

Instructions d'utilisation (Manuel) du QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit



50

Version 2



Pour utilisation diagnostique in vitro



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne



R1

1127632FR

Sommaire

Utilisation prévue	4
Utilisateurs prévus	4
Description et principe	5
Volumes d'échantillon	5
Lyse des échantillons.....	7
Adsorption sur la membrane de la colonne QIAamp Mini	7
Élimination des restes de contaminants.....	7
Élution des acides nucléiques purs.....	8
Rendement et taille des acides nucléiques	8
Description des protocoles.....	9
Résumé et explications	9
Matériel fourni.....	10
Contenu du kit	10
Composants du kit.....	11
Matériel nécessaire, mais non fourni	12
Réactifs supplémentaires.....	12
Consommables	12
Équipement.....	13
Avertissements et précautions	14
Informations de sécurité.....	14
Informations d'urgence.....	15
Précautions	15

Mise au rebut	16
Stockage et manipulation des réactifs.....	17
Stabilité à l'utilisation	17
Stockage et manipulation des prélèvements	18
Procédure	19
Préparation des tampons et des réactifs.....	26
Protocole Breeze : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain	29
Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain	34
Contrôle qualité.....	39
Limitations.....	39
Caractéristiques de performances.....	40
Références	41
Guide de dépannage.....	42
Symboles.....	45
Annexe A : recommandation pour la séparation et le stockage du plasma sanguin	48
Annexe B : remarques générales sur la manipulation de l'ARN	50
Informations pour commander	51
Historique des révisions du document.....	52

Utilisation prévue

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit est un système faisant appel à une technologie à base de membranes de silice (la technologie QIAamp) pour isoler et purifier l'ADN et l'ARN libres circulants à partir d'échantillons de plasma sanguin humain.

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit est conçu pour une utilisation diagnostique in vitro.

Utilisateurs prévus

Ce produit est destiné à l'usage des professionnels, tels que les techniciens et les médecins formés aux techniques de la biologie moléculaire.

Description et principe

La procédure QIAamp DSP Circulating NA comprend 4 étapes (lyse, fixation, lavage et élution) et s'effectue sur le système QIAvac à l'aide de colonnes QIAamp Mini. Cette procédure robuste permet de réduire au minimum la contamination croisée entre les échantillons et augmente la sécurité de l'utilisateur lors des manipulations d'échantillons potentiellement infectieux.

Grâce à cette procédure simple, un total de 24 échantillons peut être traité en parallèle en moins de 2 heures.

Volumes d'échantillon

Les colonnes QIAamp Mini fixent les acides nucléiques fragmentés dont la taille ne dépasse pas 20 nt, mais la quantité obtenue dépend du volume d'échantillon et de la concentration en acides nucléiques circulants de l'échantillon (généralement 1–100 ng/ml dans le plasma). La procédure QIAamp DSP Circulating NA a été optimisée pour les volumes d'échantillons de 5 ml au maximum.

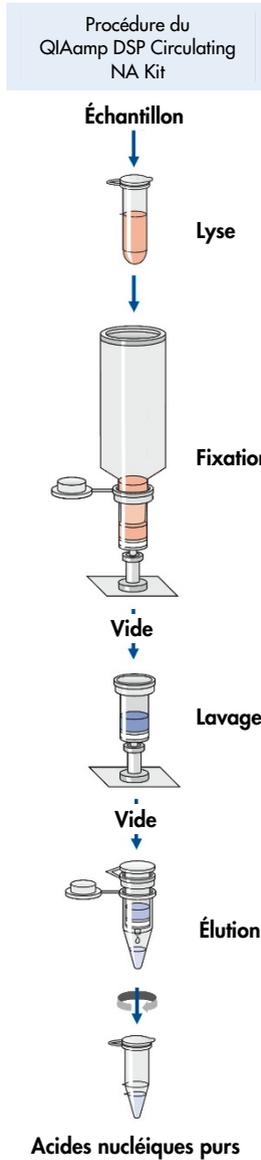


Figure 1. Vue d'ensemble de la procédure du QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Lyse des échantillons

Les acides nucléiques circulants présents dans les liquides biologiques sont généralement liés à des protéines ou contenus dans des vésicules. Il faut donc une étape de lyse efficace pour libérer les acides nucléiques afin de les fixer sélectivement à la colonne QIAamp Mini. Par conséquent, les échantillons sont lysés dans des conditions de forte dénaturation à des températures élevées en présence de protéinase K et de Buffer ACL, ce qui assure l'inactivation des DNases et des RNases et la libération des acides nucléiques liés aux protéines, lipides et vésicules.

Adsorption sur la membrane de la colonne QIAamp Mini

Afin d'optimiser la fixation des acides nucléiques circulants sur la membrane, les conditions de fixation sont ajustées par l'ajout de Buffer ACB au lysat. Les lysats sont ensuite transférés sur une colonne QIAamp Mini et les acides nucléiques circulants sont adsorbés à partir d'un grand volume sur la membrane de silice tandis que les lysats sont entraînés par la pression du vide. Les conditions salines et de pH garantissent que la majorité des protéines et des autres contaminants, qui peuvent inhiber la PCR et les autres réactions enzymatiques en aval, ne sont pas retenus sur la membrane de la colonne QIAamp Mini.

Le protocole requiert un collecteur à vide (p.ex. le QIAvac 24 Plus avec le QIAvac Connecting System) et une pompe à vide capable de produire un vide d'environ 800 à 900 mbar (p.ex. QIAGEN® Vacuum Pump). Un Vacuum Regulator (inclus dans le QIAvac Connecting System) doit être utilisé pour faciliter la surveillance de la pression du vide et l'arrêt du vide.

Élimination des restes de contaminants

Les acides nucléiques restent liés à la membrane tandis que les contaminants sont éliminés efficacement par 3 étapes de lavage.

Élution des acides nucléiques purs

L'élution est réalisée à l'aide de Buffer AVE. En une seule étape, les acides nucléiques circulants de haute pureté sont élués dans le Buffer AVE ramené à température ambiante. Le volume d'élution utilisé peut varier entre 50 et 150 µl. Si des concentrations plus élevées en acides nucléiques sont nécessaires, le volume d'élution peut être réduit jusqu'à 20 µl. Les volumes d'élution inférieurs à 50 µl donnent des éluats d'acides nucléiques plus concentrés, mais peuvent entraîner une diminution du rendement total.

Le volume d'éluat récupéré peut être inférieur de 5 µl au volume de tampon d'élution appliqué sur la colonne.

Rendement et taille des acides nucléiques

Puisque les rendements en acides nucléiques libres circulants isolés à partir des échantillons biologiques sont généralement inférieures à 1 µg, il est difficile de les déterminer avec un spectrophotomètre. Le rendement absolu en ADN ou ARN circulant obtenu à l'aide du QIAamp DSP Circulating NA Kit varie entre les échantillons qui proviennent de différents individus et dépend également d'autres facteurs (p.ex. certaines affections). De plus, l'ARN vecteur présent dans les acides nucléiques extraits est susceptible de dominer le signal dans les mesures d'absorbance UV (voir page 27). Il est recommandé de déterminer les rendements par des méthodes d'amplification quantitative.

La distribution de la taille des acides nucléiques circulants purifiés à l'aide du QIAamp DSP Circulating NA Kit peut être vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose, par hybridation à une sonde marquée spécifique de la cible (1) ou avec une solution d'électrophorèse microfluidique (p.ex. Agilent® Bioanalyzer).

Description des protocoles

Ce manuel contient deux protocoles différents.

- Le « Protocole Breeze : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain » (page 29) permet de traiter jusqu'à 5 ml de plasma par étapes de 1 ml et a été optimisé pour réduire la durée des manipulations et d'exécution.
- Le « Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain » (page 34) permet de traiter jusqu'à 5 ml de plasma par étapes de 1 ml et est identique au protocole de la 3^e révision (R3) du *Manuel du QIAamp DSP Circulating NA Kit*, version 1.

