de décontamination RNase disponibles dans le commerce
- Lorsque vous travaillez avec des échantillons d'ARN purifié, assurez-vous qu'ils restent sur la glace pendant les applications en aval

## Organigramme

Procédure de purification de l'ARN total et de l'ADN  
Trousse de micropurification ARN/ADN de Norgen



## Procédures

Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées dans une microcentrifugeuse de laboratoire. Différentes vitesses sont nécessaires pour différentes étapes, donc s'il vous plaît vérifier vos spécifications de microcentrifugeuse pour s'assurer qu'il est capable de la vitesse correcte. Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante. La vitesse de rotation correcte peut être calculée à l'aide de la formule :

$$RPM = \sqrt{\frac{FCR}{(1,118 \times 10^{-5}) (r)}}$$

où  $RCF$  = accélération gravitationnelle requise (force centrifuge relative en unités de g);  $r$  = rayon du rotor en cm ; et  $RPM$  = le nombre de tours par minute nécessaire pour obtenir la force de  $g$  nécessaire.

### NOTE IMPORTANTE :

Cette procédure est rédigée en trois étapes. La section 1 contient les protocoles de préparation du lysat de différents types de matières de départ. Veuillez vous assurer que le protocole approprié est suivi pour votre échantillon. La section 2 contient le protocole d'isolement de l'ADN génomique de l'échantillon. La section 3 contient le protocole d'isolement de l'ARN total de l'échantillon. Les mêmes protocoles pour les sections 2 à 3 s'appliqueront à toutes les matières premières différentes.

#### Notes Avant utilisation pour toutes les procédures de purification de l'ARN/ADN

- Les étapes de préparation du lysat sont différentes selon le produit de départ (**étape 1**). Cependant, les étapes suivantes sont les mêmes dans tous les cas (**étapes 2 à 9**).
- Veuillez vous assurer que la bonne procédure de préparation du lysat à partir de votre matière première est suivie.
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.
- Une centrifugeuse à vitesse variable doit être utilisée pour une performance maximale du kit. Si aucune centrifugeuse à vitesse variable n'est disponible, une centrifugeuse à vitesse fixe peut être utilisée, mais des rendements réduits peuvent être observés.
- S'assurer que toutes les solutions sont à température ambiante avant utilisation.
- Préparer une concentration de travail de la **solution de lavage A** en ajoutant :
  - 90 mL d'éthanol à 96-100 % (fourni par l'utilisateur) pour chaque flacon contenant 38 mL de **solution de lavage A** concentrée. Cela donnera un volume final de 128 mL.
  - 42 mL d'éthanol à 96-100 % (fourni par l'utilisateur) ajoutés au flacon fourni contenant 18 mL de **solution de lavage A** concentrée. Cela donnera un volume final de 60 mL.
- Les étiquettes apposées sur les bouteilles comportent une case qui peut être cochée pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. La **solution de lavage A** est utilisée pour la purification de l'ARN et de l'ADN
- **Facultatif** : l'utilisation du -mercaptoéthanol dans la lyse est fortement recommandée pour la plupart des patients tissus, en particulier ceux connus pour avoir une teneur élevée en ARNse (ex : pancréas). Il est également recommandé aux utilisateurs qui souhaitent isoler l'ARN pour des applications sensibles en aval. Ajouter 10 ml de mercaptoéthanol (fourni par l'utilisateur) à chaque 1 ml de solution **tampon SKP** nécessaire. Le 4-mercaptoéthanol est toxique et doit être administré sous une hotte. Sinon, le **tampon SKP** peut être utilisé tel que fourni.
- Il est important d'agir rapidement lors de la purification de l'ARN.
- Ce kit est fourni avec 2 colonnes séparées. Lorsque les colonnes sont retirées des sacs étiquetés, elles sont fournies dans les sacs et peuvent être facilement identifiées comme suit :
  - Micro-colonnes de purification d'ADNg - la colonne a principalement un contenu blanc
  - Micro-colonnes de purification d'ARN - la colonne a principalement un contenu noir

