

## Protocole de purification Oragene®•RNA associé au kit Qiagen RNeasy Micro pour des volumes allant jusqu'à 1 000 µl

(Pour purifier un volume inférieur à 250 µl, se référer au protocole décrit dans PD-PR-028)

### Réactifs et équipement nécessaires

1. Solution Oragene•RNA Neutralizer (fournie avec le kit Oragene•RNA)
2. Solutions d'éthanol : 70 % et 80 % (température ambiante), 95 % (-20 °C)
3. Kit Qiagen RNeasy Micro (Cat. N° 74004) et instructions. Les éléments requis provenant du kit RNeasy sont les suivants : tampon RLT et colonne de centrifugation MinElute, tubes collecteurs, tampon RW1, solution mère de DNase I, tampon RDD, tampon RPE et eau exempte de RNase.  
[3a. Le kit Qiagen RNeasy Mini (Cat. N° 74104) peut également être utilisé en association avec le kit Qiagen RNase-Free DNase (Cat. N° 79254)].

### Section I – Préparation du laboratoire et conservation d'un échantillon d'ARN•salive/Oragene

Purification	Remarques
1-1. À l'arrivée des échantillons au laboratoire, les agiter vigoureusement pendant 8 secondes au minimum.	Il est important de bien mélanger la solution Oragene•RNA et la salive pour garantir une stabilité et un rendement en ARN maximums.
1-2. Laisser incuber l'échantillon complet à 50 °C dans son tube d'origine pendant 1 heure dans un bain-marie ou pendant 2 heures dans un incubateur à air.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'échantillon complet doit être chauffé à 50 °C avant toute purification.</li> <li>• Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant une durée allant jusqu'à 8 semaines ou congelés à -20 °C indéfiniment avant ou après l'étape de chauffage.</li> </ul>

### Section II – Purification d'un aliquot d'échantillon d'ARN•salive/Oragene

Purification	Remarques
2-1. Transférer un aliquot de 250 à 500 µl dans un microtube de centrifugation de 1,5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un aliquot de 1 000 µl doit être traité dans 2 tubes.</li> <li>• Le matériel restant dans le tube Oragene•RNA peut être conservé à température ambiante pendant une durée allant jusqu'à 8 semaines ou congelé à -20 °C indéfiniment.</li> </ul>
2-2. Incuber l'aliquot à 90 °C pendant 15 minutes, puis laisser refroidir à température ambiante	Des précautions doivent être prises pour éviter que la température excède 90 °C et préserver l'intégrité de l'échantillon. Le chauffage dans un incubateur à eau constitue la méthode de préférence. Un bloc chauffant peut être utilisé mais doit être étroitement surveillé.
2-3. Ajouter 1/25 <sup>e</sup> de volume de solution Neutralizer. Bien mélanger à l'aide d'un vortex.	

