

Septembre 2019

# Mode d'emploi du QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit (manuel)

Version 1



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 MAT

1118364FR

Sample to Insight



# Sommaire

Utilisation prévue.....	4
Résumé et explication.....	4
Principe de la procédure.....	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
Matériel fourni.....	10
Contenu du kit.....	10
Matériel nécessaire mais non fourni.....	11
Avertissements et précautions.....	12
Stockage et manipulation des réactifs.....	15
Stockage et manipulation des prélèvements.....	16
Procédure.....	17
Préparation des tampons et des réactifs.....	24
Protocole Breeze : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain.....	27
Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain.....	32

---

Contrôle qualité.....	37
Limitations.....	37
Symboles.....	38
Références.....	40
Coordonnées.....	40
Guide de dépannage.....	41
Annexe A : recommandation pour la séparation et le stockage du plasma sanguin .....	44
Annexe B : remarques générales sur la manipulation de l'ARN .....	46
Informations pour commander .....	47
Historique des révisions du manuel .....	48

---

# 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.

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

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

## Résumé et explication

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 1–100 ng/ml pour les échantillons humains (1–5).

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 extensions de 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 de 20–150 µl offre la flexibilité nécessaire pour concentrer les acides nucléiques présents en faibles concentrations.

---

L'ARN ou l'ADN génomique libre circulant élué peut être stocké ou utilisé directement dans des applications en aval. Le QIAamp DSP Circulating NA Kit permet l'élimination efficace des protéines, nucléases et autres impuretés.

## Principe de la procédure

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

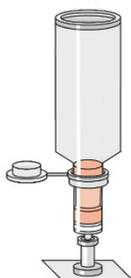
Les colonnes QIAamp Mini fixent les acides nucléiques fragmentés dont la taille ne dépasse pas 20 nt, mais la quantité obtenue dépend du volume d'échantillon et de la concentration en acides nucléiques circulants de l'échantillon (généralement 1–100 ng/ml dans le plasma). La procédure QIAamp DSP Circulating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

## Procédure du QIAamp DSP Circulatin

Échantillon

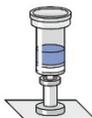


Lyse



Fixation

Vide



Lavage

Vide



Élution



Acides nucléiques purs

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 entraineur présent dans les acides nucléiques extraits est susceptible de dominer le signal dans les mesures d'absorbance UV (voir page 25). 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<sup>5</sup> 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 27) 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 32) permet de traiter jusqu'à 5 ml de plasma par étapes de 1 ml et est identique au protocole de la 3<sup>e</sup> révision (R3) du manuel du QIAamp DSP Circulating NA Kit.

# Matériel fourni

## Contenu du kit

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
Référence catalogue			61504
Nombre de préparations			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (colonnes QIAamp Mini avec tubes de lavage [WT]) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (éléments d'extension de colonnes) (20 ml)	<b>COL EXT</b>	2 x 25
WT	Wash Tubes (tubes de lavage) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (tubes d'éluion) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
VC	VacConnectors	<b>VAC CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer (tampon de lyse)*	<b>LYS BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer (tampon de fixation)* (concentré)	<b>BIND BUF CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (tampon de lavage 1)* (concentré)	<b>WASH BUF 1 CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (tampon de lavage 2)† (concentré)	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer (tampon d'éluion)† (bouchons violets)	<b>ELU BUF</b>	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (protéinase K QIAGEN)	<b>PROTK</b>	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (ARN entraîneur) (bouchons rouges)	<b>CAR RNA</b>	310 µg
	Manuel	<b>HB</b>	1

\* Contient un sel chaotropique. Voir page 12 pour les Avertissements et précautions.

† Contient de l'azide de sodium comme agent de conservation.

# 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 du produit.

Vérifier que les appareils ont été contrôlés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

Pour tous les protocoles

- 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).
- Bain-marie ou bloc chauffant capable de maintenir des tubes de centrifugation de 50 ml à 56 °C ou 60 °C.\*
- Bloc chauffant ou l'équivalent pouvant maintenir à 56 °C des tubes de lavage de 2 ml (uniquement pour le protocole classique)\*
- Microcentrifugeuse (avec rotor pour tubes de 2 ml)\*
- Tubes de centrifugation de 50 ml
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (référence catalogue 19413)
- QIAvac Connecting System (référence catalogue 19419) ou l'équivalent
- Vacuum Pump (référence catalogue 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
- 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 (PBS)
- Matériel facultatif : VacValves (référence catalogue 19408)

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

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

# Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro

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. Elles sont disponibles en ligne au format PDF à l'adresse [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), où il est possible de trouver, de consulter et d'imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

**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 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.

## Protéinase 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/dispersions/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.

