

MAGFLO™ PCR

Billes magnétiques pour la purification de la PCR



Table des matières

1. Comment utiliser les billes magnétiques MAGFLO PCR	2
1.1 Utilisation prévue	2
1.2 Symboles utilisés dans le document	2
1.3 Consignes de sécurité	3
1.4 Que contient le réactif MAGFLO PCR	4
2. Application des billes magnétiques MAGFLO PCR	4
2.1 Introduction à la purification de la PCR	5
3. Avant de commencer	6
3.1 Expédition, stockage et manipulation du réactif	6
3.2 Contrôle de qualité	6
3.3 Matériaux et réactifs supplémentaires	6
3.4 Préparation des réactifs	7
4. Protocole	8
4.1 Purification de la PCR	8
5. Guide de dépannage	9
6. Informations sur les solutions de pipetage de paillasse d'INTEGRA	10
6.1 Solutions à haut débit avec billes magnétiques MAGFLO PCR	10
7. Informations de commande	11
8. Mentions légales	11

1. Comment utiliser MAGFLO PCR pour la purification de la PCR

1.1 Utilisation prévue

Les billes magnétiques MAGFLO PCR sont destinées à la **recherche uniquement (RUO)**, pour la recherche en biologie moléculaire. Elles ne sont pas destinées ni validées pour être utilisées dans le diagnostic de maladies ou d'autres conditions médicales. Elles sont conçues pour être utilisées manuellement ou avec une automatisation de la manipulation de liquides pour les applications de biologie moléculaire.

1.2 Symboles utilisés dans le document

Le manuel d'instructions informe spécifiquement des risques résiduels avec les symboles suivants :


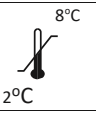





Avertissement : ce pictogramme de sécurité signale des situations dangereuses pouvant entraîner des blessures. Il indique également des risques de dommages pour l'équipement, le matériel et l'environnement. Il est essentiel que vous respectiez les précautions correspondantes.



Remarque : ce pictogramme signale des remarques importantes concernant la bonne utilisation du réactif et de ses fonctions destinées à faciliter le travail de l'utilisateur.

Tableau 1 : Symboles trouvés sur l'emballage des billes magnétiques MAGFLO PCR.

	Code QR pour accéder au manuel d'instructions et à la FDS
	Limite de température de stockage
	Date d'expiration
	Numéro de lot
	Informations sur le fabricant

1.3 Consignes de sécurité

Consulter la fiche de données de sécurité (FDS) pour connaître toutes les informations relatives à la sécurité et à l'élimination de l'appareil. Vous pouvez y accéder via le code QR présent sur l'emballage.



Remarque : selon la FDS, les billes magnétiques MAGFLO PCR ne sont pas classées comme une substance dangereuse, il n'existe donc aucune mise en garde en matière de prévention ou d'intervention liée à ce produit.



Avertissement : toujours suivre les procédures et les précautions universelles de votre établissement (en utilisant des gants jetables, des lunettes de sécurité, une blouse de laboratoire, etc.) lorsque vous travaillez avec des produits chimiques.

1.4 Que contient le réactif MAGFLO PCR

Les billes magnétiques MAGFLO PCR sont constituées de particules superparamagnétiques dans un tampon de liaison.



Remarque : lire attentivement les instructions avant d'utiliser le kit.



Remarque : consulter la réglementation locale en matière de déchets pour plus d'informations sur l'élimination de l'appareil en toute sécurité.

2. Application des billes magnétiques MAGFLO PCR

Les billes magnétiques MAGFLO PCR offrent une solution efficace pour la purification des amplicons lors du nettoyage de la PCR. Les acides nucléiques purifiés sont élués à l'aide d'un tampon d'éluion à faible teneur en sel ou d'eau de qualité biologique moléculaire et peuvent être utilisés directement dans les applications en aval.

Le protocole peut être facilement réalisé à l'aide d'un appareil de séparation magnétique du module INTEGRA MAG, éliminant ainsi le besoin de déplacer manuellement la plaque sur et hors de l'aimant. Les modules MAG utilisent des réseaux magnétiques à déplacement vertical, de sorte que la plaque reste au même endroit pendant les étapes de magnétisation. Les flux de travail de purification des billes magnétiques peuvent également être automatisés sur le robot de pipetage ASSIST PLUS ou à l'aide d'une pipette électronique VIAFLO 96 ou VIAFLO 384 pour une manipulation simplifiée des liquides.

