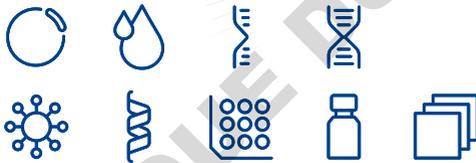


MACHEREY-NAGEL

Manuel d'utilisation



Purification et sélection de taille NGS

- NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select

Février 2023 / Rev. 07

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)
E-mail: info@mn-net.com

Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-333
E-mail: support@mn-net.com

USA

MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)
E-mail: sales-us@mn-net.com

France

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France
Tel.: +33 388 68 22 68
E-mail: sales-fr@mn-net.com

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

Switzerland

MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
E-mail: sales-ch@mn-net.com

Sommaire

1	Composition du kit	4
1.1	Composants	4
1.2	Consommables et équipement nécessaires	4
1.3	A propos de ce manuel	4
2	Description	5
2.1	Principe général	5
2.2	Caractéristiques du kit	5
2.3	Systèmes de séparation magnétiques	5
2.4	Manipulation des billes	6
3	Conditions de stockage et préparation des réactifs	7
4	Instructions de sécurité	7
5	Protocoles	8
5.1	Protocole de purification et sélection unique de taille d'ADN	8
5.2	Protocole pour éliminer les dimères d'adaptateur	12
5.3	Protocole de sélection double de taille d'ADN	13
5.4	Protocole de purification des produits PCR	18
6	Annexes	22
6.1	Guide de résolution des problèmes	22
6.2	Informations de commande	23
6.3	Restriction d'utilisation / garantie	24

1 Composition du kit

1.1 Composants

NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select			
REF	50 – 100 preps* 744970.5	250 – 500 preps* 744970.50	2500 – 5000 preps* 744970.500
Suspension de billes NucleoMag® NGS Bead	5 mL	50 mL	500 mL
Manuel d'utilisation	1	1	1

* Note : Le nombre de purification est calculé en fonction d'un volume d'échantillon de 50 – 100 µL et d'un ratio (suspension de billes / échantillon) de 1.0.

1.2 Consommables et équipement nécessaires

Réactifs :

- Ethanol 80 % (non-dénaturé)
- Tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl (pH 8) ou de l'eau)

Consommables :

- Cônes jetables

Équipement :

- Pipettes manuelles bien calibrées
- Vortex
- Système de séparation de billes magnétiques par exemple, NucleoMag® SEP (REF 744900, voir paragraphe 2.3)
- Plaque de séparation pour la séparation des billes magnétiques, par exemple, microplaque de 96 puits de 0,3 mL (Elution Plate U-bottom ; REF 740486.24)
- Film adhésif pour plaque, par exemple, feuille PE auto-adhésive (REF 740676)

1.3 A propos de ce manuel

Il est fortement recommandé aux personnes qui utilisent pour la première fois le kit NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select de lire le protocole détaillé du manuel d'utilisation. Les utilisateurs expérimentés peuvent toutefois se référer au résumé du protocole. Ce dernier est conçu pour un suivi rapide des différentes étapes de la procédure.

Toute la documentation technique est disponible sur le site www.mn-net.com.

Merci de contacter notre service technique pour obtenir les éventuelles modifications apportées à la version actuel du manuel par rapport aux précédentes révisions.

2 Description

2.1 Principe général

Le **NucleoMag® NGS Clean up and Size Select** est conçu pour la purification rapide et la sélection de taille des fragments d'ADN dans le processus de construction de bibliothèques pour le séquençage de nouvelle génération (NGS). La suspension de billes NucleoMag® NGS contient des billes paramagnétiques en suspension dans un tampon de fixation spécial. Les billes paramagnétiques lient sélectivement les fragments d'ADN en fonction du ratio de volume entre la suspension de billes et l'échantillon. Après la séparation magnétique et l'élimination du surnageant, les billes sont lavées à l'éthanol. Une courte étape de séchage est nécessaire pour éliminer l'éthanol des étapes de lavage précédentes. Enfin, les fragments d'ADN hautement purifiés sont élués avec un tampon d'éluion à faible teneur en sel ou avec de l'eau et peuvent ensuite être utilisés directement pour des applications en aval. La bibliothèque de fragments d'ADN purifiée est exempte de tout contaminant, comme les nucléotides, les amorces, les adaptateurs, les dimères d'adaptateur, les enzymes, les additifs de tampon et les sels. Le kit **NucleoMag® NGS Clean up and Size Select** peut être utilisé manuellement ou de manière automatisée sur la plupart des robots pipeteurs ou séparateurs de billes magnétiques automatisés.