Résumé et explications

Les acides nucléiques libres circulants sont présents dans le plasma humain, en général sous forme de fragments courts d'une taille inférieure à 1 000 pb pour l'ADN ou 1 000 nt pour l'ARN, ou encore d'une taille réduite à 20 nt pour les miARN. La concentration en acides nucléiques libres circulants dans le plasma sanguin humain est généralement faible et varie considérablement entre les individus dans une plage de 1 à 100 ng/ml pour les échantillons humains (2–6).

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit permet de purifier efficacement les acides nucléiques circulants à partir du plasma humain. Il peut être utilisé avec des échantillons venant d'être préparés ou préalablement congelés. Les Extension Tubes et le traitement sous vide à l'aide du QIAvac 24 Plus permettent d'utiliser des volumes de départ pouvant aller jusqu'à 5 ml et la plage des volumes d'élution entre 20 et 150 µl offre la flexibilité nécessaire pour concentrer les acides nucléiques présents en faibles concentrations.

L'ADN ou l'ARN génomique libre circulant élué peut être stocké ou utilisé directement dans des applications en aval. L'utilisateur doit optimiser la quantité de plasma et le volume d'élution en fonction de sa cible spécifique et de l'application en aval du laboratoire.

Matériel fourni

Contenu du kit

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
N° de référence	61504
Nombre de préparations	50

	Identité	Symboles	Quantité
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (colonnes QIAamp Mini avec tubes de lavage [WT]) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (éléments d'extension de colonnes) (20 ml)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tubes (tubes de lavage) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (tubes d'éluion) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer (tampon de lyse)*	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer (tampon de liaison)* (concentré)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (tampon de lavage 1)* (concentré)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (tampon de lavage 2)† (concentré)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer (tampon d'éluion)† (bouchons violets)	ELU BUF	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (protéinase K QIAGEN)	PROTK	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (ARN vecteur) (bouchons rouges)	CAR RNA	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (colonnes QIAamp Mini avec tubes de lavage [WT]) (2 ml)	COL	50
	Manuel	H B	1

* Contient un sel chaotropique. Voir page 14 pour les Avertissements et précautions.

† Contient de l'azote 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		Ingrédient actif	Concentration
Symbole	Nom		
ACL	Lysis Buffer (Tampon de lyse)	Thiocyanate de guanidine	≥ 30 à < 50 % p/p
ACB	Binding Buffer (Tampon de liaison) (concentré)	Thiocyanate de guanidine	≥ 30 à < 50 % p/p
ACW1	Wash Buffer 1 (Tampon de lavage 1) (concentré)	Chlorhydrate de guanidine	≥ 30 à < 60 % p/p
ACW2	Wash Buffer 2 (Tampon de lavage 2) (concentré)	Aucun	–
AVE	Elution Buffer (Tampon d'élution) (bouchons violets)	Aucun	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K (protéinase K QIAGEN)	Protéinase K	≥ 1 à < 3 % p/p
Carrier	Carrier RNA (ARN vecteur) (bouchons rouges)	Aucun	–

Contrôles et étalons

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

Matériel nécessaire, mais non fourni

Réactifs supplémentaires

- Éthanol (96–100 %) *
- Isopropanol (100 %)
- Glace pilée (uniquement pour le « Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain ».)
- Certains échantillons peuvent requérir une dilution avec un tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline, PBS)

Consommables

- Pipettes (réglables)
- Cônes de pipette stériles (il est recommandé d'utiliser des cônes de pipettes avec barrières à aérosol afin d'éviter la contamination croisée).
- Microtubes de 1,5 ou 2 ml sans nucléase
- Tubes de centrifugation de 50 ml

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

Équipement

- Bain-marie ou bloc chauffant capable de maintenir des tubes de centrifugation de 50 ml à 56 °C ou 60 °C.*
- Bloc chauffant ou équivalent pouvant maintenir à 56 °C des tubes de lavage de 2 ml (uniquement pour le protocole classique)*
- Vortex
- Microcentrifugeuse (avec rotor pour tubes de 2 ml)*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (N° de réf. 19413)
- QIAvac Connecting System (N° de réf. 19419) ou équivalent
- Vacuum Pump (N° de réf. 84010 [États-Unis et Canada], 84000 [Japon] ou 84020 [reste du monde]) ou pompe équivalente capable de produire un vide de -800 à -900 mbar
- Matériel facultatif : VacValves (n° de réf. 19408)

* Vérifier que les instruments ont été contrôlés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

Avertissements et précautions

Notez 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 à l'organisme de régulation du pays de l'utilisateur et/ou du patient.

Pour utilisation diagnostique in vitro

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.

AVERTISSEMENT Risque de blessure personnelle



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

Les Buffer ACL, Buffer ACB et Buffer ACW1 contiennent des sels de guanidine, qui peuvent former des composés hautement réactifs au contact de l'eau de Javel.

En cas de déversement de ces tampons, nettoyer avec un détergent de laboratoire approprié et de l'eau. Si le liquide renversé contient des agents potentiellement infectieux, nettoyer l'endroit contaminé d'abord avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'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

Les remarques suivantes sur les risques et conseils de prudence s'appliquent aux composants du QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Buffer ACB



Contient du thiocyanate de guanidine. Danger ! Nocif en cas d'ingestion. Peut être nocif en cas de contact avec la peau ou d'inhalation. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Dégage un gaz très toxique au contact d'un acide. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. 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. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Buffer ACL



Contient du thiocyanate de guanidine. Danger ! Nocif en cas d'ingestion. Peut être nocif en cas de contact avec la peau ou d'inhalation. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Dégage un gaz très toxique au contact d'un acide. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. 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. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Buffer ACW1



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

Proteinase K



Contient de la 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/fines gouttes/vapeurs/aérosols. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Porter un équipement de protection respiratoire. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée.

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 en vigueur concernant les procédures de mise au rebut.

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

Stockage et manipulation des réactifs

Les colonnes QIAamp Mini doivent être stockées au sec entre 2 et 8 °C. Tous les tampons doivent être stockés à température ambiante (15–25 °C). Les colonnes QIAamp Mini et les tampons peuvent être stockés dans ces conditions jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte du kit sans diminution des performances.

L'ARN vecteur lyophilisé peut être stocké à température ambiante (15–25 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. L'ARN vecteur doit être dissous dans le Buffer AVE ; l'ARN vecteur dissous doit être immédiatement ajouté au Buffer ACL, comme décrit page 30 pour le protocole Breeze et page 35 pour le protocole classique. Cette solution doit être préparée extemporanément. Tout reste non utilisé d'ARN vecteur dissous dans le Buffer AVE doit être congelé sous forme d'aliquotes entre –30 °C et –15 °C.

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit contient une solution de protéinase K prête à l'emploi, qui est dissoute dans un tampon de conservation spécialement conçu. La protéinase K est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette lorsqu'elle est stockée à température ambiante (15–25 °C).

Stabilité à l'utilisation

Le kit peut être utilisé pendant les 12 mois suivant la première utilisation ou jusqu'à la date d'expiration, au premier des deux termes échu.

Stockage et manipulation des prélèvements

Stockage et manipulation du sang

Pour éviter la dégradation des acides nucléiques libres et la libération des acides nucléiques cellulaires, nous recommandons de stocker le sang total pendant une durée maximale de 6 heures entre 2 et 8 °C (p. ex. échantillons de sang EDTA). En cas d'utilisation de tubes de prélèvement sanguin stabilisé, tenir compte des conditions de stockage données par le fabricant. Nous recommandons de valider ces conditions de stockage en fonction de votre application en aval et de votre cible.

