

Janvier 2020

Manuel du PAXgene[®] Blood RNA Kit

Version 2



50 (référence 762174)

R3 **MAT** 1120409FR

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Produit par QIAGEN GmbH pour PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Marques déposées : PAXgene®, PreAnalytiX™ (PreAnalytiX GmbH) ; QIAGEN®, QIAcube® (groupe QIAGEN) ; BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company) ; Eppendorf® (Eppendorf AG).

Les PAXgene Blood RNA Kits ne sont pas disponibles dans tous les pays ; nous consulter.

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du PAXgene Blood RNA Kit consent aux termes suivants :

1. PAXgene Blood RNA Kit ne doit être utilisé que conformément au *manuel du PAXgene Blood RNA Kit* et uniquement avec les éléments fournis dans le kit. PreAnalytiX n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les éléments fournis dans ce kit avec tous autres éléments non fournis dans ce kit, à l'exception des éléments décrits dans le *manuel du PAXgene Blood RNA Kit* et dans d'autres protocoles disponibles sur www.preanalytix.com.
2. Hormis les licences énoncées expressément, PreAnalytiX n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses éléments sont sous licence pour une utilisation unique et ils ne peuvent être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. PreAnalytiX rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes.
6. PreAnalytiX peut faire appliquer des interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir 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 kit et/ou à ses éléments.

Pour les clauses de licence mises à jour, consulter le site www.preanalytix.com.

Vente conditionnelle

Ce produit est fourni avec une licence au titre de certaines revendications dans les brevets US-7 270 953 et US-7 682 790, ainsi que dans le brevet EP-1 820 793 B1 et dans les équivalents étrangers de ces revendications de brevet, afin d'utiliser le produit pour traiter le complexe d'acides nucléiques formé au cours de la collecte de l'échantillon dans un PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005-2020 PreAnalytiX GmbH, tous droits réservés.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Suisse

www.preanalytix.com

Distributeurs PreAnalytiX

Les produits PreAnalytiX sont fabriqués pour PreAnalytiX par QIAGEN ou BD et sont distribués par QIAGEN ou BD au nom de PreAnalytiX. Les produits ne peuvent pas être commandés directement chez PreAnalytiX GmbH.

Veuillez vous référer à la dernière page pour connaître votre distributeur PreAnalytiX local.

Contenu

| | |
|--|----|
| Contenu du kit | 5 |
| Symboles | 7 |
| Conditions de stockage | 8 |
| Utilisation prévue | 9 |
| Limites d'utilisation | 9 |
| Contrôle qualité | 10 |
| Assistance technique | 10 |
| Informations de sécurité | 10 |
| Introduction | 14 |
| Principe et procédure | 14 |
| Prélèvement et stabilisation de l'échantillon | 15 |
| Concentration et purification de l'ARN | 20 |
| Purification manuelle des ARN | 20 |
| Purification automatisée de l'ARN | 30 |
| Matériel supplémentaire nécessaire et non fourni | 36 |
| Remarques importantes | 38 |
| Utilisation du QIAcube | 38 |
| Démarrage du QIAcube | 38 |
| Installation des protocoles sur le QIAcube | 38 |
| Chargement du QIAcube | 40 |
| Protocole : purification manuelle d'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) | 49 |

Protocole : purification automatisée de l'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 56

Guide de résolution des problèmes 63

Annexe A : remarques générales sur la manipulation de l'ARN..... 65

Annexe B : quantification et détermination de la qualité de l'ARN total 66

Annexe C : manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 68

Pour commander 69

Historique des révisions du manuel 71


Contenu du kit

| PAXgene Blood RNA Kit | | | (50) |
|-------------------------------|--|-----------------|-------------------------------------|
| Référence | | | 762174 |
| Nombre de préparations | | | 50 |
| BR1 | Resuspension Buffer (tampon de resuspension) | RES BUF | 20 ml |
| BR2 | Binding Buffer (tampon de fixation) * | BIND BUF | 18 ml |
| BR3 | Wash Buffer (tampon de lavage) 1 * | WASH BUF 1 | 45 ml |
| BR4 | Wash Buffer (tampon de lavage) 2 concentrate (concentré) [†] | WASH BUF 2 CONC | 11 ml |
| BR5 | Elution buffer (tampon d'éluion) | ELU BUF | 6 ml |
| RNFW | RNase-free Water (eau exempte de RNase, flacon) | PEL WASH | 2 × 125 ml |
| PK | Proteinase K (protéinase K, couvercle vert) | PROTK | 2 × 1,4 ml |
| PRC | PAXgene RNA Spin Columns (colonnes de centrifugation PAXgene RNA, rouges) | PAXgene RNA COL | 5 × 10 |
| PT | Processing tubes (tubes de traitement, 2 ml) | PROC TUBE | 6 × 50 |
| Hemogard | Secondary BD Hemogard™ Closures (bouchons secondaires BD Hemogard) | SEC CLOS | 50 |
| MCT | Microcentrifuge Tubes (tubes de microcentrifugation, 1,5 ml) | MIC TUBE | 3 × 50, 1 × 10 |
| RNFD | DNase I, RNase-free (DNase I, exempte de RNase, lyophilisée) | DNA REM | 1 500 unités Kunitz [‡] |
| RDD | DNA Digestion Buffer (tampon de digestion de l'ADN, couvercle blanc) | DNA DIG BUF | 2 × 2 ml |
| DRB | DNase Resuspension Buffer (tampon de resuspension de la DNase, tube, couvercle lilas) | DNase RES BUF | 2 ml |

*Non compatible avec des réactifs désinfectants contenant de l'eau de Javel. Contient un sel de guanidine. Voir page 10 pour les informations de sécurité.

[†] Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, de qualité analytique) dans le flacon, comme indiqué sur l'étiquette, pour obtenir une solution prête à l'emploi.

[‡] Les unités Kunitz sont souvent utilisées pour mesurer la DNase I et sont définies comme la quantité de DNase I qui provoque une augmentation de l'absorbance à 260 nm de 0,001 par minute et par millilitre à 25 °C et pH 5,0, avec de l'ADN hautement polymérisé comme substrat [Kunitz, M. [1950] J. Gen. Physiol. **33**, 349 et 363].

| | | | |
|-------------------------------|--|---|--------|
| PAXgene Blood RNA Kit | | (50) | |
| Référence | | 762174 | |
| Nombre de préparations | | 50 | |
| PSC | PAXgene Shredder Spin Columns (colonnes de centrifugation PAXgene Shredder, lilas) | PAXgene SHRED COL | 5 × 10 |
| Manuel | Manuel du PAXgene Blood RNA Kit (version 2) |  | 1 |

Symboles



Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests



Consulter le mode d'emploi



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Référence



Numéro de lot



Référence produit



Composants



Numéro



Méthode de stérilisation utilisant l'irradiation UV



Unités Kunitz



Ajouter



Contient














Reconstitué



Désoxyribonucléase I



Éthanol

| | |
|--|--|
|  | Isothiocyanate de guanidine |
|  | RNase-Free DNase Set |
|  | Code article international (global trade item number, GTIN) |
|  | Ne pas réutiliser |
|  | Limite de température |
|  | Limite de température maximale |
|  | Fabricant |
|  | Remarque importante |
|  | Noter la date du jour sur le flacon après y avoir ajouté l'éthanol |
|  | À réception |
|  | Mène à |

Conditions de stockage

Les colonnes de centrifugation PAXgene RNA (PRC), les colonnes de centrifugation PAXgene Shredder (PSC), la protéinase K (PK) et les tampons (BR1, BR2, BR3, BR4 et BR5) peuvent être conservés au sec à la température indiquée sur l'étiquette du kit.

Le RNase-Free DNase Set, qui contient la DNase I (RNFD), le tampon de digestion de l'ADN (RDD) et le tampon de resuspension de la DNase (DRB), est livré à température ambiante. Stocker tous les composants du RNase-Free DNase Set immédiatement après réception à la

température indiquée sur l'étiquette. Dans des conditions de stockage appropriées, le kit est stable jusqu'à la date limite d'utilisation figurant sur la boîte.

Utilisation prévue

Le PAXgene Blood RNA Kit a été développé pour la purification d'ARN intracellulaire à partir de sang total prélevé dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Lorsque le kit est utilisé avec le PAXgene Blood RNA Tube (BRT), le système permet d'obtenir de l'ARN intracellulaire purifié à partir de sang total, qui peut être utilisé pour les tests de diagnostic moléculaire basés sur la RT-PCR. Voir le *manuel du PAXgene Blood RNA Tube (PAXgene Blood RNA Tube Handbook)* pour des informations sur l'utilisation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Les caractéristiques de performance indiquées pour le PAXgene Blood RNA System ont été déterminées uniquement pour les transcrits des gènes FOS et IL1B. L'utilisateur est responsable de la détermination des caractéristiques de performance du PAXgene Blood RNA System pour les autres transcrits.

Limites d'utilisation

Le PAXgene Blood RNA Kit est conçu pour la purification d'ARN intracellulaire à partir de sang total humain ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leucocytes/ml) pour des applications de diagnostic in vitro. Il n'est pas destiné à la purification d'ADN génomique ou d'acides nucléiques viraux à partir de sang total humain. En raison du nombre limité de transcrits validés pour les spécifications de stabilisation (transcrits de gènes FOS et IL1B), les caractéristiques de performance n'ont pas été établies pour tous les transcrits. Il revient au personnel du laboratoire de comparer les données fournies par le fabricant avec les leurs et de décider si une validation est nécessaire pour d'autres transcrits.

Le produit est destiné à des utilisateurs professionnels, tels que des techniciens et des médecins formés aux procédures de diagnostics in vitro.

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot du PAXgene Blood RNA Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

Assistance technique

Chez QIAGEN, nous sommes fiers de la qualité et de la disponibilité de notre assistance technique. Des scientifiques en biologie moléculaire expérimentés sont à votre disposition pour vous conseiller et vous aider à utiliser les produits PreAnalytiX. Ne pas hésiter à les contacter pour toute question sur le PAXgene Blood RNA Kit.

Pour bénéficier d'une assistance technique et obtenir plus d'informations, contacter le service technique de QIAGEN.

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats.

Afin d'éviter tout risque de contamination (p.ex. par le VIH ou le virus de l'hépatite B) ou de blessure lors de la manipulation de matériel biologique ou chimique, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection appropriés. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Les FDS pour ce kit sont disponibles sur **www.preanalytix.com** au format PDF et peuvent être consultées et imprimées.

ATTENTION

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

Le tampon de fixation (BR2) et le tampon de lavage 1 (BR3) contiennent du thiocyanate de guanidine, qui peut former des composés hautement réactifs au contact de l'eau de Javel. En cas de déversement de tampon de fixation (BR2) ou de tampon de lavage 1 (BR3), nettoyer avec un détergent de laboratoire et de l'eau. Si le liquide renversé contient des agents à risque infectieux, nettoyer l'endroit contaminé d'abord avec un détergent et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v).

La solution de stabilisation d'ARN et le mélange sanguin du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) peuvent être désinfectés avec 1 volume d'eau de Javel (hypochlorite de sodium à 5 %) pour 9 volumes de solution de stabilisation d'ARN ou de mélange sanguin.

Les déchets de préparation des échantillons, comme le surnageant des étapes de centrifugation lors de la purification d'ARN, doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Avant leur élimination, ces déchets doivent être autoclavés ou incinérés pour détruire tout matériel infectieux. Éliminer les déchets selon les normes de sécurité en vigueur.

Les avertissements et conseils de prudence suivants s'appliquent aux composants du PAXgene Blood RNA Kit. Voir le *manuel du PAXgene Blood RNA Tube* pour les informations de sécurité sur les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Tampon BR2



Contient du thiocyanate de guanidine. Danger ! Nocif en cas d'ingestion. Peut être nocif en cas de contact avec la peau ou d'inhalation. Provoque des lésions oculaires graves. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX :** rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un **CENTRE ANTIPOISON** ou un médecin.

Tampon BR3



Contient de l'éthanol et du thiocyanate de guanidine. Danger ! Liquide et vapeurs inflammables. Provoque des lésions oculaires graves. Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique. Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX :** rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un **CENTRE ANTIPOISON** ou un médecin.

DNase I



Contient de la DNase. Danger ! Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/dispersions/vapeurs/aérosols. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Porter un équipement de protection respiratoire. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

Protéinase K



Contient de la protéinase K. Danger ! Provoque une légère irritation cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/dispersions/vapeurs/aérosols. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Porter un équipement de protection respiratoire. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

Introduction

Le prélèvement de sang total est la première étape de nombreux tests moléculaires analysant l'ARN cellulaire. L'instabilité du profil d'ARN cellulaire in vitro constitue un grand problème. Des études menées par PreAnalytiX ont montré que le nombre de copies de chaque espèce d'ARNm dans le sang total peut changer plus de 1 000 fois pendant le stockage ou le transport à température ambiante*. Cela est dû à la dégradation rapide de l'ARN et à l'induction de l'expression de certains gènes après le prélèvement du sang. De telles modifications du profil d'expression de l'ARN rendent impossible l'obtention de résultats fiables lors d'études d'expression de gènes. Une méthode permettant de stabiliser le profil d'expression de l'ARN pendant et après la phlébotomie est donc essentielle pour une analyse exacte de l'expression de gènes dans le sang total humain.

Principe et procédure

PreAnalytiX a développé un nouveau système qui permet de prélever, stabiliser, conserver et transporter des échantillons de sang total humain, en combinaison avec un protocole rapide et efficace pour la purification d'ARN intracellulaire. Ce système requiert l'utilisation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT ; brevets US-6 602 718 et 6 617 170) pour le prélèvement du sang et la stabilisation d'ARN ainsi que le PAXgene Blood RNA Kit pour la purification manuelle ou automatisée d'ARN. Les protocoles manuel et automatisé fournissent des performances substantiellement équivalentes concernant la qualité et le rendement en ARN. Les données relatives aux performances des protocoles manuel (pages 23–30) et automatisé (pages 33–35) figurent dans ce manuel.

* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Prélèvement et stabilisation de l'échantillon

Les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contiennent un réactif spécifique basé sur une technologie brevetée de stabilisation d'ARN. Ce réactif protège les molécules d'ARN de la dégradation par les RNases et minimise les modifications ex vivo de l'expression de gènes. Les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pour le prélèvement de sang total humain assurent la stabilisation d'ARN cellulaire jusqu'à 3 jours à une température comprise entre 18 et 25 °C (figures 1 et 2, pages 16 et 17) ou jusqu'à 5 jours entre 2 et 8 °C (figures 3 et 4, pages 18 et 19). Les données actuellement disponibles démontrent une stabilisation d'ARN cellulaire d'au moins 11 ans quand le sang stabilisé est conservé à -20 °C ou à -70 °C*. Pour plus d'informations sur les études de stabilité à plus long terme, contacter le service technique de QIAGEN.