2.2 Caractéristiques du kit

NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select est conçu pour la purification rapide, manuelle et automatisée ainsi que pour la sélection de taille des fragments d'ADN à partir d'une variété de mélanges réactionnels utilisés dans le processus de construction de bibliothèques pour le séquençage de nouvelle génération, tels que

- Mélange de fragmentation
- Mélange issu de la réparation de l'ADN
- Mélange suite à la polyadénylation
- Mélange de ligations d'adaptateur
- Mélange d'amplifications PCR

La quantité d'échantillon typique de fragments d'ADN double brin est comprise entre 5 ng et 1 µg.

En utilisant la méthode de sélection de taille, il est possible d'obtenir des bibliothèques de fragments d'ADN d'une taille comprise entre 150 pb et 800 pb.

Pour garantir un pipetage précis, le volume de l'échantillon doit être $\geq 50 \mu\text{L}$.

Le protocole **NucleoMag® NGS Clean up and Size Select** peut être entièrement utilisé à température ambiante.

Réservé pour la recherche uniquement.

2.3 Systèmes de séparation magnétiques

Pour utiliser le kit **NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select**, le séparateur **NucleoMag® SEP** (voir les informations de commande) est recommandé. La séparation est effectuée en microplaque de 96 puits à fond en U de 300 µL. Le kit peut également être utilisé avec d'autres systèmes de séparation courants.

2.4 Manipulation des billes

Distribution de la suspension

Un pipetage précis de la suspension de billes NucleoMag[®] NGS Bead et de l'échantillon est essentiel pour obtenir des résultats fiables. Les variations de volume affectent la performance de la sélection de taille. Par conséquent, nous recommandons d'utiliser des pipettes bien calibrées et de nouvelles pointes après chaque puits (canal unique) ou chaque colonne (pipette multicanaux). Une bonne technique pour pipeter la suspension de billes légèrement visqueuse consiste à pipeter très lentement. Aspirer lentement et s'assurer qu'il n'y a pas de gouttelettes de liquide à l'extérieur de l'embout et ne pas aspirer d'air. Distribuer lentement pour s'assurer que la suspension de billes est complètement transférée dans les puits.

Une distribution homogène des billes magnétiques dans les différents puits de la plaque de séparation est essentielle pour assurer une grande cohérence d'un puits à l'autre. Par conséquent, avant de distribuer les billes, s'assurer qu'elles sont complètement remises en suspension. Bien agiter le flacon de stockage ou le placer brièvement sur un vortex.

Temps de séparation magnétique

La capture des billes magnétiques sur les aimants dépend de la force magnétique des aimants, de la plaque de séparation choisie, de la distance entre la plaque de séparation et les aimants et du volume à traiter. Les temps individuels pour la capture complète des billes sur les barres aimantées doivent être vérifiés et ajustés pour chaque système. Il est recommandé d'utiliser les plaques ou les tubes de séparation spécifiés par le fournisseur du séparateur magnétique.

Ratio de volume

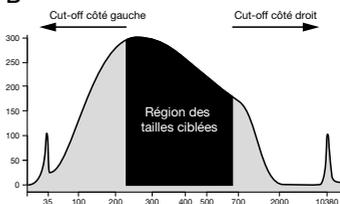
Les billes paramagnétiques NucleoMag[®] NGS lient sélectivement les fragments d'ADN en fonction du ratio de volume de la suspension de billes et de l'échantillon. En général, l'augmentation du ratio de volume favorise l'adsorption de fragments plus courts sur les billes paramagnétiques. Ce manuel d'utilisation présente les protocoles les plus couramment utilisés pour des profils de tailles distincts qui sont optimaux pour les applications NGS utilisant les systèmes de séquençage Illumina. En modifiant le ratio de volume, il est possible de produire des bibliothèques de fragments d'ADN d'une taille comprise entre 150 pb et 800 pb pour n'importe quelle plateforme de séquençage. La suspension de billes NucleoMag[®] NGS est similaire à d'autres produits bien connus sur le marché. Vous pouvez donc utiliser les mêmes ratios de volume que ceux recommandés dans votre protocole de préparation de kit de librairie NGS.