## **Section 1. Préparation de lysat à partir de différents types cellulaires**

### **1A. Préparation de lysat à partir de cellules animales cultivées**

#### **Remarques avant utilisation**

- Pour des résultats optimaux, il est recommandé d'utiliser  $5 \times 10^5$  cellules ou moins pour l'entrée
- Un hémocytomètre peut être utilisé en association avec un microscope pour compter le nombre de cellules. À titre indicatif, une plaque confluente de 3,5 cm de cellules HeLa contiendra  $10^6$  cellules.
- Les granulés cellulaires peuvent être conservés à -70°C pour une utilisation ultérieure ou utilisés directement dans la procédure. Déterminer le nombre de cellules présentes avant la congélation.
- Les granules congelés ne doivent pas être conservés plus de 2 semaines pour s'assurer que l'intégrité de l'ARN n'est pas compromise.
- Les granules congelés ne doivent pas être décongelés avant le début du protocole.  
Ajouter le **tampon SKP** directement au culot de cellules congelées (**étape 1A(ii) d)**.

#### **1A (i). Préparation de lysat cellulaire à partir de cellules se développant dans une monocouche**

- a. Aspirer le milieu et laver la monocouche de cellules avec une quantité appropriée de PBS. PBS par aspiration.
- b. Ajouter directement 300 L de **tampon SKP** à la plaque de culture.
- c. Lyser les cellules en tapotant doucement la boîte de culture et en faisant tournoyer le tampon autour de la surface de la plaque pendant cinq minutes.
- d. Transférer le lysat dans un tube de microcentrifugeuse.

**Facultatif :** Le lysat peut être chauffé à 55 oC pendant 10 minutes pour améliorer la lyse

- e. **Passer à l'Etape 2.**

#### **1A (ii). Préparation de lysat cellulaire à partir de cellules en suspension et de cellules levées**

- a. Transférer la suspension cellulaire dans un tube exempt de RNase (non fourni) et centrifuger à une vitesse ne dépassant pas  $200 \times g$  (~2 000 RPM) pendant 10 minutes pour cultiver les cellules.
- b. Décanter soigneusement le surnageant

**Note :** Pour les entrées de plus de  $10^5$  cellules, 5-10 10 de milieu peuvent être laissés avec la pastille afin de s'assurer que la pastille n'est pas délogée. Pour des entrées de moins de  $10^5$  cellules, on peut laisser de 30 à 50 10 de milieu afin de s'assurer que la pastille, qui pourrait être invisible, n'est pas délogée.

- c. Ajouter 300 L de **tampon SKP** au culot. Lyser les cellules au vortex pendant 15 secondes. S'assurer que la totalité du culot est complètement dissoute avant de passer à l'étape suivante. **Facultatif :** Le lysat peut être chauffé à 55 oC pendant 10 minutes pour améliorer la lyse
- d. **Passer à l'Etape 2.**

## 1B. Préparation de lysat de tissus animaux (mous, non fibreux)

### **Remarques avant utilisation**

- L'ARN dans les tissus animaux n'est pas protégé après la récolte jusqu'à ce qu'il soit perturbé et homogénéisé. Il est donc important que la procédure soit effectuée aussi rapidement que possible, en particulier l'étape de Préparation du Lysat Cellulaire.
- Des tissus frais ou congelés peuvent être utilisés pour la procédure. Les tissus doivent être surgelés dans de l'azote liquide et transférés immédiatement au congélateur à -70°C pour une conservation à long terme. Les tissus peuvent être conservés à -70°C pendant plusieurs mois. Ne pas laisser décongeler les tissus congelés avant de les broyer avec le mortier et le pilon afin de s'assurer que l'intégrité de l'ARN n'est pas compromise.
- L'apport maximal recommandé de tissu pour une séparation optimale de l'ARN et de l'ADN est de 5 mg. Si votre tissu d'intérêt n'est pas inclus dans le tableau ci-dessous, nous vous recommandons de commencer par une dose de 3 mg au maximum.

