



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'élution, 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 $> 8\ 000\times g$ . Jeter l'effluent. Utiliser de nouveau le tube collecteur à l'étape 6.
6. Ajouter 350 $\mu$ l de tampon RW1 dans la colonne RNeasy MinElute. Fermer le capuchon et centrifuger pendant 15 s à $> 8\ 000\times g$ . Jeter l'effluent. Utiliser de nouveau le tube collecteur à l'étape 8.
7. Dans un tube séparé ajouter 10 $\mu$ l de solution mère de DNase I à 70 $\mu$ l de tampon RDD. Mélanger doucement en inversant le tube.
8. Déposer le mélange d'incubation contenant la DNase I (80 $\mu$ l) directement sur la membrane de la colonne RNeasy MinElute et incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
9. Ajouter 350 $\mu$ l de tampon RW1 dans la colonne RNeasy MinElute. Fermer le capuchon et centrifuger pendant 15 s à $> 8\ 000\times g$ . Jeter l'effluent et le tube collecteur.
10. Placer la colonne RNeasy MinElute sur un nouveau tube collecteur de 2 ml. Ajouter 500 $\mu$ l de tampon RPE dans la colonne. Fermer le capuchon et centrifuger pendant 15 s à $> 8\ 000\times g$ . Jeter l'effluent. Réutiliser le tube collecteur à l'étape 11.
11. Ajouter 500 $\mu$ l d'éthanol à 80 % dans la colonne RNeasy MinElute. Fermer la centrifugeuse et centrifuger pendant 2 min à $> 8\ 000\times g$ . 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 $\mu$ l 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.