

Mode d'emploi (manuel) du QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit



Version 2

IVD

Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour une utilisation avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



Numéro de référence

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R2 **MAT**

1130780FR

Contenu

Utilisation prévue	4
Utilisateurs prévus	4
Description et principe	5
Résumé et explications	5
Principe de la procédure	5
Matériel fourni.....	7
Contenu du kit	7
Composants du kit.....	8
Matériel nécessaire, mais non fourni	9
Réactifs supplémentaires.....	9
Consommables	9
Équipement.....	9
Avertissements et précautions	10
Informations de sécurité.....	10
Informations d'urgence.....	11
Précautions	11
Mise au rebut	12
Conservation et manipulation des réactifs	13
Stabilité à l'utilisation	13
Conservation et manipulation des échantillons	14
Procédure	15
Protocole : Isolement d'ADN génomique à partir de coupes de tissu FFPE	21

Contrôle qualité.....	25
Limitations.....	26
Caractéristiques de performances.....	27
Guide de dépannage.....	28
Symboles.....	29
Annexe : manipulation	32
Informations pour commander	33
Historique des révisions du document.....	34

Utilisation prévue

Le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit est un système ayant recours à la technologie des membranes de silice (technologie QIAamp) pour l'isolement et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques fixés au formol et inclus en paraffine (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).

Il est destiné à la préparation manuelle des échantillons et ne donne aucun résultat de test, qu'il soit qualitatif ou quantitatif.

Utilisateurs prévus

Ce produit est destiné à des professionnels, tels que les techniciens et les médecins formés aux techniques de biologie moléculaire à des fins de diagnostic in vitro (IVD).

Description et principe

Résumé et explications

Le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit est utilisé pour la purification de l'ADN à partir de coupes de tissu FFPE. Il repose sur la technologie éprouvée QIAamp DNA Micro pour la purification de l'ADN génomique et mitochondrial à partir d'échantillons de faible volume ou taille. Le kit associe les propriétés de liaison sélective de la membrane à base de silice à des volumes d'élution variables.

Les conditions de lyse permettent une purification efficace de l'ADN génomique issu de coupes de tissu FFPE sans recours à une incubation pendant la nuit. L'incubation à température élevée après digestion par Protéinase K élimine une partie du formaldéhyde fixé à l'ADN libéré, ce qui améliore potentiellement le rendement et les performances de l'ADN lors des dosages réalisés en aval. Il est à noter que l'ADN isolé à partir d'échantillons FFPE est souvent d'un poids moléculaire inférieur à l'ADN provenant d'échantillons frais ou congelés. Le degré de fragmentation dépend du type et de l'âge de l'échantillon ainsi que des conditions utilisées lors de la fixation.

Après la lyse des échantillons, la procédure simple du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit convient parfaitement au traitement simultané de plusieurs échantillons.

Il incombe à l'utilisateur de valider les performances du système pour les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN® décrites dans le manuel.

Principe de la procédure

La procédure du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit comprend 6 étapes (Figure 1) :

- Élimination de la paraffine : la paraffine est dissoute dans du xylène puis éliminée.
- Lyse : l'échantillon est lysé à 56 °C dans des conditions dénaturantes en présence de protéinase K.

- Chauffage : l'incubation à 90 °C inverse la réticulation du formol.
- Liaison : l'ADN se lie à la membrane et les contaminants sont évacués.
- Lavage : les contaminants résiduels sont éliminés par lavage.
- Éluion : l'ADN pur et concentré est élué de la membrane.

Procédure du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

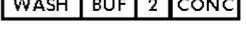


Figure 1. Procédure du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Matériel fourni

Contenu du kit

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	(50)
N° de référence	60404
Nombre de préparations	50

	Désignation	Symboles	Quantité
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Colonnes QIAamp MinElute avec tubes de lavage)		50
WT	Wash Tubes (Tubes de lavage) (2 ml)		3 × 50
ET	Elution Tubes (Tubes d'élution) (1,5 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Tubes de lyse) (2 ml)		50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Tampon de lyse tissulaire)		10 ml
AL	Lysis Buffer* (Tampon de lyse)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Tampon de lavage 1) (concentré)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tampon de lavage 2) (concentré)		13 ml
ATE	Elution Buffer (tampon d'élution)†		12 ml
PK	Protéinase K		1,25 ml
–	Mode d'emploi (Manuel)		1

* Contient du sel de guanidine. Incompatible avec tout désinfectant contenant de l'eau de Javel. Voir page 10 pour les Avertissements et précautions.