Stockage et manipulation du plasma

En cas d'utilisation d'EDTA comme anticoagulant, il est recommandé d'effectuer la séparation du plasma et l'isolement des acides nucléiques immédiatement après le prélèvement sanguin, en particulier pour l'ARN. Pour un stockage de courte durée, le plasma peut être stocké pendant 24 heures entre 2 et 8 °C.

Pour un stockage de plus longue durée, les aliquotes de plasma provenant de tubes de prélèvement sanguin non stabilisés ou stabilisés peuvent être stockées à -20 °C ou -80 °C pendant 12 mois maximum (ADN uniquement) ou à -80 °C pendant 4 semaines (ARN).

Stockage des acides nucléiques élués

Les acides nucléiques élués sont collectés dans des tubes d'élution de 1,5 ml (fournis). Les acides nucléiques circulants purifiés peuvent être stockés jusqu'à 24 heures entre 2 et 8 °C. Pour un stockage au-delà de 24 heures, il est recommandé de stocker l'ADN entre -30 °C et -15 °C et l'ARN entre -90 °C et -60 °C pour les applications en aval.

Procédure

Points importants avant de commencer

QIAvac 24 Plus

Le QIAvac 24 Plus est conçu pour traiter avec rapidité et efficacité un maximum de 24 colonnes de centrifugation QIAGEN en parallèle. Les échantillons et les solutions de rinçage sont entraînés à travers la membrane des colonnes sous l'effet du vide et non par centrifugation, ce qui accroît la vitesse et réduit la durée des manipulations dans les procédures de purification.

Associé au QIAvac Connecting System, le QIAvac 24 Plus peut être utilisé pour gérer l'effluent des échantillons. L'effluent des échantillons est collecté dans un flacon à déchets séparé.

Pour la maintenance du QIAvac 24 Plus, consulter les consignes dans le *manuel du QIAvac 24 Plus*.

Traitement des colonnes QIAamp Mini sur le QIAvac 24 Plus

Le traitement des colonnes QIAamp Mini sur le QIAvac 24 Plus s'effectue à l'aide de VacConnectors jetables et de VacValves réutilisables. Les VacValves (facultatives) sont insérées directement dans les emplacements luer du collecteur QIAvac 24 Plus. Elles garantissent la stabilité du débit, simplifiant le traitement en parallèle de différents volumes d'échantillons. Il est recommandé de les utiliser si les débits d'échantillons diffèrent notablement pour assurer un vide homogène. Les VacConnectors sont des connecteurs jetables qui se placent entre les colonnes QIAamp Mini et les VacValves ou entre les colonnes QIAamp Mini et les emplacements luer du QIAvac 24 Plus. Ils empêchent tout contact direct entre la colonne de centrifugation et la VacValve pendant la purification, évitant ainsi toute contamination croisée entre les échantillons. Les VacConnectors ne peuvent resservir et doivent être jetés après utilisation. En raison des grands volumes de solutions utilisés, il est nécessaire d'utiliser le QIAvac Connecting System (ou un montage équivalent avec des flacons à déchets) (voir Figure 2).

Consignes de manipulation du QIAvac 24 Plus

- Veiller à toujours placer le QIAvac 24 Plus sur une paillasse ou un espace de travail sécurisé. En cas de chute, le collecteur QIAvac 24 Plus peut se fissurer.
- Veiller à toujours nettoyer et sécher le QIAvac 24 Plus avant de le ranger. Pour les procédures de nettoyage, voir le *Manuel du QIAvac 24 Plus*.
- Les composants du QIAvac 24 Plus peuvent être endommagés par certains solvants (Tableau 2). En cas de déversements de ces solvants sur l'unité, la rincer abondamment avec de l'eau.
- Pour assurer la régularité des performances, ne pas appliquer de silicone ni de graisse à vide sur aucune partie du collecteur QIAvac 24 Plus.
- Veiller à toujours faire preuve de prudence et à toujours porter des lunettes de protection lorsque vous travaillez à proximité d'un collecteur à vide sous pression.
- Contacter les Services techniques de QIAGEN ou votre distributeur local pour les informations sur les pièces de rechange ou de remplacement.
- La pression du vide correspond à la différence de pression entre l'intérieur du collecteur à vide et l'atmosphère (pression atmosphérique normale, soit 1 013 millibars ou 760 mm Hg). Elle peut être mesurée à l'aide du QIAvac Connecting System (voir Figure 2). Les protocoles requièrent l'utilisation d'une pompe à vide capable de produire un vide de -800 à -900 mbar (p. ex. QIAGEN Vacuum Pump). Il faut éviter les pressions du vide supérieures. L'utilisation de pressions du vide inférieures aux pressions recommandées peut réduire la quantité et la pureté des acides nucléiques et accroître le risque d'obstruction des membranes.

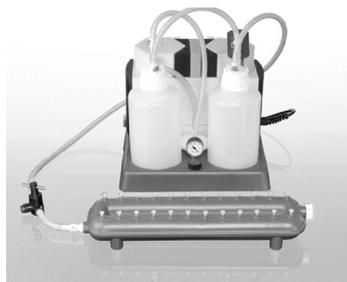


Figure 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System et Vacuum Pump.

Tableau 2. Propriétés de résistance aux produits chimiques du QIAvac 24 Plus.

Résistant à		Non résistant à
Acide acétique	Sels chaotropiques	Benzène
Acide chromique	Alcools concentrés	Phénol
SDS	Chlorure de sodium	Chloroforme
Tween™ 20	Urée	Toluène
Eau de Javel	Acide chlorhydrique	Éthers
Hydroxyde de sodium		

Mise en place du QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Connecter le QIAvac 24 Plus à une source de vide. En cas d'utilisation du QIAvac Connecting System, connecter le système au collecteur et à la source de vide, comme décrit dans l'annexe A du *manuel du QIAvac 24 Plus*.
2. Insérer une VacValve (facultative) dans chaque emplacement luer du QIAvac 24 Plus à utiliser (voir Figure 3). Boucher les emplacements luer non utilisés avec des bouchons luer ou fermer la VacValve insérée.
Si les débits d'échantillons diffèrent notablement, il est recommandé d'utiliser les VacValves pour assurer un vide homogène.
3. Insérer un VacConnector dans chaque VacValve (voir Figure 3).
Effectuer cette étape directement avant le début de la purification afin d'éviter l'exposition des VacConnectors aux contaminants potentiels dans l'air.
4. Placer les colonnes QIAamp Mini dans les VacConnectors sur le collecteur (voir Figure 3).
Remarque : conserver le tube de lavage contenu dans l'emballage pour l'utiliser pendant le protocole de purification.
5. Insérer un élément d'extension de colonne (20 ml) dans chaque colonne QIAamp Mini (voir Figure 3).
Remarque : veiller à ce que l'élément d'extension de colonne soit bien inséré dans la colonne QIAamp Mini afin d'éviter toute fuite d'échantillon.

6. Pour la purification des acides nucléiques, respecter les instructions indiquées dans les protocoles. Jeter les VacConnectors de façon appropriée après utilisation.

Laisser le couvercle de la colonne QIAamp Mini ouvert pendant l'application du vide. Arrêter le vide entre les étapes afin de garantir l'application d'un vide homogène pendant le traitement. Pour permettre un arrêt rapide du vide, utiliser un Vacuum Regulator (inclus dans le QIAvac Connecting System).

Remarque : chaque VacValve peut être fermée séparément quand l'échantillon est complètement passé à travers la colonne de centrifugation, ce qui permet de traiter en parallèle des échantillons de différents volumes ou viscosités.

7. Après le traitement des échantillons, nettoyer le QIAvac 24 Plus (voir « Nettoyage et décontamination du QIAvac 24 Plus » dans le *manuel du QIAvac 24 Plus*).