Caractéristiques de performance

- Conçu pour les amplicons d'ADN.
- Récupération élevée d'amplicons supérieurs à 100 pb lors du nettoyage de la PCR.
- Élimine efficacement les excès d'amorce, les dimères d'amorces, les nucléotides non incorporés, les sels et les enzymes.
- Aucune étape de centrifugation ou de filtration n'est nécessaire.

Exigences en matière d'introduction d'échantillon

- Les échantillons doivent contenir un amplicon d'ADN double brin.

Les fragments d'acide nucléique sont prêts à l'emploi pour les applications en aval suivantes

- PCR/qPCR/ddPCR
- Détection de mutation et génotypage
- Protocoles de séquençage Sanger
- Analyse de fragments
- Microréseaux
- Réactions enzymatiques
- Clonage
- Expériences de transfection
- Ligature

2.1 Introduction à la purification de la PCR

Les billes magnétiques MAGFLO PCR offrent une purification fiable des amplicons PCR à un rapport billes/échantillon spécifique de 1,8. Les billes magnétiques lient sélectivement des fragments d'ADN supérieurs à 100 pb. Le processus de purification de la PCR implique trois étapes simples (liaison, lavage et élution) au cours desquelles les billes magnétiques lient les fragments d'ADN ≥ 100 pb, tout en éliminant les amorces en excès, les dimères d'amorces, les nucléotides non incorporés, les sels et les enzymes. Les fragments d'intérêt sont ensuite récupérés dans un tampon d'élution (**Figure 1**).

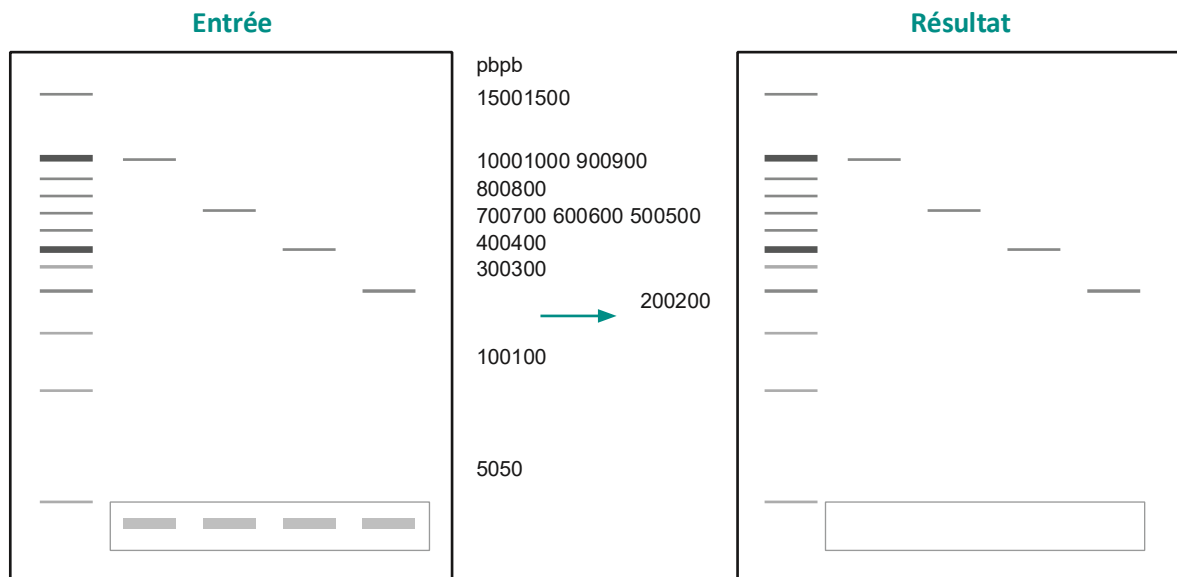


Figure 1 : Présentation schématique du processus de purification de la PCR illustré par une échelle d'ADN. Au cours de ce processus, de petits fragments, qui représentent des amorces et/ou des dimères d'amorces (moins de 100 pb), sont retirés et les amplicons de taille différente sont isolés.

3. Avant de commencer

3.1 Expédition, stockage et manipulation du réactif

Les billes magnétiques MAGFLO PCR sont stables pendant le transport à température ambiante, mais ne peuvent pas être congelées. La température de stockage recommandée est de 2 à 8 °C. Amener le produit à température ambiante (TA) avant utilisation.



Remarque : les billes magnétiques MAGFLO PCR ne peuvent plus être utilisées si elles ont été congelées.



