

Mode d'emploi (manuel) du QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit



Version 3



Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour une utilisation avec le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE



R1 1127543FR

Sommaire

Utilisation prévue.....	4
Utilisateurs prévus.....	4
Description et principe	5
Lyse des cellules sanguines.....	5
Fixation de l'ADN génomique sur la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini.....	5
Élimination des contaminants résiduels.....	6
Élution de l'ADN génomique purifié	6
Rendement et qualité de l'ADN génomique	7
Purification automatisée sur le QIAcube Connect MDx.....	7
Résumé et explications	10
Matériel fourni.....	11
Contenu du kit	11
Composants du kit.....	12
Matériel nécessaire, mais non fourni	13
Réactifs supplémentaires.....	13
Consommables	13
Équipement.....	13
Pour la procédure avec aspiration sous vide uniquement.....	13
Pour la procédure automatisée uniquement.....	14
Avertissements et précautions	15
Informations de sécurité.....	15

Précautions	16
Mise au rebut	17
Conservation et manipulation des réactifs	18
Stabilité à l'utilisation	18
Prélèvement, stockage et manipulation des échantillons	19
Remarques importantes	21
Points importants avant de démarrer un protocole	21
Préparation des réactifs et tampons	22
Manipulation des colonnes de centrifugation QIAamp Mini	23
Configuration du système de vide QIAvac 24 Plus	24
Procédure	26
Protocole : Extraction et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang à l'aide d'une microcentrifugeuse ou d'une purification automatisée sur le QIAcube Connect MDx.	26
Protocole : Extraction et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang à l'aide d'un système de vide	31
Contrôle de la qualité	36
Limitations	37
Caractéristiques de performances	38
Guide de dépannage	39
Symboles	43
Informations pour commander	46
Historique des révisions du document	48

Utilisation prévue

Le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit est un système utilisant une technologie à base de membranes de silice (la technologie QIAamp) pour extraire et purifier l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques.

Le QIAamp DSP DNA Blood Mini 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.

Mode d'emploi (manuel) du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Description et principe

Chaque procédure QIAamp DSP DNA Blood Mini comprend 4 étapes :

- Lyse des cellules dans l'échantillon de sang
- Fixation de l'ADN génomique du lysat cellulaire sur la membrane d'une colonne de centrifugation QIAamp Mini
- Lavage de la membrane
- Éluion de l'ADN génomique fixé sur la membrane

Ce manuel présente les protocoles pour 2 procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini différentes : une procédure avec centrifugation, qui nécessite une centrifugeuse ou peut être automatisée sur le QIAcube® Connect MDx (Figure 1), et une procédure avec aspiration sous vide, qui nécessite une centrifugeuse et un système de vide (voir schéma page 9).

Lyse des cellules sanguines

Les échantillons sont lysés dans des conditions dénaturantes à température élevée. La lyse est réalisée en présence de QIAGEN® Protease (QP) et de tampon de lyse (AL).

Fixation de l'ADN génomique sur la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini

Afin d'optimiser la fixation de l'ADN génomique sur la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, de l'éthanol est d'abord ajouté aux lysats. Chaque lysat est ensuite transféré dans une colonne de centrifugation QIAamp Mini. L'ADN génomique est adsorbé sur la membrane de silice alors que le lysat passe à travers la membrane sous l'effet de la pression du vide ou de la force centrifuge.

Élimination des contaminants résiduels

Tandis que l'ADN génomique reste fixé sur la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, les contaminants sont éliminés de manière efficace par lavage, d'abord avec le tampon de lavage 1 (AW1), puis avec le tampon de lavage 2 (AW2).

Élution de l'ADN génomique purifié

L'ADN génomique est élué de la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini à l'aide de 50 à 200 µl de tampon d'éluion (AE). L'ADN élué est prêt à l'emploi pour différents dosages en aval, dont divers dosages diagnostiques in vitro effectués en aval. Le tampon d'éluion (AE) doit être amené à température ambiante (15–25 °C) avant d'être déposé sur la colonne.

En raison du tampon d'éluion restant retenu par la membrane de la colonne de centrifugation après la centrifugation, le volume d'éluat obtenu peut être inférieur au volume du tampon d'éluion (AE) déposé sur la colonne. Le volume d'éluat obtenu dépend de la nature de l'échantillon. L'ADN élué est collecté dans des tubes d'éluion (ET) et peut être stocké entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 4 semaines. Pour un stockage à long terme, nous recommandons une conservation à -20 °C.

Remarque : La stabilité de l'éluat dépend fortement de nombreux facteurs et est liée à l'application en aval spécifique. Elle a été évaluée pour le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit en association avec des applications en aval exemplaires. Il incombe à l'utilisateur de consulter le mode d'emploi de l'application en aval spécifique utilisée dans son laboratoire et/ou de valider l'ensemble du flux de travail pour établir les conditions de conservation appropriées.

Rendement et qualité de l'ADN génomique

Le rendement en ADN dépend de l'échantillon et de la qualité du matériel de départ. L'élution dans des volumes plus faibles augmente la concentration finale d'ADN dans l'éluat de manière significative mais réduit légèrement le rendement d'ADN total. Il est recommandé d'utiliser un volume d'élution approprié pour l'application prévue en aval.

Le rendement et la qualité de l'ADN génomique extrait sont adaptés aux procédures de détection en aval dans les diagnostics moléculaires tels que la PCR. Les dosages diagnostiques doivent être réalisés conformément aux consignes des fabricants.

Purification automatisée sur le QIAcube Connect MDx

Le QIAcube Connect MDx effectue de façon automatisée l'extraction et la purification des acides nucléiques. Il peut traiter jusqu'à 12 échantillons par cycle.

La procédure de préparation des échantillons avec le QIAcube Connect MDx suit les mêmes étapes que la procédure manuelle (à savoir : lyse, fixation, lavage et élution), ce qui permet de continuer à utiliser le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit pour la purification de l'ADN de haute qualité.

En cas d'automatisation du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sur l'instrument QIAcube Connect MDx, l'instrument peut traiter moins de 50 échantillons en raison des volumes morts, de l'évaporation et de la consommation supplémentaire de réactif par pipetage automatisé. QIAGEN ne garantit 50 préparations d'échantillons qu'en cas d'utilisation manuelle du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

