

CD34+ HSC LNP kit, 100 µL

Mode d'emploi

Traduit de l'anglais

Introduction

À lire avant de déballer ou d'utiliser le kit

Ces instructions contiennent des informations importantes pour la manipulation, le déballage et la préparation en toute sécurité du kit CD34+ HSC LNP kit, 100 µL.

Avant d'utiliser ce produit, tous les utilisateurs doivent lire le présent document ainsi que le document *NanoAssemblr Spark Operating Instructions (NIS1024)*.

Utilisation prévue

Le kit CD34+ HSC LNP kit, 100 µL permet d'introduire de l'ARN dans des cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH) stimulées.

Ce kit est fourni comme un produit autonome devant être utilisé uniquement en association avec l'instrument Spark et les cartouches Spark.

Les produits sont uniquement destinés à la recherche et ne peuvent pas être utilisés dans le cadre de procédures cliniques ou *in vitro*, ou à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.

Sécurité

Pour une utilisation et une manipulation des produits en toute sécurité, se reporter à la fiche de données de sécurité (FDS) de chaque produit chimique utilisé dans la procédure.

Scanner le code QR figurant sur l'emballage pour accéder à la FDS des composants.

Généralités

Description

Le CD34+ HSC LNP kit, 100 µL est un mélange de réactifs à base de nanoparticules lipidiques (NPL) qui est optimisé pour la délivrance d'ARN (tel que de l'ARNm de Cas9/ARNsg) dans des CSH stimulées.

Les composants du kit CD34+ HSC LNP sont utilisés avec l'instrument NanoAssemblr Spark pour produire des NPL-ARN. Le kit est disponible en deux versions. Les deux versions incluent des réactifs, mais une seule d'entre elles inclut des cartouches Spark. Voir la section [Composants du kit, à la page 5](#).

Cette méthode de délivrance non virale peut être intégrée à des flux de travail de culture de CSH standard. Le kit CD34+ HSC LNP permet aux chercheurs d'établir une méthode évolutive et cliniquement pertinente pour la délivrance et l'édition de gènes *ex vivo*. Le kit est approprié pour être utilisé dans la découverte de médicaments, le criblage, et le développement de thérapies à base de CSH modifiées par un gène.

Applications typiques

- Délivrance d'ARN pour exprimer des protéines d'intérêt
- Délivrance d'ARNm de nucléase à des fins de manipulation génétique, par exemple une invalidation génique par CRISPR/Cas.
- Délivrance d'ARNsi pour une extinction génique transitoire

Produits associés

Les produits suivants peuvent être utilisés avec l'instrument NanoAssemblr Ignite ou Ignite+ pour des applications à l'échelle préclinique.

- CD34+ HSC LNP kit, 2 mL
- Instrument NanoAssemblr Ignite
- Instrument NanoAssemblr Ignite+

Voir la section [Recherche des informations de commande sur Internet, à la page 20](#) pour plus d'informations.

Ressources en ligne pour l'utilisateur

L'utilisateur peut télécharger les ressources sur les produits suivants depuis Internet.

- *CD34+ HSC LNP kit, 100 µL Workbook*
- *RiboGreen Assay Protocol to Determine RNA Encapsulation Efficiency*
- *Genome Editing of CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells with Lipid Nanoparticles*

Pour obtenir les fichiers des documents, effectuer une recherche par titre de document sur le site [cytiva.com](https://www.cytiva.com).

Documentation de l'utilisateur

La documentation de l'utilisateur est répertoriée dans le tableau ci-dessous.

Documentation	Contenu principal
<i>Mode d'emploi des instruments NanoAssemblr Spark (NIS1024)</i> Dans le présent document, ce document est appelé <i>Mode d'emploi de l'instrument</i> .	Instructions nécessaires à la préparation et à l'exploitation correctes et en toute sécurité de l'instrument Spark. Vue d'ensemble du système, exigences relatives au site et instructions relatives au déplacement du système à l'intérieur d'un bâtiment Instructions pour la maintenance et le dépannage de base

Accès à la documentation utilisateur en ligne

Scanner le code QR ou visiter le site cytiva.com/instructions. Saisir le titre ou le numéro de document pour accéder au fichier.



