

Février 2017

Manuel du kit QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue



Version 1

IVD

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro



REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALLEMAGNE

R3 MAT

1062689FR

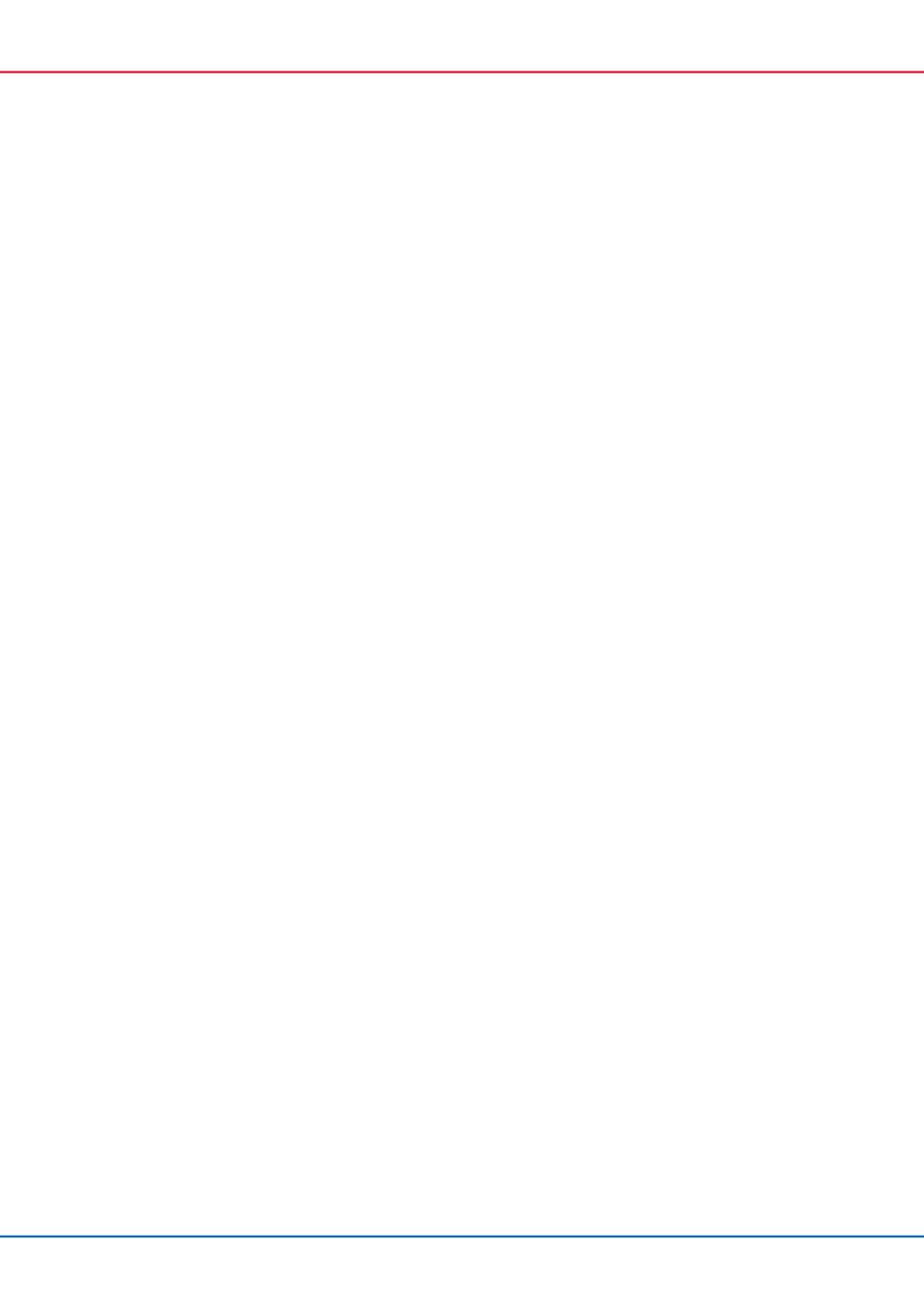


Table des matières

Utilisation prévue	5
Résumé et description	5
Principe de la procédure	6
Matériel fourni.....	8
Contenu du kit.....	8
Matériel nécessaire mais non fourni	9
Avertissements et précautions	10
Stockage et manipulation des réactifs.....	11
Stockage et manipulation des échantillons	12
Procédure	13
Préparation des tampons	14
Échantillons de départ.....	15
Consignes de manipulation pour éviter les contaminations croisées	16
Centrifugation	17
Traitement des colonnes QIAamp MinElute en microcentrifugeuse	17
Élution de l'ADN purifié	18
Protocole : Isolation d'ADN génomique à partir de coupes de tissu FFPE.....	20
Contrôle de la qualité.....	24
Limitations.....	24
Caractéristiques de performance	25
Symboles	25
Coordonnées	26
Pour commander	27

Utilisation prévue

Le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue est un système ayant recours à la technologie des membranes de silice (technologie QIAamp) pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques fixés au formol et inclus en paraffine (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Ce produit est destiné à être utilisé par des professionnels, tels que des techniciens et des médecins, formés aux techniques de biologie moléculaire utilisées à des fins de diagnostic in vitro (DIV). Il est destiné à être utilisé pour la préparation manuelle des échantillons et ne génère aucun résultat, qualitatif ou quantitatif.

Résumé et description

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

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

Après l'étape de lyse des échantillons, la procédure simple du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue convient parfaitement à la préparation simultanée de plusieurs échantillons.

L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour chacune des procédures utilisées dans son laboratoire n'étant pas couverte par les études de performances de QIAGEN décrites dans le manuel.

Principe de la procédure

La procédure QIAamp DSP DNA FFPE Tissue comporte six étapes (Figure 1) :

- Élimination de la paraffine : du xylène est utilisé pour dissoudre et éliminer la paraffine
- Lyse : l'échantillon est lysé à 56 °C dans des conditions dénaturantes en présence de Protéinase K
- Chaleur : inversion de la fixation formolée par incubation à 90 °C