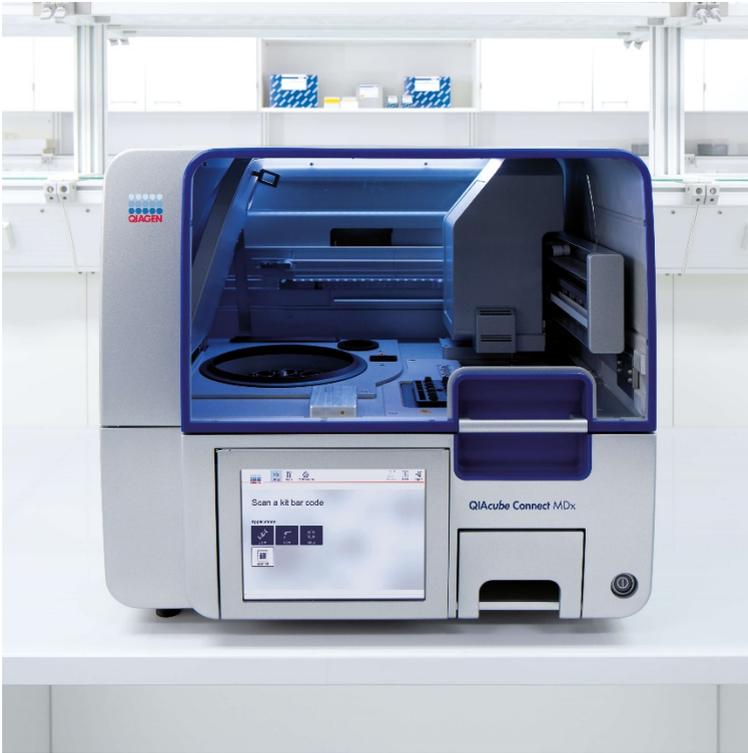
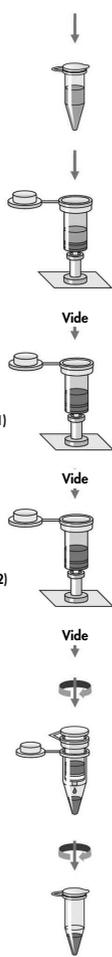


Figure 1. Le QIAcube Connect MDx.

Procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini avec centrifugation et aspiration sous vide

Procédure QIAamp avec centrifugation Échantillon	Procédure QIAamp avec aspiration sous vide Échantillon	
		<p>Lire attentivement les protocoles (pages 26 et 31) avant de commencer.</p> <p>Dans un tube LT, déposer 20 µl de QP, 200 µl d'échantillon et 200 µl d'AL. Vortexer pendant 15 s. Incuber à 56 °C pendant 10 min. Ajouter 200 µl d'éthanol. Vortexer pendant 15 s.</p> <p>Transférer le lysat sur une colonne de centrifugation QIAamp Mini. Procédure avec centrifugation : centrifuger pendant 1 min à 6 000 × g.</p> <p>Procédure avec aspiration sous vide : appliquer le vide.</p> <p>Procédure avec centrifugation : placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube WT, ajouter 500 µl d'AW1 et centrifuger pendant 1 min à 6 000 × g.</p> <p>Procédure avec aspiration sous vide : ajouter 750 µl d'AW1 et appliquer le vide.</p> <p>Procédure avec centrifugation : placer une colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube WT, ajouter 500 µl d'AW2 et centrifuger 1 min à vitesse maximale (environ 20 000 × g ou 14 000 tr/min).</p> <p>Procédure avec aspiration sous vide : ajouter 750 µl d'AW2 et appliquer le vide.</p> <p>Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube WT.</p> <p>Centrifuger pendant 3 min à vitesse maximale (environ 20 000 × g, ou 14 000 tr/min).</p> <p>Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube ET.</p> <p>Ajouter 50 à 200 µl d'AE et incuber pendant 1 min.</p> <p>Centrifuger pendant 1 min à 6 000 × g.</p>

Résumé et explications

Le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit exploite une technologie éprouvée qui permet d'extraire et de purifier rapidement et facilement l'ADN génomique à partir de 200 µl de sang total.

Les procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini, qui ont été développées pour le traitement simultané de plusieurs échantillons de sang, permettent d'obtenir de l'ADN purifié prêt à l'emploi. Ces procédures peuvent être utilisées avec des échantillons de sang total, frais ou congelé, et de sang traité à l'EDTA ou au citrate.

Il n'est pas nécessaire de séparer les leucocytes au préalable. Ces procédures ne nécessitent ni extraction au phénol/chloroforme ni précipitation à l'alcool, et elles ne demandent qu'un nombre restreint d'interventions de l'utilisateur, permettant la manipulation en toute sécurité des échantillons potentiellement infectieux. Ces procédures sont conçues pour limiter la contamination croisée entre les échantillons. L'ADN purifié est prêt à l'emploi pour la PCR ou autres applications. Il peut également être conservé à -20 °C pour un stockage à long terme.

Faciles à mettre en œuvre, les procédures QIAamp DSP avec centrifugation et aspiration sous vide permettent le traitement simultané de plusieurs échantillons. Certaines procédures de centrifugation QIAamp peuvent être entièrement automatisées sur le QIAcube Connect MDx pour favoriser la normalisation et simplifier l'utilisation (page 7).

Pour la procédure avec aspiration sous vide, 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.

Matériel fourni

Contenu du kit

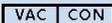
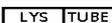
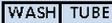
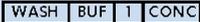
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

N° de référence

61104

Nombre de préparations

50

	Désignation	Symboles	Quantité
5	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini Spin Columns avec tubes de lavage) (WT) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (tubes d'élution) (1,5 ml)	 	50
VC	VacConnectors		50
LT	Lysis Tubes (tubes de lyse) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (tubes de lavage) (2 ml)		3 × 50
AL	Lysis Buffer* (tampon de lyse)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 [†] (tampon de lavage 1) (concentré)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 [†] (tampon de lavage 2) (concentré)		13 ml
AE	Elution Buffer [‡] (tampon d'élution)		25 ml
PS	Protease Solvent [‡] (solvant pour protéase)		2 ml
QP	QIAGEN Protease [§]		1 flacon
-	Mode d'emploi (manuel)		1

* En cas d'automatisation du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sur l'instrument QIAcube Connect MDx, l'instrument peut traiter moins de 50 échantillons en raison des volumes morts, de l'évaporation et de la consommation supplémentaire de réactif par pipetage automatisé. QIAGEN ne garantit 50 préparations d'échantillons qu'en cas d'utilisation manuelle du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

[†] Contient du chlorhydrate de guanidine. Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel. Pour plus d'informations, consulter la section Informations de sécurité page 15.

[‡] Contient de l'azote de sodium comme conservateur.

[§] Le volume de resuspension est de 1,2 ml. Consulter la section « Préparation des réactifs et tampons » page 22.

Composants du kit

Les principaux composants du kit contenant les ingrédients actifs sont détaillés ci-dessous.

Réactif	Ingrédients actifs	Concentration (p/p) [%]
QIAGEN Protease	Subtilisine	≥ 0 à ≤ 100
AL	Chlorhydrate de guanidine Acide maléique	≥ 30 à < 50 $\geq 0,1$ à < 1
AW1	Chlorhydrate de guanidine	≥ 50 à < 70

Matériel nécessaire, mais non fourni

Réactifs supplémentaires

- Éthanol (96–100 %) *

Consommables

- Pipettes† et pointes de pipette (pour éviter toute contamination croisée, il est fortement recommandé d'utiliser des pointes de pipette avec dispositif anti-aérosols)
- Gants jetables

Équipement

- Bloc chauffant† pour la lyse des échantillons à 56 °C (pour les microtubes de 1,5 ml)
- Microcentrifugeuse†
- Éprouvette graduée (50 ml)
- Vortex

Pour la procédure avec aspiration sous vide uniquement

- Système de vide QIAvac 24 Plus (n° de réf. 19413) ou équivalent†
- VacValves (n° de réf. 19408)
- QIAvac Connecting System (n° de réf. 19419)
- Vacuum Pump (n° de réf. 84020)
- Vacuum Regulator (n° de réf. 19530)

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

† Afin de s'assurer du bon traitement des échantillons lors des procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini, il est fortement recommandé que tous les instruments (p. ex. pipettes et blocs chauffants) aient été vérifiés et soient étalonnés conformément aux consignes des fabricants.