Composants du kit

Introduction

Le kit CD34+ HSC LNP est disponible en deux versions : une qui inclut des cartouches Spark, et une qui n'en inclut pas. Les sections suivantes indiquent les noms des composants et les températures de stockage pour chaque version du kit.

Étiquette	Contenu	Taille	Stockage
Lipid mix	Mélange de lipides	100 µl	-80 °C
Formulation buffer type 1	Tampon de formulation	400 µl	2 °C à 8 °C
Dilution buffer type 1	Tampon de dilution	1500 µl	2 °C à 8 °C
Apolipoprotein-E (ApoE)	Apolipoprotéine-E (ApoE)	100 µg	-80 °C
Cartouches NanoAssemblr Spark (si applicable)		5 unités	15 °C à 25 °C

Date d'expiration

Voir l'emballage de chaque composant.

Capacité du kit

Le kit contient du matériel suffisant pour la préparation d'au moins 5 formulations de nanoparticules lipidiques, chacune contenant 10 µg d'ARN.

Matériel requis

Matériel requis fourni par Cytiva

- Instrument NanoAssemblr Spark
- Cartouches NanoAssemblr Spark

Voir la section [Recherche des informations de commande sur Internet, à la page 20](#) pour plus d'informations.

Matériel requis fourni par l'utilisateur

Pour préparer les NPL-ARN avec le kit CD34+ HSC LNP, l'équipement, les consommables et les réactifs suivants sont requis.

- Lecteur de plaques en fluorescence
- Bloc chauffant ou étuve capable de chauffer à 55 °C
- Étuve, capable de chauffer à 37 °C
- Spectromètre UV
- Agitateur vortex
- Tubes de 0,5 à 2 ml avec capuchon à vis et joint torique
- Micropipettes et cônes de pipette exempts de RNase - 10, 20 et 200 µl
- Plaques à 96 puits à fond noir
- Quant-iT RiboGreen Assay Kit
- Triton X-100
- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) 1X, sans calcium et magnésium
- Eau de qualité biologie moléculaire (exempte de RNase/DNase et d'endotoxines)
- Isopropanol à 70 %
- Solution de décontamination des RNases

Vue d'ensemble du flux de travail

Cette section décrit le flux de travail pour préparer des NPL-ARN sur l'instrument Spark, y compris la préparation de la solution d'ARN, la manipulation de l'instrument et la préparation des NPL. Un flux de travail typique utilisant un kit CD34+ HSC LNP kit est indiqué dans le tableau ci-dessous.

Phase	Action	Description
1	Remplissage du <i>CD34+ HSC LNP kit, 100 µL Workbook</i>	Calculer la consommation en réactifs et préparer le matériel
2	Préparation de l'espace de travail et de l'instrument	Décongeler les réactifs et les matériels, étiqueter les flacons et paramétrer l'instrument Spark
3	Préparation de la solution d'ARN	Préparer la solution de travail d'ARN en combinant la charge utile d'ARN et le tampon de formulation inclus
4	Formulation des NPL-ARN	Formuler les NPL sur l'instrument Spark
5	Quantification de l'ARN chargé	Quantifier l'ARN encapsulé à l'aide de l'essai RiboGreen
6	Traitement des CSH par les NPL	Ajouter les NPL-ARN aux cellules

Remplissage de la feuille de calcul

L'outil *CD34+ HSC LNP kit, 100 µL Workbook* est un outil permettant de calculer les paramètres et les volumes pour la formulation des NPL sur l'instrument Spark.

L'outil *CD34+ HSC LNP kit, 100 µL Workbook* est également appelé *Feuille de calcul* dans le présent document. Cette *Feuille de calcul* est disponible sur Internet. Voir la section [Ressources en ligne pour l'utilisateur, à la page 2](#).