- Fixation : l'ADN est retenu sur la membrane et les contaminants évacués
- Lavage : les contaminants résiduels sont éliminés par lavage
- Éluion : l'ADN pur et concentré est élué de la membrane

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure

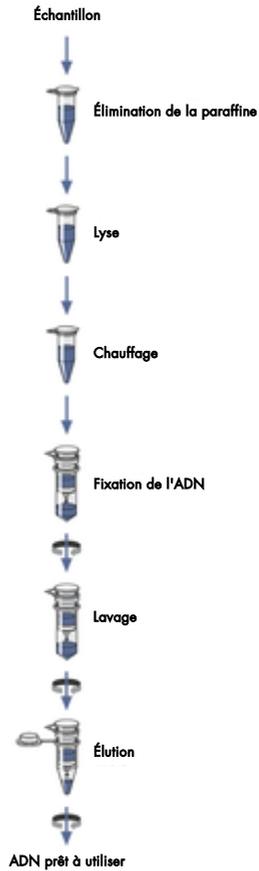


Figure 1. Procédure QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Matériel fourni

Contenu du kit

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
N° de référence			60404
Nombre de réactions			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (colonnes QIAamp MinElute avec tubes de lavage)	COL	50
WT	Wash Tubes (tubes de lavage) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (tubes d'élution) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (tubes de lyse) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (tampon de lyse tissulaire)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer (tampon de lyse)*	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1 (tampon de lavage 1)* (concentré)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (tampon de lavage 2)† (concentré)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer (tampon d'élution)†	ELU BUF	12 ml
PK	Protéinase K	PROTK	1,25 ml
-	Instructions d'utilisation (Manuel)	HB	1

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

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

Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter 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.

Réactifs

- Xylène
- Éthanol (96-100 %) *

Consommables

- Si l'utilisateur décide de ne pas utiliser les tubes fournis dans le kit, nous recommandons des tubes de microcentrifugation de 1,5 ml ou 2 ml pour les étapes de lyse, et des tubes de microcentrifugation de 1,5 ml pour les étapes d'éluion (disponibles auprès d'Eppendorf® [Safe-Lock : n° de réf. 022363204 aux États-Unis ou 0030 120.086 en Europe] ou de Sarstedt [n° de réf. 72.690]). Nous recommandons l'utilisation de tubes à fond conique munis de bouchons sûrs et exempts de DNase/RNase.
- Pipettes et cônes (il est fortement recommandé d'utiliser des cônes à filtre de protection contre les aérosols afin d'éviter toute contamination croisée)

Équipement

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

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

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

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter 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 consultables et imprimables pour chaque kit QIAGEN® et pour chaque composant de kit.