Pour la procédure automatisée uniquement

- Instrument QIAcube Connect MDx (n° de réf. 9003070)*
- Rotor Adapters (n° de réf. 990394)
- Rotor Adapter Holder (n° de réf. 990392)
- Sample Tubes CB (n° de réf. 990382 ; tubes d'introduction d'échantillons)
- Shaker Rack Plugs (n° de réf. 9017854)
- Reagent Bottles, 30 ml (n° de réf. 990393)
- Filter Tips, 1000 µl (n° de réf. 990352)
- Filter Tips, 200 µl (n° de réf. 990332)
- SafeSeal Tube, 1,5 ml (Sarstedt®, n° de réf. 72.706)

* Afin de s'assurer du bon traitement des échantillons lors des procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini, il est fortement recommandé que tous les instruments (p. ex. pipettes et blocs chauffants) aient été vérifiés et soient étalonnés conformément aux consignes des fabricants.

Avertissements et précautions

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

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Lire attentivement toutes les instructions avant d'utiliser le kit.

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.

<p>ATTENTION</p> 	<p>NE PAS ajouter d'eau de Javel ou de solutions acides directement aux déchets de préparation des échantillons.</p>
--	--

- Le tampon de lyse (AL) et le tampon de lavage 1 (AW1) contiennent du chlorhydrate de guanidine, qui peut former des composés hautement réactifs au contact de l'eau de Javel. En cas de déversement de liquide contenant ces tampons, nettoyer avec un détergent de laboratoire adapté 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). Si les flacons de tampon fuient ou sont abîmés, porter des gants et des lunettes de protection au moment de les jeter afin d'éviter tout risque de blessure personnelle ou à autrui.

- QIAGEN n'a réalisé aucun test sur les déchets liquides générés par les procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini pour évaluer la présence de matières infectieuses résiduelles. La contamination des déchets liquides par des matières infectieuses résiduelles est très improbable mais ne peut être complètement exclue. Par conséquent, les déchets liquides doivent être considérés comme infectieux et être manipulés et éliminés conformément aux réglementations de sécurité locales.
- 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

États-Unis & Canada 1-800-424-9300

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

Précautions

Les mentions de risque et de sécurité suivantes s'appliquent aux composants du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Buffer AL



Contient : chlorhydrate de guanidine et acide maléique. Avertissement ! Peut être nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée.

Buffer AW1



Contient : 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. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée.

QIAGEN Protease



Contient : subtilisine. Danger ! Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/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 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. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.

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.

Conservation et manipulation des réactifs

Prêter attention aux dates de péremption et aux conditions de conservation imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. Ne pas utiliser de composants périmés ou stockés dans de mauvaises conditions.

Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini doivent être conservées entre 2 et 8 °C dès réception et peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption indiquée sur la boîte du kit.

Remarque : Afin de s'assurer que les composants des différents kits ne sont pas mélangés, penser à étiqueter les colonnes de centrifugation QIAamp Mini avec le numéro de lot du kit respectif.

Tous les tampons peuvent être conservés à température ambiante (15–25 °C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur la boîte du kit.

QIAGEN Protease (QP) lyophilisé peut être conservé à température ambiante (15–25 °C) jusqu'à la date de péremption du kit sans altération des performances.

Stabilité à l'utilisation

QIAGEN Protease (QP) reconstitué est stable pendant une durée maximale de 1 an lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C, mais uniquement jusqu'à la date de péremption du kit. Éviter de garder la solution mère QIAGEN Protease (QP) à température ambiante pendant des périodes prolongées.

Le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué et le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué sont stables pendant une durée maximale de 1 an s'ils sont conservés à température ambiante (15–25 °C), mais uniquement jusqu'à la date de péremption du kit.

Pour la préparation des tampons dans le cadre de la procédure automatisée, suivre les instructions du *manuel d'utilisation QIAcube Connect MDx* (disponible dans l'onglet Resource (Ressource) sur la page du produit à l'adresse www.qiagen.com).

Prélèvement, stockage et manipulation des échantillons

Remarque : La stabilité de l'échantillon dépend fortement de nombreux facteurs et est liée à l'application en aval spécifique. Elle a été évaluée avec des applications en aval exemplaires. Il incombe à l'utilisateur de consulter le mode d'emploi de l'application en aval spécifique utilisée dans son laboratoire et/ou de valider l'ensemble du flux de travail pour établir les conditions de conservation appropriées.

Pour des recommandations générales sur le prélèvement, le transport et le stockage, se référer à la directive MM13-A approuvée du CLSI : « Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods » (Prélèvement, transport, préparation et stockage des échantillons pour les méthodes moléculaires). En outre, les consignes du fabricant concernant le dispositif de prélèvement de l'échantillon sélectionné doivent être suivies lors de la préparation des échantillons, du stockage, du transport et de la manipulation générale. Indépendamment des consignes du fabricant du tube de prélèvement sanguin, la norme ISO 20186-2:2019 (E) doit être prise en compte pour l'extraction d'ADN génomique à partir de sang total veineux.

Remarque : Selon la norme ISO 20186-2:2019 (E), l'héparine contenue dans les tubes de prélèvement sanguin peut avoir un impact sur la pureté des acides nucléiques isolés et un éventuel transfert dans les éluats peut entraîner des inhibitions dans certaines applications en aval. De ce fait, il est recommandé d'utiliser des échantillons de sang traité avec de l'EDTA ou du citrate comme anticoagulant.

Si vous utilisez des échantillons de sang frais en tubes primaires, mélangez bien les échantillons sanguins (p. ex., en retournant les tubes plusieurs fois) avant de transférer l'échantillon. Il faut décongeler rapidement les échantillons congelés (avec un maximum de 3 cycles de congélation/décongélation) au bain-marie à 37 °C en les agitant doucement pour garantir un bon

mélange, puis les laisser s'équilibrer à température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant de commencer la procédure. Ne pas utiliser des échantillons sanguins ayant été congelés et décongelés plus de 3 fois. Pour garantir un transfert d'échantillon fiable, éviter la formation de mousse dans les tubes d'échantillon. Essayer d'éviter la formation de caillots sanguins dans les échantillons et transvaser l'échantillon sans caillots. Les cryoprécipités formés au cours de la décongélation des échantillons congelés risquent d'obstruer la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini ou peut perturber la procédure automatisée sur le QIAcube Connect MDx. Si des cryoprécipités sont visibles, éviter de les aspirer.

