

Cytiva™ RNA delivery LNP kit

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 Cytiva™ RNA delivery LNP kit, 3 ml et 6 ml.

Avant d'utiliser ce produit, tous les utilisateurs doivent lire le présent document ainsi que le *Mode d'emploi des instruments NanoAssemblr™ Ignite™ et Ignite+™*.

Utilisation prévue

Le kit Cytiva RNA delivery LNP kit est uniquement destiné à la recherche relative aux vaccins à ARN.

Il s'agit d'un produit autonome et doit être uniquement utilisé avec l'instrument Ignite ou Ignite+ et les cartouches NxGen™ Ignite.

Ce produit est uniquement destiné à la recherche et ne doit pas être utilisé 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 kit Cytiva RNA delivery LNP est un mélange de réactifs à base de nanoparticules lipidiques (NPL), qui est optimisé pour l'administration d'ARN dans des essais précliniques de vaccins utilisant des modèles de petits rongeurs. Il est disponible en deux volumes : 3 ml et 6 ml. Le kit Cytiva RNA delivery LNP inclut un mélange de lipides ionisables et tous les réactifs nécessaires pour préparer les NPL sur l'instrument NanoAssemblr Ignite ou Ignite+.

Applications typiques

- Administration *in vivo* d'ARNm et de pARNa au cours d'essais précliniques de vaccins
- Analyse *in vitro* de la charge d'ARN

Ressources en ligne pour l'utilisateur

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

- *Cytiva RNA delivery LNP kit Workbook*
- *RiboGreen Assay Protocol to Determine RNA Encapsulation Efficiency*

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 Ignite et Ignite+ (NIN1134)</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 correcte et en toute sécurité de l'instrument Ignite ou Ignite+ 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

Composants et stockage

Le tableau suivant indique les noms des composants et les températures de stockage pour tous les composants du kit.

Étiquette	Contenu	Taille	Stockage
Lipid mix	Mélange de lipides	3 ml	-80 °C
		6 ml	
Formulation buffer type 1	Tampon de formulation	6 ml	2 °C à 8 °C
Dilution buffer type 1 10X	Tampon de dilution	100 ml	2 °C à 8 °C
Cryopreservation buffer type 1	Tampon de cryoconservation	12 ml	-80 °C

Remarque : *Tous les éléments du kit sont expédiés dans de la glace sèche et peuvent arriver sur site congelés. Avant de les utiliser, s'assurer que les tampons sont entièrement décongelés et qu'ils ont été resolubilisés à l'aide d'un agitateur vortex pendant 30 secondes.*

Date d'expiration

Voir les différents éléments.

Capacité du kit

Pour un rapport N/P¹ de 8, les kits permettent la formulation des quantités d'ARN suivantes :

Kit	Volume de formulation
Cytiva RNA delivery LNP kit, 3 ml	~0,7 mg d'ARN
Cytiva RNA delivery LNP kit, 6 ml	~1,5 mg d'ARN

Quand un volume total de 2 ml de NPL est préparé avec un rapport de débit (FRR) de 3:1 et un rapport N/P de 8, la récupération d'ARN prévue dans l'échantillon final est de 70 % à 80 %.

¹ Le rapport N/P correspond au rapport molaire des amines (azote) dans les groupes ionisables lipides-phosphates de l'acide nucléique.

Si le rapport N/P pour la formulation des NPL est inférieur, la récupération d'ARN est proportionnellement supérieure.

Matériel requis

Matériel requis fourni par Cytiva

- Instrument NanoAssemblr Ignite ou Ignite+
- Cartouches NanoAssemblr Ignite ou Ignite+

Voir la section [Recherche des informations de commande sur Internet, à la page 22](#) pour plus d'informations.

Matériel requis fourni par l'utilisateur

Le matériel suivant est nécessaire pour préparer les NPL-ARN avec le présent kit. Tous les consommables en plastique utilisés pendant la préparation, la formulation et le stockage des NPL doivent être stériles et sans RNase, selon le cas.