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

Les tampons AL et AW1 contiennent du chlorhydrate de guanidine qui peut former des composés hautement réactifs lorsqu'ils sont associés à un javellisant.

En cas de déversement de liquide contenant ce type de tampons, nettoyer à l'eau et à l'aide d'un détergent de laboratoire approprié. Si le liquide déversé contient des agents potentiellement infectieux, nettoyer dans un premier temps la zone concernée à l'eau accompagnée d'un détergent de laboratoire, puis à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v).

Les mentions de danger et les conseils de prudence applicables aux composants du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue sont indiqués ci-dessous.

Tampon AL



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

Tampon ATL



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

Tampon AW1



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

Protéinase K



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

Stockage et manipulation des réactifs

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

Tous les tampons peuvent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C) et sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation du kit. Toutefois, les tampons AW1 et AW2 reconstitués peuvent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 1 an ou jusqu'à la date limite d'utilisation du kit, la période la plus courte étant retenue.

Le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue contient une solution de Protéinase K prête à l'emploi, fournie dans un tampon de conservation spécialement conçu à cet effet. La Protéinase K est stable jusqu'à la date limite d'utilisation du kit lorsque conservée à température ambiante (15 à 25 °C).

Stockage et manipulation des échantillons

Des procédures standardisées de fixation au formol et d'inclusion en paraffine doivent être utilisées pour limiter le degré de fragmentation de l'ADN. Veiller à :

- Fixer les échantillons de tissu dans le formol conformément au protocole du laboratoire (en règle générale, du formol neutre tamponné à 10 %) le plus rapidement possible après l'ablation chirurgicale.
- La durée de fixation doit être de 14 à 24 heures. Veiller à limiter la durée de fixation car une fixation prolongée (> 24 heures, par exemple) peut aboutir à une fragmentation plus importante de l'ADN, et donc à des performances inférieures lors des tests réalisés en aval.
- Déshydrater soigneusement les échantillons avant de les inclure dans la paraffine (la présence résiduelle de formol peut inhiber la digestion par la Protéinase K).

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

Procédure

Remarques importantes avant de commencer

- Tous les réactifs fournis dans le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue sont destinés à être utilisés uniquement avec les autres réactifs du même kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue. Afin de garantir des performances optimales, les réactifs de ce kit ne doivent pas être remplacés.
- Après réception du kit, vérifier que les composants du kit ne sont pas endommagés. Si les emballages ou les flacons de tampon sont endommagés, contacter les Services Techniques QIAGEN ou votre distributeur local. En cas de déversement de liquide, se reporter à la section « Avertissements et précautions » à la page 10. Ne pas utiliser de composants endommagés. Leur utilisation risque d'engendrer une détérioration des performances du kit.
- Ne pas utiliser, avec le kit en cours d'utilisation, de composants issus de kits différents, à moins que le numéro du lot ne soit identique.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs du kit.
- Le kit doit uniquement être utilisé par du personnel formé aux pratiques d'un laboratoire de diagnostic in vitro.
- Toujours porter des gants en latex ou en vinyle pour manipuler les réactifs et les échantillons afin d'éviter toute contamination pouvant provenir de la surface de la peau ou de poussières présentes sur les équipements de laboratoire. Les bactéries et les champignons microscopiques pouvant se trouver dans les particules de poussière et à la surface des mains représentent des sources fréquentes de contamination. Changer souvent de gants et fermer les tubes immédiatement après usage.
- Éliminer les tampons non utilisés, les effluents de purification et les restes d'échantillon conformément à la procédure locale applicable.