La feuille de calcul est divisée en deux sections pour tenir compte des deux applications indiquées ci-dessous, et l'utilisateur doit uniquement remplir les entrées sous l'en-tête de section pertinent :

1 mRNA LNP Production (One Component)	2 CRISPR-Cas9 LNP Production (Two Components)	Legend
Step 1. User Input	Step 1. User Input	Fillable
Stock mRNA concentration (mg/mL)	Stock Cas9 mRNA concentration (mg/mL)	Dispense / Important
Samples (number of replicate LNPs)	Stock sgRNA concentration (mg/mL)	
	Cas9 to sgRNA ratio (wt.)	
	Samples (number of replicate LNPs)	

1. Pour l'expression d'ARNm
2. Pour l'édition par CRISPR Cas9 (avec l'ARNm de Cas9 et un ARNsg)

À l'étape 1, l'utilisateur doit saisir les valeurs des paramètres indiqués ci-dessous. Les valeurs recommandées pour ces paramètres sont indiquées dans le tableau.

Paramètre	Description	Valeur recommandée
Stock mRNA concentration (mg/mL) ¹	Concentration de la solution mère d'ARNm	Déterminé par l'utilisateur
Stock Cas9 mRNA concentration (mg/mL) ²	Concentration de la solution mère de Cas9	Déterminé par l'utilisateur
Stock sgRNA concentration (mg/mL) ²	Concentration de la solution mère d'ARNsg	Déterminé par l'utilisateur Remarque : <i>Une concentration mère d'ARNsg couramment utilisée est de 100 µM ou approximativement 3,2 mg/ml pour les produits de recombinaison de synthèse.</i>

Paramètre	Description	Valeur recommandée
Cas9 to sgRNA ratio (wt.) ²	Rapport en poids de l'ARNm de Cas9 sur l'ARNsg (X:1)	1
Samples (number of replicate LNPs)	Nombre de réplicats d'échantillons de NPL	Déterminé par l'utilisateur

¹ Pour l'expression d'ARNm uniquement

² Pour l'édition par CRISPR Cas9 uniquement

Préparation de l'espace de travail et de l'instrument

Il est important de maintenir la stérilité de l'ensemble du matériel et d'effectuer tous les travaux dans l'enceinte de sécurité biologique (ESB). Les cellules souches hématopoïétiques sont particulièrement sensibles aux pyrogènes, tels que les endotoxines, et ce même à des taux minimalement détectables.

Suivre les étapes ci-dessous pour préparer l'espace de travail et l'instrument Spark.

Étape	Action
1	Mettre sous tension et nettoyer l'enceinte de sécurité biologique (ESB) en l'essuyant avec de l'isopropanol à 70 % et une solution de décontamination des RNases.
2	Configurer l'instrument Spark dans l'ESB. Pour obtenir des instructions détaillées sur l'installation et l'utilisation de l'instrument, voir son <i>Mode d'emploi</i> . a. Essuyer l'instrument avec de l'isopropanol à 70 %. b. Raccorder l'instrument à une prise électrique mise à la terre. c. Mettre l'instrument sous tension.
3	Récupérer l'aliquote ou les aliquotes d'ARN congelée(s) puis la/les décongeler sur de la glace. Toujours conserver l'ARN sur de la glace afin d'empêcher sa dégradation.
4	Décongeler le mélange de lipides à 55 °C pendant 5 minutes dans un bain à billes ou un bloc chauffant. Après la décongélation, conserver le mélange de lipides à température ambiante. Conserver le flacon fermé pour empêcher toute évaporation.
5	Agiter le mélange de lipides au vortex pour garantir une parfaite homogénéité. Centrifuger dans une microcentrifugeuse pendant 3 à 5 secondes.

Étape Action

6 Placer les éléments suivants dans l'ESB.

Sur de la glace :	À température ambiante :
Aliquote(s) d'ARN	- Instrument Spark et cartouches - Les composants du kit : mélange de lipides, tampon de formulation et tampon de dilution - Trois tubes de 0,5 ml pour chaque échantillon de NPL, étiquetés de manière appropriée pour le matériel suivant : - Solution d'ARN : un tube pour préparer la solution aqueuse d'ARN - Échantillon RiboGreen : un tube de collecte pour une petite aliquote de NPL-ARN afin de réaliser l'essai RiboGreen (~20 à 25 µL) - Échantillon final : un tube de collecte pour l'échantillon de NPL-ARN, pour les NPL-ARN restantes pour la culture cellulaire (~150 µL) - Micropipettes de 20 µl et 200 µl et cônes de pipette stériles

7 Dans le menu de l'instrument, appuyer sur **Purge**, puis appuyer sur le bouton physique de l'instrument Spark.

Résultat :

L'instrument est purgé pour éliminer l'air piégé.