- Lecteur de plaques en fluorescence
- Bloc chauffant ou étuve capable de chauffer à 55 °C
- Spectromètre UV
- Agitateur vortex
- Centrifugeuse réfrigérée avec rotor oscillant
- Tubes de centrifugation coniques : 15 ml et 50 ml
- Tubes de 0,5 à 2 ml avec capuchon à vis et joint torique
- Seringue jetable : 1 ml, 3 ml, 5 ml ou 10 ml

Remarque : *Voir le Mode d'emploi de l'instrument pour connaître les marques et les tailles de seringue à utiliser en fonction des paramètres de formulation. Il est recommandé d'utiliser la plus petite taille de seringue possible pouvant recueillir le volume requis.*

- Micropipettes et cônes de pipette
- Pipeteur et pipettes sérologiques
- Aiguilles émoussées
- Filtres de seringue stériles : 13 mm, 0,2 µm, polyéthersulfone (PES)
- Filtres de centrifugation Amicon® à seuil de coupure (MWCO) de 30 kDa, 15 ml
- Plaques à 96 puits à fond noir, surface non traitée
- Quant-iT RiboGreen Assay Kit
- Triton X-100
- Eau de qualité biologie moléculaire
- Isopropanol à 70 %

- Solution de décontamination des RNases

Vue d'ensemble du flux de travail

Cette section décrit le flux de travail de préparation des NPL-ARN sur les instruments Ignite et Ignite+, y compris la préparation de la solution d'ARN, la manipulation de l'instrument et la préparation des NPL. Le tableau ci-dessous présente un flux de travail type utilisant un kit Cytiva RNA delivery LNP kit.

Étape	Action	Description
1	Remplissage de la feuille de calcul <i>Cytiva RNA delivery LNP Workbook</i>	Calcul de la consommation en réactifs et préparation du matériel
2	Préparation de l'espace de travail et des réactifs	Décongélation et préparation des réactifs, qui doivent avoir les concentrations requises
3	Préparation de la solution d'ARN	Préparation de la solution d'ARN en combinant la charge d'ARN avec le tampon de formulation et l'eau de qualité biologie moléculaire inclus
4	Formulation de NPL-ARN	Formulation des NPL sur l'instrument
5	Traitement en aval des NPL	• Échange de tampon et concentration des NPL à l'aide de filtres de centrifugation • Ajout du tampon de cryoconservation • Filtration stérile
6	Détermination des caractéristiques physicochimiques des NPL	• Détermination de la taille et de la polydispersité des NPL par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ou toute autre méthode équivalente • Quantification de l'ARN encapsulé en s'appuyant sur l'essai RiboGreen
7	Dilution pour atteindre la concentration voulue	Dilution des NPL-ARN à la concentration voulue en fonction de la concentration de l'ARN encapsulé

Remplissage de la feuille de calcul

L'outil *Cytiva RNA delivery LNP kit Workbook* permet de calculer les paramètres et les volumes pour la formulation des NPL sur les instruments Ignite et Ignite+.

L'outil *Cytiva RNA delivery LNP kit 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](#).

Dans **Step 1: User Input** (Étape 1 : saisie de l'utilisateur), l'utilisateur doit saisir les valeurs des paramètres indiqués dans le tableau ci-dessous. Des valeurs recommandées sont également mentionnées pour les paramètres concernés.

Paramètre	Description	Valeur recommandée
Total flow rate (mL/min)	Sommes des débits des canaux C et R avant la dilution en ligne facultative	20 ml/min
Total LNP volume (mL)	Volume total de NPL préparé, y compris les déchets Remarque : <i>Cette valeur n'inclut pas le volume ajouté par la dilution en ligne.</i>	Déterminé par l'utilisateur
RNA stock concentration (mg/mL)	Concentration de la solution mère d'ARN	Mesurée par UV-vis
Lipid mix working concentration (ratio of stock concentration)	Concentration du mélange de lipides utilisé pendant la procédure par rapport au mélange de lipides fourni dans le kit	1
In-line dilution ratio Dil:LNP (X:1)	Ratio de dilution diluant:NPL, si une dilution en ligne est effectuée	2 Remarque : <i>Laisser vide ou saisir N/A si ce paramètre est sans objet.</i>
Flow rate ratio Aq:Lipid (X:1)	Ratio des volumes des liquides des seringues C et R	3