---

## 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 entraîneur lyophilisé peut être stocké à température ambiante (15–25 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. L'ARN entraîneur doit être dissous dans le Buffer AVE ; l'ARN entraîneur dissous doit être immédiatement ajouté au Buffer ACL, comme décrit page 28 pour le protocole Breeze et page 33 pour le protocole classique. Cette solution doit être préparée extemporanément. Elle est stable entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 48 heures. La solution d'ARN entraîneur dissous dans le Buffer AVE non utilisée doit être congelée sous forme d'aliquotes entre –30 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).

---

# 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 à 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 (uniquement dans le cas de l'ADN) ou -80 °C (ADN et ARN) pendant au moins 4 semaines.

## 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 et -15 °C et l'ARN entre -90 et -60 °C pour les applications en aval.

# Procédure

## Remarques importantes 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 1). 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.

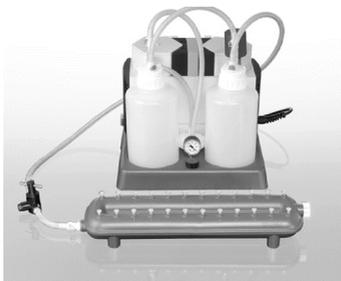


Figure 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System et pompe à vide.

Tableau 1. 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 12 pour les Avertissements et précautions.

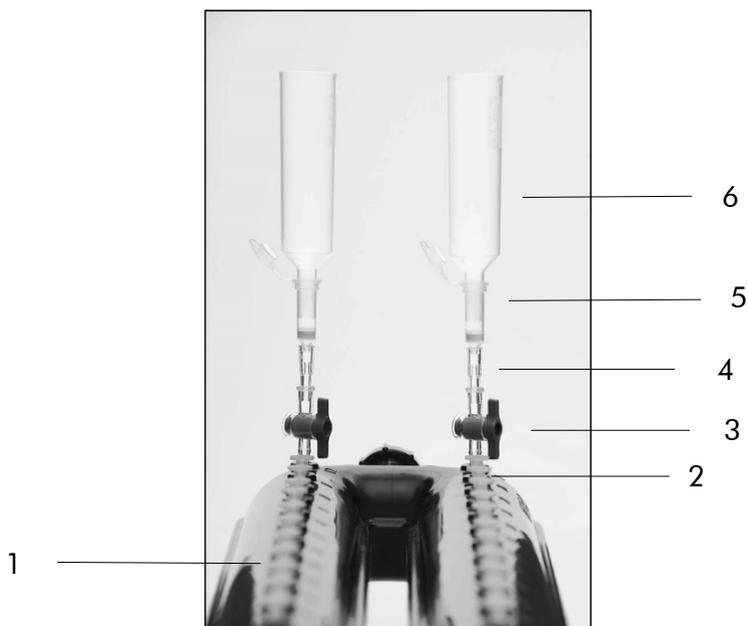
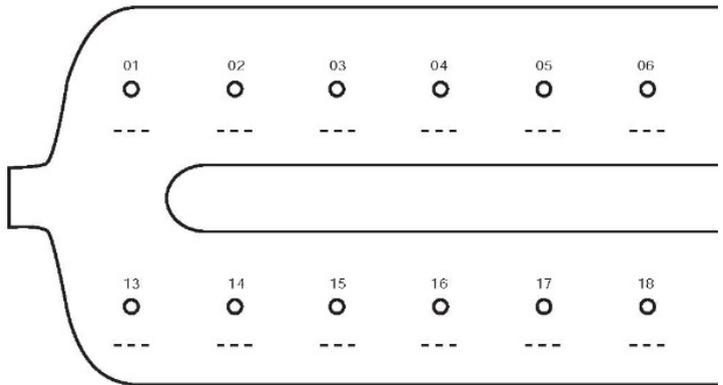


Figure 3. Configuration du QIAvac 24 Plus avec les colonnes QIAamp Mini utilisant des VacValves, des VacConnectors et des éléments d'extension de colonnes.