La durée de la stabilisation d'ARN peut varier selon le type d'ARN cellulaire et l'application en aval utilisée. En raison du nombre limité de transcrits validés pour les spécifications de stabilisation (transcrits de gènes FOS et IL1B), les caractéristiques de performance n'ont pas été établies pour tous les transcrits. Il revient au personnel du laboratoire de comparer les données fournies par le fabricant avec les leurs et de décider si une validation est nécessaire pour d'autres transcrits.

* Une étude à long terme sur la conservation du sang dans les PAXgene Blood RNA Tubes est en cours.

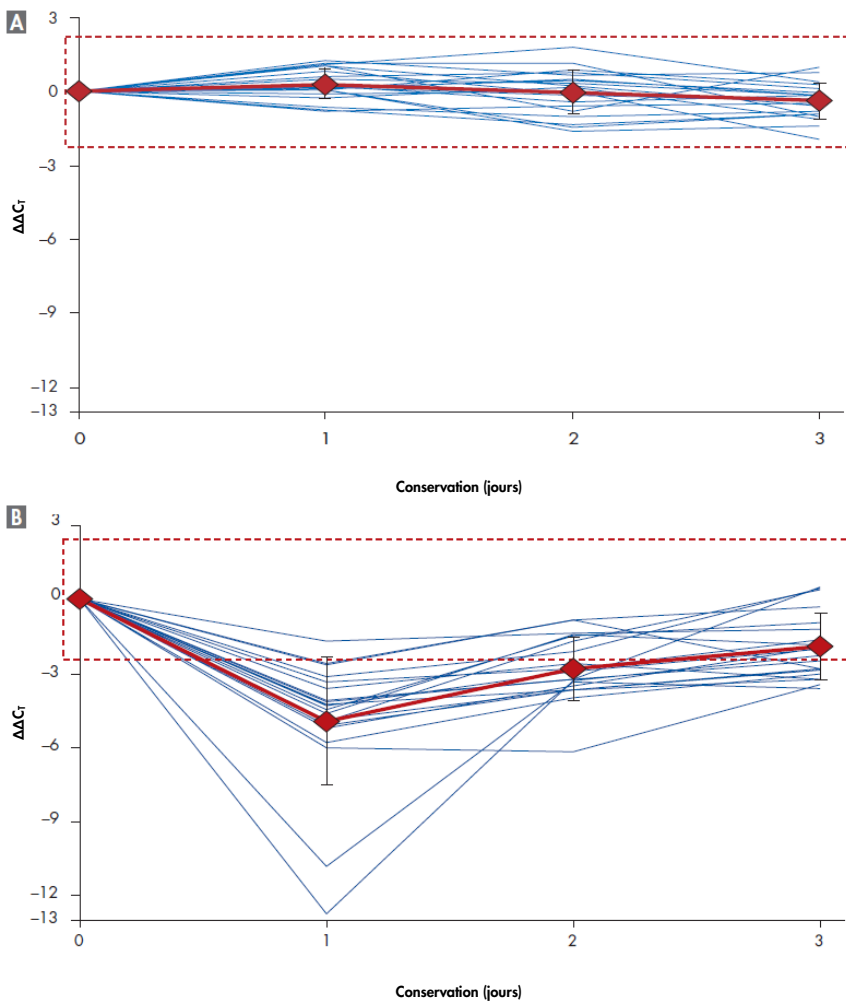


Figure 1. Stabilité de l'ARN dans les échantillons sanguins entre 18 et 25 °C : FOS. Des échantillons de sang ont été prélevés sur 10 donneurs, en duplicats, et conservés à une température comprise entre 18 et 25 °C pendant la durée indiquée, avant la purification d'ARN total. **[A]** Le sang a été prélevé et conservé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). L'ARN total a été purifié à l'aide du PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Les échantillons de sang ont été prélevés et conservés dans des tubes de prélèvement sanguin standard, contenant de l'EDTA comme anticoagulant, et l'ARN total a été purifié selon une méthode d'extraction organique standard avec lavage de l'ARN sur membrane de silice. Les niveaux relatifs de transcrits de FOS ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées dans un graphique avec leur moyenne et écart-type. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3 \times$ la précision totale du test (2,34 C_t).

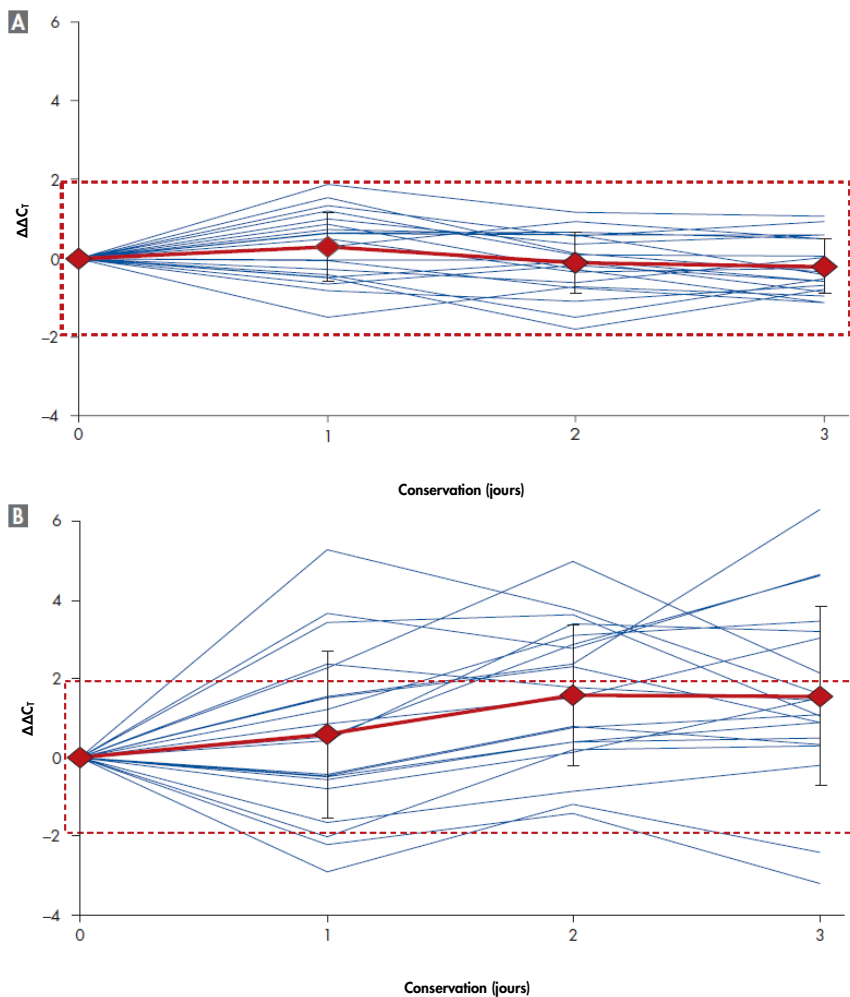


Figure 2. Stabilité de l'ARN dans les échantillons sanguins entre 18 et 25 °C : IL1B. Le sang a été prélevé et l'ARN total purifié, après conservation à une température de 18 à 25 °C, comme décrit dans la figure 1. Les niveaux relatifs de transcrits d'IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées dans un graphique avec leur moyenne et écart-type. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3 \times$ la précision totale du test (1,93 C_t).

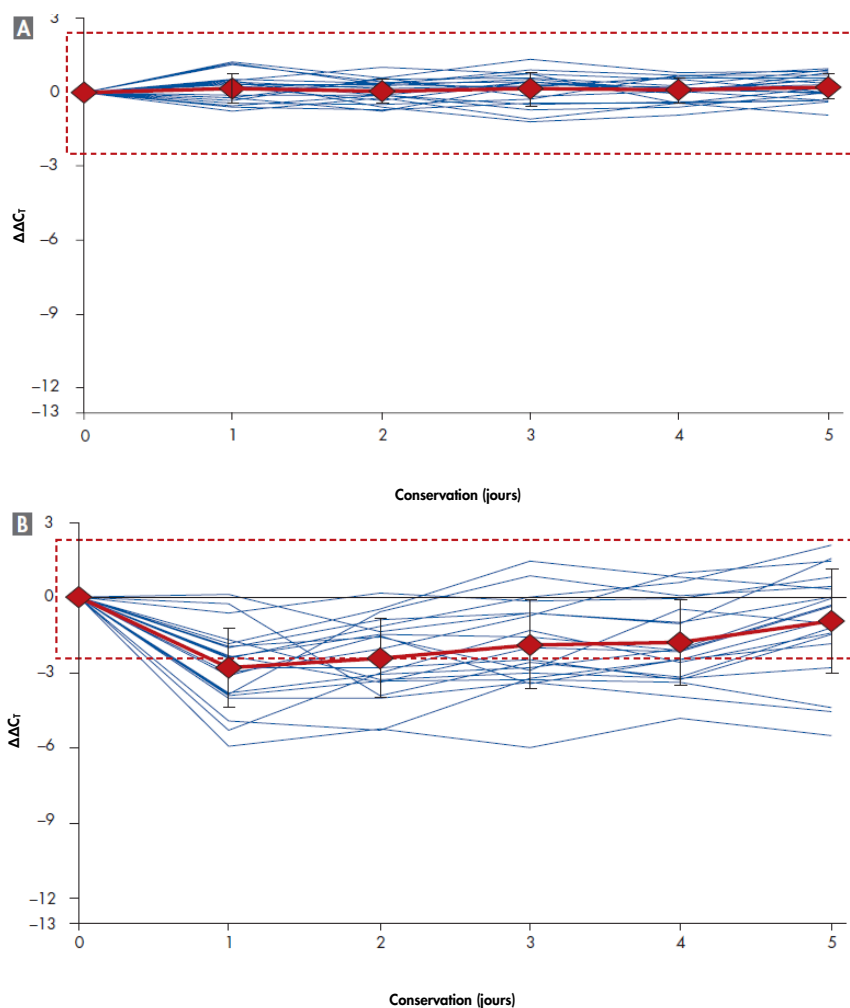


Figure 3. Stabilité de l'ARN dans les échantillons sanguins entre 2 et 8 °C : FOS. Des échantillons de sang ont été prélevés sur 10 donneurs, en duplicats, et conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant la durée indiquée, avant la purification d'ARN total. **[A]** Le sang a été prélevé et conservé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). L'ARN total a été purifié à l'aide du PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Les échantillons de sang ont été prélevés et conservés dans des tubes de prélèvement sanguin standard, contenant de l'EDTA comme anticoagulant, et l'ARN total a été purifié selon une méthode d'extraction organique standard avec lavage de l'ARN sur membrane de silice. Les niveaux relatifs de transcrits de FOS ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées dans un graphique avec leur moyenne et écart-type. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3x$ la précision totale du test (2,34 C_t).

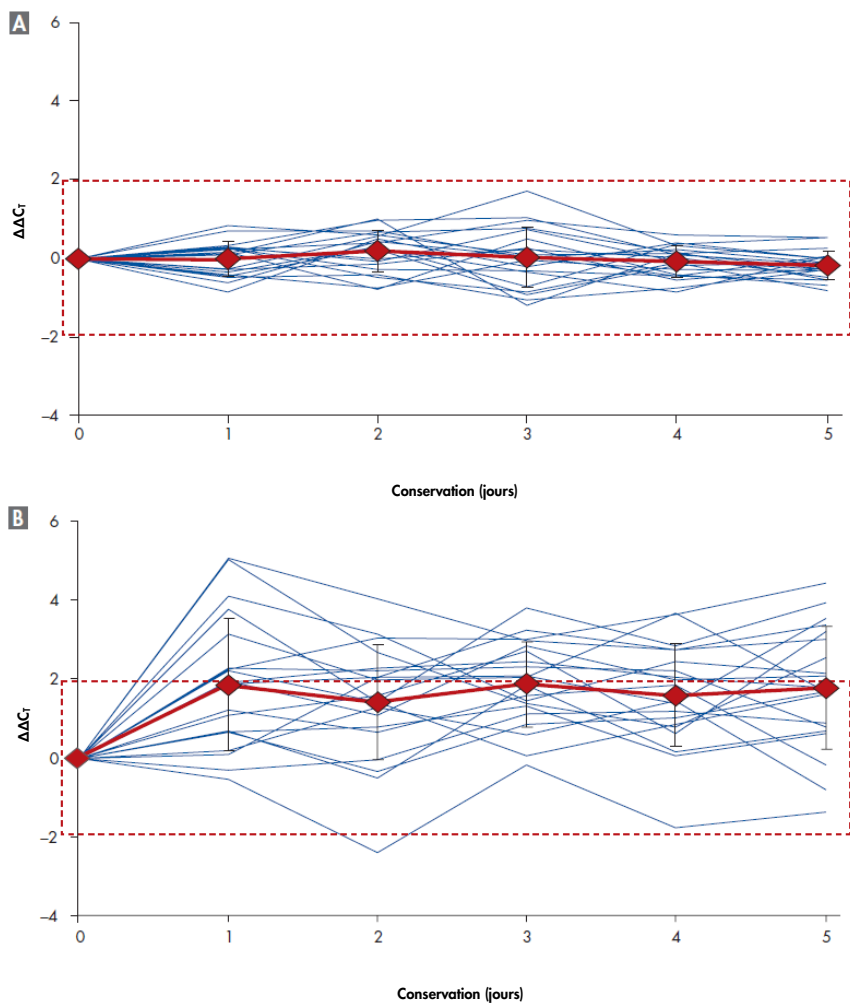


Figure 4. Stabilité de l'ARN dans les échantillons sanguins entre 2 et 8 °C : IL1B. Le sang a été prélevé et l'ARN total purifié, après conservation à une température de 2 à 8 °C, comme décrit dans la figure 3. Les niveaux relatifs de transcrits d'IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées dans un graphique avec leur moyenne et écart-type. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3 \times$ la précision totale du test ($1,93 C_t$).

Concentration et purification de l'ARN

Le PAXgene Blood RNA Kit a été développé pour la purification d'ARN total à partir de 2,5 ml de sang total humain prélevé dans un PAXgene Blood RNA Tube (BRT). La procédure est simple et peut être réalisée manuellement ou de façon automatisée (voir les figures 5 et 10, pages 21 et 31). Dans les deux protocoles, la purification commence par une étape de centrifugation afin de culotter les acides nucléiques dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Le culot est lavé et remis en suspension, puis l'ARN est purifié manuellement ou de façon automatisée. En principe, les deux protocoles suivent les mêmes étapes et utilisent les mêmes composants du kit.