A

Recouvrement des fragments d'ADN [%]

Size (bp)	0.5:1	0.55:1	0.6:1	0.65:1	0.7:1	0.75:1	0.8:1	0.85:1	0.9:1	0.95:1	1:1
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0	0	3	5	6	8	13
200	0	0	0	2	3	6	9	20	32	42	59
250	0	1	2	4	8	21	31	54	77	86	91
300	0	0	3	10	21	53	66	82	95	97	95
400	0	5	14	49	75	95	93	94	99	99	95
500	3	20	48	90	109	103	98	99	103	102	98
600	7	45	81	96	96	99	93	96	98	98	94
700	18	70	92	95	95	97	91	93	96	96	92
800	40	81	93	94	94	95	89	91	95	94	91
900	64	84	93	94	95	96	89	91	95	95	90
1000	80	83	91	93	94	95	88	90	94	94	89

B



Procédure NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select. (A) Purification de fragments de différentes tailles. Pour la sélection de taille de l'ADN, 100 µL d'ADN (10 ng/µL) ont été ajoutés à différents volumes de billes du NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select afin d'obtenir les ratios indiqués (ratio = suspension de billes/échantillon). L'ADN utilisé est constitué de fragments de taille compris entre 100 pb et 1000 pb. Les différentes purifications avec les ratios appliqués (billes/ADN utilisé) sont indiquées en pourcentage [%]. (B) Sélection de la taille du mélange de fragments. Pour la sélection de taille d'un seul côté (gauche ou droite), l'échantillon est mélangé avec les billes selon un ratio afin d'exclure les fragments plus grands ou plus petits en fonction du seuil choisi. Pour la sélection double de taille, deux étapes de fixation sont effectuées, afin d'exclure les fragments plus grands au-dessus du seuil et les fragments plus petits en dessous du seuil inférieur.

3 Conditions de stockage et préparation des réactifs

- Le kit NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select est expédié à température ambiante. La suspension de billes doit être stockée à 2–8 °C dès son arrivée et elle est stable dans des conditions de stockage appropriées jusqu'à : voir l'étiquette de l'emballage.
- La suspension de billes NucleoMag® NGS Bead est livrée prête à l'emploi.

4 Instructions de sécurité

Le kit NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select ne contient pas de substances dangereuses.

5 Protocoles

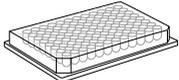
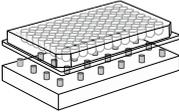
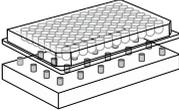
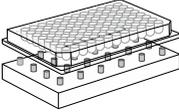
5.1 Protocole de purification et sélection unique de taille d'ADN

Résumé de protocole

- Pour les équipements supplémentaires et le matériel requis, voir les paragraphes 1.2 et 2.3, respectivement.
- Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir page 10.

Avant de débiter la procédure :

- Retirer la suspension NucleoMag® NGS Bead du réfrigérateur. Laisser reposer pendant environ 30 minutes pour que la suspension de billes atteigne la température ambiante.

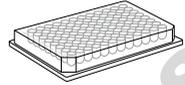
1	Fixer l'ADN cibles aux billes NucleoMag® NGS Bead	Mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène	
		100 µL NucleoMag® NGS Bead 100 µL d'échantillon d'ADN	
		Mélanger par pipetages successifs	
		Incuber pendant 5 min	
		Éliminer le surnageant après 5 min de séparation	
2	1er lavage avec de l'éthanol 80 %	Laisser la plaque 96-puits sur le NucleoMag® SEP	
		200 µL d'éthanol 80 % Incuber 30 s	
		Éliminer le surnageant avec précaution	
3	2ième lavage avec de l'éthanol 80 %	Laisser la plaque 96-puits sur le NucleoMag® SEP	
		200 µL d'éthanol 80 % Incuber 30 s	
		Éliminer le surnageant avec précaution	