- |  |                                  |
|--|----------------------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vacuum manifold                                     | 4 VacConnectors                  |
| 2 Emplacement luer du QIAvac 24 Plus<br>(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 à vide QIAvac 24 Plus conformément au schéma de la Figure 4 afin d'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 : \_\_\_\_\_

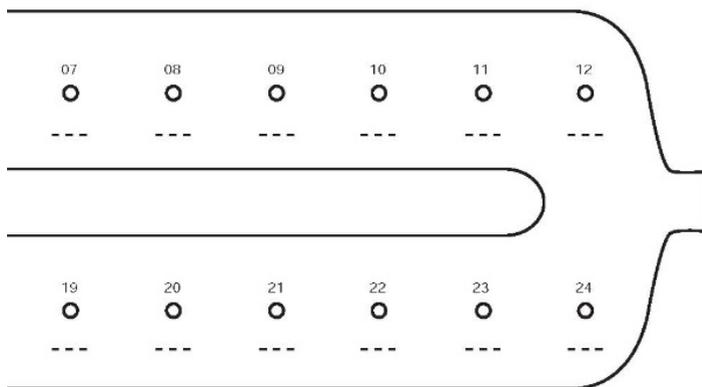


Figure 4. Schéma d'étiquetage des tubes et des colonnes QIAamp Mini pour utilisation sur le système à vide QIAvac 24 Plus.

# 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.

## Addition de l'ARN entraîneur au Buffer ACL\*

L'ARN entraîneur 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 entraîneur 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.

La quantité d'ARN entraîneur lyophilisé procurée est suffisante pour le volume de Buffer ACL fourni dans le kit. La concentration recommandée en ARN entraîneur 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.

\* Contient un sel chaotropique. Voir page 12 pour les avertissements et précautions.

† Contient de l'azide de sodium comme agent de conservation.

---

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 entraîneur 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 entraîneur.

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

Pour les systèmes d'amplification impliquant des amorces oligo-dT, aucun ARN entraîneur 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 entraîneur lyophilisé pour obtenir une solution d'une concentration de 0,2 µg/µl. Dissoudre complètement l'ARN entraîneur, le répartir en aliquotes de taille appropriée et le stocker entre -30 et -15 °C. Ne pas effectuer plus de 3 cycles de congélation-décongélation des aliquotes d'ARN entraîneur.

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

Calculer le volume du mélange Buffer ACL-ARN entraîneur 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.

\*Contient de l'azide de sodium comme agent de conservation.

---

Remarque : la procédure de préparation des échantillons est optimisée pour un maximum de 1,0 µg d'ARN entraîneur par échantillon. Si une quantité inférieure d'ARN entraîneur 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 entraîneur requis pour chaque préparation, ajouter 5 µl d'ARN entraîneur dissous au Buffer ACL. (L'utilisation de quantités d'ARN entraîneur inférieures à 1,0 µg peut s'avérer avantageuse et doit être validée pour chaque type d'échantillon et d'analyse 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 32).

## Remarques importantes 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 du vide doit être entre –800 et –900 mbar.
- Laisser les échantillons se stabiliser à température ambiante.
- Utiliser du tampon phosphate salin 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 19.
- 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 24.
- Ajouter l'ARN entraîneur reconstitué dans le Buffer AVE au Buffer ACL conformément aux consignes du Tableau 2.

Tableau 2. Volume de Buffer ACL et d'ARN entraîneur (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	ARN entraîneur dans le Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Nombre d'échantillons	Buffer ACL (ml)					
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. Visser le bouchon du tube et vortexer 5 fois 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 ( $\pm 1$  °C) pendant 15 $\pm$ 1 minutes.
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 vortexer soigneusement 5 fois 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  $5 \pm 1$  minutes 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 19). 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 que les grands volumes de lysats d'échantillons (environ 18 ml pour un volume d'échantillon de 5 ml au démarrage) peuvent requérir jusqu'à 20 minutes 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 rpm) pendant 3±0,5 minutes.
14. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage de 2 ml neuf. Ouvrir le couvercle et incubé 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 µl de Buffer AVE au centre de la membrane de la colonne QIAamp Mini. Fermer le couvercle et incubé à température ambiante pendant 3±0,5 minutes.

Remarque importante : vérifier que le Buffer AVE s'est stabilisé à température ambiante (15–25 °C). En cas d'utilisation de petits volumes d'élution (<50 µl), 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 µl inférieur au volume d'élution déposé sur la membrane de la colonne QIAamp Mini.

Remarque : si vous prévoyez d'obtenir une faible quantité d'AN, 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 rpm) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.

# 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<sup>e</sup> 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.

## Remarques importantes 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 du vide doit être entre –800 et –900 mbar.