Le rendement et la qualité de l'ADN purifié dépendent des conditions de stockage du sang. Les échantillons de sang frais peuvent donner de meilleurs résultats. Pour un stockage à court terme jusqu'à 10 jours, un stockage à une température comprise entre 2 et 8 °C est recommandé. Néanmoins, pour des applications nécessitant une taille de fragment maximum, comme le transfert de Southern, nous conseillons un stockage à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 3 jours seulement, car l'ADN se dégradera légèrement après cette période. Pour un stockage à long terme (plus de 10 jours), prélever du sang dans des tubes contenant un anticoagulant standard (de préférence de l'EDTA, si de l'ADN à masse moléculaire élevée est nécessaire), puis stocker à -20 ou -80 °C.

Remarques importantes

Points importants avant de démarrer un protocole

- Après réception du kit, vérifier que les composants du kit ne sont pas endommagés. Si les emballages blister ou les flacons de tampon sont endommagés, contacter les services techniques QIAGEN ou le distributeur local. En cas de déversement de liquide, consulter la section « Informations de sécurité » (page 15). Ne pas utiliser de composants de kit endommagés, car leur utilisation risque de nuire aux performances du kit.
- Changer systématiquement les pointes de pipette entre chaque transfert de liquide. Afin de limiter la contamination croisée, il est recommandé d'utiliser des pointes de pipette équipées d'un dispositif anti-aérosols.
- Toujours utiliser des gants jetables pendant l'intégralité de la procédure et s'assurer régulièrement qu'ils ne sont pas contaminés par l'échantillon. Jeter les gants s'ils sont contaminés.
- Pour limiter les risques de contamination croisée, ouvrir un seul tube à la fois.
- Après toutes les étapes de passage au vortex par impulsions, centrifuger brièvement les tubes de microcentrifugation afin d'éliminer les gouttes présentes dans les bouchons. L'utilisateur doit s'assurer de garantir la traçabilité des échantillons tout au long de la procédure.
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (15 à 25 °C).
- Ne pas utiliser de composants provenant d'autres kits avec le kit en cours d'utilisation, à moins que les numéros de lots ne soient identiques.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs du kit.
- Afin de limiter les risques d'infection par des matières potentiellement infectieuses, il est recommandé de travailler sous un flux d'air laminaire jusqu'à ce que les échantillons soient lysés.
- Ce kit doit être utilisé uniquement par du personnel formé aux pratiques d'un laboratoire de diagnostic in vitro.

Préparation des réactifs et tampons

- Préparation de QIAGEN Protease

Ajouter 1,2 ml de solvant pour protéase (PS) au flacon de QIAGEN Protease (QP) lyophilisé et mélanger soigneusement. Afin d'éviter la formation de mousse, mélanger en retournant le flacon plusieurs fois. Vérifier que QIAGEN Protease (QP) est entièrement dissoute.

Important : ne pas ajouter QIAGEN Protease (QP) directement dans le tampon de lyse (AL).

- Préparation du tampon de lavage 1

À l'aide d'une éprouvette graduée, ajouter 25 ml d'éthanol (96–100 %) au flacon contenant 19 ml de tampon de lavage 1 (AW1) concentré. Conserver le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué à température ambiante (15–25 °C).

Important : avant de démarrer la procédure, toujours mélanger le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué en retournant plusieurs fois le flacon..

- Préparation du tampon de lavage 2

À l'aide d'une éprouvette graduée, ajouter 30 ml d'éthanol (96–100 %) au flacon contenant 13 ml de tampon de lavage 2 (AW2) concentré. Conserver le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué à température ambiante (15–25 °C).

Important : avant de démarrer la procédure, toujours mélanger le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué en retournant plusieurs fois le flacon.

- Préparation du tampon d'éluion

Un flacon de tampon d'éluion (AE) est fourni dans le kit. Afin d'éviter toute contamination du tampon d'éluion (AE), il est vivement recommandé d'utiliser des pointes de pipette avec dispositif anti-aérosols lors du pipetage du tampon d'éluion (AE) depuis le flacon et de remettre le bouchon sur le flacon tout de suite après.

Important : le tampon d'éluion (AE) contient de l'azoture de sodium comme conservateur, qui présente une absorbance à 260 nm. Par conséquent, vérifier que le blanc contient la même concentration d'azoture de sodium que l'éluat lors de la quantification de l'ADN dans l'éluat par mesure de l'absorbance à 260 nm, lors de la détermination de la pureté de l'ADN dans l'éluat par mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm ou lors du balayage de l'absorbance dans une gamme de 220 nm à 350 nm. Par exemple, en cas de préparation de l'éluat par dilution de 50 µl d'éluat dans 100 µl d'eau pour des mesures d'absorbance, il faut préparer le blanc en diluant 50 µl de tampon d'éluion (AE) dans 100 µl d'eau. Pour les dilutions, utiliser de l'eau fraîche et distillée.

Manipulation des colonnes de centrifugation QIAamp Mini

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

- Transférer avec précaution l'échantillon ou la solution dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini. Déposer l'échantillon à l'aide d'une pipette dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans mouiller le bord de la colonne.
- Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec la pointe de la pipette.
- Ouvrir une seule colonne de centrifugation QIAamp Mini à la fois, et prendre garde à ne pas générer d'aérosols.

Configuration du système de vide QIAvac 24 Plus

Veiller à bien assembler la colonne de centrifugation QIAamp Mini, le VacConnector (VC) et la VacValve (voir figure 2).

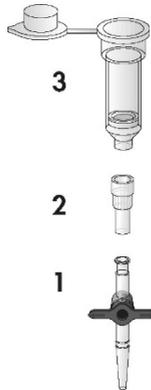


Figure 2. Assemblage des composants du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit pour le traitement des échantillons sous vide. (1) VacValve, (2) VacConnector (VC), et (3) Colonne de centrifugation QIAamp Mini.

En cas d'application de la procédure avec aspiration sous vide à l'aide du système de vide QIAvac 24 Plus, il est recommandé de marquer les tubes de lyse (LT), les tubes d'éluion (ET) et les colonnes de centrifugation QIAamp Mini conformément au schéma de la figure 3 (voir page suivante) afin d'éviter de confondre les échantillons. Cette figure peut être photocopiée afin d'y noter le nom des échantillons. Il est recommandé d'utiliser un schéma semblable en cas d'utilisation d'autres systèmes de vide ou de la procédure avec centrifugation.

Date : _____

Opérateur : _____

ID cycle : _____

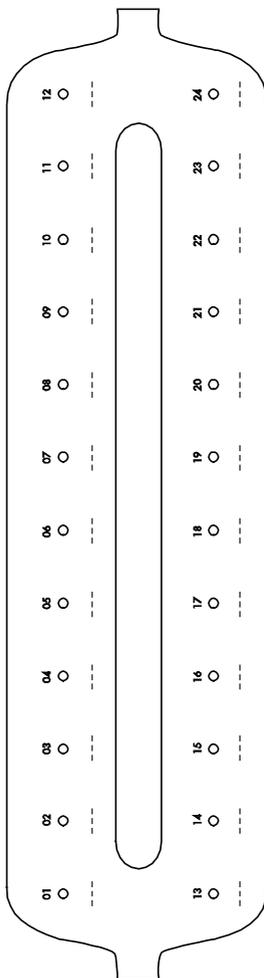


Figure 3. Schéma de marquage des tubes de lyse (LT), des tubes d'éluion (ET) et des colonnes de centrifugation QIAamp Mini utilisés sur le système de vide QIAvac 24 Plus.