Remarque : les Buffer ACL, Buffer ACB et Buffer ACW1 ne sont pas compatibles avec les agents désinfectants contenant de l'eau de Javel. Voir page 14 pour les Avertissements et précautions.

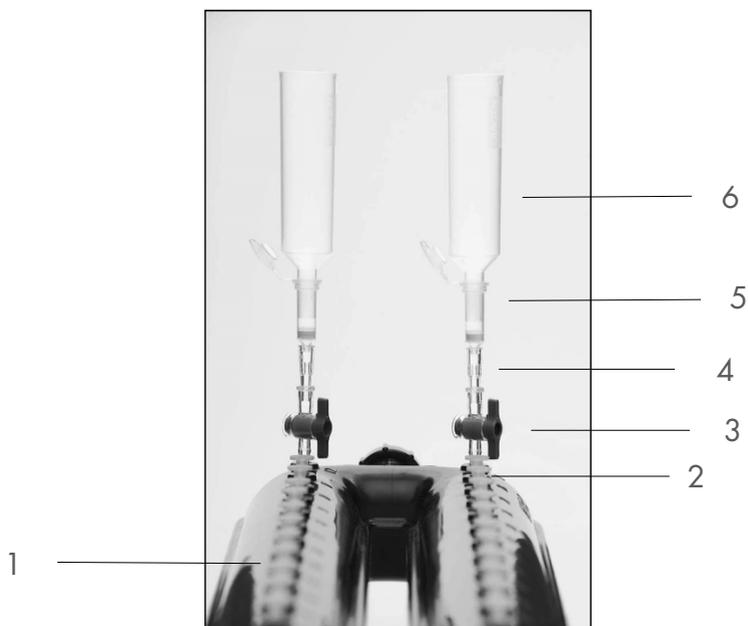
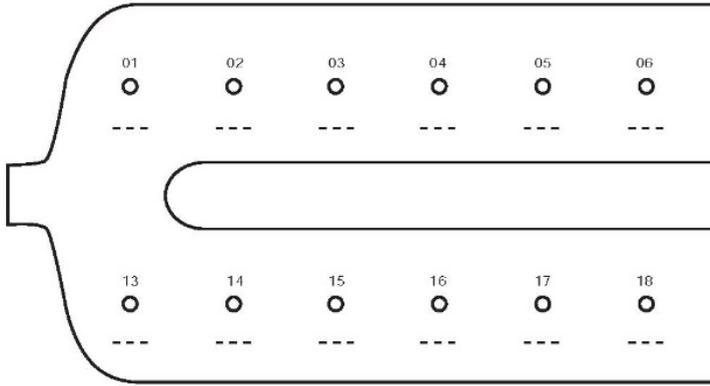


Figure 3. Configuration du QIAvac 24 Plus avec les colonnes QIAamp Mini utilisant des VacValves, des VacConnectors et des éléments d'extension de colonnes.

- | | | | |
|----------|---|----------|--------------------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Emplacement luer du QIAvac 24 Plus (fermé avec un bouchon luer) | 5 | Colonne QIAamp Mini |
| 3 | VacValve* | 6 | Élément d'extension de colonne |

Nous recommandons d'étiqueter les tubes et les colonnes QIAamp Mini pour utilisation sur le système de vide QIAvac 24 Plus conformément au schéma de la Figure 4 pour éviter de mélanger les échantillons. Cette figure peut être photocopiée pour y noter le nom des échantillons.

* À acheter séparément.



Date : _____

Opérateur : _____

ID du cycle : _____

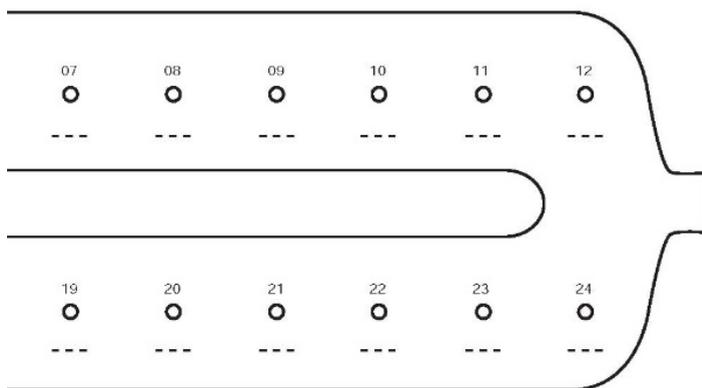


Figure 4. Schéma d'étiquetage des tubes et des colonnes QIAamp Mini pour utilisation sur le système de vide QIAvac 24 Plus.

Préparation des tampons et des réactifs

Buffer ACB

Avant utilisation, ajouter 200 ml d'isopropanol (100 %) à 300 ml de concentré de Buffer ACB pour obtenir 500 ml de Buffer ACB. Bien mélanger après l'addition d'isopropanol.

Buffer ACW1 *

Avant utilisation, ajouter 25 ml d'éthanol (96–100 %) à 19 ml de concentré de Buffer ACW1 pour obtenir 44 ml de Buffer ACW1. Bien mélanger après l'addition d'éthanol.

Buffer ACW2 †

Avant utilisation, ajouter 30 ml d'éthanol (96–100 %) à 13 ml de concentré de Buffer ACW2 pour obtenir 43 ml de Buffer ACW2. Bien mélanger après l'addition d'éthanol.

Ajout de l'ARN vecteur au Buffer ACL*

L'ARN vecteur remplit 2 fonctions : premièrement, il améliore la fixation des acides nucléiques sur la membrane QIAamp Mini, en particulier si l'échantillon contient très peu de molécules cibles. Deuxièmement, l'addition de grandes quantités d'ARN vecteur réduit les risques de dégradation de l'ARN dans les rares cas où les molécules de RNase ne sont pas dénaturées par les sels chaotropiques et les détergents du Buffer ACL.

* Contient un sel chaotropique. Voir page 14 pour les Warnings and Precautions.

† Contient de l'azotate de sodium comme conservateur.

La quantité d'ARN vecteur lyophilisé procurée est suffisante pour le volume de Buffer ACL fourni dans le kit. La concentration recommandée en ARN vecteur a été ajustée de façon à pouvoir utiliser le protocole QIAamp DSP Circulating NA comme système de purification générique compatible avec de nombreux systèmes d'amplification différents. Elle convient à un grand nombre d'ARN et d'ADN cibles.

L'efficacité des systèmes d'amplification varie en fonction de la quantité totale d'acides nucléiques présents dans la réaction. Les éluats obtenus avec ce kit contiennent à la fois des acides nucléiques circulants et de l'ARN entraîneur et, dans la plupart des cas, la quantité d'ARN vecteur est largement supérieure à la quantité d'acides nucléiques. Il est donc déconseillé d'utiliser des mesures de l'absorbance UV pour la quantification des acides nucléiques circulants isolés, puisque les résultats de ces mesures sont déterminés par la présence de l'ARN vecteur.

Pour obtenir les meilleurs niveaux de sensibilité possible dans les réactions d'amplification, il peut être nécessaire de réduire la quantité d'ARN vecteur ajoutée au Buffer ACL.

Pour les systèmes d'amplification impliquant des amorces oligo-dT, aucun ARN vecteur ne doit être ajouté pendant l'isolement des acides nucléiques libres circulants.

Ajouter 1 550 µl de Buffer AVE* au tube contenant 310 µg d'ARN vecteur lyophilisé pour obtenir une solution d'une concentration de 0,2 µg/µl. Dissoudre complètement l'ARN vecteur, le répartir en aliquotes de taille appropriée et le stocker entre -30 °C et -15 °C. Ne pas effectuer plusieurs cycles de congélation-décongélation des aliquotes d'ARN vecteur.