Remarque : ne pas utiliser le produit après la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

3.2 Contrôle de la qualité

Les billes magnétiques MAGFLO PCR sont produites selon des protocoles prédéterminés et validés dans le système de gestion de la qualité. De plus, un contrôle qualité est effectué après la production de chaque lot. Ceci est documenté dans le certificat de conformité pour garantir une qualité constante du produit.



Remarque : le certificat de conformité est disponible sur demande. Contacter votre représentant régional INTEGRA.

3.3 Matériaux et réactifs supplémentaires

Matériaux et réactifs à fournir par l'utilisateur.

Équipement

- Appareil de séparation magnétique (par exemple, module INTEGRA MAG/HEATMAG)
- Pipettes (manuelles ou électroniques)
- Un système de manipulation de liquide (par exemple, ASSIST PLUS, VIAFLO 96 ou VIAFLO 384)



Remarque : nous recommandons d'utiliser l'ASSIST PLUS avec un module MAG/HEATMAG intégré pour une purification aux billes magnétiques entièrement automatisée. Dans cette configuration, le logiciel intègre et automatise entièrement l'étape de séparation magnétique en contrôlant la montée et la descente du réseau magnétique.



Remarque : nous recommandons de combiner la pipette VIAFLO 96 ou VIAFLO 384 avec un module MAG/HEATMAG pour une séparation magnétique semi-automatisée sans transfert de matériel de laboratoire. Dans cette configuration, l'étape de séparation magnétique est entièrement automatisée en déplaçant le réseau magnétique de haut en bas.



Remarque : nous recommandons d'utiliser des pipettes électroniques multicanaux VIAFLO ou des pipettes mécaniques EVOLVE avec un module MAG/HEATMAG indépendant pour les flux de travail manuels. Dans cette configuration, l'étape de séparation magnétique est entièrement automatisée en déplaçant le réseau magnétique de haut en bas.

Consommables

- Matériel de laboratoire source de votre choix, comme une microplaque à 96 ou 384 puits, des bandes PCR à 8 puits ou des tubes de microcentrifugation
- Matériel de laboratoire de destination de votre choix, comme une microplaque à 96 ou 384 puits, des bandes PCR à 8 puits ou des tubes de microcentrifugation
- Embouts de pipettes
- Réservoirs à réactif



Remarque : nous recommandons la plaque PCR 96 puits Bio-Rad Hard-Shell® (HSP9601) pour des performances optimales. Les plaques à puits profonds INTEGRA (6535) sont recommandées pour un pipetage fiable des réactifs sur les systèmes de manipulation de liquides INTEGRA, ou si le volume de réaction dépasse le volume de la plaque PCR. De plus, nous recommandons des GRIPTIPS® filtrants et réactifs utilisés dans le protocole

Réactifs

- Éthanol à 70 % (fraîchement préparé à partir d'alcool non dénaturé) pour les étapes de lavage
- Eau de qualité biologie moléculaire (sans DNase) ou tampon d'élution (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) pour l'étape d'élution



Remarque : il est important de préparer à chaque fois une nouvelle solution d'éthanol à 70 %. Le stockage de la solution avant utilisation peut avoir un impact sur l'efficacité de l'étape de lavage et affecter négativement les résultats.

3.4 Préparation des réactifs

- Veiller à préparer l'éthanol à 70 % juste avant son utilisation.
- Amener les billes magnétiques MAGFLO PCR à température ambiante et vortexer celles-ci soigneusement pour remettre complètement en suspension les particules magnétiques avant utilisation.

4. Protocole

4.1 Purification de la PCR

Le protocole fourni est valable pour les formats de plaques 96 ou 384 puits, les tubes de microcentrifugation et les plaques à puits profonds de 2,2 mL.

1. Utilisez un rapport billes/échantillon de 1,8x pour le nettoyage de la PCR.
2. Amener les billes magnétiques MAGFLO PCR à température ambiante et vortexer celles-ci soigneusement pour remettre complètement en suspension les particules magnétiques avant utilisation.
3. Mesurer le volume de réaction du ou des échantillons et déterminer s'il est nécessaire de transférer le ou les échantillons vers une plaque ou un tube de traitement approprié.
4. Ajouter 1,8 fois le volume de réaction des billes magnétiques MAGFLO PCR dans chaque puits. Un exemple des volumes de billes respectifs peut être trouvé dans le **Tableau 2** ci-dessous.