Purification manuelle des ARN

Dans le détail, le culot remis en suspension est incubé dans des tampons optimisés avec de la protéinase K (PK) pour digérer les protéines. Une étape de centrifugation additionnelle avec la colonne de centrifugation PAXgene Shredder (PSC) est réalisée pour homogénéiser le lysat cellulaire et éliminer les débris cellulaires. Le surnageant de l'effluent est transféré dans un nouveau tube de microcentrifugation. De l'éthanol est ajouté pour optimiser les conditions de fixation et le lysat est déposé sur une colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC). Lors d'une brève centrifugation, l'ARN se fixe sélectivement sur la membrane de silice PAXgene et les contaminants passent à travers. Les contaminants restants sont éliminés par plusieurs étapes de lavage efficaces. La membrane est incubée avec de la DNase I (RNFD) entre la première et la deuxième étape de lavage pour supprimer toute trace d'ADN fixé. Après les étapes de lavage, l'ARN est élué dans le tampon d'élution (BR5) et dénaturé thermiquement.

L'ARN total purifié avec le système PAXgene Blood RNA est d'une grande pureté. Avec le protocole manuel, le rapport A_{260}/A_{280} se situe entre 1,8 et 2,2 et une proportion d'ADN génomique $\leq 1\%$ (p/p) est présente dans $\geq 95\%$ des échantillons. Ces valeurs ont été mesurées par une PCR quantitative en temps réel d'une séquence du gène de l'actine bêta. Au moins 95 % des échantillons ne présentent aucune inhibition en RT-PCR lorsqu'un maximum de 30 % de l'éluat est utilisé.

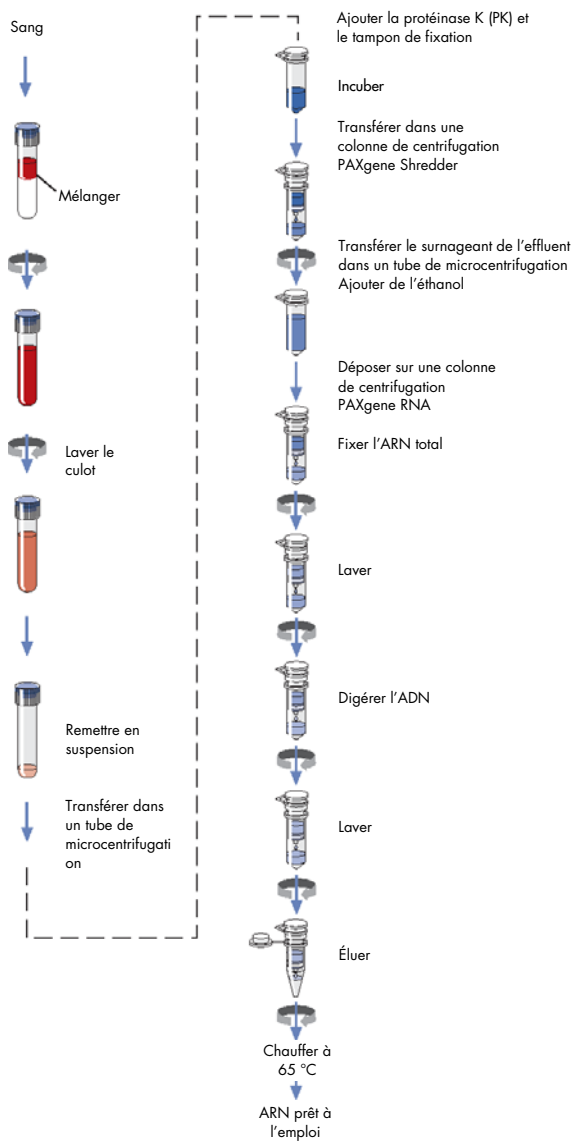


Figure 5. Procédure manuelle PAXgene Blood RNA.

Avec le protocole manuel, la moyenne du temps de préparation d'un échantillon (selon les données d'un lot de 12 préparations d'échantillons) est d'environ 90 minutes*, dont seulement 40 minutes de manipulation. Le rendement en ARN obtenu avec 2,5 ml de sang total humain sain est $\geq 3 \mu\text{g}$ pour $\geq 95 \%$ des échantillons traités. Puisque les rendements dépendent fortement du donneur, les rendements individuels peuvent varier. Pour l'analyse d'un donneur en particulier, le système PAXgene Blood RNA permet d'obtenir des rendements en ARN reproductibles et répétables (voir les figures 6 et 7, pages 23 et 24) et des résultats de RT-PCR également reproductibles et répétables (voir les figures 8 et 9, pages 28 et 29), de sorte que le système est parfaitement adapté aux analyses cliniques et diagnostiques.

La figure 6 (page 23) représente la répétabilité et la reproductibilité globales du système PAXgene Blood RNA. L'influence des différents lots du PAXgene Blood RNA Kit ainsi que des opérateurs sur la reproductibilité du rendement en ARN et sur les performances de la RT-PCR en temps réel a été analysée dans d'autres études. Puisque ces études ont été effectuées avec un pool d'échantillons sanguins et non avec des échantillons prélevés individuellement dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), les résultats ne reflètent pas la répétabilité du système, qui prend en considération les différences entre les prélèvements sanguins : ils reflètent uniquement la répétabilité de la préparation des échantillons (voir figure 7, page 24).

* Durée totale du protocole, comprenant la manipulation initiale des PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugations, lavage du culot et remise en suspension du culot).

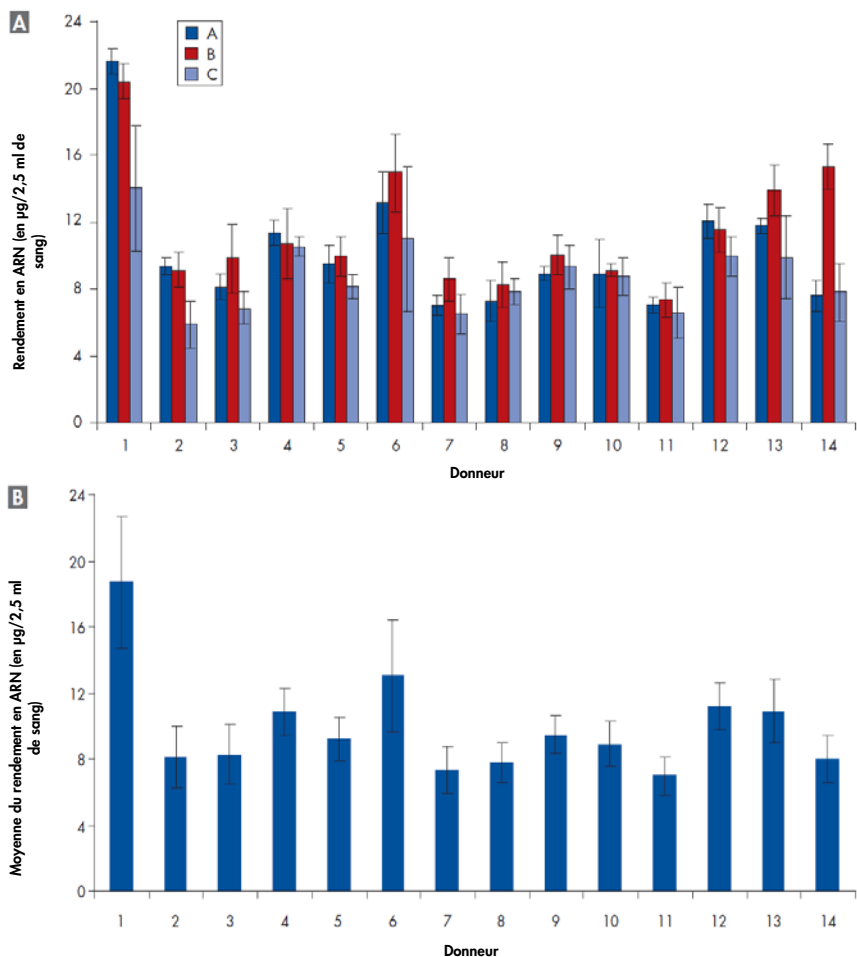


Figure 6. Reproductibilité et répétabilité de la purification d'ARN. Des échantillons de sang en 4 exemplaires, prélevés sur 14 donneurs, ont été traités manuellement par chacun des 3 techniciens [A, B et C]. Trois équipements ont été utilisés et tous les échantillons préparés par un même technicien ont été traités sur le même équipement. **[A]** La moyenne et l'écart-type du rendement en ARN pour les répliquats provenant des mêmes donneurs et de techniciens différents sont indiqués. **[B]** Douze répliquats d'échantillons sanguins ont été traités par les 3 techniciens différents pour chacun des 14 donneurs. La moyenne et l'écart-type du rendement en ARN pour les échantillons des mêmes donneurs et tous les techniciens sont indiqués. Pour les échantillons d'ARN, les rapports A_{260}/A_{280} étaient compris entre 1,8 et 2,2.

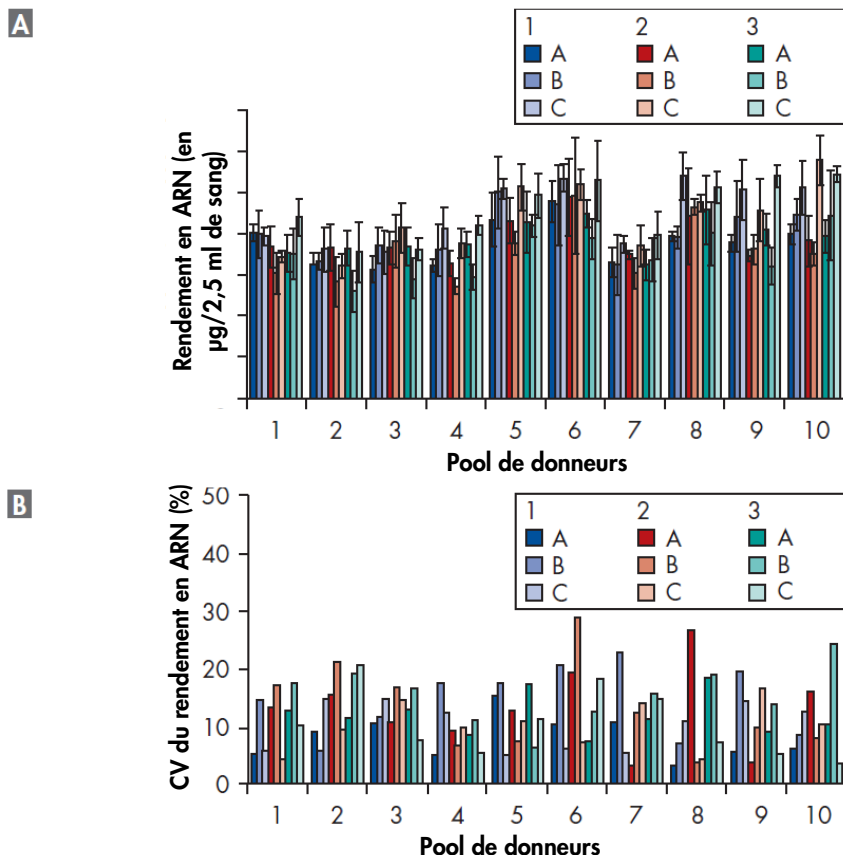


Figure 7. Répétabilité et reproductibilité du rendement en ARN d'un pool d'échantillons sanguins avec différents opérateurs et différents lots du PAXgene Blood RNA Kit. Les échantillons sanguins de 30 donneurs différents ont été prélevés dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT ; 12 tubes par donneur, soit 360 tubes au total). Le contenu des tubes de 3 donneurs a été poolé puis réaliquoté en 36 échantillons. Ces 36 échantillons par pool de 3 donneurs ont été traités manuellement par 3 opérateurs différents. Chaque opérateur a utilisé 3 lots de PAXgene Blood RNA Kit différents pour l'extraction et a traité des échantillons en 4 exemplaires de chacun des 10 pools de donneurs. **[A]** Rendement en ARN et écart-type pour chaque combinaison opérateur-lot. Les échantillons de sang en 4 exemplaires provenant de 10 pools de donneurs ont été traités par 3 opérateurs différents (A, B et C) avec chacun des 3 lots de kits (1, 2 et 3). Les rendements moyens (colonnes) et les écarts-types (barres d'erreur) sont indiqués pour chaque échantillon en 4 exemplaires du même pool de donneurs pour des opérateurs et lots de kits différents. **[B]** Coefficient de variation (CV) du rendement en ARN par pool de donneurs pour toutes les combinaisons opérateur-lot (A, B, C ; 1, 2, 3) calculé à partir de la moyenne et l'écart-type du rendement représentés dans la figure 7A.