Noter que l'ARN vecteur n'est pas soluble dans le Buffer ACL. Il doit d'abord être dissous dans le Buffer AVE puis ajouté au Buffer ACL.

*Contient de l'azotate de sodium comme conservateur.

Calculer le volume du mélange Buffer ACL-ARN vecteur nécessaire pour chaque lot d'échantillons selon les tableaux dans les protocoles. Saisir le nombre d'échantillons à traiter simultanément.

Mélanger doucement en retournant 10 fois le tube ou le flacon. Afin d'éviter la formation de mousse, ne pas vortexer.

Remarque : la procédure de préparation des échantillons est optimisée pour un maximum de 1,0 µg d'ARN vecteur par échantillon. Si une quantité inférieure d'ARN vecteur est préférable pour votre système d'amplification, transférer uniquement la quantité d'ARN entraîneur dissous nécessaire dans les tubes contenant le Buffer ACL. Pour chaque microgramme d'ARN vecteur requis pour chaque préparation, ajouter 5 µl d'ARN entraîneur dissous au Buffer ACL. (L'utilisation de quantités d'ARN vecteur inférieures à 1,0 µg peut s'avérer avantageuse et doit être validée pour chaque type d'échantillon et de dosage en aval spécifiques.)

Protocole Breeze : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain

Ce protocole permet la purification de l'ADN et l'ARN circulant à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain et a été optimisé pour réduire la durée des manipulations et d'exécution. Pour des procédures validées existantes utilisant le QIAamp DSP Circulating NA Kit version 1/R3, consulter la section « Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain » (page 34).

Points importants avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (15–25 °C).
- Arrêter le vide entre les étapes afin de garantir l'application d'un vide homogène pendant les étapes du protocole.
Remarque : la pression de la Vacuum Pump doit être entre –800 et –900 mbar.
- Laisser les échantillons se stabiliser à température ambiante.
- Utiliser du TPS pour ajuster le volume de l'échantillon au volume exact le plus proche (1 à 5 ml).
- Configurer le QIAvac 24 Plus comme décrit page 21.
- Régler la température d'un bain-marie ou d'un bloc chauffant à 56 °C pour l'utilisation avec des tubes à centrifugation de 50 ml dans l'étape 3.
- Laisser les colonnes de centrifugation QIAamp Mini se stabiliser pendant au moins 1 heure à température ambiante avant utilisation.
- Vérifier que les Buffer ACB, Buffer ACW1 et Buffer ACW2 ont été préparés (addition d'isopropanol ou d'éthanol) conformément aux consignes page 26.
- Ajouter l'ARN vecteur reconstitué dans le Buffer AVE au Buffer ACL conformément aux consignes du Tableau 3.

Tableau 3. Volume de Buffer ACL et d'ARN vecteur (dissous dans le Buffer AVE) requis pour le traitement de 1 à 5 ml d'échantillons de plasma sanguin humain

Config. pour chaque volume de plasma (ml)	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Nombre d'échantillons	Buffer ACL (ml)					ARN vecteur dans le Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procédure : protocole Breeze

1. Ajouter à l'aide d'une pipette de la QIAGEN Proteinase K, du plasma et du Buffer ACL **dans cet ordre** à un tube de centrifugation de 50 ml (non fourni).

Config.	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Fermer le bouchon du tube et effectuer 5 passages au vortex par impulsions de 2 secondes. Veiller à ce qu'il se forme un tourbillon visible dans le tube. Afin de garantir l'efficacité de la lyse, il est essentiel que l'échantillon et le Buffer ACL soient bien mélangés pour former une solution homogène.

Remarque : ne pas interrompre la procédure à cette étape. Passer immédiatement à l'étape 3 pour commencer l'incubation de la lyse.

3. Incuber à 56 °C (± 1 °C) pendant 15 minutes (± 1).
4. Remettre le tube sur la paillasse et dévisser le bouchon.
5. Ajouter le Buffer ACB au lysat dans le tube. Choisir le volume en fonction de la configuration de l'étape 1.

Config.	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Visser le bouchon du tube et effectuer soigneusement 5 passages au vortex par impulsions de 2 secondes. Veiller à ce qu'il se forme un tourbillon visible dans le tube. Afin de garantir l'efficacité de la lyse, il est essentiel que le lysat et le Buffer ACB soient bien mélangés pour former une solution homogène.
7. Incuber le mélange lysat-Buffer ACB dans le tube pendant 5 minutes (± 1) à température ambiante.

8. Insérer la colonne QIAamp Mini dans le VacConnector sur le QIAvac 24 Plus (voir « Mise en place du QIAvac 24 Plus vacuum manifold », page 21). Insérer un élément d'extension de colonne de 20 ml dans la colonne QIAamp Mini ouverte.

Veiller à ce que l'élément d'extension de colonne soit bien inséré dans la colonne QIAamp Mini afin d'éviter toute fuite d'échantillon.

Remarque : conserver le tube de lavage pour la centrifugation à sec de l'étape 13.

9. Déposer soigneusement le lysat de l'étape 7 dans l'élément d'extension de colonne de la colonne QIAamp Mini. Allumer la pompe à vide. Une fois que tous les lysats sont complètement passés à travers les colonnes, éteindre la pompe à vide et laisser la pression revenir à 0 mbar. Retirer soigneusement puis jeter l'élément d'extension de colonne.

Noter qu'il peut falloir jusqu'à 20 minutes aux grands volumes de lysats d'échantillons (environ 18 ml pour un volume d'échantillon de 5 ml au démarrage) pour passer à travers la membrane QIAamp Mini sous l'effet du vide.

Pour un arrêt simple et rapide du vide, utiliser un Vacuum Regulator (inclus dans le QIAvac Connecting System).

Remarque : pour éviter la contamination croisée, veiller à ne pas passer au-dessus des colonnes QIAamp Mini lorsque vous retirez les éléments d'extension de colonnes.

10. Déposer 600 µl de Buffer ACW1 dans la colonne QIAamp Mini. Laisser le couvercle de la colonne ouvert et allumer la pompe à vide. Une fois que tout le Buffer ACW1 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, éteindre la pompe à vide et laisser la pression revenir à 0 mbar.

11. Déposer 750 µl de Buffer ACW2 dans la colonne QIAamp Mini. Laisser le couvercle de la colonne ouvert et allumer la pompe à vide. Une fois que tout le Buffer ACW2 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, éteindre la pompe à vide et laisser la pression revenir à 0 mbar.

12. Déposer 750 µl d'éthanol (96–100 %) dans la colonne QIAamp Mini. Laisser le couvercle de la colonne ouvert et allumer la pompe à vide. Une fois que tout l'éthanol est passé à travers la colonne de centrifugation, éteindre la pompe à vide et laisser la pression revenir à 0 mbar.

13. Fermer le couvercle de la colonne QIAamp Mini. Retirer la colonne du collecteur à vide et jeter le VacConnector. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage de 2 ml propre (de l'étape 8) et centrifuger à vitesse maximale (20 000 g ; 14 000 tr/min) pendant 3 minutes ($\pm 0,5$).
14. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage de 2 ml neuf. Ouvrir le couvercle et incuber l'ensemble à température ambiante pendant 3 minutes pour sécher complètement la membrane.
15. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube d'élution de 1,5 ml propre (fourni) et jeter le tube de lavage de 2 ml de l'étape 14. Déposer soigneusement 20 à 150 μ l de Buffer AVE au centre de la membrane de la colonne QIAamp Mini. Fermer le couvercle et incuber à température ambiante pendant 3 minutes ($\pm 0,5$).

Important : vérifier que le Buffer AVE d'élution s'est stabilisé à température ambiante (15–25 °C). En cas d'utilisation de petits volumes d'élution (<50 μ l), le tampon d'élution doit être déposé au centre de la membrane afin de permettre l'élution complète des acides nucléiques fixés.