Paramètre	Description	Valeur recommandée
N/P ratio	Rapport molaire des amines (azote) dans les groupes ionisables lipides-phosphates de l'acide nucléique	8
Lipid mix excess (mL)	Volume de mélange de lipides préparé en plus du volume nécessaire pour compenser les pertes lors des transferts	Déterminé par l'utilisateur
RNA solution excess (mL)	Volume de solution d'ARN préparé en plus du volume nécessaire pour compenser les pertes lors des transferts	Déterminé par l'utilisateur
Start waste (mL)	Volume de liquide devant être récupéré dans le tube de récupération des déchets au début du cycle	Voir le <i>Mode d'emploi</i> de l'instrument pour connaître les volumes de déchets recommandés en fonction des tailles de seringue utilisées.
End waste (mL)	Volume de liquide devant être récupéré dans le tube de récupération des déchets à la fin du cycle	Voir le <i>Mode d'emploi</i> de l'instrument pour connaître les volumes de déchets recommandés en fonction des tailles de seringue utilisées.

Remarque :

Pour des structures d'ARN plus complexes et de plus grande taille, il est recommandé d'utiliser les paramètres de formulation et de procédé suivants pour produire des NPL de plus petite taille, avec un indice de polydispersité (PDI) plus faible et une meilleure encapsulation de l'ARN :

- rapport N/P de 8,
- rapport de débit (FRR) de 5,
- concentration du mélange de lipides de 0,5X.

Préparation de l'espace de travail et des réactifs

Suivre les étapes ci-dessous pour préparer l'espace de travail et les réactifs. Pour maintenir les réactifs stériles, réaliser toutes les étapes à l'intérieur de l'armoire de biosécurité (ESB) et utiliser du matériel de laboratoire stérile en plastique.

Étape	Action
1	Mettre l'ESB en marche et la nettoyer avec une solution de décontamination des RNases puis de l'isopropanol à 70 %.
2	Décongeler le tube de lipides à 55 °C pendant 5 minutes dans un bain à billes ou un bloc chauffant. Maintenir le tube fermé pour éviter toute évaporation quand la température du mélange de lipides est supérieure à la température ambiante.
3	Une fois le mélange de lipides décongelé, transférer le tube sur un agitateur vortex à température ambiante.

Remarque :

Après la décongélation du mélange de lipides, il est recommandé de le répartir, en parts aliquotes, dans des récipients de plus petit volume. Cela permet de maintenir le mélange de lipides stérile et de réduire le nombre de cycles de congélation-décongélation.

- | | |
|---|--|
| 4 | Placer les éléments suivants dans l'ESB. |
|---|--|
- Les composants du kit : mélange de lipides, tampon de formulation, tampon de dilution, tampon de cryoconservation
 - Eau de qualité biologie moléculaire
 - Tubes stériles d'un volume adéquat pour la préparation des solutions à la concentration requise :
 - Tampon de dilution
 - Tampon de cryoconservation 2X
 - Tampon de cryoconservation 1X
 - Solution d'ARN
 - Mélange de lipides
 - Tubes stériles étiquetés pour les échantillons suivants :
 - Échantillon concentré : un tube de collecte pour l'échantillon de NPL-ARN, avant la filtration stérile

Étape Action

- Échantillon de cryoconservation : un tube de collecte pour diluer l'échantillon de NPL-ARN avec le tampon de cryoconservation avant la filtration stérile
- Échantillon stérile : un tube de collecte pour l'échantillon de NPL-ARN final après la filtration stérile
- Échantillon à analyser : un tube de collecte pour la répartition en parts aliquotes d'un petit volume de NPL en vue d'une diffusion dynamique de la lumière (DLS) et d'un essai RiboGreen

Remarque :

Le volume et le nombre de chaque type de tube dépend des paramètres de formulation.