- En cas de non-utilisation des tubes fournis dans le kit, il est recommandé d'utiliser des tubes à fond conique jetables en polypropylène de 1,5 ml à 2 ml à faible adsorption, exempts de DNase/RNase et munis de bouchons sûrs pendant toute la durée de la procédure de purification.
- Effectuer toutes les étapes de centrifugation à température ambiante (15 à 25 °C).
- Tous les tampons doivent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C) ; ils doivent être mélangés convenablement avant utilisation.
- Préchauffer un ThermoMixer ou un agitateur-incubateur orbital à 56 °C pour l'étape 11. En l'absence d'un ThermoMixer ou d'un agitateur-incubateur orbital, un bloc chauffant ou un bain-marie peut être utilisé.
- En cas de présence de précipités dans le tampon AL ou le tampon ATL, les dissoudre à une température de 70 °C sous agitation modérée.
- S'assurer que les tampons AW1 et AW2 ont été préparés conformément aux instructions fournies ci-dessous.
- Chez QIAGEN, les procédures de contrôle de la qualité utilisent des tests fonctionnels de validation des kits pour chaque lot de kit individuel. Par conséquent, il convient de ne pas mélanger les réactifs issus de différents lots de kits et de ne pas combiner les réactifs issus de différents lots de réactifs.

Préparation des tampons

Préparation du tampon ATL

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

Préparation du tampon AL

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

Préparation du tampon AW1

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

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

Préparation du tampon AW2

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

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

Échantillons de départ

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

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

Consignes de manipulation pour éviter les contaminations croisées

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

- Ne pas introduire une quantité excessive de tissu dans les tubes.
- Utiliser un scalpel différent pour chaque échantillon de tissu prélevé par grattage.
- Transférer avec précaution l'échantillon ou la solution dans la colonne QIAamp MinElute. Déposer l'échantillon à la pipette sur la colonne QIAamp MinElute sans toucher le rebord de la colonne.
- Toujours changer les cônes des pipettes entre chaque transfert de liquide. Il est recommandé d'utiliser des cônes à filtre de protection contre les aérosols.
- Toujours utiliser des tubes de lavage neufs lors des étapes de lavage des échantillons.
- S'assurer que les bouchons des tubes sont correctement fermés avant de les agiter au vortex et de les centrifuger.
- S'assurer que les colonnes QIAamp MinElute sont complètement fermées avant de les centrifuger.
- Après chaque étape d'homogénéisation par impulsions au vortex et d'incubation à 90 °C, centrifuger brièvement les tubes de microcentrifugation afin d'enlever les gouttes présentes à l'intérieur des bouchons.
- Ouvrir une seule colonne QIAamp MinElute à la fois et prendre garde à ne pas générer d'aérosols.
- Toujours utiliser des scalpels différents pour chaque échantillon.
- Toujours changer les cônes des pipettes entre chaque transfert de liquide. Pour réduire au minimum les contaminations croisées, il est recommandé d'utiliser des cônes à filtre de protection contre les aérosols et d'éviter l'utilisation de pipettes à répétition.

- Toujours utiliser des gants jetables et s'assurer régulièrement qu'ils ne sont pas contaminés par l'échantillon. Changer de gants s'ils sont susceptibles d'avoir été contaminés.
- N'ouvrir qu'un tube à la fois.

Centrifugation

Les colonnes QIAamp MinElute sont compatibles avec la plupart des tubes de microcentrifugation standard de 1,5 ml à 2 ml. Des tubes de lavage de 2 ml supplémentaires sont disponibles séparément (QIAGEN, n° de réf. 19201). Les colonnes QIAamp MinElute sont centrifugées à environ 6 000 x g afin de réduire le bruit émis par la centrifugeuse. La centrifugation à vitesse maximale n'améliore pas les rendements en ADN. Toutefois, la centrifugation à vitesse maximale des colonnes QIAamp MinElute est requise dans deux étapes de la procédure : l'étape de séchage par centrifugation après lavage des membranes et l'étape d'élution. La centrifugation à vitesse maximale est également requise pour descendre l'échantillon après traitement par le xylène et l'étape de lavage à l'éthanol.

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

Traitement des colonnes QIAamp MinElute en microcentrifugeuse

- Toujours fermer les colonnes QIAamp MinElute avant de les installer dans la microcentrifugeuse.
- Éviter de toucher la membrane de la colonne QIAamp MinElute avec le cône de la pipette.
- Les effluents de purification peuvent contenir des déchets dangereux et doivent être éliminés de manière appropriée.