† Contient de l'azoture de sodium comme conservateur.

Composants du kit

Les principaux composants du kit sont détaillés ci-dessous.

Tableau 1. Ingrédients actifs dans les réactifs fournis

Réactif		Ingrédients actifs	Concentration (M/M) [%]
Symbole	Nom		
ATL	Buffer ATL	Laurylsulfate de sodium	≥1 à <10
AL	Buffer AL	Chlorhydrate de guanidine Acide maléique	>30 à <50 ≥0,1 à <1
AW1	Buffer AW1	Chlorhydrate de guanidine Éthanol	≥50 à <70 ≥10 à <90
AW2	Buffer AW2	Éthanol	≥10 à <90
ATE	Buffer ATE	Aucun	-
PK	Proteinase K (Protéinase K)	Protéinase K	≥1 à <10

Afin de fausser le moins possible les résultats diagnostiques générés après l'isolement d'ADN, il convient d'utiliser des contrôles adéquats pour les applications en aval.

Matériel nécessaire, mais non fourni

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur des produits.

Réactifs supplémentaires

- Xylène
- Éthanol (96 à 100 %) *

Consommables

- Si l'utilisateur décide de ne pas utiliser les tubes fournis dans le kit, nous recommandons les tubes de microcentrifugation de 1,5 ou 2 ml (pour les étapes de lyse) et les tubes de microcentrifugation de 1,5 ml (pour les étapes d'éluion) (p. ex. ceux disponibles auprès de Sarstedt®, n° de réf. 72.690). Nous recommandons l'utilisation de tubes à fond conique munis de bouchons sûrs et exempts de DNase/RNase. Il incombe à l'utilisateur de valider les performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.
- Pipettes et pointes de pipette (il est fortement recommandé d'utiliser des pointes de pipette à filtre de protection contre les aérosols afin d'éviter toute contamination croisée)

Équipement†

- ThermoMixer‡, agitateur-incubateur orbital, bloc chauffant ou bain-marie permettant une incubation à 56 °C, 70 °C et 90 °C
- Microcentrifugeuse† avec rotor pour tubes de 2 ml
- Agitateur vortex

* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé contenant d'autres substances telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

† Avant utilisation, s'assurer que les instruments ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

‡ Afin que les échantillons soient traités de manière appropriée au cours de procédures QIAamp DSP DNA FFPE, il est fortement recommandé d'étalonner les instruments selon les recommandations du fabricant.

Avertissements et précautions

Conformément à la gestion des risques de QIAGEN, toutes les mesures prévues pour le contrôle des risques ont été prises lors de la conception du produit. Le risque résiduel global est considéré comme acceptable et l'utilisation du dispositif est considérée comme sûre. Le présent manuel contient les consignes, avertissements et précautions garantissant la sécurité et les performances du dispositif. Il convient de les respecter scrupuleusement.

Noter qu'il peut être nécessaire de consulter la réglementation locale avant de signaler tout incident grave survenant en lien avec le produit au fabricant et/ou son représentant agréé et à l'organisme de régulation du pays de l'utilisateur et/ou du patient.

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

ATTENTION NE PAS ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation des échantillons.



- Le Buffer AL et le Buffer AW1 contiennent du chlorhydrate de guanidine qui peut former des composés hautement réactifs au contact de l'eau de Javel.
- En cas de déversement de liquide contenant ce type de tampons, nettoyer à l'eau et à l'aide d'un détergent de laboratoire approprié. Si le liquide déversé contient des agents potentiellement infectieux, nettoyer dans un premier temps la zone concernée à l'eau accompagnée d'un détergent de laboratoire, puis à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v).

- Les prélèvements et les échantillons sont potentiellement infectieux. Jeter les échantillons et les dosages usagés conformément aux procédures de sécurité locales.

Informations d'urgence

CHEMTREC

Aux États-Unis et au Canada +1 800-424-9300

En dehors des États-Unis et du Canada +1 703-527-3887

Précautions

Buffer AL



Contient : chlorhydrate de guanidine et acide maléique. Avertissement ! Peut être nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer une allergie cutanée. Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon. En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Buffer ATL



Avertissement ! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin.

Buffer AW1



Contient : chlorhydrate de guanidine. Avertissement ! Nocif par ingestion ou par inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Proteinase K



Contient : protéinase K. Danger ! Provoque une légère irritation cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée. En cas de symptômes respiratoires : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. EN CAS D'INHALATION : s'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer. Porter un équipement de protection respiratoire.