Procédure

Protocole : Extraction et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang à l'aide d'une microcentrifugeuse ou d'une purification automatisée sur le QIAcube Connect MDx.

Pour l'extraction et la purification de l'ADN génomique des échantillons de 200 µl de sang total traité à l'EDTA ou au citrate à l'aide d'une microcentrifugeuse ou de façon automatisée sur le QIAcube Connect MDx.

Points importants avant de commencer

- La procédure ci-dessous indique les consignes pour le traitement d'un seul échantillon de sang. Néanmoins, il est possible de traiter simultanément plusieurs échantillons, le nombre d'échantillons dépendant de la capacité de la microcentrifugeuse utilisée.
- Le traitement automatisé de 2 à 10 ou 12 échantillons peut être effectué sur l'instrument QIAcube Connect MDx.
- Pour une automatisation, suivre les instructions affichées sur l'interface utilisateur (QIAcube Connect MDx) et se reporter au *manuel d'utilisation du QIAcube Connect MDx* (disponible sous l'onglet Resource (Ressource) de la page du produit à l'adresse www.qiagen.com).

À faire avant de commencer

- Amener les échantillons de sang à température ambiante, et vérifier qu'ils sont bien mélangés.
- S'assurer que tous les réactifs et les colonnes de centrifugation QIAamp Mini (dans des emballages blisters scellés) sont équilibrés à température ambiante.
- Préchauffer un bloc chauffant à 56 °C pour l'étape 4 (requis pour la procédure manuelle et la procédure automatisée avec lyse en dehors de l'instrument).

- Vérifier que le tampon de lavage 1 (AW1), le tampon de lavage 2 (AW2) et QIAGEN Protease (QP) ont bien été préparés suivant les consignes dans la section « Préparation des réactifs et tampons » page 22.
- Si un précipité s'est formé dans le tampon de lyse (AL), le dissoudre par incubation à 56 °C.
- Chez QIAGEN, les procédures de contrôle qualité intègrent des tests fonctionnels de validation des kits pour chaque lot de kit donné. Il convient donc de ne pas mélanger des réactifs provenant de lots de kits différents et de ne pas combiner des réactifs provenant de lots de réactifs différents.

Procédure

- Pour la procédure manuelle avec une microcentrifugeuse, suivre les étapes 1 à 15.
 - Cette procédure peut être automatisée dans 3 versions différentes :
 - Volume d'élution : 100 µl entièrement automatisé (début de l'automatisation à partir de l'étape 1)
 - Volume d'élution : 200 µl entièrement automatisé (début de l'automatisation à partir de l'étape 1)
 - Lyse manuelle : partiellement automatisée avec lyse en dehors de l'instrument et volumes d'élution de 100 à 200 µl par incrément de 10 µl (début de l'automatisation après l'étape 5).
1. Transférer à l'aide d'une pipette 20 µl de QIAGEN Protéase (QP) dans un tube de lyse (LT).
 - ⓘ Vérifier la date de péremption de la protéase reconstituée avant utilisation.
 2. Ajouter 200 µl de sang dans le tube de lyse (LT).
 3. Ajouter 200 µl de tampon de lyse (AL) au tube de lyse (LT), fermer le capuchon et mélanger ≥ 15 sec par passage au vortex par impulsions.

- i** Afin de garantir l'efficacité de la lyse, il est essentiel que l'échantillon et le tampon de lyse (AL) soient bien mélangés pour former une solution homogène.
 - i** Le tampon de lyse (AL) présentant une viscosité élevée, s'assurer d'ajouter le volume adéquat de tampon de lyse (AL) en pipetant avec le plus grand soin à l'aide d'une pipette appropriée.
 - i** Ne pas ajouter QIAGEN Protease (QP) directement dans le tampon de lyse (AL).
4. Incuber à 56 °C pendant 10 min.
 5. Centrifuger ≥ 5 sec le tube de lyse (LT) à vitesse maximale pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.
 - i** Si la lyse manuelle (étapes 1–5) a été effectuée en dehors de l'instrument, les étapes suivantes (étapes 6–15) peuvent être automatisées sur le QIAcube Connect MDx à l'aide du protocole pour la lyse manuelle.
 6. Ajouter 200 μ l d'éthanol (96 à 100 %) au tube de lyse (LT), fermer le capuchon et bien mélanger ≥ 15 sec par passage au vortex par impulsions.
 7. Centrifuger ≥ 5 sec le tube de lyse (LT) à vitesse maximale pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.
 8. Déposer avec précaution la totalité du lysat de l'étape 7 dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec la pointe de la pipette.
 - i** Si vous traitez plusieurs échantillons, n'ouvrir qu'un tube de lyse (LT) à la fois.
 9. Fermer le bouchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, et centrifuger à environ 6 000 $\times g$ pendant 1 min. Placer la colonne QIAamp Mini Spin dans un tube de lavage (WT) propre, et jeter le tube contenant le filtrat.

i Si le lysat n'est pas complètement passé à travers la membrane après centrifugation à $6\ 000 \times g$ ($8\ 000$ tr/min), recentrifuger à vitesse maximale (jusqu'à $20\ 800 \times g$) pendant 1 min.

i Si le lysat n'est toujours pas entièrement passé travers la membrane pendant la centrifugation, jeter l'échantillon et répéter l'extraction et la purification avec un nouvel échantillon, en commençant par l'étape 1 page 27.

10. Ouvrir la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et ajouter $500\ \mu\text{l}$ de tampon de lavage 1 (AW1) sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec la pointe de la pipette.

11. Fermer le bouchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, et centrifuger à environ $6\ 000 \times g$ pendant 1 min. Placer la colonne QIAamp Mini Spin dans un tube de lavage (WT) propre, et jeter le tube contenant le filtrat.

12. Ouvrir la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et ajouter $500\ \mu\text{l}$ de tampon de lavage 2 (AW2) sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec la pointe de la pipette.

13. Fermer le bouchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, et centrifuger à vitesse maximale (environ $20\ 000 \times g$, ou $14\ 000$ tr/min) pendant 1 min. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage (WT) propre, et jeter le tube contenant le filtrat.

Centrifuger à vitesse maximale (environ $20\ 000 \times g$, ou $14\ 000$ tr/min) pendant 3 min afin de sécher complètement la membrane.

i L'omission de la centrifugation de séchage peut entraîner l'inhibition du dosage en aval.

14. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube d'élution (ET) propre et jeter le tube de lavage (WT) contenant le filtrat. Ouvrir le bouchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et déposer 50 à $200\ \mu\text{l}$ de tampon d'élution (AE) au centre de la membrane.

- ① Il est important d'utiliser un nouveau tube d'élution afin d'éviter une contamination avec les tampons de lavage résiduels qui peut entraîner une inhibition du dosage en aval.
- ① La distribution du tampon d'élution (AE) au centre de la membrane est particulièrement important pour les volumes d'élution les plus faibles afin de garantir une récupération optimale des acides nucléiques et du tampon d'élution (AE).