4 Sécher les billes **5 – 15 min à TA**

5 Eluer l'ADN

Retirer la plaque 96-puits
sur le NucleoMag[®] SEP

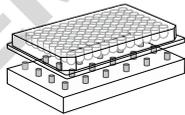
10 – 50 µL de tampon d'éluion



**Mélanger par pipetages
successifs**

Incuber 2 – 5 min

**Séparer pendant 5 min et
transférer les ADN dans une
nouvelle plaque 96-puits**



Protocole détaillé

Ce protocole peut être utilisé pour éliminer les contaminants (tels que les nucléotides, les amorces, les adaptateurs, les enzymes, les additifs de tampon, les sels) et les petits fragments d'ADN d'un échantillon. La méthode utilise une étape de sélection unique de taille (également appelée sélection du côté gauche) : après avoir ajouté le volume approprié de suspension de billes NucleoMag® NGS à l'échantillon d'ADN, les billes lient les fragments plus grands. Le surnageant contient des fragments plus petits et des contaminants qui sont éliminés. Pour la plupart des applications de séquençage NGS, il est optimal d'éliminer tous les fragments inférieurs à 150–200 pb. Ceci peut être réalisé en utilisant un ratio de volume (suspension de billes/échantillon) de 1,0, qui est décrit dans le protocole suivant (par exemple, ajouter 100 µL de suspension de billes à 100 µL d'échantillon). Pour garantir un pipetage précis, le volume de l'échantillon doit être ≥ 50 µL. Cependant, le ratio de volume peut être modifié pour s'adapter à l'application spéciale du processus de construction de la librairie (voir paragraphe 2.4, page 6).

Avant de débiter la procédure :

- Retirer la suspension NucleoMag® NGS Bead du réfrigérateur. Laisser reposer pendant environ 30 minutes pour que la suspension de billes atteigne la température ambiante.
-

1 Fixer les ADN cibles aux billes NucleoMag® NGS Bead

Vortexer la **suspension de billes NucleoMag® NGS Bead** jusqu'à l'obtention d'une couleur homogène. Ajouter **100 µL** de la **suspension de billes** bien mélangée dans chaque puits de la plaque de séparation.

Ajouter **100 µL d'échantillon d'ADN** (le ratio de volume entre la suspension de billes et l'échantillon est de 1,0). Ajuster la pipette à 200 µL et **mélanger** par une dizaine de pipetages successifs.

Incuber la plaque de séparation à **température ambiante** pendant **5 minutes**.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **5 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes aient été capturées par les aimants ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.

Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

Le surnageant contient des contaminants indésirables de faible poids moléculaire et des fragments d'ADN plus petits indésirables.

Note : ne pas perturber les billes capturées lors de l'aspiration du surnageant. Prélever le surnageant du côté opposé du puits.

2 1er lavage avec de l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique pendant l'étape de lavage.

Ajouter 200 µL d'éthanol 80 % sans perturber le culot de billes. Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant au moins **30 secondes**. Retirer soigneusement le surnageant en le pipetant.

3 2ième lavage avec de l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique pendant l'étape de lavage.

Ajouter 200 μL d'éthanol 80 % sans perturber le culot de billes. Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant au moins **30 secondes**. Retirer soigneusement le surnageant en le pipétant.

Note : éliminer complètement le surnageant, y compris les gouttelettes résiduelles.

4 Sécher les billes

Laisser la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique et **incuber** à température ambiante pendant **5 à 15 minutes** afin de permettre l'évaporation des traces d'alcool restantes.

Note : Laisser le culot sécher suffisamment pour qu'il n'y ait plus de gouttelettes visibles du surnageant au fond des puits. Ne pas trop sécher les billes. Le rendement peut diminuer car les fragments d'ADN plus longs élueront plus lentement.

5 Eluer les fragments d'ADN de la librairie

Retirer la plaque 96 puits du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **10 à 50 μL de tampon d'élution** et **remettre** le culot de billes en suspension par une dizaine de pipetages successifs ou en agitant (par exemple, à 1100 rpm à l'aide d'un Thermomixer® eppendorf).

Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant **2 à 5 minutes**.

Note : 10mM de Tris-HCl (pH 8), de l'eau ou un tampon d'élution MN (par exemple, le tampon BE, voir les informations relatives à la commande) peuvent être utilisés comme tampon d'élution.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **5 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes aient été capturées par les aimants ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.

Transférer le surnageant contenant la **librairie de fragments d'ADN purifiée** dans une nouvelle **plaque 96 puits**. Passer à l'étape suivante du processus de préparation de la librairie.

5.2 Protocole pour éliminer les dimères d'adaptateur

Ce protocole peut être utilisé pour éliminer les dimères d'adaptateur après une réaction permettant d'ajouter des adaptateurs aux fragments d'ADN.

La méthode utilise deux étapes de purification successives conformément au protocole 5.1.

Dans la première étape, un ratio (suspension de billes/échantillon) de 1,0 est utilisé pour éliminer les agents précipitants de l'ADN du tampon réactionnel de ligation qui interfèrent avec le processus de sélection de taille. L'étape suivante élimine les dimères d'adaptateur en utilisant la même procédure mais avec un ratio de 0,8.

1 Remplacer le tampon réactionnel de ligation

Effectuer la procédure de purification décrite au point 5.1 avec un ratio de 1,0 et éluer dans 50 µL.