Mise au rebut

Les déchets contiennent des échantillons et des réactifs. Ceux-ci peuvent contenir des matières toxiques ou infectieuses et doivent être mis au rebut de manière appropriée. Se reporter aux règles de sécurité locales concernant les procédures de mise au rebut appropriées.

Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF sur www.qiagen.com/safety, où il est possible de trouver, consulter et imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

Conservation et manipulation des réactifs

Les colonnes QIAamp MinElute doivent être conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C dès réception et peuvent être utilisées jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur la boîte du kit.

Tous les tampons peuvent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C) et sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation du kit, s'il n'est pas ouvert.

Stabilité à l'utilisation

Les Buffer AW1 et AW2 reconstitués peuvent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C) jusqu'à 1 an ou jusqu'à la date limite d'utilisation du kit, au premier des deux termes échu.

Conservation et manipulation des échantillons

Le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit a été développé pour une utilisation avec des échantillons FFPE.

La stabilité de l'ADN dépend de divers facteurs tels que la collecte, la manipulation, la préparation et les conditions de stockage des échantillons, qui peuvent avoir une incidence sur son utilisation dans l'application en aval. Il est important de consulter le mode d'emploi de l'application spécifique en aval et/ou de vérifier et de valider l'ensemble du flux de travail afin d'établir les conditions appropriées.

Pour des informations générales sur les procédures de laboratoire pour la collecte, la manipulation, la préparation et les conditions de stockage des échantillons FFPE, reportez-vous à la norme ISO 20166-3:2018 « Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) — Partie 3 : ADN isolé » et CLSI MM13-A « Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline ; ».

L'ADN est élué dans le Buffer ATE. Après élution, l'ADN est immédiatement prêt à être utilisé pour des réactions d'amplification ou peut être conservé (les conditions de stockage peuvent varier selon les besoins de l'utilisateur). Se reporter aux manuels des kits correspondants pour connaître les conditions de stockage recommandées pour des applications en aval QIAGEN spécifiques.

Procédure

Remarques importantes avant de commencer

- Tous les réactifs fournis dans le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs du même QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Afin de garantir des performances optimales, les réactifs de ce kit ne doivent pas être remplacés.
- Après réception du kit, vérifier que les composants du kit ne sont pas endommagés. Si les emballages ou les flacons de tampon sont endommagés, contacter les Services Techniques QIAGEN ou votre distributeur local. En cas de déversement de liquide, se reporter à la section « Avertissements et précautions » à la page 10. Ne pas utiliser de composants de kit endommagés. Leur utilisation risque de nuire aux performances du kit.
- Ne pas utiliser de composants provenant d'autres kits avec le kit en cours d'utilisation, à moins que les numéros de lots ne soient identiques.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs du kit.
- Le kit doit uniquement être utilisé par du personnel formé aux pratiques d'un laboratoire de diagnostic in vitro.
- Toujours porter des gants en latex ou en vinyle pour manipuler les réactifs et les échantillons afin d'éviter une contamination provenant de la surface de la peau ou des poussières présentes sur les équipements de laboratoire. Les bactéries et les champignons microscopiques pouvant se trouver dans les particules de poussière et à la surface des mains représentent des sources fréquentes de contamination. Changer souvent de gants et fermer les tubes immédiatement après utilisation.
- Éliminer les tampons non utilisés, les effluents de purification et les restes d'échantillon conformément à la procédure locale.
- En cas de non-utilisation des tubes fournis dans le kit, il est recommandé d'utiliser des tubes à fond conique jetables en polypropylène de 1,5 ml à 2 ml à faible adsorption, exempts de DNase/RNase et munis de bouchons sûrs pendant toute la durée de la procédure de purification.

- Effectuer toutes les étapes de centrifugation à température ambiante (15 à 25 °C).
- Tous les tampons doivent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C) et doivent être mélangés convenablement avant utilisation.
- Préchauffer un ThermoMixer ou un agitateur-incubateur orbital à 56 °C pour l'étape 9. En l'absence d'un ThermoMixer ou d'un agitateur-incubateur orbital, un bloc chauffant ou un bain-marie peut être utilisé.
- En cas de présence de précipités dans le Buffer AL ou le Buffer ATL, les dissoudre à une température de 70 °C sous agitation modérée.
- S'assurer que les Buffer AW1 et AW2 ont été préparés conformément aux instructions fournies ci-dessous.
- Chez QIAGEN, les procédures de contrôle qualité intègrent des tests fonctionnels de validation des kits pour chaque lot de kit donné. Il convient donc de ne pas mélanger des réactifs provenant de lots de kits différents et de ne pas combiner des réactifs provenant de lots de réactifs différents.