15. Fermer le bouchon et incuber à température ambiante pendant 1 min. Centrifuger à environ $6\ 000 \times g$ (8 000 tr/min) pendant 1 min pour éluer l'ADN.

- ① Orienter les couvercles des tubes d'élution de façon à ce qu'ils pointent dans la direction opposée à la rotation du rotor (p.ex. si le rotor tourne dans le sens des aiguilles d'une montre, orienter les couvercles dans le sens inverse).
- ① Pour toutes les procédures automatisées, veiller à retirer les éluats de l'instrument tout de suite après la fin du cycle et à les conserver de façon appropriée.

Protocole : Extraction et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang à l'aide d'un système de vide

Pour l'extraction et la purification de l'ADN génomique des échantillons de 200 µl de sang total traité à l'EDTA ou au citrate à l'aide d'un système de vide tel que le système de vide QIAvac 24 Plus.

Remarque importante avant de commencer

La procédure ci-dessous indique les consignes pour le traitement d'un seul échantillon de sang. Néanmoins, il est possible de traiter simultanément jusqu'à 24 échantillons sur le système de vide QIAvac 24 Plus.

À faire avant de commencer

- Amener les échantillons de sang à température ambiante, et vérifier qu'ils sont bien mélangés.
- S'assurer que tous les réactifs et les colonnes de centrifugation QIAamp Mini (dans des emballages blisters scellés) sont équilibrés à température ambiante.
- Régler un bloc chauffant à 56 °C pour l'utiliser à l'étape 4.
- Vérifier que le tampon de lavage 1 (AW1), le tampon de lavage 2 (AW2) et QIAGEN Protease (QP) ont bien été préparés suivant les consignes dans la section « Préparation des réactifs et tampons » page 22.
- Si un précipité s'est formé dans le tampon de lyse (AL), le dissoudre par incubation à 56 °C.
- Pour limiter la contamination croisée, insérer un VacConnector (VC) dans chaque adaptateur Luer du système de vide.
- Vérifier que le flacon à déchets du système de vide est vide et que tous les raccords sont bien connectés.
- Pour plus d'informations sur l'utilisation du système de vide, notamment sur sa maintenance, consulter le manuel fourni avec le système.
- Chez QIAGEN, les procédures de contrôle qualité intègrent des tests fonctionnels de validation des kits pour chaque lot de kit donné. Il convient donc de ne pas mélanger des réactifs provenant de lots de kits différents et de ne pas combiner des réactifs provenant de lots de réactifs différents.

Procédure

1. Déposer à l'aide d'une pipette 20 µl de QIAGEN Protease (QP) dans un tube de lyse (LT).
 - ① Vérifier la date de péremption de la protéase reconstituée avant utilisation.
2. Ajouter 200 µl de sang dans le tube de lyse (LT).
3. Ajouter 200 µl de tampon de lyse (AL) au tube de lyse (LT), fermer le capuchon et mélanger ≥ 15 sec par passage au vortex par impulsions.
 - ① Afin de garantir l'efficacité de la lyse, il est essentiel que l'échantillon et le tampon de lyse (AL) soient bien mélangés pour former une solution homogène.
 - ① Le tampon de lyse (AL) présentant une viscosité élevée, s'assurer d'ajouter le volume adéquat de tampon de lyse (AL) en pipetant avec le plus grand soin à l'aide d'une pipette appropriée.
 - ① Ne pas ajouter QIAGEN Protease (QP) directement dans le tampon de lyse (AL).
4. Incuber à 56 °C pendant 10 min.
5. Centrifuger le tube de lyse (LT) pendant ≥5 s à vitesse maximale afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.
6. Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100 %) au tube de lyse (LT), fermer le capuchon et bien mélanger ≥ 15 sec par passage au vortex par impulsions.
7. Centrifuger le tube de lyse (LT) pendant ≥5 s à vitesse maximale afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.
8. Insérer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans le VacConnector (VC) du système de vide. S'assurer que la vanne de dépression principale (entre le système de vide et le collecteur de vide) et la vanne du bouchon à vis (sur le collecteur de vide) sont fermées. Allumer la pompe à vide.

Jeter le tube de lavage (WT) (2 ml) dans lequel la colonne de centrifugation QIAamp Mini est placée dans le blister.

Le vide est appliqué uniquement au système de connexion (le cas échéant), et non au collecteur de vide.

9. Déposer avec précaution la totalité du lysat de l'étape 7 dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec la pointe de la pipette.

i Si vous traitez plusieurs échantillons, n'ouvrir qu'un tube de lyse (LT) à la fois.

10. Ouvrir la vanne de dépression principale. Une fois le lysat passé à travers la colonne de centrifugation QIAamp Mini, fermer la vanne de dépression principale et ouvrir la vanne du bouchon à vis du collecteur de vide pour la remise à pression atmosphérique du collecteur. Fermer la vanne du bouchon à vis après l'évacuation du vide du collecteur.

Une fois la vanne de dépression principale fermée, le vide est appliqué uniquement au système de connexion (le cas échéant), et non au collecteur de vide.

i Utiliser la vanne du bouchon à vis du collecteur de vide pour évacuer rapidement le vide.

i Pour traiter plusieurs colonnes de centrifugation QIAamp Mini à la fois, il est recommandé de fermer la VacValve de chaque colonne une fois le lysat passé, afin de réduire la durée de cette étape.

i Si le lysat n'est pas entièrement passé à travers la membrane au bout de 10 min, placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage (WT) propre, fermer le bouchon et centrifuger à $6\ 000 \times g$ (8 000 tr/min) pendant 3 min ou jusqu'à ce que le lysat soit complètement passé à travers la membrane. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un autre tube de lavage (WT) propre et poursuivre avec l'étape 10 du protocole de la page 33.

i Si le lysat n'est toujours pas entièrement passé travers la membrane pendant la centrifugation, jeter l'échantillon et répéter l'extraction et la purification avec un nouvel échantillon, en commençant par l'étape 1 page 32.

11. Déposer 750 µl de tampon de lavage 1 (AW1) dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec la pointe de la pipette. Laisser le bouchon de la colonne ouvert et ouvrir la vanne de dépression principale. Une fois le tampon de lavage 1 (AW1) passé à travers la colonne de centrifugation QIAamp Mini, fermer la vanne de dépression principale et ouvrir la vanne du bouchon à vis afin de permettre la remise à pression atmosphérique du collecteur. Fermer la vanne du bouchon à vis après l'évacuation du vide du collecteur.
12. Déposer 750 µl de tampon de lavage 2 (AW2) dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec la pointe de la pipette. Laisser le bouchon de la colonne ouvert et ouvrir la vanne de dépression principale. Une fois le tampon de lavage 2 (AW2) passé à travers la colonne de centrifugation QIAamp Mini, fermer la vanne de dépression principale et ouvrir la vanne du bouchon à vis afin de permettre la remise à pression atmosphérique du collecteur. Fermer la vanne du bouchon à vis après l'évacuation du vide du collecteur.
13. Fermer le bouchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, la retirer du système de vide et jeter le VacConnector (VC). Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage (WT) propre et centrifuger à vitesse maximale (environ 20 000 x g, ou 14 000 tr/min) pendant 3 min pour sécher complètement la membrane.
 -  L'omission de la centrifugation de séchage peut entraîner l'inhibition du dosage en aval.
14. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube d'élution (ET) propre et jeter le tube de lavage (WT) contenant le filtrat. Ouvrir le bouchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et déposer 50 à 200 µl de tampon d'élution (AE) au centre de la membrane.
 -  Il est important d'utiliser un nouveau tube d'élution (ET) afin d'éviter une contamination avec les tampons de lavage résiduels qui peut entraîner une inhibition du dosage en aval.