Le volume d'élution peut varier et être adapté en fonction des exigences des applications en aval.

L'élution avec des volumes de Buffer AVE plus faibles donne des concentrations en acides nucléiques plus élevées, mais peut entraîner une diminution du rendement total.

Le volume d'éluat récupéré peut être jusqu'à 5 μ l inférieur au volume d'élution déposé sur la membrane de la colonne QIAamp Mini.

Remarque : si vous prévoyez d'obtenir une faible quantité d'acide nucléique, nous vous recommandons d'utiliser un tube à faible fixation (non fourni) pour l'élution.

16. Centrifuger dans une microcentrifugeuse à vitesse maximale (20 000 g ; 14 000 tr/min) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.

Remarque : orienter les bouchons des tubes d'élution dans la direction opposée à la rotation du rotor (p. ex. si le rotor tourne dans le sens horaire, orienter les bouchons dans le sens antihoraire).

Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain

Ce protocole est identique au protocole de la 3^e révision (R3) du *Manuel du QIAamp DSP Circulating NA Kit* pour une utilisation avec les procédures validées existantes avec 1 à 5 ml de plasma humain, par exemple.

Points importants avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (15–25 °C).
- Arrêter le vide entre les étapes afin de garantir l'application d'un vide homogène pendant les étapes du protocole.
Remarque : la pression de la Vacuum Pump doit être entre –800 et –900 mbar.
- Laisser les échantillons se stabiliser à température ambiante.
- Utiliser du TPS pour ajuster le volume de l'échantillon au volume exact le plus proche (1 à 5 ml).
- Configurer le QIAvac 24 Plus comme décrit page 21.
- Régler la température d'un bain-marie ou d'un bloc chauffant à 60 °C pour l'utilisation avec des tubes à centrifugation de 50 ml dans l'étape 3.
- Régler la température d'un bloc chauffant à 56 °C pour l'utilisation avec des tubes de lavage de 2 ml dans l'étape 14.
- Laisser les colonnes de centrifugation QIAamp Mini se stabiliser au moins 1 heure à température ambiante avant utilisation.
- Vérifier que les Buffer ACB, Buffer ACW1 et Buffer ACW2 ont été préparés (addition d'isopropanol ou d'éthanol) conformément aux consignes page 26.
- Ajouter l'ARN vecteur reconstitué dans le Buffer AVE au Buffer ACL conformément aux consignes du Tableau 4.

Tableau 4. Volume de Buffer ACL et d'ARN vecteur (dissous dans le Buffer AVE) requis pour le traitement de 1 à 5 ml d'échantillons de plasma sanguin humain

Config. pour chaque volume de plasma (ml)	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Nombre d'échantillons	Buffer ACL (ml)					ARN vecteur dans le Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procédure : protocole classique

1. Ajouter à l'aide d'une pipette de la QIAGEN Proteinase K, du plasma et du Buffer ACL dans cet ordre à un tube de centrifugation de 50 ml (non fourni).

Config.	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Fermer le bouchon du tube et effectuer un passage au vortex par impulsions de 30 s. Veiller à ce qu'il se forme un tourbillon visible dans le tube. Afin de garantir l'efficacité de la lyse, il est essentiel que l'échantillon et le Buffer ACL soient bien mélangés pour former une solution homogène.

Remarque : Ne pas interrompre la procédure à cette étape. Passer immédiatement à l'étape 3 pour commencer l'incubation de la lyse.

3. Incuber à 60 °C (± 1 °C) pendant 30 minutes (± 2).
4. Remettre le tube sur la paillasse et dévisser le bouchon.
5. Ajouter le Buffer ACB au lysat dans le tube. Choisir le volume en fonction de la configuration de l'étape 1.

Config.	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Visser le bouchon du tube et effectuer soigneusement un passage au vortex par impulsions de 30 secondes. Veiller à ce qu'il se forme un tourbillon visible dans le tube. Afin de garantir l'efficacité de la lyse, il est essentiel que le lysat et le Buffer ACB soient bien mélangés pour former une solution homogène.
7. Incuber le mélange lysat-Buffer ACB dans le tube pendant 5 minutes (± 1) sur de la glace.

8. Insérer la colonne QIAamp Mini dans le VacConnector sur le QIAvac 24 Plus (voir « Mise en place du QIAvac 24 Plus vacuum manifold », page 21). Insérer un élément d'extension de colonne de 20 ml dans la colonne QIAamp Mini ouverte.

Veiller à ce que l'élément d'extension de colonne soit bien inséré dans la colonne QIAamp Mini afin d'éviter toute fuite d'échantillon.

Remarque : Conserver le tube de lavage pour la centrifugation à sec de l'étape 13.

9. Déposer soigneusement le lysat de l'étape 7 dans l'élément d'extension de colonne de la colonne QIAamp Mini. Allumer la pompe à vide pour appliquer une pression de -800 à -900 mbar. Une fois que tous les lysats sont complètement passés à travers les colonnes, éteindre la pompe à vide et laisser la pression revenir à 0 mbar. Retirer soigneusement puis jeter l'élément d'extension de colonne.

Noter qu'il peut falloir jusqu'à 20 minutes aux grands volumes de lysats d'échantillons (environ 18 ml pour un volume d'échantillon de 5 ml au démarrage) pour passer à travers la membrane QIAamp Mini sous l'effet du vide.

Pour un arrêt simple et rapide du vide, utiliser un Vacuum Regulator (inclus dans le QIAvac Connecting System).

Remarque : Pour éviter la contamination croisée, veiller à ne pas passer au-dessus des colonnes QIAamp Mini lorsque vous retirez les éléments d'extension de colonnes.

10. Déposer 600 µl de Buffer ACW1 dans la colonne QIAamp Mini. Laisser le couvercle de la colonne ouvert et allumer la pompe à vide. Une fois que tout le Buffer ACW1 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, éteindre la pompe à vide et laisser la pression revenir à 0 mbar.

11. Déposer 750 µl de Buffer ACW2 dans la colonne QIAamp Mini. Laisser le couvercle de la colonne ouvert et allumer la pompe à vide. Une fois que tout le Buffer ACW2 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, éteindre la pompe à vide et laisser la pression revenir à 0 mbar.

12. Déposer 750 µl d'éthanol (96–100 %) dans la colonne QIAamp Mini. Laisser le couvercle de la colonne ouvert et allumer la pompe à vide. Une fois que tout l'éthanol est passé à travers la colonne de centrifugation, éteindre la pompe à vide et laisser la pression revenir à 0 mbar.

13. Fermer le couvercle de la colonne QIAamp Mini. Retirer la colonne du collecteur à vide et jeter le VacConnector. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage de 2 ml propre (de l'étape 8) et centrifuger à vitesse maximale (20 000 g ; 14 000 tr/min) pendant 3 minutes ($\pm 0,5$).
14. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage de 2 ml neuf. Ouvrir le couvercle et incuber l'ensemble à 56 °C (± 1 °C) pendant 10 minutes (± 1) pour sécher complètement la membrane.
15. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube d'élution de 1,5 ml propre (fourni) et jeter le tube de lavage de 2 ml de l'étape 13. Déposer soigneusement 20 à 150 μ l de Buffer AVE au centre de la membrane de la colonne QIAamp Mini. Fermer le couvercle et incuber à température ambiante pendant 3 minutes ($\pm 0,5$).

Important : Vérifier que le Buffer AVE d'élution s'est stabilisé à température ambiante (15–25 °C). En cas d'utilisation de petits volumes d'élution (<50 μ l), le tampon d'élution doit être déposé au centre de la membrane afin de permettre l'élution complète des acides nucléiques fixés.

Le volume d'élution peut varier et être adapté en fonction des exigences des applications en aval.