Préparation des tampons

Préparation du Buffer ATL

- Avant de commencer la procédure, inspecter le Buffer ATL à la recherche de précipité dans la solution. Si nécessaire, dissoudre le précipité à 70 °C sous agitation modérée.

Préparation du Buffer AL

- Avant de commencer la procédure, inspecter le Buffer AL à la recherche de précipité dans la solution. Si nécessaire, dissoudre le précipité à 70 °C sous agitation modérée.

Préparation du Buffer AW1

- Ajouter 25 ml d'éthanol (96 à 100 %)* au flacon contenant 19 ml de Buffer AW1 concentré. Cocher la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. Le Buffer AW1 reconstitué peut être conservé à température ambiante (15 à 25 °C) jusqu'à 1 an ou jusqu'à la date limite d'utilisation du kit, au premier des deux termes échu. Nous recommandons d'écrire la date de reconstitution sur l'étiquette du tampon.

Remarque : avant de commencer la procédure, mélanger le Buffer AW1 reconstitué en l'agitant.

Préparation du Buffer AW2

- Ajouter 30 ml d'éthanol (96 à 100 %)* au flacon contenant 13 ml de Buffer AW2 concentré. Cocher la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. Le Buffer AW2 reconstitué peut être conservé à température ambiante (15 à 25 °C) jusqu'à 1 an ou jusqu'à la date limite d'utilisation du kit, au premier des deux termes échu. Nous recommandons d'écrire la date de reconstitution sur l'étiquette du tampon.

Remarque : avant de commencer la procédure, mélanger le Buffer AW2 reconstitué en l'agitant.

Échantillons de départ

Les échantillons de départ pour la purification d'ADN sont des coupes de tissu FFPE (idéalement fraîchement coupées). Plusieurs coupes peuvent être associées dans 1 préparation unique. En l'absence d'informations sur la nature de votre échantillon de départ, il est recommandé de commencer avec un nombre maximal de 3 coupes par préparation.

* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé contenant d'autres substances telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

L'utilisateur doit optimiser le nombre de coupes, ainsi que l'épaisseur et la surface des coupes, pour chacune des procédures réalisées dans son laboratoire. Si l'utilisation du kit est associée à une application QIAGEN en aval, se reporter aux consignes du manuel correspondant.

Consignes de manipulation pour éviter les contaminations croisées

En raison de la sensibilité des technologies d'amplification des acides nucléiques, il est nécessaire de prendre les précautions suivantes lors de la manipulation des colonnes QIAamp MinElute afin d'éviter toute contamination croisée entre les échantillons :

- Ne pas introduire une quantité excessive de tissu dans les tubes.
- Utiliser un scalpel différent pour chaque échantillon de tissu prélevé par grattage.
- Transférer avec précaution l'échantillon ou la solution dans la colonne QIAamp MinElute. Déposer l'échantillon à l'aide d'une pipette dans la colonne QIAamp MinElute sans mouiller le bord de la colonne.
- Changer systématiquement les pointes de pipette entre les transferts de liquide. Il est recommandé d'utiliser des pointes de pipette équipées d'un dispositif anti-aérosols.
- Toujours utiliser des tubes de lavage neufs lors des étapes de lavage des échantillons.
- S'assurer que les bouchons des tubes sont complètement fermés avant de les agiter au vortex et de les centrifuger.
- S'assurer que les colonnes QIAamp MinElute sont complètement fermées avant de les centrifuger.
- Après tous les passages au vortex par impulsions et les étapes d'incubation à 90 °C, centrifuger brièvement les tubes de microcentrifugation afin d'éliminer les gouttes présentes à l'intérieur des bouchons.
- Ouvrir 1 seule colonne QIAamp MinElute à la fois et veiller à ne pas générer d'aérosols.
- Toujours utiliser des scalpels différents pour chaque échantillon.
- Changer systématiquement les pointes de pipette entre les transferts de liquide. Pour réduire au minimum les contaminations croisées, il est recommandé d'utiliser des pointes de pipette équipées d'un dispositif anti-aérosols et d'éviter l'utilisation de pipettes à répétition.
- Toujours utiliser des gants jetables et s'assurer régulièrement qu'ils ne sont pas contaminés par l'échantillon. Changer de gants s'ils sont susceptibles d'avoir été contaminés.
- N'ouvrir que 1 tube à la fois.