- Micropipettes de 20 µl, 200 µl et 1 ml et cônes de pipette sans RNase
- Pipettes sérologiques sans RNase (du volume requis et dans la quantité nécessaire) et pipeteur
- Seringues, aiguilles et filtres de 0,2 µm
- Éthanol, si nécessaire

5 Préparer le tampon de dilution 1X dans un tube stérile :

- a. Saisir le volume final de tampon de dilution 1X requis dans l'étape 2 de la *Feuille de calcul*.

Step 2. Dilution buffer Preparation	
Dilution buffer type 1 10X (mL)	2.0
Molecular biology grade water (mL)	18.0
Final volume 1X Dilution buffer (mL)	20.0

- b. Diluer le tampon de dilution 10X fourni dans le kit avec de l'eau de qualité biologie moléculaire en respectant les volumes indiqués à l'étape 2.

6 Préparer le tampon de cryoconservation 2X dans un tube stérile :

- a. Saisir le volume final de tampon de cryoconservation 2X requis dans l'étape 3 de la *Feuille de calcul*.

Step 3. 2X Cryopreservation buffer Preparation	
Cryopreservation buffer type 1 (5X) (mL)	2.00
Molecular biology grade water (mL)	3.00
Final volume 2X Cryopreservation buffer (mL)	5.00

Étape	Action
-------	--------

- | | |
|--|--|
| | <p>b. Diluer le tampon de cryoconservation 5X fourni dans le kit avec de l'eau de qualité biologie moléculaire en respectant les volumes indiqués à l'étape 3.</p> |
|--|--|

7 Préparer le tampon de cryoconservation 1X dans un tube stérile :

- a. Saisir le volume final de tampon de cryoconservation 1X requis dans l'étape 4 de la *Feuille de calcul*.

Step 4. 1X Cryopreservation buffer Preparation

Cryopreservation buffer type 1 (5X) (mL)	1.00
Molecular biology grade water (mL)	4.00
Final volume 1X Cryopreservation buffer (mL)	5.00

- b. Diluer le tampon de cryoconservation 5X fourni dans le kit avec de l'eau de qualité biologie moléculaire en respectant les volumes indiqués à l'étape 4.

Astuce :

Pour un calcul précis du volume, patienter et effectuer cette opération à l'étape précédant le début de la procédure de dilution décrite à la section [Dilution à la concentration voulue, à la page 21](#).

8 Préparer le mélange de lipides comme suit :

- a. Veiller à ce que le mélange de lipides refroidisse à température ambiante.
- b. Mélanger le contenu du tube avec un agitateur vortex pour s'assurer que le mélange des lipides est homogène.
- c. Ajouter le volume requis de mélange de lipides (1) dans un tube stérile d'une taille adaptée, comme indiqué à l'étape 5 de la *Feuille de calcul*. Si une dilution doit être exécutée, ajouter le volume d'éthanol (2) dans le tube et mélanger minutieusement par pipetage.

Step 5. Lipid mix Preparation

Lipid mix (mL)	0.825	①
Ethanol (mL)	0.000	②
Final volume Lipid mix (mL)	0.825	

Préparation de la solution d'ARN

Pour la manipulation de solutions d'ARN, toujours suivre les recommandations ci-dessous :

- Décongeler les solutions mères d'ARN et les conserver sur de la glace.
- Toujours ouvrir les solutions mères d'ARN dans l'ESB.
- Répartir les solutions mères d'ARN en parts aliquotes dans différents récipients pour ne pas avoir à réaliser plusieurs cycles de décongélation-congélation.
- Ne pas agiter les solutions d'ARN avec un agitateur vortex.
- Avant utilisation, les mélanger délicatement par inversion et pipetage.
- Utiliser des cônes de pipette sans RNase pour mesurer et transférer les solutions d'ARN.