L'élution avec des volumes de Buffer AVE plus faibles donne des concentrations en acides nucléiques plus élevées, mais peut entraîner une diminution du rendement total.

Le volume d'éluat récupéré peut être jusqu'à 5 μ l inférieur au volume d'élution déposé dans la colonne QIAamp Mini.

Remarque : si vous prévoyez d'obtenir une faible quantité d'acide nucléique, nous vous recommandons d'utiliser un tube à faible fixation (non fourni) pour l'élution.

16. Centrifuger dans une microcentrifugeuse à vitesse maximale (20 000 g ; 14 000 tr/min) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.

Remarque : orienter les bouchons des tubes d'élution dans la direction opposée à la rotation du rotor (p. ex. si le rotor tourne dans le sens horaire, orienter les bouchons dans le sens antihoraire).

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de QIAamp DSP Circulating NA Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Limitations

Les performances du système en termes d'isolement des acides nucléiques libres circulants ont été évaluées à l'aide d'échantillons de plasma humain préparés avec les tubes de prélèvement sanguin suivants :

- K2-EDTA (Beckton Dickinson and Company, n° de réf. 367525)
- PAXgene® Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, n° de réf. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, n° de réf. 218962)

Il est de la responsabilité de 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.

Afin de limiter les risques d'impact négatif sur les résultats diagnostiques, des contrôles appropriés doivent être utilisés 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: Test And Methodology.

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

Caractéristiques de performances

Les caractéristiques de performances applicables sont disponibles sous l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com.

Références

1. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis. Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Humana Press.
3. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem.* **56**, 1210-1211.
4. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 541-563.
5. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* **10**, 21.
6. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med.* **57**, 932-953.

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, visitez le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Peu ou pas d'acide nucléique dans l'éluat

- | | |
|--|---|
| a) Utilisation de plasma non stabilisé | Les échantillons de plasma non stabilisés peuvent entraîner une dégradation accélérée de l'ADN. Nous recommandons de suivre les spécifications de CEN/TS 16835-3:2015. Répéter la procédure de purification avec de nouveaux échantillons. |
| b) Délai trop long entre le prélèvement sanguin et la préparation du plasma. | Les cellules sanguines nucléées peuvent se dégrader et libérer de l'ADN génomique dans le plasma, diluant l'acide nucléique cible. |
| c) Échantillons congelés et décongelés plus d'une fois | Il faut éviter de répéter les cycles de congélation-décongélation, car ils peuvent entraîner la dégradation de l'ADN. Veiller à toujours utiliser des échantillons frais ou décongelés une seule fois. |
| d) Faible concentration d'ADN cible dans les échantillons | Les échantillons de plasma ont été laissés trop longtemps à température ambiante. Répéter la procédure de purification avec de nouveaux échantillons.
Remarque : certains individus peuvent avoir une faible concentration d'AN libre dans le plasma ; dans ce cas, choisir un plus grand volume d'échantillon et un plus petit volume d'éluat. |
| e) Lyse inefficace des échantillons dans le Buffer ACL | Si la QIAGEN Proteinase K a été soumise à des températures élevées pendant une période prolongée, elle peut perdre son activité. Répéter la procédure avec de nouveaux échantillons et un nouveau flacon de QIAGEN Proteinase K. |
| f) Homogénéisation insuffisante du mélange Buffer ACL-ARN vecteur | Mélanger le Buffer ACL avec l'ARN entraîneur en retournant doucement le tube de mélange Buffer ACL-ARN vecteur au moins 10 fois. |
| g) Faible pourcentage d'éthanol utilisé au lieu de 96–100 % | Répéter la procédure de purification avec de nouveaux échantillons et de l'éthanol à 96–100 %. Ne pas utiliser d'alcool dénaturé contenant d'autres substances telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone. |

Commentaires et suggestions

- | | | |
|----|---|--|
| h) | Buffer ACB préparé de façon incorrecte | Vérifier que le concentré de Buffer ACB a été reconstitué avec le bon volume d'isopropanol (pas d'éthanol, voir page 26). |
| i) | Buffer ACW1 ou Buffer ACW2 préparés de façon incorrecte | Vérifier que les concentrés de Buffer ACW1 et de Buffer ACW2 ont été dilués avec le bon volume d'éthanol (voir page 26). Répéter la procédure de purification avec de nouveaux échantillons. |
| j) | Buffer ACW1 ou Buffer ACW2 préparé avec de l'éthanol à 70 % | Vérifier que les concentrés de Buffer ACW1 et de Buffer ACW2 ont été dilués avec de l'éthanol à 96–100 % (voir page 26). Répéter la procédure de purification avec de nouveaux échantillons. |

L'ADN ou l'ARN ne réagit pas bien dans les réactions enzymatiques en aval

- | | | |
|----|----------------------------------|--|
| a) | Peu ou pas d'ADN dans l'éluat | Voir la section « Peu ou pas d'acide nucléique dans l'éluat » plus haut pour les explications possibles. Si possible, augmenter la quantité d'éluat ajoutée à la réaction enzymatique. |
| b) | Volume d'éluat utilisé incorrect | Déterminer le volume d'éluat maximal convenant à votre application en aval. Réduire ou augmenter en conséquence le volume d'éluat ajouté à l'application en aval. Le volume d'éluat peut être adapté de façon proportionnelle.
Remarque : l'éluat avec des volumes de Buffer AVE plus faibles donne des concentrations en acides nucléiques plus élevées, mais peut entraîner une diminution du rendement total. |
| c) | Tampons insuffisamment mélangés | Le sel et l'éthanol peuvent s'être séparés du tampon de lavage Buffer ACW2 s'il est resté inutilisé pendant une longue période entre les préparations. Veiller à toujours mélanger complètement les tampons avant chaque préparation. |
| d) | Interférence due à l'ARN vecteur | Si la présence d'ARN vecteur dans l'éluat interfère avec la réaction enzymatique en aval, il peut s'avérer nécessaire de réduire la quantité d'ARN entraîneur ou de ne pas en utiliser du tout. |

Manipulation générale

- | | | |
|----|------------------------------|---|
| a) | Colonne QIAamp Mini obstruée | Si le débit est réduit, le temps d'application du vide peut être allongé.
Une autre solution consiste à fermer la VacValve, si elle est utilisée, et à retirer soigneusement l'ensemble élément d'extension de colonne-VacConnector-VacValve de la colonne QIAamp Mini sans perdre de lysat dans l'élément d'extension de colonne.
Retirer la colonne QIAamp Mini du collecteur à vide, la placer dans un tube de lavage de 2 ml et la centrifuger à vitesse maximale jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement passé à travers la membrane. Remettre en place l'ensemble élément d'extension de colonne-VacConnector-VacValve contenant le lysat restant. Allumer la pompe à vide, ouvrir la VacValve et continuer de charger le lysat restant.
Répéter la procédure ci-dessus si la colonne QIAamp Mini continue de s'obstruer. |
|----|------------------------------|---|

Commentaires et suggestions

- Des cryoprécipités ont pu se former dans le plasma à cause des congélations et décongélations répétées. Ils peuvent bloquer la colonne QIAamp Mini. Ne pas utiliser de plasma qui a été congelé et décongelé plus d'une fois.
- Si des cryoprécipités sont visibles, clarifier l'échantillon par centrifugation pendant 5 minutes à 16 000 g.
- b) Volumes d'éluat variables
- Les différences entre échantillons peuvent affecter le volume d'éluat final. Le volume d'éluat récupéré peut être jusqu'à 5 µl inférieur au volume d'éluat déposé dans la colonne QIAamp Mini.
- c) Pression du vide de -800 à -900 mbar non atteinte
- Le collecteur à vide n'est pas bien fermé. Appuyer sur le couvercle du collecteur à vide après l'activation du vide. Vérifier que la pression du vide est atteinte.
- Le joint du couvercle QIAvac est usé. Contrôler visuellement l'étanchéité du collecteur et remplacer le joint si nécessaire.
- Les VacValves sont usées. Retirer toutes les VacValves et insérer des VacConnectors directement dans les extensions luer. Insérer des colonnes QIAamp Mini dans les VacConnectors, fermer le couvercle des colonnes et activer le vide. Vérifier que la pression du vide est atteinte. Remplacer les VacValves si nécessaire.
- Le raccordement à la pompe à vide fuit. Fermer toutes les extensions luer avec des bouchons luer et allumer la pompe à vide. Vérifier que la pression du vide est stable après le démarrage de la pompe (et la fermeture de la vanne du Vacuum Regulator). Remplacer les raccords entre la pompe et le collecteur à vide si nécessaire.
- Si la pression du vide ne peut toujours pas être atteinte, remplacer la pompe à vide avec un modèle plus puissant.

