

Protocole de purification Oragene®•RNA pour des volumes allant jusqu'à 250 µl

(Pour purifier un volume supérieur à 250 µl, se référer au protocole décrit dans PD-PR-021)

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 provenant du kit RNeasy sont les suivants : tampon RLT, colonne de centrifugation MinElute, tubes collecteurs, tampon RW1, solution mère de DNase I, tampon RDD, tampon RPE et eau exempte de RNase.
*Le kit Qiagen RNeasy Mini (Cat. N° 74104) peut également être utilisé en association avec le kit Qiagen RNase-Free DNase (Cat. N° 79254)

Étapes préalables à la purification de l'ARN à partir d'un échantillon salive/Oragene•ARN

1. À l'arrivée des échantillons au laboratoire, les agiter vigoureusement pendant 8 secondes au minimum.
2. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant une durée allant jusqu'à 8 semaines ou congelés à -20 °C indéfiniment.
3. Avant la purification, 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.

Purification initiale d'un aliquot de Oragene•RNA

1. Transférer un aliquot de 250 µl dans un microtube de centrifugation de 1,5 ml.
2. Incuber l'aliquot à 90 °C pendant 15 minutes, puis laisser refroidir à température ambiante.
3. Ajouter 1/25^e de volume de solution Neutralizer. (Par ex., 10 µl de solution Neutralizer pour un échantillon de 250 µl). Incuber dans la glace pendant 10 minutes.
4. Centrifuger 3 minutes à vitesse maximale (>13 000×g).
5. Transférer avec soin le surnageant dans un nouveau tube en veillant à ne pas détacher le culot ; jeter le culot.
6. Préparer la solution Qiagen RNeasy à utiliser avec Oragene•RNA comme suit : mélanger 250 µl de tampon RNeasy RLT avec 250 µl d'éthanol à 95 %.
7. Ajouter à ce mélange RLT/éthanol jusqu'à 250 µl de l'échantillon neutralisé salive/Oragene•ARN ; mélanger 6 fois en inversant doucement.
8. Passer **immédiatement** aux instructions du kit **RNeasy Purification**.

Procédure de purification Qiagen RNeasy

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. (Remarque une légère modification de l'étape d'élution, étape n° 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. Réutiliser 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. Réutiliser le tube collecteur à l'étape 8.
7. 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 incubé 15 minutes à température ambiante.
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 le capuchon 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.