2 Supprimer des dimères d'adaptateur

Effectuer la procédure de purification comme décrit au point 5.1, mais avec un ratio de 0,8 (à 50 µL d'éluat de l'étape 1, ajouter 40 µL de suspension de billes NucleoMag® NGS). Éluer dans 30 µL.

Passez à l'étape suivante du processus de construction de votre librairie.

5.3 Protocole de sélection double de taille d'ADN

Résumé du protocole

- Pour les équipements supplémentaires et le matériel requis, voir les paragraphes 1.2 et 2.3, respectivement. Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir page 15.

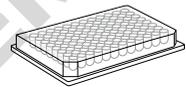
Avant de débiter la procédure :

- Retirer la suspension NucleoMag® NGS Bead du réfrigérateur. Laisser reposer pendant environ 30 minutes pour que la suspension de billes atteigne la température ambiante.

1 Éliminer les grands fragments d'ADN non souhaités

Mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène

40 µL NucleoMag® NGS Bead
100 µL d'échantillon d'ADN



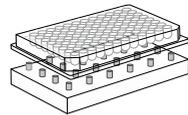
Mélanger par pipetages successifs



Incuber pendant 5 min

Prélever et conserver le surnageant après 5 min de séparation

Transférer le surnageant dans une plaque 96-puits
Jeter les billes



2 Éliminer les petits fragments d'ADN non souhaités

Ajouter 20 µL NucleoMag® NGS Bead au surnageant de l'étape 1

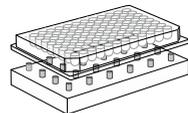


Mélanger par pipetages successifs



Incuber pour 5 min

Eliminer et jeter le surnageant après 5 min de séparation



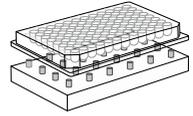
3 1er lavage avec l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96-puits sur le NucleoMag® SEP

200 µL d'éthanol 80 %

Incuber 30 s

Éliminer le surnageant avec précaution



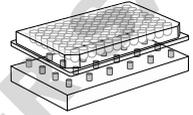
4 2ième lavage avec l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96-puits sur le NucleoMag® SEP

200 µL d'éthanol 80 %

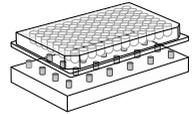
Incuber 30 s

Éliminer le surnageant avec précaution



5 Sécher les billes

5 – 15 min à TA



6 Eluer l'ADN

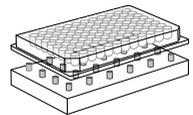
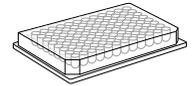
Retirer la plaque 96-puits sur le NucleoMag® SEP

10 – 50 µL de tampon d'élution

Mélanger par pipetages successifs

Incuber 2 – 5 min

Séparer pendant 5 min et transférer les ADN dans une nouvelle plaque 96-puits



Protocole détaillé

Ce protocole peut être utilisé pour générer des bibliothèques de fragments d'ADN d'une certaine taille ou pour réduire la distribution de taille des fragments. La méthode est appelée double sélection de taille, car les fragments les plus petits et les plus grands peuvent être éliminés. Tout d'abord, un volume approprié de suspension de billes NucleoMag® NGS Bead est ajouté à l'échantillon d'ADN. Cette étape permet de lier tous les fragments d'ADN plus longs que la limite supérieure souhaitée de l'intervalle. Les billes contenant les fragments d'ADN plus grands non désirés sont éliminées (sélection du côté droit). Le surnageant, qui contient des fragments d'ADN plus courts que la limite supérieure de taille, est transféré dans un nouveau tube pour effectuer la deuxième étape de sélection de taille (sélection du côté gauche) : une plus grande quantité de suspension de billes est ajoutée au surnageant, de sorte que les fragments d'ADN plus longs que la limite inférieure de l'intervalle soient liés. Après élimination du surnageant, les fragments d'ADN situés dans l'intervalle de taille souhaité sont élués.

Le protocole suivant illustre la sélection de taille des bibliothèques de fragments d'ADN dont la taille est comprise entre 400 et 500 pb. En modifiant les ratios de volume, il est possible d'obtenir des bibliothèques de fragments d'ADN avec d'autres gammes de taille (voir paragraphe 2.4, page 6).

Avant de débiter la procédure :

- Retirer la suspension NucleoMag® NGS Bead du réfrigérateur. Laisser reposer pendant environ 30 minutes pour que la suspension de billes atteigne la température ambiante.

1 Éliminer les grands fragments d'ADN non souhaités

Vortexer la suspension de billes **NucleoMag® NGS Bead** jusqu'à l'obtention d'une couleur homogène. Ajouter **40 µL** de la **suspension de billes** bien homogénéisée dans chaque puits de la plaque de séparation.