Tableau 1A. Reproductibilité au sein de chaque lot et pour chaque technicien pour les pools de donneurs sélectionnés (1, 6, 9, 10)

| Combinaison des données | Pool de donneurs 1 ^{1,1} _{SEP} 5,1 x 10 ⁶ cellules/ml | | | Pool de donneurs 6 ^{1,1} _{SEP} 6,5 x 10 ⁶ cellules/ml | | |
|-------------------------|---|----------|--------|---|----------|--------|
| | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) |
| Lot 1, technicien A | 8,03 | 0,42 | 5 | 9,55 | 0,99 | 10 |
| Lot 1, technicien B | 7,98 | 1,17 | 15 | 9,38 | 1,94 | 21 |
| Lot 1, technicien C | 7,87 | 0,45 | 6 | 10,71 | 0,65 | 6 |
| Lot 2, technicien A | 7,32 | 0,98 | 13 | 9,78 | 1,89 | 19 |
| Lot 2, technicien B | 6,09 | 1,04 | 17 | 9,82 | 2,83 | 29 |
| Lot 2, technicien C | 6,87 | 0,31 | 4 | 10,37 | 0,74 | 7 |
| Lot 3, technicien A | 7,04 | 0,90 | 13 | 8,96 | 0,68 | 8 |
| Lot 3, technicien B | 6,98 | 1,22 | 17 | 7,73 | 0,97 | 13 |
| Lot 3, technicien C | 8,78 | 0,89 | 10 | 10,59 | 1,94 | 18 |
| Combinaison des données | Pool de donneurs 9 ^{6,1} _{SEP} 8,4 x 10 ⁶ cellules/ml | | | Pool de donneurs 10 ^{6,1} _{SEP} 10,2 x 10 ⁶ cellules/ml | | |
| | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) |
| Lot 1, technicien A | 7,52 | 0,41 | 6 | 7,96 | 0,49 | 6 |
| Lot 1, technicien B | 8,82 | 1,72 | 19 | 8,90 | 0,76 | 9 |
| Lot 1, technicien C | 10,14 | 1,46 | 14 | 10,22 | 1,29 | 13 |
| Lot 2, technicien A | 6,92 | 0,27 | 4 | 7,63 | 1,23 | 16 |
| Lot 2, technicien B | 7,20 | 0,71 | 10 | 7,00 | 0,56 | 8 |
| Lot 2, technicien C | 9,14 | 1,52 | 17 | 11,56 | 1,21 | 10 |
| Lot 3, technicien A | 8,18 | 0,76 | 9 | 7,85 | 0,82 | 10 |
| Lot 3, technicien B | 6,41 | 0,88 | 14 | 8,88 | 2,17 | 24 |
| Lot 3, technicien C | 10,78 | 0,56 | 5 | 10,88 | 0,37 | 3 |

Tableau 1B. Reproductibilité pour chaque technicien et entre tous les lots pour les pools de donneurs sélectionnés (1, 6, 9, 10).

| Combinaison des données | Pool de donneurs 1 _{SEP} 5,1 x 10 ⁶ cellules/ml | | | Pool de donneurs 6 _{SEP} 6,5 x 10 ⁶ cellules/ml | | |
|-----------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
| | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) |
| Technicien A, tous les lots | 7,46 | 0,85 | 11 | 9,43 | 1,22 | 13 |
| Technicien B, tous les lots | 7,02 | 1,31 | 19 | 8,98 | 2,09 | 23 |
| Technicien C, tous les lots | 7,84 | 0,98 | 13 | 10,56 | 1,15 | 11 |
| Combinaison des données | Pool de donneurs 9 _{SEP} 8,4 x 10 ⁶ cellules/ml | | | Pool de donneurs 10 _{SEP} 10,2 x 10 ⁶ cellules/ml | | |
| | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) |
| Technicien A, tous les lots | 7,54 | 0,72 | 10 | 7,81 | 0,82 | 11 |
| Technicien B, tous les lots | 7,48 | 1,50 | 20 | 8,26 | 1,54 | 19 |
| Technicien C, tous les lots | 10,02 | 1,34 | 13 | 10,89 | 1,10 | 10 |

Tableau 1C. Reproductibilité au sein de chaque lot et entre tous les techniciens pour les pools de donneurs sélectionnés (1, 6, 9, 10).

| Combinaison des données | Pool de donneurs 1 _{SEP} 5,1 x 10 ⁶ cellules/ml | | | Pool de donneurs 6 _{SEP} 6,5 x 10 ⁶ cellules/ml | | |
|-----------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
| | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) |
| Lot 1, tous les techniciens | 7,96 | 0,69 | 9 | 9,88 | 1,34 | 14 |
| Lot 2, tous les techniciens | 6,76 | 0,93 | 14 | 9,99 | 1,84 | 18 |
| Lot 3, tous les techniciens | 7,60 | 1,27 | 17 | 9,09 | 1,71 | 19 |
| Combinaison des données | Pool de donneurs 9 _{SEP} 8,4 x 10 ⁶ cellules/ml | | | Pool de donneurs 10 _{SEP} 10,2 x 10 ⁶ cellules/ml | | |
| | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) |
| Lot 1, tous les techniciens | 8,83 | 1,63 | 19 | 9,02 | 1,27 | 14 |
| Lot 2, tous les techniciens | 7,75 | 1,36 | 18 | 8,73 | 2,31 | 26 |
| Lot 3, tous les techniciens | 8,46 | 1,99 | 24 | 9,20 | 1,80 | 20 |

Tableau 1D. Reproductibilité entre tous les lots et entre tous les techniciens pour les pools de donneurs sélectionnés (1, 6, 9, 10).

| Combinaison des données | Pool de donneurs 1 ^{SEP} 5,1 x 10 ⁶ cellules/ml | | | Pool de donneurs 6 ^{SEP} 6,5 x 10 ⁶ cellules/ml | | |
|-----------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
| | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) |
| Lot 1, tous les techniciens | 7,44 | 1,09 | 15 | 9,66 | 1,65 | 17 |

| Combinaison des données | Pool de donneurs 9 ^{SEP} 8,4 x 10 ⁶ cellules/ml | | | Pool de donneurs 10 ^{SEP} 10,2 x 10 ⁶ cellules/ml | | |
|-----------------------------|--|----------|--------|--|----------|--------|
| | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) | Rendement moyen (µg) | É-T (µg) | CV (%) |
| Lot 1, tous les techniciens | 8,35 | 1,70 | 20 | 8,99 | 1,80 | 20 |

Analyse détaillée de 4 pools de donneurs représentatifs. Les pools ont été sélectionnés en fonction de la numérotation leucocytaire et reflètent les valeurs hautes, médianes et basses de la plage normale de numérotation leucocytaire (4,8 x 10⁶ – 1,1 x 10⁷ leucocytes/ml). La numérotation leucocytaire représente la valeur moyenne de 3 numérotations leucocytaires de 3 donneurs par pool de donneurs.

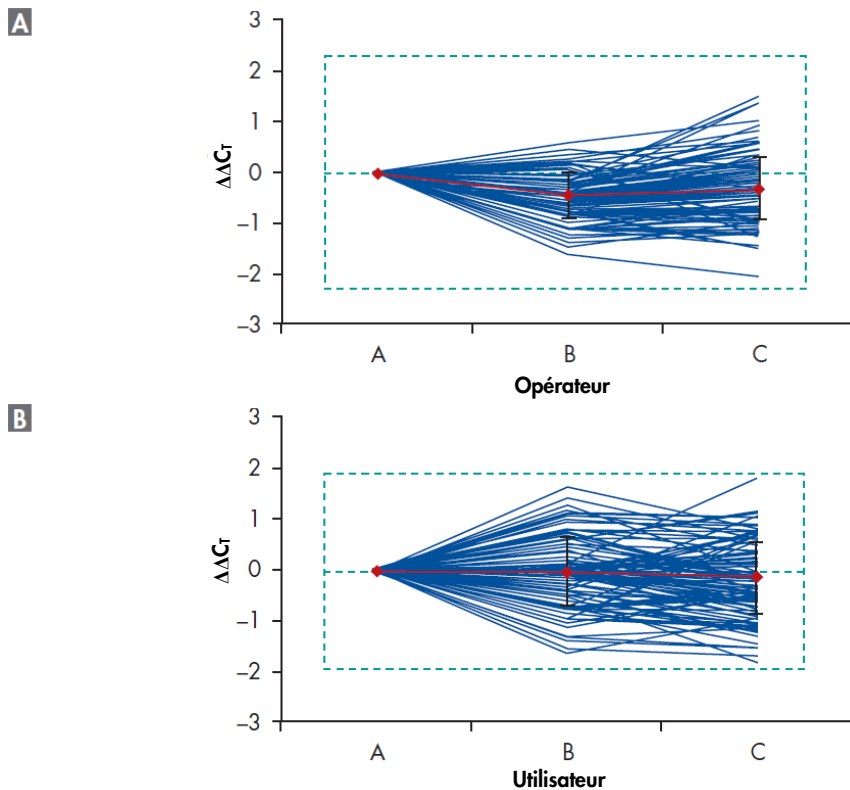


Figure 8. Reproductibilité de la RT-PCR entre les opérateurs. L'ARN purifié au cours de l'analyse décrite dans la figure 7 a été utilisé pour une RT-PCR en temps réel. Les niveaux relatifs de transcrits de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées graphiquement en fonction des valeurs pour le technicien 1 (10 pools de donneurs x 3 lots de kits x 4 réplicats = 120 jeux de données pour chaque gène), avec les moyennes (lignes rouges) et les écarts-types (barres noires) de tous les échantillons. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3 \times$ la précision totale du test (FOS : $2,34 C_T$; IL1B : $1,93 C_T$).

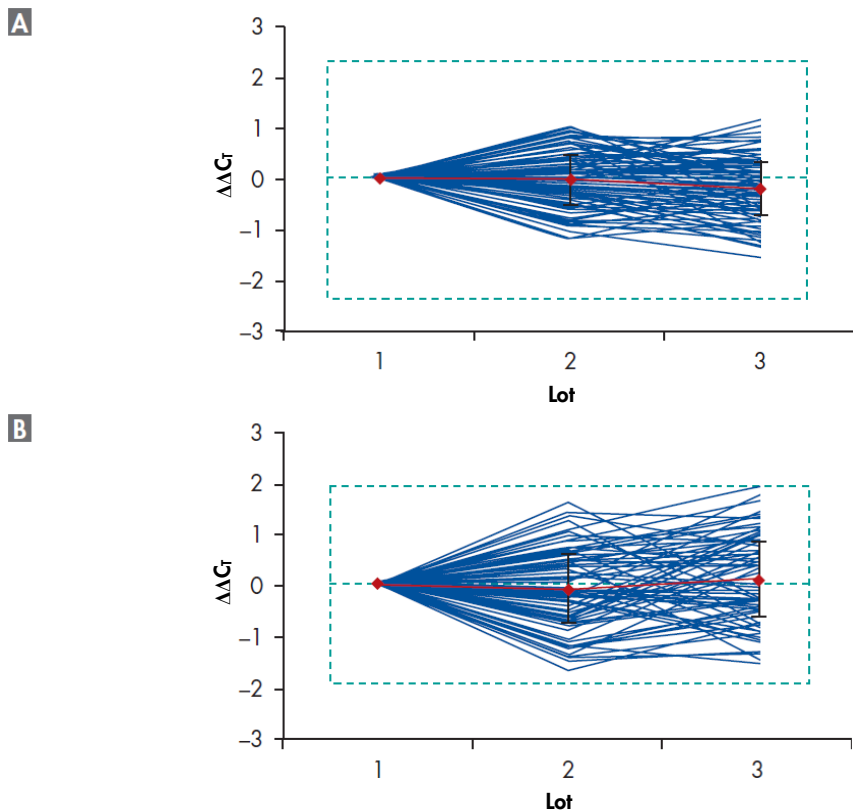


Figure 9. Reproductibilité de la RT-PCR entre les lots du kit. L'ARN purifié au cours de l'analyse décrite dans la figure 7 a été utilisé pour une RT-PCR en temps réel. Les niveaux relatifs de transcrits de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées graphiquement en fonction des valeurs pour le lot de kit 1 (10 pools de donneurs x 3 techniciens x 4 réplicats = 120 jeux de données pour chaque gène), avec les moyennes (lignes rouges) et les écarts-types (barres noires) de tous les échantillons. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3 \times$ la précision totale du test (FOS : 2,34 C_t ; IL1B : 1,93 C_t).

Tableau 2. Résumé des données de RT-PCR des figures 8 et 9.

| Système de test | Test FOS/ARNr 18S | | Test IL1B/ARNr 18S | |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | Moyenne ($\Delta\Delta C_T$) | \pm É-T ($\Delta\Delta C_T$) | Moyenne ($\Delta\Delta C_T$) | \pm É-T ($\Delta\Delta C_T$) |
| Reproductibilité pour chaque utilisateur et entre tous les lots | | | | |
| Tous les utilisateurs, lot 1–lot 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tous les utilisateurs, lot 1–lot 2 | -0,03 | 0,48 | -0,07 | 0,66 |
| Tous les utilisateurs, lot 1–lot 3 | -0,21 | 0,52 | 0,11 | 0,71 |
| Reproductibilité pour chaque utilisateur et entre tous les lots | | | | |
| Tous les lots, utilisateur A–utilisateur A | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tous les lots, utilisateur A–utilisateur B | -0,46 | 0,44 | -0,06 | 0,69 |
| Tous les lots, utilisateur A–utilisateur C | -0,31 | 0,60 | -0,15 | 0,71 |

Utilisateur : technicien de laboratoire ayant effectué l’analyse.

Lot : numéro de lot du kit utilisé dans cette étude.

É-T : écart-type.

Les moyennes des valeurs de $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) et les écarts-types sont indiqués pour les données présentées dans les figures 8 et 9.

Purification automatisée de l’ARN

La préparation des échantillons est automatisée à l’aide du QIAcube® standard (référence 9001882 [110 V], référence 9001293 [230 V] ; QIAcube Connect non inclus) et comporte les mêmes étapes que la procédure manuelle. Cela vous permet de continuer d’utiliser le PAXgene Blood RNA Kit pour purifier de l’ARN de haute qualité. Consulter le *manuel d’utilisation du QIAcube (QIAcube User Manual)* et www.qiagen.com/MyQIAcube pour plus d’informations sur le QIAcube.

Le protocole automatisé de purification de l’ARN consiste en 2 parties (ou protocoles) : « PAXgene Blood RNA Part A » et « PAXgene Blood RNA Part B » avec une brève intervention manuelle entre les 2 parties (voir figure 10, page 31).

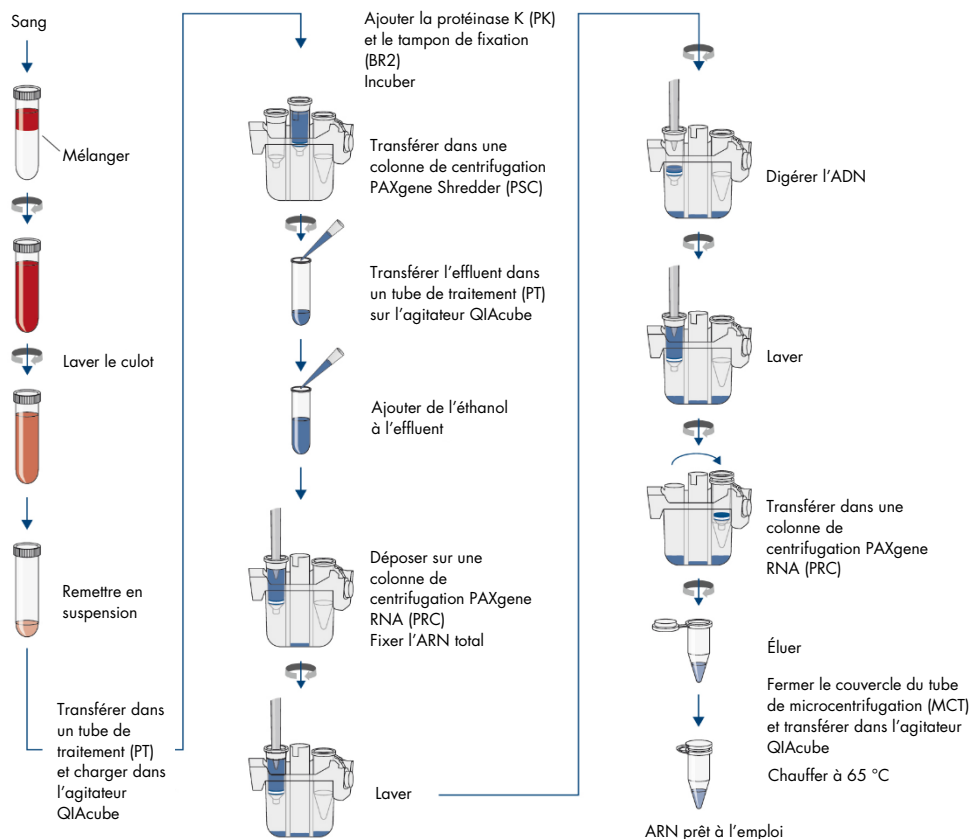


Figure 10. Procédure automatisée PAXgene Blood RNA.