Centrifugation

Les colonnes QIAamp MinElute sont compatibles avec la plupart des tubes de microcentrifugation standard de 1,5 ml à 2 ml. Les colonnes QIAamp MinElute sont centrifugées à environ 6 000 x g afin de réduire le bruit émis par la centrifugeuse. La centrifugation à vitesse maximale n'améliore pas les rendements en ADN. Toutefois, la centrifugation à vitesse maximale des colonnes QIAamp MinElute est requise dans 2 étapes de la procédure : l'étape de séchage par centrifugation après lavage des membranes et l'étape d'élution. La centrifugation à vitesse maximale est également requise pour descendre l'échantillon après traitement par le xylène et l'étape de lavage à l'éthanol.

Toutes les étapes de centrifugation doivent être effectuées à température ambiante (15 à 25 °C). Une température de centrifugation trop basse peut aboutir à des rendements d'extraction non optimaux.

Traitement des colonnes QIAamp MinElute en microcentrifugeuse

- Toujours fermer les colonnes QIAamp MinElute avant de les installer dans la microcentrifugeuse.
- Éviter de toucher la membrane de la colonne QIAamp MinElute avec la pointe de pipette.
- Les effluents de purification peuvent contenir des déchets dangereux et doivent être éliminés de manière appropriée.
- Pour un traitement efficace de plusieurs échantillons en parallèle, nous recommandons de remplir un portoir avec des tubes de lavage dans lesquels les colonnes QIAamp MinElute peuvent être transférées après centrifugation. Les tubes de lavage usagés contenant les effluents de purification peuvent être éliminés et les tubes de lavage neufs contenant les colonnes QIAamp MinElute peuvent être placés directement dans la microcentrifugeuse.
- S'assurer de garantir la traçabilité complète des échantillons tout au long de la procédure.

Élution de l'ADN purifié

Pour les applications en aval qui exigent de faibles volumes de départ (p. ex. certains dosages PCR), l'obtention d'un éluat plus concentré peut augmenter la sensibilité du dosage mais risque également d'accroître la concentration en inhibiteurs potentiels.

L'augmentation du volume d'élution diminue la concentration en ADN de l'éluat.

Le volume d'éluat récupéré peut être inférieur de 5 µl environ au volume de Buffer ATE appliqué sur la colonne QIAamp MinElute. Par exemple, un volume d'élution de 20 µl donne ≥ 15 µl d'éluat. Le volume d'éluat obtenu dépend de la nature de l'échantillon.

Il incombe à l'utilisateur d'optimiser le volume d'élution pour chaque procédure utilisée dans son laboratoire. Se reporter aux manuels des kits pour connaître les volumes d'élution recommandés pour des applications en aval QIAGEN spécifiques.

Les rendements peuvent être augmentés si la colonne est incubée avec le Buffer ATE à température ambiante pendant 5 minutes, par exemple, avant la centrifugation. L'ADN élué peut être recueilli dans les tubes d'élution de 1,5 ml (fournis). Les conditions de stockage de l'ADN élué dépendent des besoins de l'utilisateur. Se reporter aux manuels des kits pour connaître les conditions de stockage recommandées pour des applications en aval QIAGEN spécifiques.

Protocole : Isolement d'ADN génomique à partir de coupes de tissu FFPE

Procédure

1. À l'aide d'un scalpel, découper la paraffine en excès du bloc d'échantillon.
2. Couper le bloc de tissu pour générer des coupes selon le mode opératoire normal du laboratoire (voir « Échantillons de départ » page 17). L'utilisateur doit optimiser le nombre de coupes, ainsi que l'épaisseur et la surface des coupes, pour chacune des procédures réalisées dans son laboratoire. Garantir la traçabilité des échantillons tout au long de la procédure.
3. Gratter immédiatement le tissu des coupes à l'aide d'un scalpel stérile et introduire l'échantillon dans un tube de lyse (fourni). S'assurer d'introduire tout le tissu disponible dans le tube. Ajouter 1 ml de xylène à l'échantillon, fermer le bouchon et agiter énergiquement au vortex jusqu'à dissolution de la paraffine (p. ex. 10 secondes). Veiller à ce que le tube soit bien fermé pour éviter tout débordement de xylène, toute contamination croisée entre les échantillons et une exposition au xylène.