Suivre les étapes ci-dessous pour préparer la solution d'ARN. Pour maintenir l'état stérile des réactifs, effectuer toutes les étapes utilisant des tubes ouverts à l'intérieur de l'ESB.

Étape	Action
1	Récupérer une part aliquote d'ARN congelée, puis la décongeler sur de la glace. Toujours conserver l'ARN sur de la glace afin d'empêcher sa dégradation.
2	Une fois décongelée, mesurer la concentration de la solution mère d'ARN par UV-Vis.
3	Saisir la concentration mesurée de la solution mère d'ARN dans l'étape 1 de la <i>Feuille de calcul</i> .

Step 1. User Input	
Total flow rate (mL/min)	20
Total LNP volume (mL)	2.5
RNA stock concentration (mg/mL)	1
Lipid mix working concentration (ratio of stock concentration)	1
In-line dilution ratio Diluent:Aq+Lipid (X:1)	N/A
Flow rate ratio Aqueous:Lipid (X:1)	3
N/P ratio	8
Lipid mix excess (mL)	0.2
RNA solution excess (mL)	0.3
Start waste (mL)	0.45
End waste (mL)	0.05

Étape	Action
-------	--------

- | | |
|---|---|
| 4 | À l'aide d'une pipette, prélever les volumes de tampon de formulation (1) et d'eau de qualité biologie moléculaire (2) (indiqués à l'étape 6 de la <i>Feuille de calcul</i>) dans un tube destiné à la solution d'ARN. |
|---|---|

Step 6. RNA solution Preparation		
Formulation buffer type 1 (µL)	218	①
Molecular biology grade water (µL)	1790	②
RNA (µL)	168	③
Final volume RNA solution (µL)	2175	

- | | |
|---|---|
| 5 | Ajouter le volume requis d'ARN (3) dans le tube de solution d'ARN, comme indiqué à l'étape 6 de la <i>Feuille de calcul</i> . |
| 6 | Prélever l'échantillon avec précaution à l'aide d'une pipette, le verser, puis mélanger. |
-

Conserver la solution mère 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 Ignite ou Ignite +.

Étape	Action
1	Mettre l'instrument en marche comme décrit dans le <i>Mode d'emploi</i> .
2	Nettoyer l'instrument avec une solution de décontamination des RNases puis avec de l'isopropanol à 70 %.
3	Dans le menu principal, appuyer sur Quick Run (Cycle rapide).
4	Sélectionner les seringues à utiliser pour les solutions L , C et R en se basant sur les volumes calculés nécessaires pour chaque solution, indiqués en gris à l'étape 7 dans la <i>Feuille de calcul</i> .

Remarque :

Il est recommandé d'utiliser la plus petite taille de seringue pouvant recueillir les volumes calculés.

Step 7. Ignite Parameters	
L (Diluent) syringe volume (mL)	N/A
C (Aqueous) syringe volume (mL)	1.88
R (Lipid) syringe volume (mL)	0.63
Flow rate ratio C:R	3:1
Total volume (mL)	2.5
Total flow rate (mL/min)	20
Dilution ratio L:(C+R)	N/A
Start waste (mL)	0.45
End waste (mL)	0.05

- | | |
|---|---|
| 5 | Sur l'interface utilisateur de l'instrument, saisir les paramètres du cycle indiqués dans les cellules oranges de l'étape 7 de la <i>Feuille de calcul</i> . Voir le <i>Mode d'emploi</i> de l'instrument pour plus de détails. |
| 6 | Insérer la cartouche dans l'instrument. |
| 7 | Préparer la seringue R avec le mélange de lipides :
a. Agiter la solution de mélange de lipides à l'aide d'un agitateur vortex. |

Étape	Action
-------	--------

- | | |
|--|--|
| | <p>b. Aspirer la quantité de mélange de lipides requise dans la seringue en utilisant une aiguille émoussée propre.</p> |
|--|--|

Remarque :

Il est recommandé de prélever 100 à 200 µl de mélange supplémentaires dans les seringues pour garantir que le volume complet est administré dans la cartouche.