**Tableau 1. Quantités maximales d'entrée recommandées pour différents tissus**

Tissu	Montant d'entrée maximum
Cerveau	5 mg
Rein	5 mg
Foie	5 mg
Poumon	5 mg
Rate	5 mg
Coeur ou muscle	Veuillez utiliser la section 1C

### **1B. Préparation de lysat cellulaire de tissus animaux (mous, non fibreux)**

- a. Exciser l'échantillon de tissu de l'animal.
- b. Déterminer la quantité de tissu par pesée. Veuillez consulter le tableau 1 pour connaître les quantités maximales recommandées de différents tissus. Pour les tissus non inclus dans le tableau, nous recommandons de commencer par une dose inférieure ou égale à 3 mg.
- c. Transférer le tissu dans un mortier qui contient une quantité appropriée d'azote liquide pour couvrir l'échantillon. Broyer soigneusement le tissu à l'aide d'un pilon.
- d. Laisser l'azote liquide s'évaporer, sans laisser décongeler le tissu.
- e. Ajouter 300 L de **tampon SKP** à l'échantillon de tissu et poursuivre le broyage jusqu'à homogénéisation de l'échantillon. Homogénéiser en faisant passer le lysat 5 à 10 fois à travers une aiguille de calibre 25 fixée à une seringue.

**Facultatif :** Alternativement, le lysat peut être chauffé à 55°C pendant 10 minutes pour améliorer la lyse

- f. À l'aide d'une pipette, transférer le lysat dans un microtube sans RNase (non fourni).
- g. Faire tourner le lysat pendant 2 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Transférer le surnageant dans un autre microtube sans RNase (non fourni). Noter le volume du surnageant/lysat.
- h. **Passer à l'Etape 2.**

## **1C. Préparation de lysat à partir de tissus animaux (fibreux)**

### ***Remarques avant utilisation***

- L'ARN dans les tissus animaux n'est pas protégé après la récolte jusqu'à ce qu'il soit perturbé et homogénéisé. Il est donc important que la procédure soit effectuée aussi rapidement que possible, en particulier l'étape de Préparation du Lysat Cellulaire.
- Des tissus frais ou congelés peuvent être utilisés pour la procédure. Les tissus doivent être surgelés dans de l'azote liquide et transférés immédiatement au congélateur à -70°C pour une conservation à long terme. Les tissus peuvent être conservés à -70°C pendant plusieurs mois. Ne pas laisser décongeler les tissus congelés avant de les broyer avec le mortier et le pilon afin de s'assurer que l'intégrité de l'ARN n'est pas compromise.
- Reconstituer la protéinase K fournie avec 600 L d'eau de qualité biologie moléculaire jusqu'à une concentration finale de 20 mg/mL comme suit. Préparer de petits aliquotes et conserver l'enzyme non utilisée à -20°C.
- L'apport maximal recommandé du cœur ou du muscle pour une séparation optimale de l'ARN et de l'ADN est de 5 mg. Pour les autres tissus fibreux, il est recommandé de commencer par un apport ne dépassant pas 3 mg.

## **1C. Préparation de lysat cellulaire à partir de tissus animaux (fibreux)**

- a. Exciser l'échantillon de tissu de l'animal.
- b. Déterminer la quantité de tissu par pesée. Pour les tissus autres que le cœur ou le muscle, il est recommandé de commencer avec un apport ne dépassant pas 3 mg.
- c. Transférer le tissu dans un mortier qui contient une quantité appropriée d'azote liquide pour couvrir l'échantillon. Broyer soigneusement le tissu à l'aide d'un pilon.
- d. Laisser l'azote liquide s'évaporer, sans laisser décongeler le tissu.
- e. Ajouter 300 L de **tampon SKP** à l'échantillon de tissu et poursuivre le broyage jusqu'à homogénéisation de l'échantillon. Homogénéiser en faisant passer le lysat 5 à 10 fois à travers une aiguille de calibre 25 fixée à une seringue.
- f. À l'aide d'une pipette, transférer le lysat dans un microtube sans RNase (non fourni).
- g. Ajouter 300 L d'**eau exempte de RNase**. Mélanger au vortex
- h. Ajouter 20 100 L de protéinase K reconstituée au lysat et incuber à 55°C pendant 15 minutes. Agiter les tubes au vortex de temps en temps pendant l'incubation.
- i. Faire tourner le lysat pendant 2 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Transférer le surnageant dans un autre microtube sans RNase (non fourni). Noter le volume du surnageant/lysat. **Passer à l'Etape 2.**

## **1D. Lysat de sang**

### ***Remarques avant utilisation***

- Le sang de tous les sujets humains et animaux est considéré comme potentiellement infectieux. Toutes les précautions nécessaires recommandées par les autorités compétentes du pays d'utilisation doivent être prises lors de l'utilisation de sang total.
- Il est recommandé de ne pas utiliser plus de 50 L de sang afin d'éviter le colmatage de la colonne.
- Nous recommandons l'utilisation de cette trousse pour isoler l'ARN du sang frais non coagulant en utilisant l'EDTA comme anticoagulant.