Ajouter **100 µL d'échantillon d'ADN** (le ratio de volume entre la suspension de billes avec le tampon de fixation et l'échantillon est de 0,4). Ajuster la pipette à 140 µL et mélanger par une dizaine de pipetages successifs.

Incuber la plaque de séparation à **température ambiante** pendant **5 minutes**.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **5 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes aient été capturées par les aimants ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.

Transférer le surnageant dans une nouvelle plaque et jeter les billes qui contiennent les grands fragments non souhaités.

2 Éliminer les petits fragments d'ADN non souhaités

Vortexer la **suspension de billes NucleoMag® NGS Bead** jusqu'à l'obtention d'une couleur homogène. Ajouter **20 µL de la suspension de billes** bien homogénéisée à chaque puits contenant les surnageants de l'étape 1 (le ratio du **volume total** de la suspension de billes avec le tampon de fixation par rapport à l'échantillon d'origine est maintenant de 0,6 ; 40 µL et 20 µL à 100 µL). Ajuster la pipette à 160 µL et **mélanger** par une dizaine de pipetages successifs.

Incuber la plaque de séparation à **température ambiante** pendant **5 minutes**.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **5 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes aient été capturées par les aimants ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.

Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

Note : ne pas perturber les billes capturées lors de l'aspiration du surnageant. Prélever le surnageant du côté opposé du puits.

3 1er lavage avec de l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique pendant l'étape de lavage.

Ajouter **200 µL d'éthanol 80 %** sans perturber le culot de billes. Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant au moins **30 secondes**. Retirer soigneusement le surnageant en le pipétant.

4 2ième lavage avec de l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique pendant l'étape de lavage.

Ajouter **200 µL d'éthanol 80 %** sans perturber le culot de billes. Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant au moins **30 secondes**. Retirer soigneusement le surnageant en le pipétant.

Note : éliminer complètement le surnageant, y compris les gouttelettes résiduelles.

5 Sécher les billes

Laisser la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique et **incuber** à température ambiante pendant **5 à 15 minutes** afin de permettre l'évaporation des traces d'alcool restantes.

Note : Laisser le culot sécher suffisamment pour qu'il n'y ait plus de gouttelettes visibles du surnageant au fond des puits. Ne pas trop sécher les billes. Le rendement peut diminuer car les fragments d'ADN plus longs éluent plus lentement.

6 Eluer les fragments d'ADN de la librairie

Retirer la plaque 96 puits du séparateur magnétique NucleoMag® SEP.

Ajouter **10 à 50 µL de tampon d'éluion** et **remettre** le culot de billes en suspension par une dizaine de pipetages successifs ou en agitant (par exemple, à 1100 rpm à l'aide d'un Thermomixer® eppendorf).

Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant **2 à 5 minutes**.

Note : 10mM de Tris-HCl (pH 8), de l'eau ou un tampon d'éluion MN (par exemple, le tampon BE, voir les informations relatives à la commande) peuvent être utilisés comme tampon d'éluion.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique NucleoMag® SEP. Attendre au moins **5 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes aient été capturées par les aimants ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.

Transférer le surnageant contenant la **librairie de fragments d'ADN purifiée** dans une nouvelle **plaque 96 puits**. Passer à l'étape suivante du processus de préparation de la librairie.

5.4 Protocole de purification des produits PCR

Résumé du protocole

- Pour les équipements supplémentaires et le matériel requis, voir les paragraphes 1.2 et 2.3, respectivement.
- Pour des informations détaillées sur chaque étape, voir page 20.

Avant de débiter la procédure :

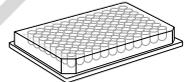
- Retirer la suspension NucleoMag® NGS Bead du réfrigérateur. Laisser reposer pendant environ 30 minutes pour que la suspension de billes atteigne la température ambiante.