Le culot d'acides nucléiques centrifugé, lavé et remis en suspension (voir « Concentration et purification de l'ARN », page 20) est transféré du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) dans des tubes de traitement (PT), qui sont placés sur l'agitateur thermique du plan de travail du QIAcube. L'opérateur sélectionne et lance le protocole « PAXgene Blood RNA Part A » depuis le menu. Le QIAcube réalise les étapes du protocole jusqu'à l'élution de l'ARN dans le tampon

d'élution (BR5). L'opérateur transfère les tubes de microcentrifugation (MCT), qui contiennent l'ARN purifié, dans l'agitateur thermique du QIAcube. Il lance alors le protocole « PAXgene Blood RNA Part B » depuis le menu et le QIAcube effectue la dénaturation thermique.

Le temps de préparation moyen d'un échantillon (selon les données d'un lot de 12 préparations d'échantillons) est de 151 minutes*, avec une durée de manipulation beaucoup plus faible que pour le protocole manuel.

Le rendement en ARN obtenu avec 2,5 ml de sang total humain sain est $\geq 3 \mu\text{g}$ pour $\geq 95 \%$ des échantillons traités. La figure 11 (page 33) indique les rendements en ARN sur un total de 216 échantillons préparés par 3 techniciens selon le protocole automatisé avec 3 lots du kit. Puisque ces études ont été effectuées avec des échantillons sanguins poolés et non avec des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuels, les résultats ne reflètent pas le rendement en ARN attendu avec des échantillons individuels de chaque prélèvement sanguin. Puisque les rendements dépendent fortement du donneur, les rendements individuels peuvent varier (figure 11, page 33).

Au moins 95 % des échantillons ne présentent aucune inhibition en RT-PCR lorsqu'un maximum de 30 % de l'éluat est utilisé. Avec le protocole automatisé, la contamination croisée entre les échantillons est indétectable, comme le démontre la RT-PCR quantitative en temps réel pour les séquences des transcrits d'ABL1 et de FOS dans les échantillons négatifs à l'ARN (l'eau) couplés à des échantillons positifs à l'ARN (sang total humain) lors de la même analyse.

L'ARN purifié avec le système PAXgene Blood RNA et le protocole automatisé est très pur, comme l'indique l'absence d'inhibition de la RT-PCR (voir figure 11, page 33) et les valeurs du rapport A_{260}/A_{280} comprises entre 1,8 et 2,2. L'ADN génomique est présent à $\leq 1 \%$ (p/p) dans $\geq 95 \%$ des échantillons, comme le démontre la PCR quantitative en temps réel d'une séquence du gène de l'actine bêta. Les figures 12 et 13 (pages 33 et 34) représentent le rapport A_{260}/A_{280} , ainsi que l'ADN génomique relatif d'un total de 216 échantillons préparés à l'aide du protocole automatisé par 3 opérateurs avec 3 lots du kit.

* Durée totale du protocole, comprenant la manipulation initiale des PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugations, lavage du culot et remise en suspension du culot).

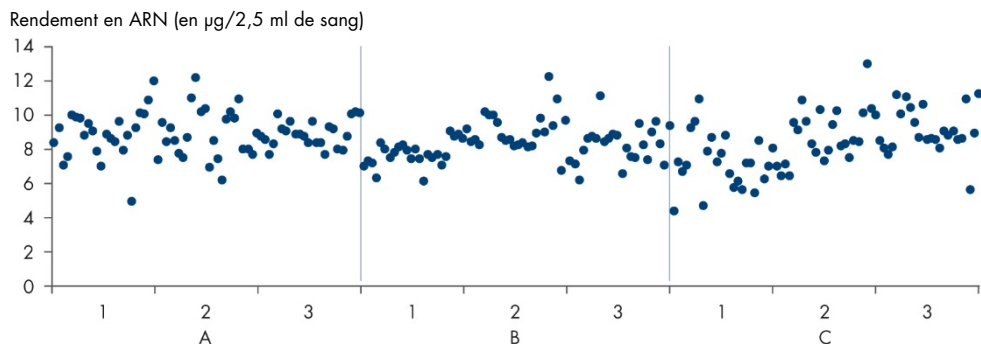


Figure 11. Rendement en ARN avec la procédure automatisée. Les échantillons sanguins de 36 donneurs différents ont été prélevés dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT ; 6 tubes par donneur, soit 216 tubes au total). Le contenu des tubes de 6 donneurs a été poolé puis réaliquoté en 36 échantillons. Ces 36 échantillons par pool de 6 donneurs ont été traités par 3 opérateurs différents (A, B, C). Chaque opérateur a utilisé 3 lots différents (1, 2, 3) du PAXgene Blood RNA Kit pour l'extraction automatisée et a traité des échantillons en 4 exemplaires de chacun des pools de 6 donneurs. Les rendements en ARN de chaque échantillon sont présentés pour chaque combinaison opérateur-lot.

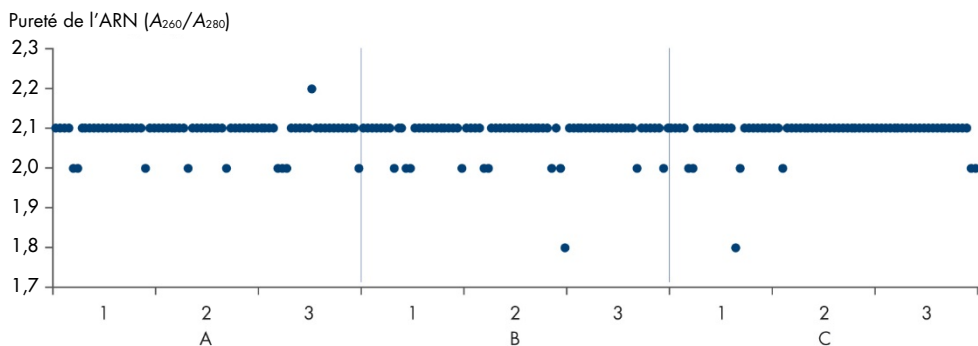


Figure 12. Pureté de l'ARN (valeurs du rapport A_{260}/A_{280}) dans la procédure automatisée. L'ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) à l'aide de 3 lots différents (1, 2, 3) du PAXgene Blood RNA Kit dans l'expérience décrite sous la figure 11. Les valeurs du rapport A_{260}/A_{280} de tous les échantillons sont présentées pour chaque combinaison opérateur-lot.

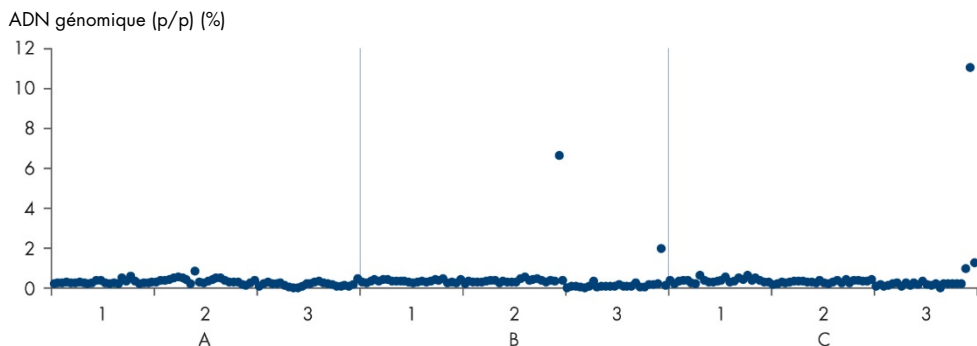


Figure 13. Pureté de l'ARN (contamination par l'ADN génomique en %) dans la procédure automatisée. L'ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) à l'aide de 3 lots différents (1, 2, 3) du PAXgene Blood RNA Kit dans l'expérience décrite sous la figure 11. Les quantités d'ADN génomique (p/p) de tous les échantillons sont présentées pour chaque combinaison opérateur-lot.

Le protocole automatisé de purification de l'ARN avec le système PAXgene Blood RNA génère des résultats de RT-PCR hautement reproductibles et répétables, comme illustré dans la figure 14 (page 35), de sorte que le système est parfaitement adapté aux analyses cliniques diagnostiques.

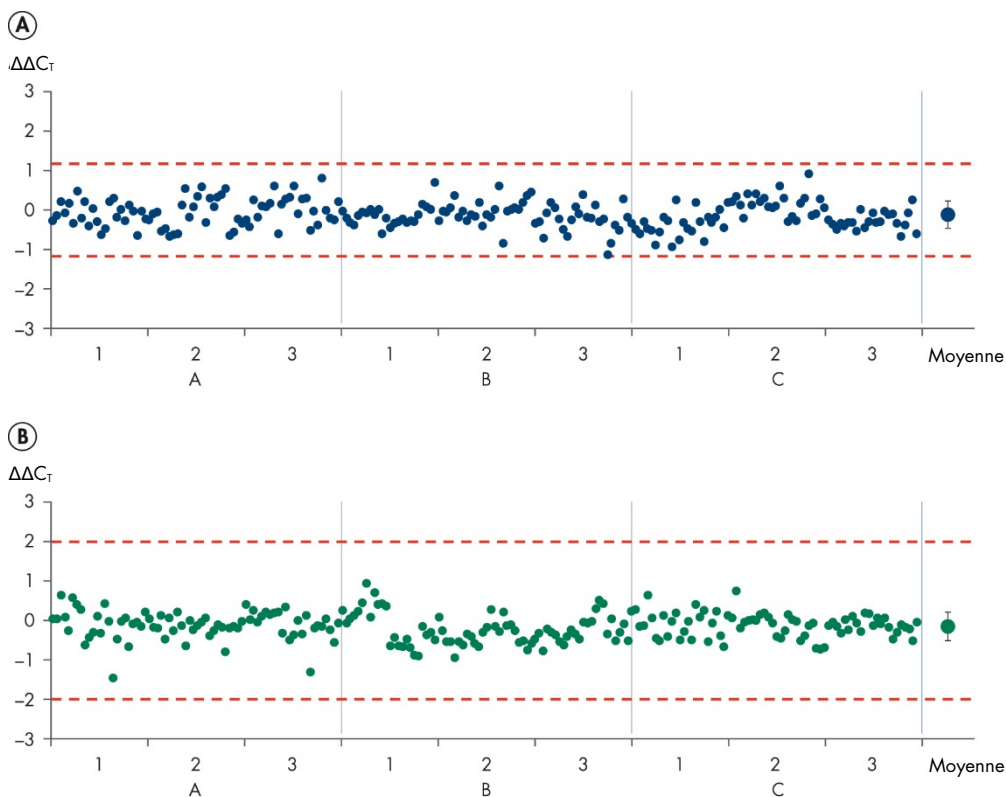


Figure 14. Reproductibilité de la RT-PCR entre les protocoles automatisé et manuel. L'ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) à l'aide de 3 lots différents (1, 2, 3) du PAXgene Blood RNA Kit et selon le protocole automatisé dans l'expérience décrite sous la figure 11. En parallèle, l'ARN a été purifié à partir des tubes de réplicats correspondants selon le protocole manuel. Les niveaux de transcrits relatifs de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les différences possibles des niveaux de transcrits entre l'ARN préparé à partir d'échantillons de sang appariés avec les deux protocoles d'extraction (manuel et automatisé) ont été calculées selon la méthode du $\Delta\Delta C_T$. Les valeurs de $\Delta\Delta C_T$ individuelles de toutes les paires d'échantillons (4 réplicats x 6 pools de donneurs x 3 lots du kit x 3 opérateurs = 216 paires pour chaque gène) sont représentées sous forme de points individuels, les moyennes étant représentées sous forme de points plus grands et les écarts-types sous forme de barres noires pour tous les échantillons correspondants. Les lignes pointillées correspondent à ± 3 la précision totale du test (FOS : 1,16 C_T ; IL1B : 1,98 C_T ; précisions des analyses différentes par rapport aux figures 1–4, 8 et 9 en raison des différentes versions de l'analyse).

Matériel supplémentaire nécessaire et 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.

Pour tous les protocoles

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, réf. 762165)
- Éthanol (96 à 100 %, de qualité analytique)
- Pipettes* (10 µl à 4 ml)
- Pointes de pipette stériles, avec filtre anti-aérosol et exemptes de RNase[†]
- Éprouvette graduée[‡]
- Centrifugeuse* pouvant atteindre 3 000 à 5 000 x g équipée d'un rotor à angle variable avec des godets oscillants adaptés aux PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitateur vortex*
- Glace pilée
- Stylo indélébile pour l'étiquetage

Pour le protocole manuel

- Microcentrifugeuse* à vitesse variable pouvant atteindre au moins 1 000 à 8 000 x g, bien qu'il soit possible d'utiliser des valeurs de force g en dessous ou au-dessus de cette plage (voir les étapes du protocole pour plus de détails), avec un rotor pour tubes de microcentrifugation de 2 ml

* S'assurer que tous les appareils sont vérifiés, entretenus et calibrés régulièrement selon les instructions du fabricant.

[†] S'assurer de bien lire les consignes sur la manipulation de l'ARN (voir annexe A, page 64).

[‡] Pour l'addition d'éthanol au concentré de tampon BR4.

- Un agitateur-incubateur * capable d'incuber à 55 °C et 65 °C et d'agiter entre 400 et 1 400 tr/min (p.ex. Eppendorf® Thermomixer Compact ou équivalent)

Pour le protocole automatisé

- QIAcube* (QIAGEN, réf. 9001882 [110 V], réf. 9001293 [230 V])
- Ciseaux

Consommables du QIAcube

- Filter-Tips, 1 000 µl (1 024) (QIAGEN, réf. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, réf. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, réf. 990394)†

Accessoires du QIAcube

- Reagent Bottle Rack (QIAGEN, réf. 990390)†
- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, réf. 990392)†

* S'assurer que tous les appareils sont vérifiés, entretenus et calibrés régulièrement selon les instructions du fabricant.