- ① La distribution du tampon d'élution (AE) au centre de la membrane est particulièrement important pour les volumes d'élution les plus faibles afin de garantir une récupération optimale des acides nucléiques et du tampon d'élution (AE).

15. Fermer le bouchon et incubé à température ambiante pendant 1 min. Centrifuger à $6\ 000 \times g$ (8 000 tr/min) pendant 1 min pour éluer l'ADN.

- ① Orienter les couvercles des tubes d'élution (ET) de façon à ce qu'ils pointent dans la direction opposée à la rotation du rotor (p.ex. si le rotor tourne dans le sens des aiguilles d'une montre, orienter les couvercles dans le sens inverse).
- ① Suivre la procédure de maintenance pour le système de vide après avoir effectué ce protocole (consulter le manuel fourni avec le système de vide pour plus d'informations).

Contrôle de la qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit est testé en fonction de spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Limitations

Les performances du système ont été établies à l'aide de sang total pour l'extraction d'ADN génomique.

Les informations sur l'utilisation du QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sont disponibles dans la section « Description et principe ». La procédure automatisée est détaillée dans la section « Protocole : Extraction et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang à l'aide d'une microcentrifugeuse ou d'une purification automatisée sur le QIAcube Connect MDx ».

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

Afin de 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 suivantes : « International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) in ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology » (Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques exposées dans ICH Q2(R1) Validation des procédures analytiques : texte et méthodologie).

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 dans l'onglet Resource (Ressource), sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com.

Guide de dépannage

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

Commentaires et suggestions

Manipulation générale

- a) Obstruction des pointes de pipette lors du transfert d'échantillon
- Mélanger soigneusement les échantillons sanguins (p. ex. en retournant les tubes plusieurs fois) avant le transfert d'échantillon. Il faut décongeler rapidement les échantillons congelés au bain-marie à 37 °C en les agitant doucement pour garantir un bon mélange, puis les laisser s'équilibrer à température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant de commencer la procédure.
- Essayer d'éviter la formation de caillots sanguins dans les échantillons et transvaser l'échantillon sans caillots. Les cryoprécipités formés au cours de la décongélation des échantillons congelés risquent d'obstruer la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini ou peut conduire à des problèmes pendant la procédure automatisée.
- b) Colonne de centrifugation QIAamp Mini obstruée
- Flux de travail avec centrifugation :
- Si le lysat n'est pas complètement passé à travers la membrane après centrifugation à 6 000 × g (8 000 tr/min), recentrifuger à vitesse maximale (jusqu'à 20 800 × g) pendant 1 min.
- Si le lysat ne passe toujours pas à travers la membrane pendant la centrifugation, mettre l'échantillon au rebut et répéter l'extraction et la purification avec un nouvel échantillon, en commençant par l'étape 1.
- Flux de travail avec aspiration sous vide :
- 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 VacConnector-VacValve de la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans perdre de lysat.
- Retirer la colonne de centrifugation 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 VacConnector-VacValve contenant le lysat restant. Allumer la pompe à vide, ouvrir la VacValve et continuer de charger le lysat restant.

Commentaires et suggestions

Répéter la procédure ci-dessus si la colonne de centrifugation QIAamp Mini continue de s'obstruer.

Si le lysat ne passe toujours pas à travers la membrane pendant la centrifugation, mettre l'échantillon au rebut et répéter l'extraction et la purification avec un nouvel échantillon, en commençant par l'étape 1.

Informations générales

Des cryoprécipités ont pu se former à cause des congélations et décongélations répétées. Ils peuvent bloquer la colonne de centrifugation QIAamp Mini. Ne pas utiliser des échantillons sanguins ayant été congelés et décongelés plus de 3 fois. Il faut décongeler rapidement les échantillons congelés au bain-marie à 37 °C en les agitant doucement pour garantir un bon mélange, puis les laisser s'équilibrer à température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant de commencer la procédure.

- | | | |
|----|---|---|
| c) | Un précipité s'est formé dans le tampon de lyse (AL) | Dissoudre en incubant le tampon de lyse (AL) à 56 °C. |
| d) | Volumes d'élution variables | <p>Le volume d'éluat obtenu dépend de la nature de l'échantillon.</p> <p>En raison du tampon d'élution (AE) restant retenu par la membrane de la colonne de centrifugation après la centrifugation, le volume d'éluat obtenu peut être inférieur au volume du tampon d'éluat déposé sur la colonne.</p> <p>Déposer le tampon d'élution (AE) au centre de la membrane. La distribution du tampon d'élution (AE) au centre de la membrane est particulièrement important pour les volumes d'élution les plus faibles afin de garantir une récupération optimale des acides nucléiques et du tampon d'élution (AE).</p> |
| e) | Pression du vide d'environ 800 à 900 mbar non atteinte | <p>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.</p> <p>Les VacValves sont usées. Retirer toutes les VacValves et insérer des VacConnectors (VC) directement dans les extensions luer. Insérer des colonnes de centrifugation QIAamp Mini dans les VacConnectors (VC), fermer le couvercle des colonnes et activer le vide. Vérifier que la pression du vide est atteinte. Remplacer les VacValves si nécessaire.</p> <p>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.</p> <p>Si la pression du vide ne peut toujours pas être atteinte, remplacer la pompe à vide avec un modèle plus puissant.</p> |
| f) | Pour les problèmes dans la procédure de travail automatisée | Se reporter au <i>manuel d'utilisation du QIAcube Connect MDx</i> (disponible dans l'onglet Resource (Ressource) sur la page du produit à l'adresse www.qiagen.com). |