1 **Fixation** de l'ADN cibles aux billes NucleoMag® NGS Bead

Mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène

180 µL NucleoMag® NGS Bead

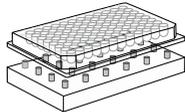
100 µL d'échantillon d'ADN



Mélanger par pipetages successifs

Incuber pendant 5 min

Éliminer le surnageant après 5 min de séparation



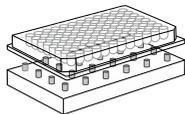
2 **1er lavage** avec l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96-puits sur le NucleoMag® SEP

200 µL d'éthanol 80 %

Incuber 30 s

Éliminer le surnageant avec précaution



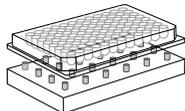
3 **2ième lavage** avec l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96-puits sur le NucleoMag® SEP

200 µL d'éthanol 80 %

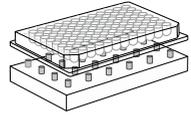
Incuber 30 s

Éliminer le surnageant avec précaution



4 Séchage des billes

5 – 15 min à TA



5 Elution de l'ADN

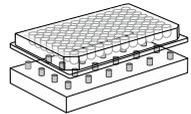
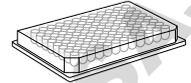
Retirer la plaque 96-puits
du NucleoMag® SEP

10-50 µL de tampon d'éluion

**Mélanger par pipetages
successifs**

Incuber 2 – 5 min

**Séparer pendant 5 min et
transférer des ADN dans une
nouvelle plaque PCR 96-puits**



Protocole détaillé

Ce protocole peut être utilisé pour éliminer les contaminants (par exemple, les nucléotides, les amorces, les adaptateurs, les enzymes, les additifs de tampon, les sels) d'un mélange de réaction PCR. Pour garantir une bonne fixation des fragments PCR, il convient d'utiliser un ratio billes/échantillon de 1,8. Nous recommandons d'utiliser des plaques PCR 96 puits avec un séparateur magnétique approprié pour la purification des réactions.

1 Fixer les ADN cibles aux billes NucleoMag® NGS Bead

Vortexer la suspension de **billes NucleoMag® NGS Bead** jusqu'à l'obtention d'une couleur homogène.

Ajouter 1,8 vol. de suspension de billes NucleoMag® NGS Bead bien mélangée dans chaque puits de la plaque de séparation. Consulter le tableau 1 pour des suggestions de volumes d'échantillons et de billes.

Note : Dans le cas de volumes de traitement supérieurs à 200 µL, un contenant de mélange plus grand, par exemple une plaque à puits profonds, peut être utilisé.

Tableau 1 : Volumes réactionnels de PCR avec les volumes de suspension de billes NucleoMag® NGS Bead suggérés

Volume réactionnel des échantillons	Volume de la suspension NucleoMag® NGS Bead
10 µL	18 µL
20 µL	36 µL
50 µL	90 µL
100 µL	180 µL

Mélanger par agitation ou de préférence à la pipette jusqu'à ce que la couleur du mélange devienne homogène (par exemple, 10 fois).

Incuber les échantillons pendant **5 minutes à température ambiante**.

Séparer les billes magnétiques en plaçant la plaque contenant les échantillons sur un séparateur magnétique approprié (selon la plaque de séparation). Attendre au moins **2 minutes** que les billes soient capturées par les aimants.

Retirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette.

2 1er lavage avec de l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique.

Ajouter **200 µL d'éthanol 80 %** sans perturber le culot de billes. Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant **30 secondes**. Retirer soigneusement et jeter le surnageant.

3 2ième lavage avec de l'éthanol 80 %

Laisser la plaque 96 puits sur le séparateur magnétique.

Ajouter **200 µL d'éthanol 80 %** sans perturber le culot de billes. Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant **30 secondes**. Retirer soigneusement et jeter le surnageant.

4 Sécher les billes

Laisser la plaque de séparation sur le séparateur magnétique et **incuber** à température ambiante pendant **5 à 15 minutes** afin de permettre l'évaporation des traces d'alcool restantes.

Note : Laisser le culot sécher suffisamment pour qu'il n'y ait plus de gouttelettes visibles du surnageant au fond des puits. Ne pas trop sécher les billes. Le rendement peut diminuer car les fragments d'ADN plus longs élueront plus lentement.

5 Eluer les fragments d'ADN

Retirer la plaque de séparation du séparateur magnétique.

Ajouter **10 à 50 µL de tampon d'élution** et **remettre** le culot de billes en suspension par une dizaine de pipetages successifs.

Incuber la plaque de séparation à température ambiante pendant **2 à 5 minutes**.

Séparer les billes magnétiques contre la paroi des puits en plaçant la plaque avec les échantillons sur le séparateur magnétique. Attendre au **moins 2 minutes** jusqu'à ce que toutes les billes aient été capturées par les aimants.

Transférer le surnageant contenant **les fragments d'ADN purifiée** dans une nouvelle plaque.