Volume d'échantillon introduit × rapport = volume de billes magnétiques

Exemple : 50 µL × 1,8 = 90 µL de billes magnétiques

5. Pipeter de haut en bas 5 à 20 fois ou vortexer pendant 30 secondes jusqu'à ce que la solution semble homogène.
6. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
7. Activer l'aimant et séparer les billes magnétiques. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que la solution soit complètement débarrassée des billes magnétiques et que le culot de billes soit formé.
8. Aspirer et éliminer le surnageant clarifié. Ne pas déranger le culot de billes magnétiques.
9. Ajouter le volume approprié d'éthanol frais à 70 % dans chaque puits comme suit :
30 µL pour une plaque à 384 puits ; 200 µL pour une plaque à 96 puits ; 500-1 000 µL pour un tube de microcentrifugation ou une plaque à puits profonds
10. Incuber à température ambiante pendant 1 minute sans remettre le culot en suspension.
11. Aspirer et éliminer le surnageant clarifié. Ne pas déranger le culot de billes magnétiques.
12. Répéter les étapes 9 à 11 pour terminer une deuxième étape de lavage à l'éthanol à 70 %.
13. En gardant l'aimant activé, retirer tout liquide résiduel et laisser sécher les billes magnétiques à l'air libre pendant 3 à 15 minutes. Veiller à ce que tout liquide résiduel soit éliminé.
14. Désactiver l'aimant et ajouter le volume approprié, soit entre 10 et 100 µL, d'eau de qualité biologie moléculaire ou de tampon d'éluion dans chaque puits (par exemple, 10 µL d'échantillon et 10 µL de volume d'éluion représentent une dilution 1:1).
15. Pipeter de haut en bas 20 à 30 fois ou vortexer pendant 30 secondes jusqu'à ce que la solution semble homogène.
16. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
17. Activer l'aimant et séparer les billes magnétiques. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que la solution soit complètement débarrassée des billes magnétiques.
18. Transférer le surnageant clarifié contenant l'ADN purifié dans une nouvelle plaque ou un nouveau tube et stocker les éluats à 2-8 °C pour un stockage à court terme, ou à -20 °C pour un stockage à long terme.

Tableau 2 : Volumes pour un rapport MAGFLO PCR/échantillon de 1,8x.

MATÉRIEL DE LABORATOIRE POSSIBLE	VOLUME DE RÉACTION PCR (µL)	VOLUME DE BILLES MAGNÉTIQUES (µL)
Plaque PCR 96 puits	10	18
	20	36
	50	90
Plaque PCR 384 puits	5	9
	7	12,6
	10	18
Tube de microcentrifugation	50	90
	100	180
	150	270

5. Guide de dépannage

Veillez utiliser ce guide pour résoudre certains problèmes connus qui peuvent survenir. Contacter votre représentant commercial régional INTEGRA ou votre spécialiste des applications sur le terrain pour obtenir de l'aide.

Tableau 3 : Guide de dépannage.

PROBLÈME	CAUSE	SOLUTION
Faible rendement	Réaction PCR inefficace	Augmenter le nombre de cycles d'amplification pour la PCR et/ou optimiser davantage la réaction PCR.
	Produit de petite taille (pb)	Les petits fragments d'ADN donnent normalement des rendements inférieurs.
	Interférence de résidus d'éthanol	Pendant l'étape de séchage, retirer tout liquide du fond du puits. Veiller à utiliser de l'éthanol frais à 70 %.
	Perte de billes magnétiques pendant la procédure	Augmenter le temps de magnétisation. Aspirer lentement. Veiller à ce que la plaque ou le tube s'adapte bien à l'aimant.
	L'ADN reste lié aux billes magnétiques	Éviter de trop sécher les particules et/ou augmenter le volume d'élution.
	Remise en suspension incomplète des billes magnétiques lors de l'élution	Vortexer ou pipeter de haut en bas pour remettre complètement les particules en suspension. Augmenter le nombre de cycles de mélange. Pour augmenter le rendement, il est également possible de chauffer le tampon d'élution jusqu'à 65 °C avant utilisation. Réduire le temps de séchage pour éviter un séchage excessif des billes.
Transfert d'amorce	Lavage insuffisant des billes magnétiques	Laver les billes magnétiques une fois de plus avec de l'éthanol à 70 %. Veiller à utiliser de l'éthanol fraîchement préparé.
Les produits d'amplification non spécifiques n'ont pas été éliminés	La taille des produits d'amplification non spécifiques est supérieure à 100 pb	Les produits d'amplification non spécifiques supérieurs à 100 pb ne sont pas efficacement éliminés des produits PCR avec le protocole standard (rapport 1,8x). Une optimisation du rapport billes/échantillon peut être nécessaire.
Problèmes dans les applications en aval	Transfert de sel	L'éthanol à 70 % doit être conservé à température ambiante.
	Transfert d'éthanol	Veiller à ce que toutes les traces d'éthanol soient éliminées après chaque lavage à l'éthanol et à ce que les billes magnétiques soient complètement séchées avant l'élution. Veiller à utiliser de l'éthanol frais à 70 %.