## **1D. Préparation de lysat cellulaire à partir du sang**

- a. Transférer jusqu'à 50 L de sang non coagulant dans un microtube sans RNase (non fourni).

- b. Ajouter 250 L de **tampon SKP** à chaque 50 L de sang. Lyser les cellules au vortex pendant 15 secondes. S'assurer que le mélange devient transparent (avec une couleur rouge foncé) avant de passer à l'étape suivante.
- Facultatif :** Le lysat peut être chauffé à 55 oC pendant 10 minutes pour améliorer la lyse
- c. **Passer à l'Etape 2.**

## Section 2 : Purification de l'ADN génomique de tous les types de lysat

**Note :** Les étapes suivantes de la procédure de purification de l'ADN génomique sont les mêmes pour tous les différents types de lysat.

### 2. Liaison de l'ADN à la microcolonne de purification

- a. Assembler une **microcolonne de purification d'ADNg** avec l'un des tubes de prélèvement fournis.
- b. Déposer jusqu'à 600 L du lysat sur la colonne et centrifuger à **5 200 x g (~8 000 RPM)** pendant 2 minutes

**Note :** Vérifier que la totalité du volume de lysat est passée dans le tube de prélèvement en inspectant la colonne. Si la totalité du volume du lysat n'est pas passée, faire tourner pendant une minute supplémentaire à **14 000 x g (~14 000 tr/min)**.

- c. **Conserver le filtrat pour la purification de l'ARN (section 3). Le flux contient l'ARN et doit être conservé sur de la glace ou à -20°C jusqu'à ce que le protocole de purification de l'ARN soit mis en oeuvre.**
- d. Réassembler la colonne avec le tube de collecte.

### 3. Lavage de l'ADN génomique

- a. Appliquer 500 L de la **solution de lavage A** sur la colonne et centrifuger à une vitesse  $\geq 3 500 \times g$  (**~6 000 RPM**) pendant 1 minute. Éliminer le filtrat.
- b. Appliquer 500 L de la **solution de lavage A** sur la colonne et centrifuger à une vitesse  $\geq 3 500 \times g$  (**~6 000 RPM**) pendant 1 minute. Éliminer le filtrat.
- c. Faire tourner la colonne à **14 000 x g (~14 000 RPM)** pendant 2 minutes afin de sécher complètement la résine. Jeter le tube collecteur.

### 4. Élution de l'ADN génomique

- a. Placer la colonne dans un nouveau tube d'élation de 1,7 mL fourni avec le kit.
- b. Ajouter 20 - 50 L de **tampon d'élation F** à la colonne et laisser reposer à température ambiante pendant 2 minutes.
- c. Centrifuger pendant **2 minutes à 200 x g (~2 000 RPM)**, puis **1 minute à 14 000 x g (~14 000 RPM)**. Noter le volume élué de la colonne. Si la totalité du volume n'a pas été éluée, faire tourner la colonne à **14 000 x g (~14 000 tr/min)** pendant 1 minute supplémentaire.

**Remarque :** Pour une récupération maximale de l'ADN, il est recommandé de procéder à une seconde élution dans un microtube à centrifuger séparé (répéter les **étapes 4b et 4c**).

### 5. Conservation de l'ADN

L'échantillon d'ADN purifié peut être conservé à 4°C pendant quelques jours. Il est recommandé de placer les échantillons à une température  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  pour une conservation à long terme.

## Section 3 : Purification de l'ARN total de tous les types de lysat

### 6. Liaison de l'ARN à la colonne

- À chaque 100 L d'écoulement provenant de l'étape 2c, ajouter 60 L d'éthanol à 96-100 %. Mélanger au vortex.

**Remarque :** Par exemple, pour 300 L d'écoulement, ajouter 180 L d'éthanol à 96-100 %

- Assembler une **microcolonne de purification d'ARN** avec l'un des tubes de prélèvement fournis.
- Appliquer jusqu'à 600 L du lysat avec l'éthanol sur la colonne et centrifuger pendant 1 minute à  $\geq 3\,500 \times g$  (~6 000 RPM).