Purification	Remarques
2-4. Incuber dans la glace pendant 10 minutes.	L'échantillon deviendra trouble en raison de la précipitation des impuretés et des inhibiteurs.
2-5. Centrifuger dans une microcentrifugeuse 3 minutes à vitesse maximale (>13 000×g).	
2-6. Transférer avec soin le surnageant limpide à l'aide d'un cône de pipette dans un nouveau microtube. Éliminer le culot contenant les impuretés.	Le culot contient des impuretés turbides. Si le tube est agité accidentellement, il doit être de nouveau centrifugé.
2-7. Ajouter 2 volumes d'éthanol froid à 95 % au surnageant limpide. Bien mélanger en inversant le tube, à l'aide d'un vortex ou par agitation.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Par ex., pour un aliquot de 250 µl utiliser 500 µl d'éthanol à 95 % ; pour un aliquot de 500 µl utiliser 1 000 µl d'éthanol à 95 %.</li> <li>• Le mélange avec l'éthanol précipite les acides nucléiques.</li> </ul>
2-8. Incuber à -20 °C pendant 30 minutes.	L'incubation à -20 °C est nécessaire pour garantir une précipitation maximale de l'ARN.
2-9. Placer le tube dans la microcentrifugeuse suivant une orientation connue. Recueillir le précipité par centrifugation à vitesse maximale (>13 000×g) pendant 3 minutes.	Par exemple, placer chaque tube dans la microcentrifugeuse avec la charnière du capuchon pointant dans la direction opposée au centre du rotor. Après la centrifugation, la position du culot peut être localisée (même si le culot est très petit) : le culot se trouvera sur le côté du tube à proximité de l'extrémité du tube sous la charnière.
2-10. Éliminer le surnageant en le prélevant avec soin et en veillant à ne pas perturber le culot.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ce culot contient les acides nucléiques purifiés. La perte du culot signifie également la perte de l'ARN.</li> <li>• Le fait de tourner le tube de façon à ce que le culot se trouve sur la paroi supérieure permet la manipulation sans risque d'un cône de pipette le long de la paroi inférieure et l'élimination de tout le surnageant.</li> </ul>
2-11. Dissoudre le culot dans 350 µl de tampon RLT (kit RNeasy Micro) en vortexant vigoureusement et veillant à ce que le culot soit complètement dissous.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Il peut être nécessaire d'avoir à vortexer vigoureusement pour dissoudre le culot.</li> <li>• Plusieurs pipetages peuvent aider à dissocier et à dissoudre le culot</li> <li>• La dissolution complète du culot peut prendre quelques minutes.</li> </ul>
2-12. Ajouter 350 µl d'éthanol à 70 %. Bien mélanger en vortexant.	Il est normal d'observer de petites particules.
2-14. Passer immédiatement aux instructions du kit Qiagen RNeasy Cleanup.	

### Section III - Procédure du kit Qiagen RNeasy Cleanup

Commencer à l'étape n° 5 du protocole du kit Qiagen RNeasy Micro « Isolation d'ARN total à partir de cellules animales ». La version abrégée du protocole est fournie ci-dessous pour référence. (Remarquer une légère modification de l'étape d'éluion, étapes n° 3 à 13).

5. Transférer l'échantillon sur la colonne de centrifugation RNeasy MinElute placée sur un tube collecteur de 2 ml. Fermer le capuchon et centrifuger pendant 15 s à > 8 000×g. Jeter l'effluent. Utiliser de nouveau le tube collecteur à l'étape 6.
6. Ajouter 350 µl de tampon RW1 dans la colonne RNeasy MinElute. Fermer le capuchon et centrifuger pendant 15 s à > 8 000×g. Jeter l'effluent. Utiliser de nouveau le tube collecteur à l'étape 8.
7. Dans un tube séparé ajouter 10 µl de solution mère de DNase I à 70 µl de tampon RDD. Mélanger doucement en inversant le tube.
8. Déposer le mélange d'incubation contenant la DNase I (80 µl) directement sur la membrane de la colonne RNeasy MinElute et incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
9. Ajouter 350 µl de tampon RW1 dans la colonne RNeasy MinElute. Fermer le capuchon et centrifuger pendant 15 s à > 8 000×g. Jeter l'effluent et le tube collecteur.
10. Placer la colonne RNeasy MinElute sur un nouveau tube collecteur de 2 ml. Ajouter 500 µl de tampon RPE dans la colonne. Fermer le capuchon et centrifuger pendant 15 s à > 8 000×g. Jeter l'effluent. Réutiliser le tube collecteur à l'étape 11.
11. Ajouter 500 µl d'éthanol à 80 % dans la colonne RNeasy MinElute. Fermer la centrifugeuse et centrifuger pendant 2 min à > 8 000×g. Jeter l'effluent et le tube collecteur.
12. Placer la colonne RNeasy MinElute sur un nouveau tube collecteur de 2 ml. Ouvrir le capuchon de la colonne et centrifuger 5 minutes à vitesse maximale. Jeter l'effluent et le tube collecteur.
13. Placer la colonne RNeasy MinElute sur un nouveau tube collecteur de 1,5 ml. Ajouter 25 µl d'eau exempte de RNase directement au centre de la membrane de la colonne. Incuber 5 minutes à température ambiante. Fermer le capuchon et centrifuger 1 minute à vitesse maximale pour éluer l'ARN.