† Également inclus dans le Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, réf. 990395)

Remarques importantes

Utilisation du QIAcube

S'assurer de bien savoir utiliser le QIAcube. Veuillez lire le *manuel d'utilisation du QIAcube* et toute autre information fournie avec le QIAcube, en portant une attention particulière aux informations de sécurité, avant de lancer les protocoles de PAXgene Blood RNA automatisés.

Démarrage du QIAcube

Fermer la porte du QIAcube et le mettre en marche à l'aide de l'interrupteur d'alimentation (voir figure 15, page 39).

Un bip retentit et l'écran de démarrage apparaît. L'appareil réalise des tests d'initialisation de façon automatique.

Installation des protocoles sur le QIAcube

Commencer par installer un protocole avant d'exécuter le premier cycle de préparation d'ARN sur le QIAcube. Installer les protocoles « PAXgene Blood RNA Part A » et « PAXgene Blood RNA Part B ».

Les protocoles sont disponibles sur **www.qiagen.com/MyQIAcube** et doivent être téléchargés sur la clé USB fournie avec le QIAcube puis transférés sur le QIAcube via le port USB.

Le port USB, situé derrière le panneau de protection (voir figure 15, page 39), permet de connecter la clé USB fournie au QIAcube. Les fichiers de données (p.ex. fichiers journaux ou fichiers de rapport) peuvent également être transférés du QIAcube vers la clé USB via le port USB.



Le port USB doit être utilisé uniquement avec la clé USB fournie par QIAGEN. Ne pas connecter d'autres périphériques sur ce port.



Ne pas retirer la clé USB pendant le téléchargement de protocoles, le transfert de fichiers de données ou l'exécution d'un cycle de protocole.



Figure 15. Vue frontale du QIAcube.

1

Écran tactile

2

Porte

3

Port série RS232 derrière le panneau de protection (utilisation réservée aux spécialistes de maintenance des appareils QIAGEN)

4

Port USB derrière le panneau de protection

5

Interrupteur d'alimentation

6

Tiroir à déchets

Chargement du QIAcube

Pour gagner du temps, le chargement peut être réalisé pendant une étape de centrifugation de 10 minutes ou les deux (étapes 3 et 5) dans « Protocole : purification automatisée de l'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) », page 56.

Flacons de réactif

Avant chaque cycle sur le QIAcube, remplir soigneusement les 4 flacons de réactif avec les réactifs indiqués dans le tableau 3 jusqu'à la marque de niveau maximal ou, si cela s'avère impossible, jusqu'au niveau que permettent d'atteindre les volumes de tampons fournis dans le PAXgene Blood RNA Kit. Marquer les flacons et les couvercles clairement avec les noms des tampons et placer les flacons de réactif remplis dans les positions appropriées du portoir pour flacons de réactif. Placer le portoir sur le plan de travail du QIAcube comme illustré (figures 16 et 17, pages 41 et 42).



Le volume de tampon BR2 fourni est insuffisant pour remplir un flacon de réactif jusqu'à la marque. Après le traitement de plusieurs échantillons dans des cycles précédents, le volume des tampons BR3 et BR4 peut être insuffisant pour remplir le flacon jusqu'à la marque.



Veiller à retirer les couvercles des flacons avant de les placer sur le plan de travail.



Les volumes de tampon fournis dans le PAXgene Blood RNA Kit (50) sont suffisants pour un maximum de 7 cycles de préparations d'ARN sur le QIAcube, avec un nombre d'échantillons compris entre 2 et 12 par cycle. D'une façon générale, les cycles avec un nombre réduit d'échantillons doivent être évités afin de pouvoir traiter un total de 50 échantillons par kit avec un maximum de 7 cycles de préparation d'ARN. La réalisation de plus de 7 cycles de préparation d'ARN peut entraîner un manque de tampons pour le traitement des derniers échantillons.

Tableau 3. Positions sur le portoir pour flacons de réactif.

| Position | Réactif |
|----------|----------------------------|
| 1 | Tampon de fixation (BR2) |
| 2 | Éthanol à 96–100 % |
| 3 | Tampon de lavage 1 (BR3) |
| 4 | Tampon de lavage 2 (BR4) * |
| 5 | – (laisser vide) |
| 6 | – (laisser vide) |

* Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, de qualité analytique) dans le flacon, comme indiqué sur l'étiquette, pour obtenir une solution prête à l'emploi.

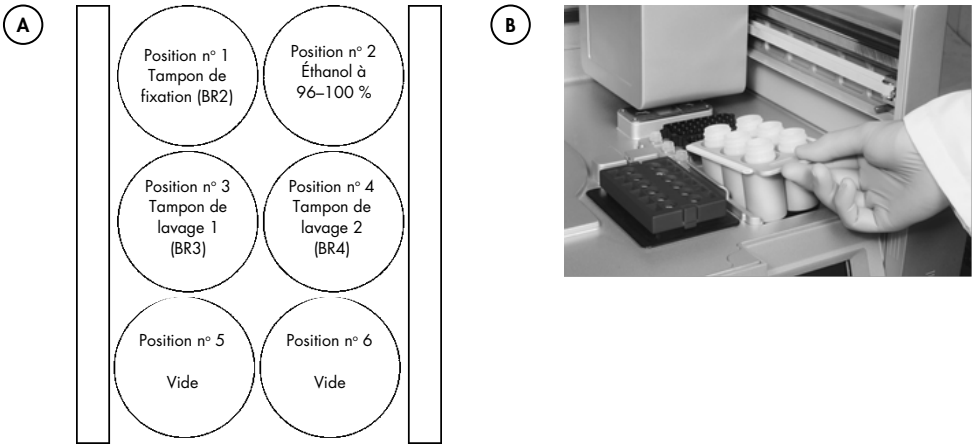


Figure 16. Chargement du portoir pour flacons de réactif. [A] Schéma des positions et du contenu des flacons sur le portoir pour flacons de réactif. [B] Chargement du portoir dans le QIAcube.

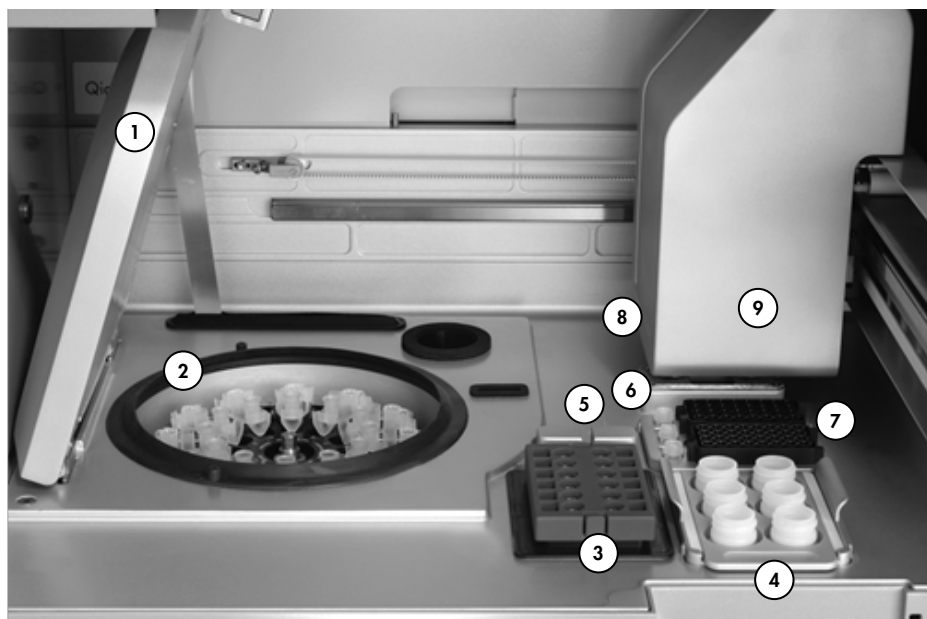


Figure 17. Vue de l'intérieur du QIAcube.

- | | |
|---|---|
| <p>① Couverture de la centrifugeuse</p> <p>② Centrifugeuse</p> <p>③ Agitateur</p> <p>④ Portoir pour flacons de réactif</p> <p>⑤ Capteur de pointes de pipette</p> | <p>⑥ Emplacements pour tubes de microcentrifugation</p> <p>⑦ Portoirs à pointes de pipette</p> <p>⑧ Emplacements pour l'élimination des pointes de pipette et des colonnes</p> <p>⑨ Bras robotisé</p> |
|---|---|

Colonnes de centrifugation (PRC, PSC), tubes de microcentrifugation (MCT) et matériel en plastique du QIAcube

Placer 2 portoirs remplis avec des pointes de pipette à filtre de 1 000 µl dans le QIAcube (voir figure 17, page 42). Remplir de nouveau les portoirs avec des pointes de pipette lorsque cela s'avère nécessaire.



Utiliser uniquement des pointes de pipette à filtre de 1 000 µl conçus pour une utilisation avec le QIAcube.

Marquer les adaptateurs pour rotor et les tubes de microcentrifugation (MCT) pour chaque échantillon à l'aide d'un stylo indélébile. Ouvrir les colonnes de centrifugation PAXgene Shredder (PSC) à utiliser et couper complètement les couvercles avec des ciseaux (voir figure 18, page 44).



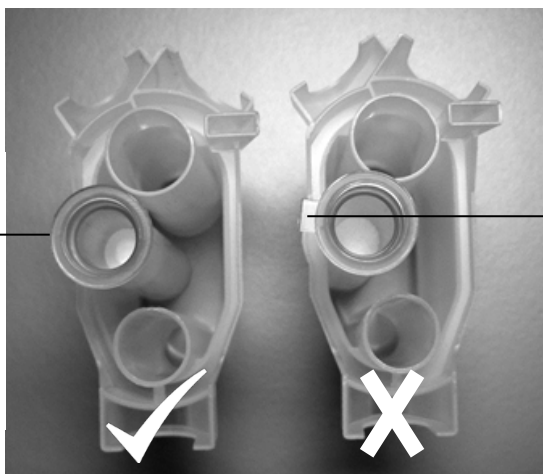
Pour que la pince robotisée du QIAcube fonctionne correctement, retirer complètement (couper) les couvercles et toutes les parties en plastique les reliant aux colonnes de centrifugation PAXgene Shredder (PSC ; voir figure 16). Autrement, la pince robotisée ne peut pas saisir les colonnes (PSC, PRC) correctement.

Charger la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC), la colonne de centrifugation PAXgene Shredder (PSC, sans le couvercle) et le tube de microcentrifugation marqué (MCT) dans les positions appropriées dans chaque adaptateur pour rotor marqué, comme illustré dans le tableau 4 et dans la figure 19 (page 44).



S'assurer que les couvercles de la colonne (PRC) et du tube de microcentrifugation (MCT) sont enfoncés sur toute leur longueur au fond des espaces, sur le bord de l'adaptateur pour rotor ; dans le cas contraire, ils seront coupés pendant la centrifugation.

Le couvercle de la colonne (PSC) a été retiré correctement.



Le couvercle de la colonne (PSC) n'a pas été retiré correctement ; une partie du couvercle est restée.

Figure 18. Chargement d'une colonne de centrifugation PAXgene Shredder (PSC). La colonne de centrifugation PAXgene Shredder (PSC) est chargée en position médiane dans l'adaptateur pour rotor. Couper le couvercle avant de charger la colonne (PSC).

Tableau 4. Matériel de laboratoire dans l'adaptateur pour rotor.

| Position | Réactif | Position du couvercle |
|----------|---|-----------------------|
| 1 | Colonne de centrifugation PAXgene RNA (rouge, PRC) | L1 |
| 2 | Colonne de centrifugation PAXgene Shredder (lilas, PSC) (couper le couvercle avant de la placer dans l'adaptateur pour rotor) | – |
| 3 | Tube de microcentrifugation (MCT)* | L3 |

* Utiliser les tubes de microcentrifugation (1,5 ml, MCT) inclus dans le PAXgene Blood RNA Kit.

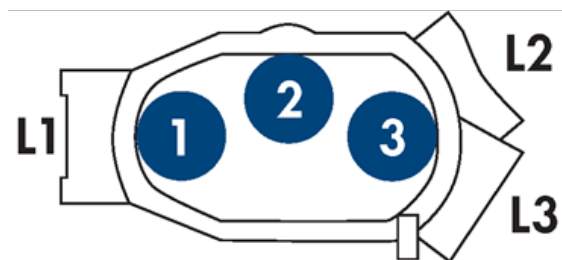


Figure 19. Positions dans l'adaptateur pour rotor. L'adaptateur pour rotor possède trois positions de tube (1 à 3) et trois positions de couvercles (L1 à L3).

Chargement de la centrifugeuse

Charger les adaptateurs pour rotor montés dans les godets de la centrifugeuse, comme illustré dans la figure 20 ci-dessous.



Si moins de 12 échantillons sont traités, veiller à charger le rotor de la centrifugeuse de manière équilibrée radialement (voir figure 21, page 46). Tous les godets de la centrifugeuse doivent être montés avant de lancer un cycle de protocole, même s'il y a moins de 12 échantillons à traiter. Il est impossible de traiter un seul échantillon ou 11 échantillons.

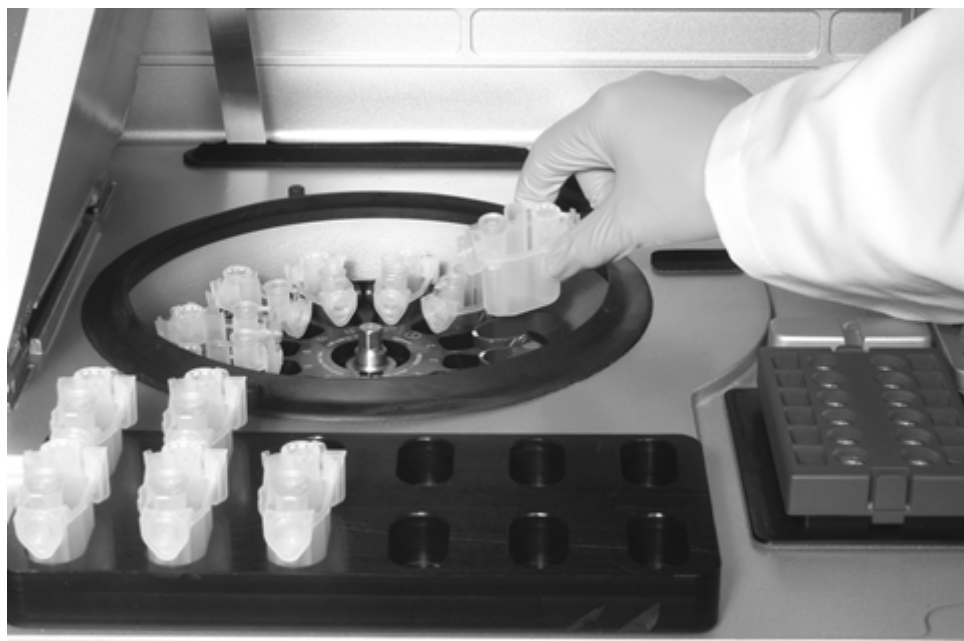


Figure 20. Chargement de la centrifugeuse. Charger les adaptateurs pour rotor montés dans les godets de la centrifugeuse.