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
	Numéro

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
	Limite de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	Conserver à l'abri des rayons du soleil
	Avertissement/Attention
	À réception
	Ouvrir à la livraison ; conserver les colonnes de centrifugation QIAamp Mini à une température comprise entre 2 et 8 °C
	Volume

Symbole

Définition du symbole

	Ajouter
	Noter la date du jour sur le flacon après y avoir ajouté l'éthanol
	Éthanol
	Noter la date du jour sur le flacon après y avoir ajouté l'isopropanol
	Isopropanol
→	Mène à
	Thiocyanate de guanidine
	Chlorhydrate de guanidine
	BRIJ 58
	Protéinase K
	Identificateur unique d'appareil

Annexe A : recommandation pour la séparation et le stockage du plasma sanguin

Avec des tubes de prélèvement sanguin de stabilisation (p. ex. PAXgene ccfDNA Tube ou Streck Cell-Free DNA Tube), suivre les instructions du fabricant pour la séparation et le stockage du plasma. Nous recommandons de valider ces conditions de stockage en fonction de votre application en aval et de votre cible.

Pour les BCT non stabilisés, nous recommandons de suivre la norme ISO 20186-3:2019 Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour le sang total veineux — Partie 3 : ADN libre circulant extrait du plasma ou la norme CEN/TS 17742 Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour le sang total veineux — ARN libre circulant extrait du plasma.

Pour isoler les acides nucléiques libres circulants à partir d'échantillons sanguins, nous recommandons de suivre ce protocole qui inclut une centrifugation à vitesse élevée, afin d'éliminer les débris cellulaires et ainsi de réduire la quantité d'ADN ou d'ARN génomique ou cellulaire dans les échantillons.

1. Mettre du sang total EDTA dans des tubes BD Vacutainer® (ou d'autres tubes sanguins primaires contenant de l'EDTA comme anticoagulant) dans une centrifugeuse refroidie à 4 °C avec un rotor à angle variable et des godets appropriés.
2. Centrifuger les échantillons sanguins pendant 10 minutes à 1 900 g (3 000 tr/min) à 4 °C.
3. Aspirer soigneusement le surnageant de plasma sans perturber la couche d'interface entre le plasma et les cellules. Il est possible d'obtenir environ 4 à 5 ml de plasma à partir d'un tube sanguin primaire de 10 ml.

Remarque : le plasma peut être utilisé pour l'extraction des acides nucléiques circulants à cette étape. Toutefois, l'étape suivante de centrifugation à haute vitesse permet d'éliminer des débris cellulaires supplémentaires et d'éviter la contamination des acides nucléiques circulants par l'ADN et l'ARN génomiques provenant de la dégradation des cellules sanguines nucléées.

4. Le plasma aspiré est transféré dans un tube de centrifugation neuf.
5. Centrifuger les échantillons de plasma pendant 10 minutes à 16 000 g (dans un rotor à angle fixe) à 4 °C.
Cela permet l'élimination d'autres acides nucléiques liés aux débris cellulaires.
6. Retirer soigneusement et transférer le surnageant dans un nouveau tube sans perturber le culot.
7. Si le plasma doit être utilisé le jour même pour l'extraction des acides nucléiques, stocker entre 2 et 8 °C jusqu'au traitement ultérieur. Pour un stockage de plus longue durée, les aliquotes de plasma provenant de tubes de prélèvement sanguin non stabilisés ou stabilisés peuvent être stockées à -20 °C (ADN) ou -80 °C (ARN) pendant au moins 4 semaines. Avant d'utiliser le plasma pour l'extraction des acides nucléiques circulants, décongeler les tubes de plasma à température ambiante.
8. **Étape facultative** : pour éliminer les cryoprécipités, centrifuger les échantillons de plasma pendant 5 minutes à 16 000 g (dans un rotor à angle fixe).

Étape facultative : transférer le surnageant dans un nouveau tube, puis commencer le protocole d'extraction des acides nucléiques circulants.

Annexe B : remarques générales sur la manipulation de l'ARN

Manipulation de l'ARN

Les ribonucléases (RNases) sont des enzymes très stables et très actives qui ne requièrent généralement pas de cofacteurs pour être activées. Puisque les RNases sont difficiles à inactiver et que de très petites quantités d'enzyme suffisent à dégrader l'ARN, ne pas utiliser de matériel en plastique ou en verre sans le traiter au préalable contre une contamination possible par les RNases. Faire attention à ne pas introduire des RNases par inadvertance dans l'échantillon d'ARN pendant ou après la purification. Lors de la manipulation de l'ARN, afin de créer et de maintenir un environnement exempt de RNase, prendre les précautions suivantes au cours du prétraitement et de l'utilisation des récipients jetables ou non jetables et des solutions.

Manipulation générale

Lors de la préparation de l'ARN, veiller à toujours respecter les principes de techniques microbiologiques aseptiques. Les mains et les particules de poussière peuvent être porteuses de bactéries et de champignons et sont la source la plus fréquente de contaminations par les RNases. Toujours porter des gants en latex ou en vinyle pour manipuler les réactifs et les échantillons d'ARN afin d'éviter une contamination par les RNases due à la peau ou à l'équipement de laboratoire poussiéreux. Changer souvent de gants et fermer les tubes immédiatement après utilisation. Garder l'ARN purifié sur de la glace si des aliquotes sont préparées pour les applications en aval.

Consommables en plastique jetables

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

Informations pour commander

Produit	Sommaire	N° de réf.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Pour 50 préparations : colonnes QIAamp Mini, éléments d'extension de colonnes, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, réactifs, tampons et tubes de prélèvement	61504
Accessoires		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Collecteur à vide pour le traitement de 1 à 24 colonnes de centrifugation : QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, bouchons luer et raccords rapides	19413
Vacuum Pump*	Pompe à vide universelle	84010 [États-Unis et Canada] 84000 [Japon] 84020 [reste du monde]
QIAvac Connecting System*	Système pour raccorder le collecteur à vide à la pompe à vide : inclut plateau, flacons à déchets, tuyaux, raccords, vanne, jauge et 24 VacValves.	19419

* À utiliser dans le cadre des protocoles sous vide.

Pour les dernières informations sur les licences et les clauses limitatives de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, juin 2022	Kit IVDR version 2, aucune modification apportée aux protocoles ou aux données de performances par rapport à la version 1 ; ajout de l'isolement « manuel » dans l'utilisation prévue ; mises à jour et corrections mineures

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Contrat de licence limitée pour le QIAamp DSP Circulating NA 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 tenue 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[®], (Groupe QIAGEN) ; Agilent[®] (Agilent Technologies, Inc.) ; BD[™], Vacutainer[®] (Becton Dickinson and Company) ; PAXgene[®] (PreAnalytiX GmbH) ; Tween[™] (ICI Americas Inc.). Les noms déposés, marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Juin 2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

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