- Pour un traitement efficace de plusieurs échantillons en parallèle, nous recommandons de remplir un portoir avec des tubes de lavage dans lesquels les colonnes QIAamp MinElute peuvent être transférées après centrifugation. Les tubes de lavage usagés contenant les effluents de purification peuvent être éliminés et les tubes de lavage neufs contenant les colonnes QIAamp MinElute peuvent être placés directement dans la microcentrifugeuse.
- S'assurer de garantir la traçabilité complète des échantillons tout au long de la procédure.

Élution de l'ADN purifié

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

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

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

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

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

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

Procédure

1. À l'aide d'un scalpel, découper la paraffine en excès du bloc d'échantillon.
2. Couper le bloc de tissu pour générer des coupes selon le mode opératoire normal du laboratoire (voir « Échantillons de départ » à la page 15). L'utilisateur doit optimiser le nombre de coupes, ainsi que l'épaisseur et la surface des coupes, pour chacune des procédures réalisées dans son laboratoire. S'assurer de garantir la traçabilité des échantillons tout au long de la procédure.
3. Gratter immédiatement le tissu des coupes à l'aide d'un scalpel stérile et introduire l'échantillon dans un tube de lyse (fourni). S'assurer d'introduire tout le tissu disponible dans le tube. Ajouter 1 ml de xylène à l'échantillon, fermer le bouchon et agitez énergiquement au vortex jusqu'à dissolution de la paraffine (env. 10 s). Veiller à ce que le tube soit bien fermé pour éviter tout débordement de xylène, toute contamination croisée entre les échantillons et une exposition au xylène.

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

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

Remarque : Une température de centrifugation trop basse peut aboutir à des rendements d'extraction sous-optimaux.

5. Aspirer par pipetage pour éliminer le surnageant. Conserver le culot.

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

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

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

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

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

Aspirer avec soin tout l'éthanol résiduel à l'aide d'un cône de pipette fin. Ouvrir le tube et incuber entre 15 et 40 °C jusqu'à évaporation de la totalité de l'éthanol résiduel.

L'élimination de l'éthanol résiduel est essentielle pour une extraction réussie.

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

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

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

9. Incuber à 56 °C ± 3 °C pendant 1 h environ (ou jusqu'à lyse complète de l'échantillon).

10. Incuber à 90 °C ± 5 °C pendant 1 heure ± 5 min.

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

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

12. Ajouter 200 µl de tampon AL et mélanger soigneusement au vortex. Ensuite, ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100 %) et mélanger à nouveau soigneusement au vortex.
Il est essentiel de mélanger immédiatement et soigneusement l'échantillon, le tampon AL et l'éthanol à l'aide d'un agitateur vortex ou par pipetage pour obtenir une solution homogène. Le tampon AL et l'éthanol peuvent être mélangés au préalable et ajoutés ensemble en une seule étape pour gagner du temps lorsque plusieurs échantillons sont traités en même temps. Un précipité blanc peut se former lors de l'ajout du tampon AL et de l'éthanol. Ce précipité n'interfère pas avec la procédure QIAamp. Toujours utiliser un mélange fraîchement préparé et l'éliminer l'excédent immédiatement après utilisation.
13. Centrifuger brièvement le tube afin d'éliminer les gouttes présentes dans le bouchon.
14. Transférer soigneusement la totalité du lysat dans la colonne QIAamp MinElute (placée dans un tube de lavage de 2 ml) sans toucher le rebord de la colonne. Fermer le bouchon et centrifuger à environ 6 000 x g pendant ≥ 1 min. Placer la colonne QIAamp MiniElute dans un tube de lavage de 2 ml propre (fourni), et jeter le tube de lavage contenant l'effluent.
Si la totalité du lysat n'a pas traversé la membrane après centrifugation, centrifuger à nouveau à vitesse plus élevée jusqu'à ce que la colonne QIAamp MinElute soit vide.
15. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 500 µl de tampon AW1 reconstitué sans toucher le rebord. Remettre en place le bouchon et centrifuger à environ 6 000 x g pendant ≥ 1 min. Placer la colonne QIAamp MiniElute dans un tube de lavage de 2 ml propre, et jeter le tube de lavage contenant l'effluent.

16. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 500 µl de tampon AW2 reconstitué sans toucher le rebord. Remettre en place le bouchon et centrifuger à environ 6 000 x g pendant ≥ 1 min. Placer la colonne QIAamp MiniElute dans un tube de lavage de 2 ml propre, et jeter le tube de lavage contenant l'effluent.

Tout contact entre la colonne QIAamp MinElute et l'effluent doit être évité. Veiller à équilibrer le rotor de la centrifugeuse. Certains rotors de centrifugeuse peuvent vibrer lors de la décélération, ce qui entraîne un contact entre l'effluent, qui contient l'éthanol, et la colonne QIAamp MinElute. Veiller également à retirer prudemment la colonne QIAamp MinElute et le tube de lavage du rotor pour éviter tout contact entre l'effluent et la colonne QIAamp MinElute.

17. Centrifuger à vitesse maximale (environ 20 000 x g) pendant environ 3 min pour sécher la membrane.

La présence d'éthanol résiduel dans l'éluat peut interférer avec certaines applications en aval.

18. Placer la colonne QIAamp MinElute dans un tube d'éluion de 1,5 ml propre (fourni) et éliminer le tube de lavage contenant l'effluent. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajouter 20 à 200 µl de tampon ATE au centre de la membrane.

IMPORTANT : Lors de l'utilisation de volumes d'éluion faibles (< 50 µl), déposer le tampon ATE au centre de la membrane pour permettre l'éluion de la totalité de l'ADN fixé. Les colonnes QIAamp MinElute offrent une certaine souplesse par rapport au volume d'éluion. Le volume d'éluion peut donc être choisi selon les besoins de l'application en aval. Le volume d'éluat sera inférieur de 5 µl environ au volume de tampon d'éluion appliqué sur la colonne.

19. Fermer le bouchon et incuber pendant au moins 1 min à température ambiante (15 à 25 °C). Centrifuger à vitesse maximale (environ 20 000 x g) pendant ≥ 1 min.

Une fois le tampon ATE déposé sur la membrane, l'incubation de la colonne QIAamp MinElute pendant environ 5 min à température ambiante avant centrifugation peut améliorer le rendement en ADN.

Contrôle de la qualité

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

Limitations

Les performances du kit sont établies pour l'isolation de l'ADN génomique à partir de coupes de tissu fixé au formol et inclus en paraffine (tissus FFPE).

L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour chacune des procédures utilisées dans son laboratoire n'étant pas couverte par les études de performances de QIAGEN décrites dans le manuel.

Afin de limiter les risques d'impact négatif sur les résultats diagnostiques, des contrôles appropriés doivent être utilisés pour les applications en aval. Pour une validation plus approfondie, il est conseillé de suivre les directives de l'International Conference on Harmonisation (ICH) (Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques) exposées dans le document ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology.

Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés en tenant compte des autres observations cliniques ou résultats biologiques disponibles.

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

Caractéristiques de performance

Pour les caractéristiques de performance du kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue, se reporter à www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE.

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage :

Symbole	Définition des symboles
	Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	À réception
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel
	Composants
	Contient
	Nombre

Symbole

Définition des symboles

	Noter la date du jour sur le flacon après avoir ajouté l'éthanol
	Éthanol
	Ajouter
	Chlorhydrate de guanidine
	Acide maléique
	Code d'article commercial international
	Limite de température
	Fabricant
	Consulter les instructions d'utilisation
	Attention

Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, prière de consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/Support, de téléphoner au 00800-22-44-6000 ou de contacter l'un des services techniques de QIAGEN ou un distributeur local (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Pour commander

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

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d’utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et manuels d’utilisation QIAGEN sont disponibles à l’adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services Techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Marques déposées : QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], MinElute[®] (QIAGEN Group), Eppendorf[®] (Eppendorf AG).

Accord de licence limitée pour le kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du produit consent aux conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis avec le produit et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce panel. 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 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 toute licence, expresse ou tacite, autre 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 cet Accord 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 cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au panel et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com.

Févr./17 HB-04 14-004 © 2017 QIAGEN, tous droits réservés.

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