Remarque : utiliser le xylène sous hotte aspirante ou un autre système de confinement approprié.

4. Centrifuger à vitesse maximale pendant environ 2 minutes à température ambiante pour récupérer le culot de tissu. Si aucun culot n'est observé après centrifugation, répéter cette étape.

Remarque : une température de centrifugation trop basse peut aboutir à des rendements d'extraction non optimaux.

5. Retirer et éliminer le surnageant par pipetage. Conserver le culot.

Le surnageant contient du xylène, un déchet dangereux qui doit être éliminé de manière appropriée conformément à la réglementation locale.

6. Ajouter 1 ml d'éthanol (96 à 100 %) au culot de tissu et mélanger soigneusement à l'agitateur vortex.

L'éthanol extrait le xylène résiduel de l'échantillon et doit être éliminé de manière appropriée.

7. Centrifuger à vitesse maximale pendant environ 2 minutes à température ambiante.

Retirer soigneusement le surnageant par pipetage. Veiller à ne pas aspirer le culot.

Aspirer avec précaution tout l'éthanol résiduel à l'aide d'une pointe de pipette fine.

Ouvrir le tube et incuber entre 15 et 40 °C jusqu'à évaporation de la totalité de l'éthanol résiduel. L'élimination de l'éthanol résiduel est essentielle pour une extraction réussie.

Remarque : une température d'incubation plus basse ralentit l'évaporation, tandis qu'une température plus élevée peut sécher excessivement le culot et rendre sa remise en suspension difficile.

8. Mettre en suspension le culot dans 180 µl de Buffer ATL. Ajouter 20 µl de Protéinase K et mélanger au vortex.

Remarque : pour un rendement optimal, le culot doit être complètement remis en suspension dans le Buffer ATL.

9. Incuber à 56 °C pendant 1 heure environ (ou jusqu'à la lyse complète de l'échantillon).

10. Incubez à 90 °C pendant 1 heure.

L'incubation à 90 °C dans le Buffer ATL inverse partiellement la modification des acides nucléiques induite par le formaldéhyde. Des durées d'incubation plus courtes ou des températures d'incubation plus basses peuvent avoir un effet sur la qualité et la quantité d'ADN. En cas d'utilisation de 1 seul bloc chauffant, laisser l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C jusqu'à ce que le bloc chauffant ait atteint 90 °C.

11. Centrifuger brièvement le tube afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.

12. Ajouter 200 µl de Buffer AL et mélanger soigneusement au vortex. Ensuite, ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100 %) et mélanger à nouveau soigneusement au vortex.

Il est essentiel de mélanger immédiatement et soigneusement l'échantillon, le Buffer AL et l'éthanol à l'aide d'un agitateur vortex ou par pipetage pour obtenir une solution homogène. Le Buffer AL et l'éthanol peuvent être mélangés au préalable et ajoutés ensemble en 1 seule étape pour gagner du temps lorsque plusieurs échantillons sont traités en même temps. Un précipité blanc peut se former lors de l'ajout du Buffer AL et de l'éthanol. Ce précipité n'interfère pas avec la procédure QIAamp. Toujours utiliser un mélange fraîchement préparé et l'éliminer immédiatement après utilisation.

13. Centrifuger brièvement le tube afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.
14. Transférer avec précaution la totalité du lysat vers la colonne QIAamp MinElute (dans un tube de lavage de 2 ml) sans mouiller le bord, fermer le capuchon et centrifuger à 6 000 x g pendant au moins 1 minute. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un tube de lavage de 2 ml propre (fourni) et jeter le tube de lavage contenant l'effluent.
Si la totalité du lysat n'a pas traversé la membrane après centrifugation, centrifuger à nouveau à vitesse plus élevée jusqu'à ce que la colonne QIAamp MinElute soit vide.
15. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 500 µl de Buffer AW1 reconstitué sans toucher le rebord. Fermer le capuchon et centrifuger à 6 000 x g pendant au moins 1 minute. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un tube de lavage de 2 ml propre et jeter le tube de lavage contenant l'effluent.
16. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 500 µl de Buffer AW2 reconstitué sans toucher le rebord. Remettre en place le bouchon et centrifuger à 6 000 x g pendant ≥ 1 min. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un tube de lavage de 2 ml propre et jeter le tube de lavage contenant l'effluent.
Tout contact entre la colonne QIAamp MinElute et l'effluent doit être évité. Veiller à équilibrer le rotor de la centrifugeuse. Certains rotors de centrifugeuse peuvent vibrer lors de la décélération, cela entraîne un contact entre l'effluent, qui contient l'éthanol, et la colonne QIAamp MinElute. Veiller à retirer prudemment la colonne QIAamp MinElute et le tube de lavage du rotor pour éviter tout contact entre l'effluent et la colonne QIAamp MinElute.
17. Centrifuger à vitesse maximale (environ 20 000 x g) pendant environ 3 minutes pour sécher la membrane.
Le transfert d'éthanol dans l'éluat peut interférer avec certaines applications en aval.

18. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un tube d'élution de 1,5 ml propre (fourni) et éliminer le tube de lavage contenant l'effluent. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 20 à 200 µl de Buffer ATE au centre de la membrane.
Important : lors de l'utilisation de volumes d'élution faibles (<50 µl), déposer le Buffer ATE au centre de la membrane pour permettre l'élution de la totalité de l'ADN lié. Les colonnes QIAamp MinElute offrent une certaine souplesse par rapport au volume d'élution. Le volume d'élution peut donc être choisi selon les besoins de l'application en aval. Le volume d'éluat sera inférieur de 5 µl environ au volume de tampon d'élution appliqué sur la colonne.
19. Fermer le capuchon et incuber à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 1 minute. Centrifuger à vitesse maximale (environ 20 000 x g) pendant au moins 1 minute.
Une fois le Buffer ATE déposé sur la membrane, l'incubation de la colonne QIAamp MinElute pendant environ 5 minutes à température ambiante avant centrifugation peut améliorer le rendement en ADN.

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits est testé au regard de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

Limitations

Les performances du kit ont été établies à l'aide de tissus FFPE pour l'isolement d'ADN génomique.

Une fixation insuffisante ou excessive peut avoir une incidence sur la qualité de l'ADN, ce qui se traduit par des performances médiocres dans les dosages en aval.

Le formol résiduel peut inhiber l'étape de digestion à la protéinase K. Veiller à une déshydratation complète des échantillons avant l'inclusion.

L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

Afin de fausser le moins possible les résultats diagnostiques, il convient d'utiliser des contrôles adéquats pour les applications en aval. Pour une validation plus approfondie, il est conseillé de suivre les directives de la Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques (ICH) exposées dans *ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures : Text And Methodology*.

Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés à la lumière des autres observations cliniques ou résultats biologiques disponibles.

S'il est présent dans l'échantillon, l'ARN peut être purifié en même temps que l'ADN à l'aide du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Caractéristiques de performances

Les caractéristiques de performances sont disponibles sous l'onglet Resource (Ressources) sur la page du produit, sur www.qiagen.com.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous permettre de résoudre les problèmes éventuels. Pour de plus amples informations, consulter également la page de la foire aux questions dans notre centre d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des services techniques QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et/ou protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosage (pour les coordonnées, visiter le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Colonnes QIAamp MinElute obstruées

- | | |
|---|---|
| a) Échantillon de départ excessif | Réduire la quantité d'échantillon de départ. Il est primordial d'utiliser la quantité juste d'échantillon de départ (voir page 17). |
| b) Température de centrifugation trop basse | La température de centrifugation doit être de 15 à 25 °C. Certaines centrifugeuses peuvent refroidir à moins de 15 °C même si elles sont réglées à 20 °C. Cela peut entraîner la formation de précipités susceptibles d'obstruer les colonnes QIAamp MinElute. Le cas échéant, régler la température de centrifugation entre 15 et 25 °C. |

Faible rendement d'ADN

- | | |
|---|--|
| a) Échantillon de départ excessif | La surcharge de la QIAamp MinElute Spin Column réduit nettement le rendement d'acides nucléiques. Réduire la quantité d'échantillon de départ (voir page 17). |
| b) ADN toujours lié à la membrane de la Rneasy MinElute Spin Column | Répéter l'éluion d'ADN, mais incuber la QIAamp MinElute Spin Column sur la paillasse pendant 10 minutes avec du Buffer ATE (tampon d'éluion) avant centrifugation. |
| c) Conservation inadaptée des tampons/réactifs | Les QIAamp MinElute Spin Columns doivent être conservées entre 2 et 8 °C dès réception du kit. Vérifier la bonne température de conservation car l'exposition à des températures élevées pendant une période prolongée peut induire une perte de fonctionnalité. |