8 Appuyer sur **Formulation** dans l'interface utilisateur.

9 À l'invite, paramétrer l'instrument avec le réglage de pression **3**.

Préparation de la solution de travail d'ARN

Introduction

Cette section décrit la procédure de préparation de la solution de travail d'ARN. Il existe deux procédures différentes en fonction du type d'ARN.

Avant de commencer, mesurer la concentration de la ou des solution(s) mère d'ARN par UV-Vis afin de s'assurer que la concentration est bien celle prévue.

Préparation de l'ARNm pour une délivrance à un seul composant

Étape

Action

1

Prélever à la pipette les volumes de tampon de formulation (2) et d'eau de qualité biologie moléculaire (1) indiqués à l'étape 2 de la *Feuille de calcul*, puis les verser dans un tube destiné à la solution de travail d'ARN.

Step 2. RNA Working Solution Preparation		
Molecular grade water (µL)	20.66	1
Formulation buffer (µL)	3.52	2
mRNA (µL)	11.02	3
Dispensed volume to cartridge (µL)	32.00	

2

Bien mélanger.

3

Prélever à la pipette le volume d'ARNm (3) indiqué à l'étape 2 de la *Feuille de calcul*, puis le verser dans le tube de solution de travail d'ARN.

Conserver la solution de travail d'ARN sur de la glace jusqu'à utilisation.

Préparation de l'ARNm pour une délivrance à deux composants

Étape

Action

1

Prélever à la pipette les volumes de tampon de formulation (2) et d'eau de qualité biologie moléculaire (1) indiqués à l'étape 2 de la *Feuille de calcul*, puis les verser dans un tube destiné à la solution de travail d'ARN.

Step 2. RNA Working Solution Preparation		
Molecular grade water (µL)	20.66	1
Formulation buffer (µL)	3.52	2
Cas9 mRNA (µL)	5.51	3
sgRNA (µL)	5.51	4
Dispensed volume to cartridge (µL)	32.00	

Étape	Action
2	Bien mélanger.
3	Prélever à la pipette les volumes d'ARNm (3) et d'ARNsg (4) Cas9 indiqués à l'étape 2 de la <i>Feuille de calcul</i> , puis les verser dans le tube de solution de travail d'ARN.

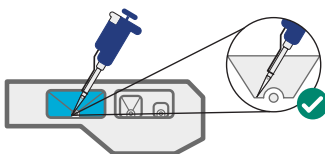
Conserver la solution de travail d'ARN sur de la glace jusqu'à utilisation.

Formulation de NPL-ARN

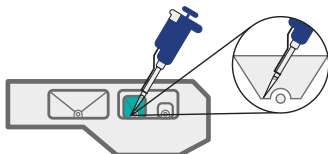
Suivre les étapes ci-dessous pour formuler les NPL-ARN sur l'instrument Spark.

Étape	Action
-------	--------

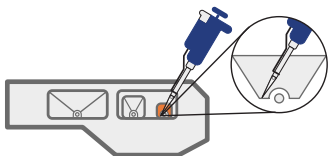
- | | |
|---|--|
| 1 | Dans l'ESB, ouvrir le paquet contenant la cartouche Spark et le couvercle associé. |
| 2 | À l'aide d'une micropipette, remplir lentement le puits 1 de la cartouche Spark avec un volume de 48 μ L de tampon de dilution.
Veiller à positionner la pipette conformément à la position de la pipette illustrée ci-dessous pour éviter toute formation de bulles à proximité de l'ouverture du canal. |



- | | |
|---|--|
| 3 | Remplir le puits 2 de la cartouche avec un volume de 32 μ L de la solution de travail d'ARN préparée précédemment. |
|---|--|



- | | |
|---|---|
| 4 | Remplir le puits 3 de la cartouche avec un volume de 16 μ L de mélange de lipides. Immédiatement après utilisation, veiller à bien reboucher le flacon de mélange de lipides pour réduire le risque d'évaporation de cette solution à base d'éthanol. |
|---|---|



- | | |
|---|--|
| 5 | Fermer la cartouche immédiatement pour éviter toute évaporation d'éthanol. |
|---|--|

Étape	Action
6	Insérer la cartouche fermée contenant les réactifs préparés dans l'instrument Spark.
7	Appuyer sur le bouton physique de l'instrument Spark pour formuler les NPL-ARN. Voir le <i>mode d'emploi</i> de l'instrument pour connaître les détails de la procédure d'exécution d'une formulation.