6 Annexes

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Cause possible et suggestions
Faible rendement en ADN	<p><i>Ratio insuffisant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Utiliser un ratio de volume décrits dans ce manuel, par exemple 1,0. (voir paragraphe 2.4, page 6) <p><i>Concentration insuffisante d'éthanol pour l'étape de lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Utiliser de l'éthanol à 80 % fraîchement préparé. Avec le temps, l'éthanol se dilue par évaporation et absorption de l'eau atmosphérique. Par conséquent, certaines parties du culot d'ADN passent en solution et les fragments d'ADN sont éliminés. <p><i>Volume de tampon d'éluion insuffisant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Le culot de billes doit être entièrement recouvert de tampon d'éluion. <p><i>Temps d'incubation pour l'éluion insuffisant</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber les billes dans le tampon d'éluion pendant 5 minutes pour obtenir des rendements optimaux. <p><i>Séchage excessif des billes</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Ne pas sécher les billes plus de 15 minutes à température ambiante. Un séchage excessif des billes peut entraîner une baisse de l'efficacité de l'éluion.
Performance suboptimale des ADN dans les applications avales	<p><i>Contamination par de l'éthanol des tampons de lavage</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Vérifier que tout l'éthanol a été éliminé après la dernière étape de lavage. Sécher les billes 5 – 10 minutes à température ambiante.
Perte de billes	<p><i>Séparation magnétique trop courte</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Augmenter la durée de séparation magnétique pour permettre aux billes d'être capturées par les aimants avant d'éliminer le surnageant. <p><i>Vitesse d'aspiration trop élevée (étape d'éluion)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Une vitesse d'aspiration élevée lors de l'éluion peut induire une perte de billes. Réduire la vitesse d'aspiration pour l'étape d'éluion.

6.2 Informations de commande

Produit	REF	Conditionnement
NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select	744970.5	1 × 96 preps
	744970.50	4 × 96 preps
	744970.500	24 × 96 preps
NucleoMag® SEP	744900	1
Elution Plate U-bottom	740486.24	24
Self adhering PE Foil	740676	50 feuilles
Buffer BE	740306.100	125 mL

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

6.3 Restriction 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, Rev. 04

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

Marques déposées :

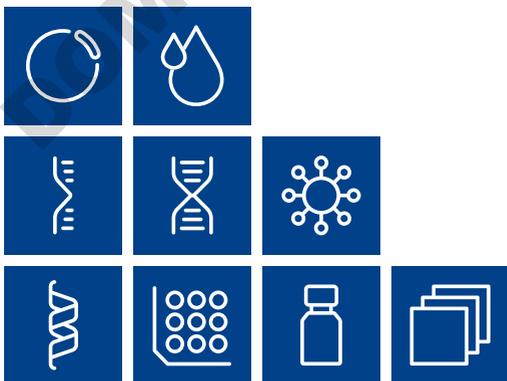
Illumina est une marque déposée d'Illumina, Inc. et de ses filiales.
Thermomixer est une marque déposée d'Eppendorf AG, Allemagne.
NucleoMag® est une marque déposée de MACHEREY NAGEL GmbH & Co KG.

Tous les noms et dénominations utilisés peuvent être des marques, des marques déposées ou des marques enregistrées de leur propriétaire respectif - même s'il ne s'agit pas d'une dénomination spéciale. La mention de produits et de marques n'est qu'une forme d'information (c'est-à-dire qu'elle ne porte pas atteinte aux marques et ne peut être considérée comme une forme de recommandation ou d'évaluation). En ce qui concerne ces produits ou services, nous ne pouvons donner aucune garantie quant au choix, à l'efficacité ou au fonctionnement.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

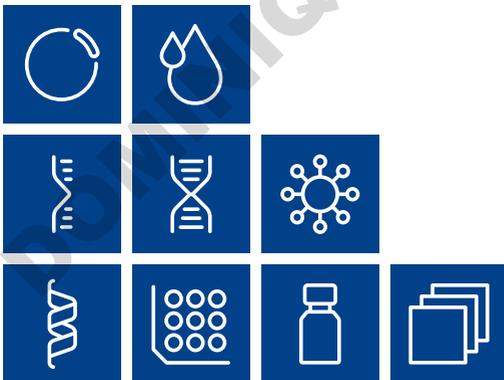
DOMINIQUE DUTSCHER SAS

TECHNIQUE DUTSCHER SAS



- Plasmid DNA
- Clean up
- RNA
- DNA
- Viral RNA and DNA
- Protein
- High throughput
- Accessories
- Auxiliary tools

BIOPHARMA BIOTECHNIQUE DUTSCHER SAS



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennener 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

xxxx/xxxx