Astuce :

Pour éviter les bulles d'air, suivre les étapes décrites ci-dessous.

- i. Aspirer 0,2 à 0,3 ml dans la seringue, hors aiguille.*
- ii. Éliminer les éventuelles bulles d'air près du joint d'étanchéité en caoutchouc en tapotant sur la seringue.*
- iii. Avec précaution, évacuer l'air présent dans la seringue jusqu'à ce qu'une goutte apparaisse au bout de l'aiguille.*
- iv. Aspirer le reste de solution dans la seringue, hors aiguille.*

- | | |
|--|---|
| | <p>c. Retirer l'aiguille de la seringue.</p> <p>d. À l'aide du piston, pousser le liquide dans la seringue en évitant tout écoulement au niveau de la pointe de la seringue.</p> <p>e. Vérifier que le volume requis plus un faible volume supplémentaire sont présents dans la seringue R.</p> |
|--|---|

- | | |
|---|--|
| 8 | À partir du tube de solution d'ARN, aspirer la totalité de la solution dans la seringue C en suivant la procédure décrite ci-dessus pour la seringue R . |
|---|--|

Remarque :

Ne pas agiter la solution d'ARN sur un agitateur vortex, mais utiliser plutôt une pipette pour aspirer/verser la solution avec précaution afin de la mélanger.

- | | |
|---|---|
| 9 | Si la procédure inclut une dilution en ligne, prélever le tampon de dilution 1X dans la seringue L en suivant la procédure décrite ci-dessus pour la seringue R . |
|---|---|

- | | |
|----|--|
| 10 | Poursuivre et fixer les seringues R , C et L (si nécessaire), puis commencer la procédure de formulation sur l'instrument comme indiqué dans le <i>Mode d'emploi</i> de ce dernier. |
|----|--|

Traitement en aval des NPL

Suivre les étapes ci-dessous après avoir terminé l'étape de formulation sur l'instrument.

Étape	Action
1	Diluer les NPL-ARN avec le volume de tampon de dilution 1X de l'étape 8 de la <i>Feuille de calcul</i> , afin d'obtenir une dilution totale par 10.

Remarque :

Par exemple, si une dilution en ligne de 2:1 a été effectuée (dilution en ligne par 3), la feuille de calcul calcule le volume de sorte qu'une dilution manuelle par 3,33 avec le tampon de dilution 1X soit ensuite effectuée.

Step 8. Downstream Processing	
Formulated LNP volume (mL)	2
Volume of 1X Dilution buffer to add (mL)	18
Concentrated LNP volume post-centrifugal filtration (mL)	2.00
Final theoretical RNA concentration (µg/mL)	36.1

- | | |
|---|---|
| 2 | Conserver les NPL-ARN diluées sur de la glace jusqu'à la filtration centrifuge. |
| 3 | Remplir les filtres pour centrifugation de NPL-ARN diluées. |
| 4 | Centrifuger à 2000 x g pendant 20 minutes à 4 °C dans un rotor à godets oscillants. |

Remarque :

L'utilisation de vitesses plus élevées permet de réduire le temps de traitement. Toutefois, les structures d'ARN plus longues et plus complexes doivent être manipulées avec précaution. La vitesse maximale recommandée est de 4000 x g.

- | | |
|---|--|
| 5 | Jeter la solution se trouvant en dessous de l'unité de filtration et répéter l'étape 3 et l'étape 4 si nécessaire, jusqu'à ce que la totalité de l'échantillon soit reconcentrée et atteigne approximativement le volume de NPL-ARN de départ. |
| 6 | Effectuer une dilution par 5 avec le tampon de dilution 1X dans le filtre de centrifugation et reconcentrer l'échantillon jusqu'à atteindre le volume de NPL-ARN de départ. |
| 7 | Jeter la solution se trouvant en dessous de l'unité de filtration. |
| 8 | Répéter l'étape 6 et l'étape 7. Lors de la reconcentration, viser un volume équivalant à la moitié du volume de NPL-ARN souhaité. |

Étape Action

- 9 Récupérer l'échantillon dans le filtre à l'aide d'une micropipette, puis le transférer dans le tube de l'échantillon concentré.