**Note :** Vérifier que la totalité du volume de lysat est passée dans le tube de prélèvement en inspectant la colonne. Si la totalité du volume de lysat n'est pas passée, faire tourner pendant une minute supplémentaire à  $14\,000 \times g$  (~14 000 tr/min).

- Éliminer le filtrat. Réassembler la colonne avec le tube de collecte.

### 7. Lavage ARN

- Appliquer 400 L de la **solution de lavage A** sur la colonne et centrifuger à  $\geq 3\,500 \times g$  (~6 000 RPM) pendant 1 minute.

**Nota :** Vérifier que la totalité de la solution de lavage est passée dans le tube collecteur en inspectant la colonne. Si la totalité du volume de lavage n'est pas passée, faire tourner pendant une minute supplémentaire.

- Jeter le liquide de rinçage et réassembler la colonne avec le tube de prélèvement.
- Laver la colonne une deuxième fois en ajoutant 400 L supplémentaires de **solution de lavage A** et centrifuger à  $\geq 3\,500 \times g$  (~6 000 RPM) pendant 1 minute.
- Jeter le flux et réassembler la colonne avec son tube de collecte.
- Laver la colonne une troisième fois en ajoutant 400 L supplémentaires de **solution de lavage A** et centrifuger à  $\geq 3\,500 \times g$  (~6 000 RPM) pendant 1 minute.
- Jeter le flux et réassembler la colonne avec son tube de collecte.
- Faire tourner la colonne à  $14\,000 \times g$  (~14 000 RPM) pendant 2 minutes afin de sécher complètement la résine. Jeter le tube collecteur.

### 8. Élution de l'ARN

- Placer la colonne dans un nouveau tube d'élution de 1,7 mL fourni avec le kit.
- Ajouter 20 à 50 L de la **solution d'élution A** à la colonne.
- Centrifuger pendant 2 minutes à  $200 \times g$  (~2 000 RPM), puis pendant 1 minute à  $14\,000 \times g$  (~14 000 RPM). Noter le volume élué de la colonne. Si la totalité du volume n'a pas été éluée, faire tourner la colonne à  $14\,000 \times g$  (~14 000 tr/min) pendant 1 minute supplémentaire.

**Note :** Pour une récupération maximale de l'ARN, en particulier pour les échantillons qui sont connus pour contenir de grandes quantités d'ARN, il est recommandé qu'une seconde élution soit effectuée dans un tube de microcentrifugeuse séparé (répétez les étapes 8b et 8c).

### 9. Conservation de l'ARN

L'échantillon d'ARN purifié peut être conservé à -20 °C pendant quelques jours. Il est recommandé de placer les échantillons à -70°C pour une conservation à long terme.

<b>Produits connexes</b>	<b>Numéro de produit</b>
Echelle ARN de 1 kb	15003
Échelle d'ADN UltraRanger 1 kb	12100
Trousse de purification des protéines et de l'ARN	48200
Trousse de purification ARN/ADN	48700
Trousse de purification de l'ARN/ADN/protéine plus	47700

## Guide de dépannage

<b>Problème</b>	<b>Cause Possible</b>	<b>Solution et explication</b>
ARN médiocre Récupération	Lyse incomplète de cellules ou tissus	Assurez-vous que la quantité appropriée de <b>Tampon SKP</b> était utilisés pour mesurer la quantité de cellules ou de tissus.
	La colonne a se boucher	Ne pas dépasser les quantités recommandées de produit de départ matériaux. La quantité de matière de départ peut nécessiter être diminuée si la colonne présente un colmatage sous la niveaux recommandés. Voir aussi « Colonne obstruée »
	Une alternative la solution d'élution était d'occasion	<b>Solution d'élution</b> Il est recommandé que la <b>A</b> fourni avec ce kit, être utilisé pour une récupération maximale de l'ARN.
	L'éthanol était absent ajouté au lysat	S'assurer que la quantité appropriée d'éthanol est ajoutée au lysat avant la liaison à la colonne.
	L'éthanol était absent ajouté à la <b>Lavage</b> <b>Solution A</b>	S'assurer que l'éthanol fourni est additionné de 96 à 100 % d'éthanol <b>Solution de lavage A</b> avant utilisation.
	Faible teneur en ARN dans les cellules ou les tissus d'occasion	Les différents tissus et cellules ont des taux d'ARN différents. et donc le rendement attendu en ARN variera considérablement de ces différentes sources. Veuillez consulter la littérature pour déterminer la teneur en ARN prévue de votre matériel.
	Culture cellulaire : Cellulaire la monocouche n'était pas lavé au PBS	S'assurer que la monocouche cellulaire est lavée avec le quantité appropriée de PBS afin d'éliminer les résidus milieu provenant de cellules.