Collecte de l'échantillon de NPL-ARN formulé

Une fois l'étape de formulation terminée sur l'instrument Spark, suivre les étapes ci-dessous pour collecter l'échantillon formulé.

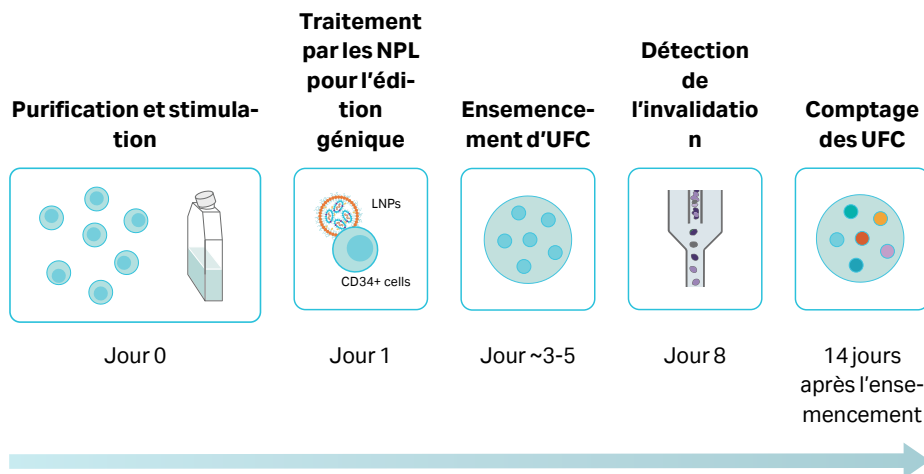
Étape	Action
1	À l'invite (c.-à-d. lorsque les instructions de l'instrument s'affichent à l'écran), retirer la cartouche Spark de l'instrument.
2	Soulever le couvercle de la cartouche avec précaution.
3	Prélever à la micropipette la solution de NPL-ARN du puits 1 de la cartouche, puis l'ajouter au tube de microcentrifugeuse stérile de 0,5 ml pour l'échantillon final.
4	Ajouter 96 µl de tampon de dilution aux NPL-ARN formulées et pipeter de haut en bas pour mélanger minutieusement. Remarque : <i>Cette étape de dilution à 1:1 stabilise les NPL.</i>
5	Aliquoter 25 µl de NPL-ARN dans le tube pour l'échantillon RiboGreen.
6	Déterminer la concentration en ARN des NPL à l'aide de l'essai RiboGreen. Voir le document <i>RiboGreen Assay Protocol to Determine RNA Encapsulation Efficiency</i> , disponible sur Internet, pour obtenir des instructions détaillées. Voir la section Ressources en ligne pour l'utilisateur, à la page 2 .

Les NPL-ARN sont désormais prêtes à être utilisées. Conserver l'échantillon à 4 °C et l'utiliser pour le traitement cellulaire dans un délai d'une (1) semaine au maximum.

Traitement des CSH par les NPL

Vue d'ensemble

L'illustration ci-dessous représente un schéma fonctionnel du flux de travail de la culture cellulaire des CSH et du traitement par les NPL. Les moments temporels suggérés dans le flux de travail sont basés sur des modèles expérimentaux d'inactivation de CD45 et CD33. Se reporter au document *Genome Editing of CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells with Lipid Nanoparticles* pour plus de détails.



Recommandations pour la culture cellulaire

Pour obtenir une efficacité de transfection optimale des NPL, tenir compte des paramètres essentiels suivants :

- **Dosage des NPL-ARN** : il est recommandé d'effectuer une titration complète de la dose pour chaque charge utile afin d'identifier la dose optimale. Une charge utile peut être, par exemple, une construction d'ARN guide unique différente. La plage recommandée pour la dose de titration peut aller de 0,2 à 20 µg d'ARN total par million de cellules traitées.
- **Pratique stérile** : maintenir un environnement de travail stérile lors de la manipulation des cellules et des NPL. Les opérateurs doivent être dûment formés à la technique stérile appropriée avant de travailler dans l'enceinte de sécurité biologique.
- **Décongélation et expansion des cellules** : les CSH CD34+ cryoconservées doivent être stimulées pendant 24 heures après la décongélation (avant l'ajout des NPL).