6. Informations sur les solutions de pipetage de paillasse d'INTEGRA

6.1 Solutions à haut débit avec billes magnétiques MAGFLO PCR

Si vous souhaitez traiter une plaque complète d'échantillons, veuillez vous référer à la configuration du flux de travail qui combine une pipette électronique à commande manuelle VIAFLO 96 ou VIAFLO 384 avec un module de séparation magnétique (MAG/HEATMAG). Un script détaillé avec des paramètres de pipetage optimisés est disponible en téléchargement dans la note d'application sur notre site internet.



Remarque : si vous souhaitez modifier le programme, veuillez vous référer au document pour modifier l'entrée d'échantillon et le volume d'éluion pour la purification de la PCR sur VIAFLO 96 et VIAFLO 384, disponible sur demande auprès de votre représentant commercial régional INTEGRA.



Remarque : les scripts de nettoyage de la PCR utilisant une pipette électronique à commande manuelle VIAFLO 96 ou VIAFLO 384, équipée d'une tête de pipetage 96 canaux 125 µL ou 300 µL, sont fournis en mode manuel et automatique.



7. Informations de commande

Contactez votre représentant commercial régional INTEGRA pour passer commande.

Tableau 4 : Numéros de référence disponibles pour les billes magnétiques MAGFLO PCR.

NUMÉRO DE RÉFÉRENCE	DESCRIPTION	NOMBRE DE RÉACTIONS POUR LES NETTOYAGES DE LA PCR*
7010	Billes magnétiques MAGFLO PCR, 1 mL	~ 55
7012	Billes magnétiques MAGFLO PCR, 50 mL	~ 2 777
7014	Billes magnétiques MAGFLO PCR, 500 mL	~ 27 777

*Le nombre de réactions est basé sur un volume de réaction PCR de 10 µL. Pour la purification du produit PCR avec un rapport billes/échantillon de 1,8x, le volume de billes magnétiques à utiliser par réaction est de $10 \times 1,8 = 18 \mu\text{L}$.

8. Mentions légales

Copyright © 2024 par INTEGRA Biosciences AG.

Tous les droits sur cette documentation sont réservés. En particulier, les droits de reproduction, de traitement, de traduction et de forme de présentation appartiennent à INTEGRA Biosciences AG. Ni la documentation complète, ni des parties de celle-ci ne peuvent être reproduites de quelque manière que ce soit, ni stockées et traitées sur des supports électroniques, ni distribuées de quelque autre manière que ce soit sans le consentement écrit d'INTEGRA Biosciences AG.

Tous les efforts ont été faits pour fournir des informations complètes et exactes dans ce manuel. Bien que ce manuel contienne un avis de garantie spécifiquement indiqué pour le produit, INTEGRA Biosciences AG ne fait aucune déclaration ni ne donne aucune garantie concernant le contenu de ce manuel et se réserve le droit de modifier ce manuel sans préavis si et quand des améliorations sont apportées.

INTEGRA Biosciences AG ne sera pas responsable de quelque perte, dommage, frais de réparation, dommages accessoires ou consécutifs de toute nature, qu'ils soient basés sur une garantie expresse ou implicite, un contrat, une omission ou une responsabilité stricte, survenant en rapport avec la conception, le développement, l'installation ou l'utilisation des produits.

INTEGRA Biosciences AG a pour objectif de fournir des données et une documentation fiables et précises. Si vous trouvez une anomalie, nous vous prions de bien vouloir nous aider en envoyant un e-mail à info@integra-biosciences.com.

Ce manuel d'instructions porte le numéro de référence 137963 et la version V00.



Fabricant et service client

Fabriqué pour INTEGRA Biosciences AG par CleanNA BV (Coenecoop 75, 2741 PH Waddinxveen, Pays-Bas). Votre représentant local INTEGRA Biosciences, des informations complémentaires et ce manuel d'instructions dans d'autres langues sont disponibles sur www.integra-biosciences.com ainsi que sur demande à info@integra-biosciences.com.

INTEGRA Biosciences AG

Tardisstrasse 201
CH-7205 Zizers, Suisse
T +41 81 286 95 30
info-ch@integra-biosciences.com

INTEGRA Biosciences Ltd

2 Rivermead Business Park
Thatcham, Berks, RG19 4EP, Royaume-Uni
T +44 1635 797 00
info-uk@integra-biosciences.com