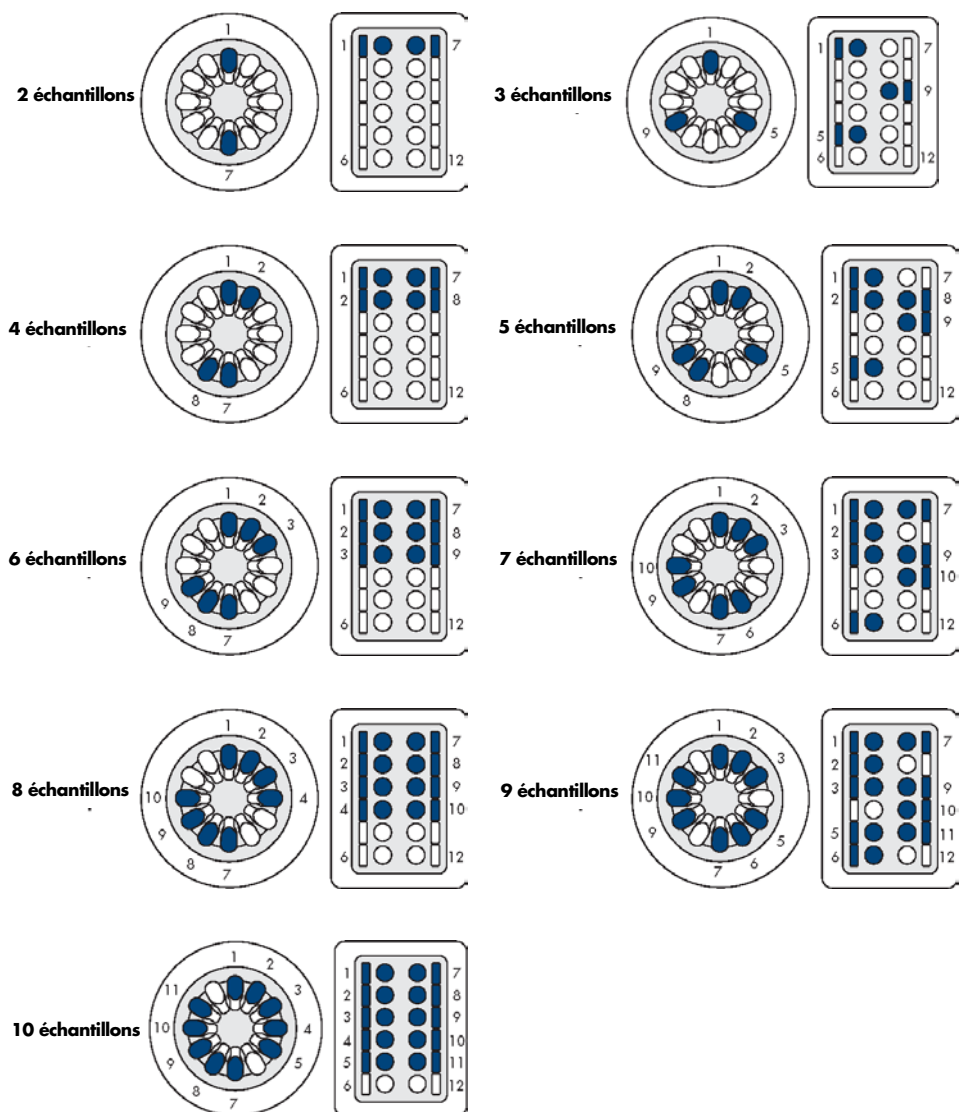


Figure 21. Chargement de la centrifugeuse et de l'agitateur. Les positions de la centrifugeuse et de l'agitateur sont illustrées pour le traitement de deux (2) à dix (10) échantillons. Il est impossible de traiter 1 ou 11 échantillons.

Tubes de traitement (PT)

Retirer les tubes de traitement (PT) des cycles précédents laissés dans les emplacements pour tubes de microcentrifugation (voir figure 17, page 42). Remplir 3 tubes de traitement (PT) avec la quantité de réactif indiquée dans le tableau 5, en fonction du nombre d'échantillons prévus dans le cycle.

Pour le mélange d'incubation de la DNase I, transférer à l'aide d'une pipette le volume indiqué de tampon de digestion de l'ADN (RDD) dans un tube de traitement (PT) et ajouter le volume indiqué de solution mère de DNase I (RNFD). Mélanger en pipettant doucement l'ensemble du mélange de haut en bas 3 fois avec une pointe de 1 000 µl.

Utiliser les tubes de traitement de 2 ml (PT) inclus dans le PAXgene Blood RNA Kit. Marquer les tubes (PT) clairement avec le nom des réactifs et les placer en position appropriée dans les emplacements pour tubes de microcentrifugation, comme indiqué dans le tableau 6 (page 48).



La DNase I (RNFD) est particulièrement sensible à la dénaturation physique. Mélanger uniquement en pipettant à l'aide de pointes de pipette à grand diamètre pour réduire les contraintes physiques. Ne pas vortexer.



Veiller à uniquement pipetter le volume requis tel qu'indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5. Volume de réactif requis dans les tubes de traitement pour les emplacements pour tubes de microcentrifugation

| Nombre d'échantillons | Volume de réactif requis pour le nombre indiqué d'échantillons (µl) | | |
|-----------------------|---|--|------------------------|
| | Protéinase K (PK) | Mélange d'incubation de la DNase I | Tampon d'élution (BR5) |
| 2 | 126 | 187 (23 de DNase I + 164 de Buffer RDD) | 313 |
| 3 | 170 | 261 (33 de DNase I + 228 de Buffer RDD) | 399 |
| 4 | 213 | 334 (42 de DNase I + 292 de Buffer RDD) | 486 |
| 5 | 256 | 407 (51 de DNase I + 356 de Buffer RDD) | 572 |
| 6 | 299 | 481 (60 de DNase I + 421 de Buffer RDD) | 658 |
| 7 | 342 | 554 (69 de DNase I + 485 de Buffer RDD) | 745 |
| 8 | 386 | 627 (78 de DNase I + 549 de Buffer RDD) | 831 |
| 9 | 429 | 701 (88 de DNase I + 613 de Buffer RDD) | 918 |
| 10 | 472 | 775 (97 de DNase I + 678 de Buffer RDD) | 1004 |
| 12 | 558 | 921 (115 de DNase I + 806 de Buffer RDD) | 1177 |

Tableau 6. Emplacements pour tubes de microcentrifugation.

| | Position | | |
|---------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| | A | B | C |
| Contenu | Protéinase K (PK) | Mélange d'incubation de la DNase I | Tampon d'élution (BR5) |
| Tube | Tube de traitement (PT)* | Tube de traitement (PT)* | Tube de traitement (PT)* |

* Utiliser les tubes de traitement de 2 ml (PT) inclus dans le PAXgene Blood RNA Kit.

Protocole : purification manuelle d'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Points importants avant de commencer

- Vérifier que la boîte du kit n'est pas endommagée et que les flacons de tampon n'ont pas fui. Ne pas utiliser de kit endommagé.
- Lors de l'utilisation d'une pipette, vérifier qu'elle indique le bon volume et que le liquide est complètement aspiré et distribué.
- Afin d'éviter de transférer les échantillons dans le mauvais tube ou dans la mauvaise colonne de centrifugation, vérifier que tous les tubes et toutes les colonnes de centrifugation sont correctement marqués avec un stylo indélébile. Marquer le couvercle et le côté de chaque tube (PT, MCT). Pour les colonnes de centrifugation, marquer le tube de traitement (PT) dans lequel aura lieu l'élution. Fermer chaque tube ou colonne de centrifugation après y avoir transféré le liquide.
- Des déversements d'échantillons et de tampons au cours de la procédure peuvent réduire le rendement et la pureté de l'ARN.
- Sauf indication contraire, toutes les étapes de ce protocole, y compris les étapes de centrifugation, doivent être effectuées à température ambiante (15 à 25 °C).

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

- Déposer avec précaution l'échantillon sur la colonne de centrifugation (PRC, PSC) sans mouiller le bord.
- Toujours changer les pointes des pipettes entre chaque transfert de liquide. Utiliser des pointes de pipette à filtre anti-aérosol.

- Ne pas toucher la membrane de la colonne de centrifugation (PRC, PSC) avec la pointe de la pipette.
- Après chaque étape de chauffage ou d'homogénéisation par vortex, centrifuger brièvement les tubes de microcentrifugation (MCT) afin de retirer les gouttelettes d'échantillon accumulées dans les bouchons des tubes.
- Porter des gants pendant toute la procédure. En cas de contact des gants avec l'échantillon, les changer immédiatement.
- Toujours fermer la colonne de centrifugation (PRC, PSC) avant de l'installer dans la microcentrifugeuse. Centrifuger comme décrit dans le protocole.
- Ouvrir une seule colonne de centrifugation (PRC, PSC) à la fois et prendre garde à ne pas générer d'aérosols.
- Pour traiter efficacement plusieurs échantillons en parallèle, remplir un portoir avec des tubes de traitement (PT) pour y transférer les colonnes de centrifugation (PRC, PSC) après centrifugation. Jeter les tubes utilisés contenant l'effluent et placer les nouveaux tubes de traitement (PT) contenant les colonnes de centrifugation (PRC, PSC) directement dans la microcentrifugeuse.

Remarques importantes avant de commencer

- Le sang doit être prélevé dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) selon les instructions du *manuel du PAXgene Blood RNA Tube*. Si nécessaire, voir l'annexe C (page 68) pour des recommandations sur la manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Après prélèvement du sang, incubé les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pendant au moins 2 heures à température ambiante afin d'assurer une lyse complète des cellules sanguines. L'incubation du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant une nuit peut augmenter les rendements. Si le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a été conservé à 2–8 °C, à –20° C ou à –70° C après prélèvement du sang, le laisser revenir à température ambiante, puis le garder pendant 2 heures à température ambiante avant de commencer la procédure.
- Lire les informations de sécurité page 10.
- Lire les consignes sur la manipulation de l'ARN (annexe A, page 65).

- Vérifier que les appareils utilisés, comme les pipettes et l'agitateur-incubateur, ont été contrôlés et calibrés régulièrement conformément aux recommandations du fabricant.
- Les étapes 5 et 20 requièrent l'utilisation d'un agitateur-incubateur. Régler la température de l'agitateur-incubateur à 55 °C.
- Le tampon de fixation (BR2) peut former un précipité au cours de sa conservation. Si nécessaire, le chauffer à 37 °C pour le dissoudre.
- Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, de qualité analytique) dans le flacon, comme indiqué sur l'étiquette, pour obtenir une solution prête à l'emploi.
- Lors de la première utilisation du RNase-Free DNase Set, préparer une solution mère de DNase I. Dissoudre la DNase I (RNFD ; 1 500 unités Kunitz)* dans 550 µl de tampon de remise en suspension de la DNase (DRB) fourni. Prendre garde à ne pas perdre de DNase I (RNFD) en ouvrant le flacon. Ne pas vortexer la DNase I reconstituée (RNFD). La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. La solution de DNase I doit être mélangée uniquement en retournant doucement le tube plusieurs fois.
- Les données actuellement disponibles montrent que la DNase I reconstituée (RNFD) peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 6 semaines. Pour une conservation de la DNase I (RNFD) de longue durée, répartir la solution en aliquotes à usage unique (utiliser les tubes de microcentrifugation de 1,5 ml [MCT] fournis dans le kit ; il y en a un nombre suffisant pour 5 aliquotes) et les conserver jusqu'à 9 mois à -20 °C. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées jusqu'à 6 semaines entre 2 et 8 °C. Ne pas recongeler les aliquotes après la décongélation.
- Lors de la reconstitution et de l'aliquotage de la DNase I (RNFD), veiller à bien respecter les consignes sur la manipulation de l'ARN (annexe A, page 65).

* Les unités Kunitz sont souvent utilisées pour mesurer la DNase I et sont définies comme la quantité de DNase I qui provoque une augmentation de l'absorbance à 260 nm de 0,001 par minute et par millilitre à 25 °C et pH 5,0, avec de l'ADN hautement polymérisé comme substrat [Kunitz, M. [1950] J. Gen. Physiol. **33**, 349 et 363].

Procédure

1. Centrifuger le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant 10 minutes entre 3 000 et 5 000 x g dans un rotor à angle variable.



Vérifier que l'échantillon sanguin a été incubé pendant au moins 2 heures à température ambiante (15–25 °C) dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) afin d'assurer une lyse complète des cellules sanguines.



Le rotor doit contenir des adaptateurs pour tubes à fond rond. Si d'autres types d'adaptateurs sont utilisés, les tubes risquent de se casser pendant la centrifugation.

2. Éliminer le surnageant en le versant ou en l'aspirant à l'aide d'une pipette. Ajouter 4 ml d'eau exempte de RNase (RNFW) sur le culot et fermer le tube avec un nouveau bouchon secondaire BD Hemogard (fourni avec le kit).

Si le surnageant est décanté, prendre garde à ne pas décoller le culot de la paroi du tube et sécher le bord du tube avec une serviette en papier propre.

3. Resuspendre complètement le culot en vortexant puis centrifuger pendant 10 minutes entre 3 000 et 5 000 x g dans un rotor à angle variable. Éliminer le surnageant aussi complètement que possible.

La présence de petits débris cellulaires dans le surnageant après mélange au vortex et avant centrifugation n'affecte pas la procédure.



En revanche, une élimination incomplète du surnageant peut inhiber la lyse et diluer le lysat, affectant ainsi les conditions de fixation de l'ARN sur la membrane PAXgene.

4. Ajouter 350 µl de tampon de resuspension (BR1) et vortexer jusqu'à resuspension totale du culot.
5. À l'aide d'une pipette, transférer l'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (MCT). Ajouter 300 µl de tampon de fixation (BR2) et 40 µl de protéinase K (PK). Vortexer pendant 5 secondes et incubé pendant 10 minutes à 55 °C dans l'agitateur-incubateur, entre 400 et 1 400 tr/min. Après incubation, régler la température de l'agitateur-incubateur à 65 °C (pour l'étape 20).