- **Densité cellulaire** : une densité d'ensemencement de 0,1 à 0,5 million de cellules/ml est recommandée pour le traitement des NPL.
- **Temps de traitement des NPL** : le temps d'incubation après la transfection des NPL dépend des caractéristiques de la charge utile d'ARN, par exemple de la cinétique d'expression et de la stabilité. Un traitement de 24 à 96 heures est recommandé, avec une optimisation supplémentaire si nécessaire.
- **Milieux de culture cellulaire** : le kit CD34+ HSC LNP montre une performance optimale dans des milieux exempts de sérum. Un milieu de culture cellulaire contenant une faible concentration de sérum ($\leq 1\%$) au moment de l'ajout des NPL peut être acceptable, mais doit être validé de manière expérimentale. En outre, l'utilisation d'un milieu exempt de sérum est recommandée pour une rétention optimale du caractère souche et d'un phénotype greffable (CD34+ CD38- CD90+ CD133+).

Procédure de traitement par des NPL

Les étapes ci-dessous offrent une vue d'ensemble de la procédure de traitement par des NPL. Se reporter au document *Genome Editing of CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells with Lipid Nanoparticles* pour obtenir un exemple de flux de travail détaillé, qui a été optimisé pour le traitement de CSH par des NPL, ainsi que des conseils pour la résolution des problèmes. Voir la section [Documentation de l'utilisateur](#), à la page 4.

Étape	Action
1	Décongeler ou isoler les CSH CD34+.
2	Diluer les cellules à 0,1 à 0,5 million de cellules/ml dans un milieu de culture cellulaire.
3	Le jour suivant, juste avant le traitement par les NPL, ajouter de l'ApoE aux cellules de la manière suivante : - Préparer une solution mère d'ApoE à 0,1 mg/ml en diluant les 100 µg d'ApoE inclus avec 1 ml de PBS 1X sans calcium ou magnésium. Conserver en aliquotes à -80 °C pendant 2 mois au maximum pour éviter les cycles de congélation/décongélation. - Ajouter la solution mère d'ApoE aux cellules pour obtenir une concentration finale de 1 µg/ml (dilution à 1:100 de la solution mère à 0,1 mg/ml). - Mélanger minutieusement par trituration.
4	Ensemencer les cellules dans un récipient de culture ou une plaque multi-puits.
5	Ajouter les NPL formulées directement aux cellules ensemencées.
6	Incuber à 37 °C dans du CO ₂ à 5 %.

Étape	Action
7	Effectuer une analyse en aval pour évaluer l'efficacité de la transfection, par exemple via une cytométrie en flux ou un essai d'unités formant colonies.

Recherche des informations de commande sur Internet

Les informations les plus récentes sur les produits proposés et les codes des produits sont disponibles sur Internet. Suivre les étapes ci-dessous pour rechercher des systèmes de formulation de nanoparticules lipidiques, des réactifs, des cartouches ou d'autres accessoires.

Étape	Action
1	Accéder au site cytiva.com .
2	Effectuer une recherche par nom de produit ou catégorie de produit.
3	Naviguer jusqu'à la page du produit recherché.
4	Faire défiler jusqu'à la section Product Specifications (Caractéristiques des produits), qui indique les noms des produits, les codes des produits et d'autres informations de commande.

Page laissée intentionnellement vide



cytiva.com

Cytiva et le logo Drop sont des marques de commerce de Life Sciences IP Holdings Corporation ou de l'une de ses sociétés affiliées opérant sous le nom de Cytiva.

NanoAssemblr est une marque de commerce de Global Life Sciences Solutions USA LLC ou de l'une de ses sociétés affiliées opérant sous le nom de Cytiva..

Toute autre marque de commerce tierce est la propriété de son détenteur respectif.

© 2024–2025 Cytiva

Pour les coordonnées des bureaux locaux, visiter le site cytiva.com/contact

1002515 AB V:11 03/2025