- Laisser les échantillons se stabiliser à température ambiante.
- Utiliser du tampon phosphate salin 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 19.
- 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 24.
- Ajouter l'ARN entraîneur reconstitué dans le Buffer AVE au Buffer ACL conformément aux consignes du Tableau 3.

Tableau 3. Volume de Buffer ACL et d'ARN entraîneur (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	ARN entraîneur dans le Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Nombre d'échantillons	Buffer ACL (ml)					
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. Visser le bouchon du tube et vortexer par impulsions pendant 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 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 ( $\pm 1$  °C) pendant 30  $\pm 2$  minutes.
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 vortexer soigneusement par impulsions pendant 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  $5 \pm 1$  minutes 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 19). 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 et jeter l'élément d'extension de colonne.

Noter que les grands volumes de lysats d'échantillons (environ 18 ml pour un volume d'échantillon de 5 ml au démarrage) peuvent requérir jusqu'à 20 minutes 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 rpm) pendant 3±0,5 minutes.
14. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage de 2 ml neuf. Ouvrir le couvercle et incubé l'ensemble à 56 °C (±1 °C) pendant 10±1 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 13. Déposer soigneusement 20 à 150 µl de Buffer AVE au centre de la membrane de la colonne QIAamp Mini. Fermer le couvercle et incubé à température ambiante pendant 3±0,5 minutes.

Remarque importante : Vérifier que le Buffer AVE s'est stabilisé à température ambiante (15–25 °C). En cas d'utilisation de petits volumes d'élution (<50 µl), 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 µl inférieur au volume d'élution déposé dans la colonne QIAamp Mini.

Remarque : si vous prévoyez d'obtenir une faible quantité d'AN, 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 rpm) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.

# 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 :

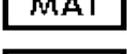
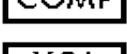
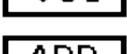
- K2-EDTA (Beckton Dickinson, référence catalogue 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnlaytiX, référence catalogue 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, référence catalogue 218962)

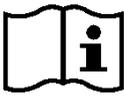
Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider les performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

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 poussée, il est conseillé de suivre la directive ICH Q2 (R1) Validation Of Analytical Procedures : Text And Methodology de la Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques (ICH).

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

# Symboles

Symbole	Définition du symbole
	Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	À réception
	Ouvrir à la livraison ; conserver les colonnes de centrifugation QIAamp Mini à une température comprise entre 2 et 8 °C
	Référence catalogue
	Numéro
	Numéro de lot
	Référence produit
	Composants
	Volume
	Ajouter

	Limite de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	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
	Contient
	Mène à
	Thiocyanate de guanidine
	Chlorhydrate de guanidine
	BRIJ 58
	Code article international (global trade item number, GTIN)

---

## Références

1. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.
2. 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.
3. 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.
4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* 10, 21.
5. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. 57, 932-953.

## Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) ou contacter les Services techniques de QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous permettre de résoudre les problèmes éventuels. Pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site [www.qiagen.com](http://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.<br>Remarque : certains individus peuvent avoir une faible concentration d'AN libres 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 entraîneur         | Mélanger le Buffer ACL avec l'ARN entraîneur en retournant doucement le tube de mélange Buffer ACL-ARN entraîneur 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.  |
| 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 24).   |

## Commentaires et suggestions

- |    |   |  |
|----|---|--|
| 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 24). 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 24). Répéter la procédure de purification avec de nouveaux échantillons. |

L'ARN ou l'ADN 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.<br><br>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 entraîneur | Si la présence d'ARN entraîneur 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.<br><br>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.<br><br>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.<br><br>Répéter la procédure ci-dessus si la colonne QIAamp Mini continue de s'obstruer.<br><br>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.<br><br>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.  |

#### Commentaires et suggestions

---

- 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.

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

Avec des tubes de prélèvement sanguin (blood collection tubes, BCT) 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 les spécifications de CEN/TS 16835-3:2015.

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'ARN ou d'ADN 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 rpm) 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 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, il est important de 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 aseptiques de microbiologie. 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	Référence catalogue
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
<b>Accessoires</b>		
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](http://www.qiagen.com) ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

# Historique des révisions du manuel

Date	Modifications
R4 09/2019	Modification de l'utilisation prévue pour les acides nucléiques libres à partir de plasma humain uniquement. Inclusion du protocole « Breeze ». Aucun protocole inclus pour l'urine et les miARN. Réactualisation des informations de sécurité.

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 ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, 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](http://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 kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit 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 kit 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 kit et/ou à ses composants.

Pour les mises à jour de la licence, consulter le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (groupe QIAGEN) ; BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company) ; 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.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, tous droits réservés.