Remarque :

Il est recommandé de placer la pipette sur la membrane pour une meilleure récupération de l'échantillon.

- 10 Facultatif : laver la membrane du filtre avec environ 100 à 200 µl de tampon de dilution 1X pour augmenter la récupération des NPL-ARN.
- 11 Mesurer le volume de NPL-ARN récupéré du filtre pour centrifugation, y compris le volume de lavage. Saisir cette valeur à l'étape 8 de la *Feuille de calcul* (1).

Step 8. Downstream Processing	
Formulated LNP volume (mL)	2
Volume of 1X Dilution buffer to add (mL)	18
Concentrated LNP volume post-centrifugal filtration (mL)	2.00 (1)
Final theoretical RNA concentration (µg/mL)	36.1 (2)

La feuille de calcul calcule la concentration théorique de l'échantillon de NPL-ARN final après la dilution avec le tampon de cryoconservation et la filtration stérile (2).

- 12 Prélever avec une pipette des volumes identiques d'échantillon et de tampon de cryoconservation 2X, et les verser dans le tube de tampon de cryoconservation.
- 13 Avec la pipette, aspirer/verser l'échantillon au moins cinq fois afin de mélanger les NPL et le tampon.
- 14 Dans l'ESB, filtrer l'échantillon de cryoconservation en plaçant un filtre stérile de 0,2 µm dans le tube stérile de l'échantillon stérile.

Astuce :

Pour maximiser la récupération des NPL, introduire de l'air dans le filtre à deux ou trois reprises pour garantir la collecte de tous les résidus de NPL.

- 15 Prélever une part aliquote de NPL-ARN pour obtenir le volume requis et la verser dans le tube d'échantillon à analyser.
- 16 Stocker le tube d'échantillon stérile dans un environnement réfrigéré en attendant les résultats de l'analyse physicochimique.
- 17 Mesurer la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Si nécessaire, contacter Cytiva pour obtenir un protocole de mesure détaillé.

Étape	Action
18	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.

Dilution à la concentration voulue

Exécuter les étapes suivantes dans l'ESB pour maintenir le ou les échantillons de NPL-ARN stériles.

Étape	Action
1	Diluer les NPL-ARN à la concentration voulue avec le tampon de cryoconservation 1X. Remarque : <i>S'appuyer sur les résultats de l'essai RiboGreen pour déterminer les volumes nécessaires pour atteindre cette concentration.</i>
2	Pour mélanger minutieusement ces volumes, les aspirer/verser à l'aide d'une pipette à cinq reprises minimum.
3	Répartir l'échantillon en parts aliquotes dans plusieurs tubes pour limiter le nombre de cycles de congélation-décongélation des NPL-ARN. Remarque : <i>Il est recommandé de soumettre les NPL-ARN à un cycle de congélation-décongélation maximum.</i>

Les NPL-ARN sont désormais prêtes à être utilisées. Pour un stockage de courte durée, conserver l'échantillon à 4 °C et l'utiliser dans un délai d'une (1) semaine maximum. Pour un stockage de longue durée (9 mois maximum), conserver les échantillons à -80 °C.

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.

Ignite, Ignite+, NanoAssemblr et NxGen sont des marques de commerce de Global Life Sciences Solutions USA LLC ou de l'une de ses sociétés affiliées opérant sous le nom de Cytiva.

Amicon est une marque de commerce de Merck KGaA. Triton est une marque de commerce de Union Carbide Corporation. RiboGreen et Quant-iT sont des marques de commerce de Thermo Fisher Scientific.

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

© 2024 Cytiva

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

29798795 AA V:3 07/2024