Faible rendement d'ADN

- a) Lyse des échantillons incomplète
- Si la QIAGEN Protease (QP) 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 Protease (QP).
- Prendre soin de dissoudre la QIAGEN Protease (QP) avec le solvant pour protéase (PS) en suivant les instructions ci-dessous. Afin d'éviter la formation de mousse, mélanger en retournant le flacon plusieurs fois. Vérifier que QIAGEN Protease (QP) est entièrement dissoute. Ne pas ajouter QIAGEN Protease (QP) directement dans le tampon de lyse (AL).
- Afin de garantir l'efficacité de la lyse, il est essentiel que l'échantillon et le tampon de lyse (AL) soient bien mélangés pour former une solution homogène. Le tampon de lyse (AL) présentant une viscosité élevée, s'assurer d'ajouter le volume adéquat de tampon de lyse (AL) en pipetant avec le plus grand soin à l'aide d'une pipette appropriée.
- b) Faible pourcentage d'éthanol utilisé au lieu de 96 à 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.
- c) Buffer AW1 ou Buffer AW2 préparés de façon incorrecte
- S'assurer que les concentrés de Buffer AW1 et Buffer AW2 ont été dilués dans le bon volume d'éthanol à 96–100 % et mélangés en retournant le flacon plusieurs fois avant de commencer la procédure.
- d) Les échantillons sanguins n'ont pas été stockés correctement.
- Le rendement et la qualité de l'ADN purifié dépendent des conditions de stockage du sang. Les échantillons de sang frais peuvent donner de meilleurs résultats. Pour un stockage à court terme jusqu'à 10 jours, un stockage à une température comprise entre 2 et 8 °C est recommandé. Néanmoins, pour des applications nécessitant une taille de fragment maximum, comme le transfert de Southern, nous conseillons un stockage à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 3 jours seulement, car l'ADN se dégradera légèrement après cette période. Pour un stockage à long terme (plus de 10 jours), prélever du sang dans des tubes contenant un anticoagulant standard (de préférence de l'EDTA, si de l'ADN à masse moléculaire élevée est nécessaire), puis stocker à -20 ou -80 °C.
- e) Les échantillons sanguins congelés ont été mal mélangés après décongélation
- Il faut décongeler rapidement les échantillons congelés au bain-marie à 37 °C en les agitant doucement pour garantir un bon mélange, puis les laisser s'équilibrer à température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant de commencer la procédure.

L'ADN ne réagit pas bien dans les réactions en aval

- a) Peu ou pas d'ADN dans l'éluat
- Voir « Faible rendement d'ADN » ci-dessus pour des motifs possibles. Si possible, augmenter la quantité d'éluat ajoutée à la réaction enzymatique.

Commentaires et suggestions

- | | | |
|----|------------------------------------|--|
| b) | Volume d'élution 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'élution peut être adapté de façon proportionnelle. L'élution avec des volumes de tampon AE plus faibles donne des concentrations en acides nucléiques plus élevées, mais peut entraîner une diminution du rendement total. |
| c) | Volume d'ADN insuffisant | Quantifier l'ADN purifié par mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 260 nm. |
| d) | Trop d'ADN utilisé | Un excès d'ADN peut inhiber certaines réactions enzymatiques. Quantifier l'ADN purifié par mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 260 nm. |
| e) | Transfert possible d'inhibiteur | Veiller à exécuter l'étape de centrifugation de séchage avant l'élution afin d'éviter une possible inhibition du dosage en aval. Il est important d'utiliser un nouveau tube d'élution (ET) afin d'éviter une contamination avec les tampons de lavage résiduels qui peut entraîner une inhibition du dosage en aval. |

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
	À réception
	Ouvrir à la livraison ; conserver les colonnes de centrifugation QIAamp Mini entre 2 et 8 °C
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
	Composants
	Contient

Symbole	Définition du symbole
	Nombre
	Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Limites de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	Volume
	Noter la date du jour sur le flacon après avoir ajouté l'éthanol
	Ajouter
	Lyophilisé
	Reconstituer dans
	Éthanol

Symbole

Définition du symbole

 The symbol consists of the text 'GuHCl' in a bold, black, sans-serif font, enclosed within a black rectangular border.	Chlorhydrate de guanidine
 The symbol consists of the text 'SUBT' in a bold, black, sans-serif font, enclosed within a black rectangular border.	Subtilisine
 A simple black arrow pointing to the right.	Mène à
 The symbol consists of a black outline of an open book with a lowercase 'i' in a bold, black, sans-serif font positioned to the right of the book.	Consulter le mode d'emploi
 The symbol consists of a lowercase 'i' in a bold, black, sans-serif font, enclosed within a black circle.	Remarque importante
 The symbol consists of the text 'UDI' in a bold, black, sans-serif font, enclosed within a black rectangular border.	Identificateur unique d'appareil

Informations pour commander

Produit	Contenu	N° de réf.
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Pour 50 préparations : Colonnes de centrifugation QIAamp Mini, tampons, réactifs, tubes, VacConnectors	61104
Produits associés		
QIAcube Connect MDx*	Instrument et garantie de 1 an pièces et main d'œuvre	9003070
Accessoires		
QIAvac 24 Plus†	Collecteur de vide pour le traitement de 1 à 24 colonnes de centrifugation : inclut le QIAvac 24 Plus vacuum manifold, bouchons Luer, raccords rapides	19413
Vacuum Pump (230 V, 50 Hz)†	Pompe à vide universelle (capacité de 34 litres/min, abs. de vide de 8 mbar)	84020
VacConnectors (500)†	500 raccords jetables pour utilisation avec les colonnes de centrifugation QIAamp sur les raccords Luer	19407
VacValves (24)	24 vannes à utiliser avec le QIAvac 24 et le QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	À utiliser avec les collecteurs QIAvac	19530
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
Rotor Adapters (10 x 24)	Pour 240 préparations : 240 adaptateurs pour rotor jetables et 240 tubes d'éluion (1,5 ml), à utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990394

Produit	Contenu	N° de réf.
Rotor Adapter Holder	Support pour 12 adaptateurs pour rotor jetables ; à utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB (2 ml)	1 000 tubes à bouchon à vis coniques sans collerette (2 ml), à utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Broches du portoir de l'agitateur (12)	9017854
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Flacons de réactif (30 ml) avec bouchons ; paquet de 6 pour utilisation avec le QIAcube Connect MDx	990393
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Pointes à filtre jetables, sur portoir ; (8 × 128). À utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (1024)	Pointes à filtre jetables, grand diamètre, sur portoir ; (8 × 128) ; non requises pour tous les protocoles. À utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Pointes à filtre jetables, sur portoir ; (8 × 128). À utiliser avec le QIAcube Connect MDx et les instruments QIASymphony SP/AS	990332

* Le QIAcube Connect MDx n'est pas disponible dans tous les pays. Pour plus d'informations, contacter les services techniques QIAGEN.

† Pour utilisation avec les protocoles sous vide.

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

Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, juin 2022	<p>Version 3, Révision 1</p> <ul style="list-style-type: none">● Mise à jour de la version 3 du Kit pour respecter l'IVDR● Mise à jour de la section « Description et principe »● Mise à jour des sections « Matériel fourni » (ajout des ingrédients actifs) et « Matériel nécessaire mais non fourni »● Mise à jour de la section « Avertissements et précautions » (Ajout d'informations d'urgence et de la section « Mise au rebut »)● Mise à jour de la section « Conservation et manipulation des réactifs »● Mise à jour de la section « Prélèvement, stockage et manipulation des échantillons »● Mise à jour des sections « Remarques importantes » et « Procédure »● Mise à jour de la section « Limitations »● Mise à jour de la section « Caractéristiques de performances »● Mise à jour de la section « Symboles »● Mise à jour de la section « Informations pour commander »

Cette page a été laissée vierge intentionnellement

Contrat de licence limitée pour le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

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

1. Le produit doit être utilisé uniquement avec les composants du panel, conformément aux protocoles fournis avec le produit et à ce manuel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresse 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®, QIAcube® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co. KG).

Juin 2022 HB-3030-001 1127543 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