Bouché Colonne	Nombre maximal Nombre de cellules ou quantité de tissu dépasse spécifications du kit	Consulter les spécifications pour déterminer si la quantité de départ le matériel est conforme aux spécifications du kit.
	Centrifuger  la température aussi  bas	S'assurer que la centrifugeuse reste à température ambiante pendant toute la procédure. Températures inférieures à 20°C peut provoquer la formation de précipités qui peuvent provoquer colonnes à boucher.
Problème	Cause Possible	Solution et explication
ARN est Dégradé	RNase  contamination	Des RNases peuvent être introduites lors de l'utilisation de la trousse. S'assurer que les procédures appropriées sont suivies pendant le travail avec ARN. Reportez-vous à la section « <i>Utilisation de l'ARN</i> » du début de ce guide d'utilisation.
	Procédure non  rapide  assez	Afin de maintenir l'intégrité de l'ARN, il est il est important que la procédure soit effectuée rapidement. Ceci est particulièrement important pour la préparation du lysat cellulaire Étape dans le protocole de tissu animal, puisque l'ARN dans les tissus animaux ne sont pas protégés après la récolte jusqu'à ce qu'ils perturbé et homogénéisé. Aussi, après la liaison à l'ADN Avant chaque étape, l'écoulement doit être maintenu sur de la glace ou à -20°C si l'étape de purification de l'ARN n'est pas effectuée immédiatement.
	Entreposage  inadéquat de  l'ARN purifié	Pour un stockage à court terme, les échantillons d'ARN peuvent être stockés à -20°C pendant quelques jours. Il est recommandé que les échantillons être conservé à -70°C pendant une durée plus longue.
	Tissus ou tissus  congelés  les granules  cellulaires étaient  laisser décongeler  préalable à ARN  isolement	Ne pas laisser décongeler les tissus congelés avant de les broyer avec mortier et pilon afin d'assurer l'intégrité L'élimination de l'ARN n'est pas compromise.
	Échantillons  tissulaires  ont été congelés  incorrectement	Les échantillons doivent être surgelés dans de l'azote liquide et transféré immédiatement au congélateur à -70°C pour une conservation à long terme stockage.

ARN ne bien fonctionner dans en aval applications	L'ARN était lavé deux fois avec le fourni <b>Lavage</b> <b>Solution A</b>	Des traces de sel provenant de l'étape de liaison peuvent rester dans le échantillon si la colonne n'est pas lavée deux <b>Lavage</b> <b>Solution A</b> . Le sel peut interférer avec l'aval applications, et donc doit être lavé de la colonne.
	Apport d'éthanol	Veiller à ce que la rotation sèche soit effectuée selon la procédure de lavage à l'ARN est effectuée, afin d'éliminer les traces d'éthanol avant élution. L'éthanol est connu pour interférer avec de nombreux applications en aval.

**Support technique**

Communiquez avec notre équipe de soutien technique entre 8 h 30 et 17 h 30 (heure normale de l'Est) au (905) 227-8848 ou sans frais au 1-866-667-4362. Un support technique peut également être obtenu sur notre site Web ([www.norgenbiotek.com](http://www.norgenbiotek.com)) ou par e-mail à l'adresse [techsupport@norgenbiotek.com](mailto:techsupport@norgenbiotek.com).

La technologie de purification de Norgen est brevetée et/ou en instance de brevet. Voir [www.norgenbiotek.com/patents](http://www.norgenbiotek.com/patents)

3430, promenade Schmon, Thorold (Ontario) Canada L2V 4Y6

Téléphone : (905) 227-8848

Télécopieur : (905) 227-1061

Numéro sans frais en Amérique du Nord : 1-866-667-4362

© 2022 Norgen Bioteck Corp.

PI50300-6