Valeur faible du rapport A_{260}/A_{280}

De l'eau a été utilisée pour diluer l'acide nucléique pour la mesure du rapport A_{260}/A_{280}	Utiliser du 10 mM Tris Cl, pH 7,5, et pas d'eau pour diluer l'échantillon avant de mesurer la pureté.
---	---

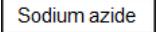
L'ADN ne réagit pas bien dans les applications/dosages en aval

Transfert d'éthanol	Une centrifugation des colonnes QIAamp MinElute à vitesse maximale est nécessaire à 2 étapes de la procédure : lors du deuxième lavage avec le Buffer AW2, il faut centrifuger à $\geq 8\ 000 \times g$ pendant 2 minutes entre 15 et 25 °C pour sécher la membrane de la QIAamp MinElute Spin Column. Après la centrifugation, retirer la délicatement la colonne du tube de prélèvement pour lui éviter tout contact avec l'effluent. Placer ensuite la colonne dans un nouveau tube de prélèvement et centrifuger à pleine vitesse pendant 5 minutes. La centrifugation à vitesse maximale est également requise pour descendre l'échantillon après le traitement au xylène et l'étape de lavage à l'éthanol.
---------------------	--

Symboles

Les symboles suivants apparaissent dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et l'étiquetage :

Symbole	Définition du symbole
	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Ce produit est conforme aux exigences de la réglementation européenne 2017/746 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
	Composants
	Contient
	Nombre

Symbole	Définition du symbole
	Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Limites de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	Conserver à l'abri des rayons du soleil
	Avertissement/Attention
	Protéinase K
	Azoture de sodium
	À réception

Symbole

Définition du symbole



Noter la date du jour sur le flacon après avoir ajouté l'éthanol

EtOH

Éthanol

ADD

Ajouter

GuHCl

Chlorhydrate de guanidine

MALEIC ACID

Acide maléique

UDI

Identifiant unique du dispositif

Annexe : manipulation

Manipulation générale

Toujours porter des gants en latex ou en vinyle pour manipuler les réactifs et les échantillons afin d'éviter une contamination provenant de la surface de la peau ou des poussières présentes sur les équipements de laboratoire. Les bactéries et les champignons microscopiques pouvant se trouver dans les particules de poussière et à la surface des mains représentent des sources fréquentes de contamination. Changer souvent de gants et fermer les tubes immédiatement après utilisation. Éviter toute contamination microbienne des réactifs du kit.

Consommables en plastique jetables

L'utilisation de tubes en polypropylène jetables et stériles est recommandée pour l'ensemble de la procédure.

Informations pour commander

Produit	Contenu	N° de réf.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – pour la purification d’ADN génomique de tissus inclus en paraffine		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d’ADN : 50 colonnes QIAamp MinElute, protéinase K, tampons, tubes de lavage (2 ml), tubes d’élution (1,5 ml), tubes de lyse (2 ml)	60404

Pour obtenir des informations actualisées sur les licences et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le mode d’emploi du kit QIAGEN correspondant. Les instructions d’utilisation des kits QIAGEN sont disponibles sur le site www.qiagen.com ou peuvent être demandées aux services techniques QIAGEN ou à votre distributeur local.

Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, juin 2022	<ul style="list-style-type: none">● Mise à jour du kit version 2 pour la conformité IVDR● Mise à jour de la section Description et principe● Mise à jour de la section Matériel nécessaire, mais non fourni● Mise à jour de la section Avertissements et précautions● Mise à jour de la section Conservation et manipulation des réactifs● Mise à jour de la section Guide de dépannage● Mise à jour de l'annexe
R2, février 2023	<ul style="list-style-type: none">● Mise à jour de la section Stockage et manipulation des prélèvements

Contrat de licence limitée pour le QIAamp DSP DNA Kit

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit doit être utilisé uniquement avec les composants du panel, conformément aux protocoles fournis avec le produit et à ce manuel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du panel consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de ce Contrat de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de ce Contrat de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au panel et/ou à ses composants.

Pour prendre connaissance des termes de licence mis à jour, consulter le site www.qiagen.com.

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (groupe QIAGEN) ; Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

Févr-2023 HB-3033-002 1130780FR © 2023 QIAGEN, tous droits réservés.

Pour commander www.qiagen.com/shop | Assistance technique support.qiagen.com |
Site Web www.qiagen.com