Ne pas mélanger le tampon de fixation (BR2) et la protéinase K (PK) avant de les ajouter à l'échantillon.

6. À l'aide d'une pipette, transférer le lysat directement sur une colonne de centrifugation PAXgene Shredder (PSC, lilas) placée dans un tube de traitement (PT) de 2 ml et centrifuger pendant 3 minutes à vitesse maximale (mais sans dépasser 20 000 x g).



À l'aide d'une pipette, déposer tout le lysat avec précaution sur la colonne de centrifugation (PSC) et vérifier visuellement que le lysat est complètement transféré sur la colonne (PSC).

Pour prévenir la détérioration des colonnes (PSC) et des tubes (PT), ne pas dépasser 20 000 x g.



Certains échantillons peuvent s'écouler à travers la colonne de centrifugation PAXgene Shredder (PSC) sans centrifugation. Cela est dû à la faible viscosité de certains échantillons et ne doit pas être considéré comme une indication de l'échec du produit.

7. Transférer avec précaution la totalité du surnageant de l'effluent dans un nouveau tube de microcentrifugation (MCT) de 1,5 ml sans décoller le culot du tube de traitement.
8. Ajouter 350 µl d'éthanol (96 à 100 %, de qualité analytique). Vortexer et centrifuger brièvement (1 à 2 secondes entre 500 et 1 000 x g) afin de retirer les gouttes présentes dans le bouchon.



La durée de centrifugation ne doit pas dépasser 1 à 2 secondes, car cela risque de culotter les acides nucléiques et réduire le rendement en ARN total.

9. À l'aide d'une pipette, déposer 700 µl d'échantillon sur la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC, rouge) placée dans un tube de traitement (PT) de 2 ml et centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne de centrifugation (PRC) dans un nouveau tube de traitement (PT) de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement (PT) contenant l'effluent.
10. À l'aide d'une pipette, déposer le reste de l'échantillon sur la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC) et centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne de centrifugation (PRC) dans un nouveau tube de traitement (PT) de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement (PT) contenant l'effluent.



À l'aide d'une pipette, déposer l'échantillon avec précaution sur la colonne de centrifugation (PRC) et vérifier visuellement que l'échantillon est complètement transféré sur la colonne (PRC).

11. Déposer 350 µl de tampon de lavage 1 (BR3) sur la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC). Centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne de centrifugation (PRC) dans un nouveau tube de traitement (PT) de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement (PT) contenant l'effluent.
12. Dans un tube de microcentrifugation (MCT) de 1,5 ml, ajouter 10 µl de solution mère de DNase I (RNFD) à 70 µl de tampon de digestion de l'ADN (RDD). Mélanger en tapotant

légèrement sur le tube avec le doigt et centrifuger brièvement pour récupérer les gouttelettes sur les parois du tube.

Par exemple, pour traiter 10 échantillons, ajouter 100 µl de solution mère de DNase I (RNFD) à 700 µl de tampon de digestion de l'ADN (RDD). Utiliser les tubes de microcentrifugation (MCT) de 1,5 ml fournis dans le kit.



La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. La mélanger uniquement en tapotant légèrement avec le doigt sur le tube. Ne pas vortexer.

13. Déposer le mélange d'incubation de la DNase I (RNFD) (80 µl) directement sur la membrane de la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC) et laisser incubé pendant 15 minutes sur la paillasse entre 20 et 30 °C.



Vérifier que le mélange d'incubation de la DNase I (RNFD) déposé se trouve directement sur la membrane. La digestion de la DNase risque d'être incomplète si une partie du mélange reste sur les parois ou sur le joint torique de la colonne de centrifugation (PRC).

14. À l'aide d'une pipette, déposer 350 µl de tampon de lavage 1 (BR3) sur la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC) et centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne de centrifugation (PRC) dans un nouveau tube de traitement (PT) de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement (PT) contenant l'effluent.
15. À l'aide d'une pipette, déposer 500 µl de tampon de lavage 2 (BR4) sur la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC) et centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne de centrifugation (PRC) dans un nouveau tube de traitement (PT) de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement (PT) contenant l'effluent.



Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Vérifier que l'éthanol a bien été ajouté au tampon de lavage 2 (BR4) avant utilisation (voir « Remarques importantes avant de commencer », page 50).

16. Ajouter une nouvelle fois 500 µl de tampon de lavage 2 (BR4) à la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC). Centrifuger pendant 3 minutes entre 8 000 et 20 000 x g.
17. Jeter le tube de traitement (PT) contenant l'effluent et placer la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC) dans un nouveau tube de traitement (PT) de 2 ml. Centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g.

18. Jeter le tube de traitement (PT) contenant l'effluent. Placer la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC) dans un tube de microcentrifugation (MCT) de 1,5 ml et déposer 40 µl de tampon d'élution (BR5) directement sur la membrane de la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC). Centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g afin d'éluer l'ARN.

Il est très important d'humidifier complètement la membrane avec le tampon d'élution (BR5) afin d'assurer une efficacité maximale de l'élution.

19. Répéter l'étape d'élution (étape 18) comme décrit avec 40 µl de tampon d'élution (BR5) et le même tube de microcentrifugation (MCT).

20. Incuber l'éluant pendant 5 minutes à 65 °C dans l'agitateur-incubateur (de l'étape 5) sans agitation. Après incubation, le mettre directement sur de la glace.

Cette incubation à 65 °C dénature les ARN pour les applications en aval. Ne pas dépasser la durée ou la température d'incubation.

21. Si les échantillons d'ARN ne sont pas utilisés immédiatement, les conserver à -20 °C ou à -70 °C.

Puisque l'ARN reste dénaturé après plusieurs cycles de congélation/décongélation, il n'est pas nécessaire de répéter l'incubation à 65 °C. Si les échantillons d'ARN sont utilisés dans un test diagnostique, respecter les consignes du fabricant.

Pour une quantification correcte de l'ARN par mesure de l'absorbance à 260 nm, nous recommandons la dilution des échantillons avec du tampon Tris-HCl à 10 mM et pH 7,5*. La dilution de l'échantillon dans de l'eau exempte de RNase peut conduire à l'obtention de valeurs faussement basses.

Pour la mise à zéro du spectrophotomètre, utiliser un blanc avec la même proportion de tampon d'élution (BR5) et de tampon Tris-HCl que celle des échantillons à mesurer. Le tampon d'élution (BR5) présente une forte absorbance à 220 nm, pouvant induire un bruit de fond élevé des valeurs d'absorbance si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement réglé.

Remarque : pour la quantification dans le tampon Tris-HCl, utiliser la relation

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$. Voir annexe B, page 66.

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

Protocole : purification automatisée de l'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Points importants avant de commencer

- Vérifier que la boîte du kit n'est pas endommagée et que les flacons de tampon n'ont pas fui. Ne pas utiliser de kit endommagé.
- Lors de l'utilisation d'une pipette, vérifier qu'elle indique le bon volume et que le liquide est complètement aspiré et distribué.
- Pour éviter de transférer les échantillons dans les mauvais tubes et consommables en plastique, vérifier que l'ensemble des tubes de traitement (PT), des tubes de microcentrifugation (MCT) et des adaptateurs pour rotor sont correctement marqués à l'aide d'un stylo indélébile. Marquer le couvercle et le côté de chaque tube de microcentrifugation (MCT), le côté de chaque tube de traitement (PT) et la paroi externe de chaque adaptateur pour rotor.
- Des déversements d'échantillons et de tampons au cours de la procédure peuvent réduire le rendement et la pureté de l'ARN.
- Sauf indication contraire, toutes les étapes de ce protocole, y compris les étapes de centrifugation, doivent être effectuées à température ambiante (15 à 25 °C).

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

- Pipetter avec précaution l'échantillon au fond du tube de traitement (PT), sans en humidifier le bord.
- Toujours changer les pointes de pipette entre chaque transfert de liquide. Utiliser des pointes de pipette à filtre anti-aérosol.

- Ne pas toucher la membrane de la colonne de centrifugation (PRC, PSC) avec la pointe de pipette.
- Après chaque étape de chauffage ou d'homogénéisation par vortex, centrifuger brièvement les tubes de microcentrifugation (MCT) afin de retirer les gouttelettes d'échantillon accumulées dans les bouchons des tubes.
- Porter des gants pendant toute la procédure. En cas de contact des gants avec l'échantillon, les changer immédiatement.

Remarques importantes avant de commencer

- Le sang doit être prélevé dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) selon les instructions du *manuel du PAXgene Blood RNA Tube*. Si nécessaire, voir l'annexe C (page 68) pour des recommandations sur la manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Après prélèvement du sang, incuber les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pendant au moins 2 heures à température ambiante afin d'assurer une lyse complète des cellules sanguines. L'incubation du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant une nuit peut augmenter les rendements. Si le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a été conservé à 2–8 °C, à –20° C ou à –70° C après prélèvement du sang, le laisser revenir à température ambiante, puis le garder pendant 2 heures à température ambiante avant de commencer la procédure.
- Lire les informations de sécurité page 10.
- Lire les « Remarques importantes », page 38.
- Lire les consignes sur la manipulation de l'ARN (annexe A, page 65).
- Veuillez lire le *manuel d'utilisation du QIAcube* et toute autre information fournie avec le QIAcube, en portant une attention particulière aux informations de sécurité.
- Vérifier que les appareils utilisés, comme les pipettes et le QIAcube, ont été contrôlés et calibrés régulièrement conformément aux recommandations du fabricant.
- Le tampon de fixation (BR2) peut former un précipité au cours de sa conservation. Si nécessaire, le chauffer à 37 °C pour le dissoudre.

- Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, de qualité analytique) dans le flacon, comme indiqué sur l'étiquette, pour obtenir une solution prête à l'emploi.
- Lors de la première utilisation du RNase-Free DNase Set, préparer une solution mère de DNase I. Dissoudre la DNase I (RNFD ; 1 500 unités Kunitz)* dans 550 µl de tampon de remise en suspension de la DNase (DRB) fourni. Prendre garde à ne pas perdre de DNase I (RNFD) en ouvrant le flacon. Ne pas vortexer la DNase I reconstituée (RNFD). La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. La solution de DNase I doit être mélangée uniquement en retournant doucement le tube plusieurs fois.
- Les données actuellement disponibles montrent que la DNase I reconstituée (RNFD) peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 6 semaines. Pour une conservation de la DNase I (RNFD) de longue durée, répartir la solution en aliquotes à usage unique (utiliser les tubes de microcentrifugation de 1,5 ml [MCT] fournis dans le kit ; il y en a un nombre suffisant pour 5 aliquotes) et les conserver jusqu'à 9 mois à -20 °C. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées jusqu'à 6 semaines entre 2 et 8 °C. Ne pas recongeler les aliquotes après la décongélation.
- Lors de la reconstitution et de l'aliquotage de la DNase I (RNFD), veiller à bien respecter les consignes sur la manipulation de l'ARN (annexe A, page 65).
- Installer l'adaptateur pour agitateur qui convient (fourni avec le QIAcube ; utiliser l'adaptateur pour tubes safe-lock de 2 ml marqués par un « 2 ») et placer le portoir de l'agitateur en haut de l'adaptateur.
- Vérifier le tiroir à déchets et le vider si nécessaire.
- Installer les protocoles si cela n'a pas encore été fait au cours des cycles précédents. Installer les protocoles « PAXgene Blood RNA Part A » et « PAXgene Blood RNA Part B ». Voir « Installation des protocoles sur le QIAcube », page 38.

* Les unités Kunitz sont souvent utilisées pour mesurer la DNase I et sont définies comme la quantité de DNase I qui provoque une augmentation de l'absorbance à 260 nm de 0,001 par minute et par millilitre à 25 °C et pH 5,0, avec de l'ADN hautement polymérisé comme substrat [Kunitz, M. [1950] J. Gen. Physiol. **33**, 349 et 363].

Procédure

1. Fermer la porte du QIAcube et le mettre en marche à l'aide de l'interrupteur d'alimentation (voir figure 15, page 39).

Un bip retentit et l'écran de démarrage apparaît. L'appareil réalise des tests d'initialisation de façon automatique.

2. Ouvrir la porte du QIAcube et charger les réactifs et le matériel en plastique nécessaires dans le QIAcube. Voir « Chargement du QIAcube », page 40.

Pour gagner du temps, le chargement peut être réalisé pendant une étape de centrifugation de 10 minutes ou les deux (étapes 3 et 5).

3. Centrifuger le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant 10 minutes entre 3 000 et 5 000 x g dans un rotor à angle variable.



Vérifier que l'échantillon sanguin a été incubé pendant au moins 2 heures à température ambiante (15–25 °C) dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) afin d'assurer une lyse complète des cellules sanguines.



Le rotor doit contenir des adaptateurs pour tubes à fond rond. Si d'autres types d'adaptateurs sont utilisés, les tubes risquent de se casser pendant la centrifugation.

4. Éliminer le surnageant en le versant ou en l'aspirant à l'aide d'une pipette. Ajouter 4 ml d'eau exempte de RNase (RNFW) sur le culot et fermer le tube avec un nouveau bouchon secondaire BD Hemogard (fourni avec le kit).

Si le surnageant est décanté, prendre garde à ne pas décoller le culot de la paroi du tube et sécher le bord du tube avec une serviette en papier propre.

5. Resuspendre complètement le culot en vortexant puis centrifuger pendant 10 minutes entre 3 000 et 5 000 x g dans un rotor à angle variable. Éliminer le surnageant aussi complètement que possible.

La présence de petits débris cellulaires dans le surnageant après mélange au vortex et avant centrifugation n'affecte pas la procédure.



En revanche, une élimination incomplète du surnageant peut inhiber la lyse et diluer le lysat, affectant ainsi les conditions de fixation de l'ARN sur la membrane PAXgene.

6. Ajouter 350 µl de tampon de resuspension (BR1) et vortexer jusqu'à resuspension totale du culot.

7. À l'aide d'une pipette, transférer l'échantillon dans un tube de traitement de 2 ml (PT).



Utiliser les tubes de traitement de 2 ml (PT) inclus dans le PAXgene Blood RNA Kit.

8. Charger les tubes de traitement (PT) ouverts contenant l'échantillon dans l'agitateur du QIAcube (voir figure 17, page 42). Les positions des échantillons sont numérotées pour faciliter leur chargement. Insérer les broches du portoir de l'agitateur (fourni avec le QIAcube) dans les emplacements, au bord du portoir de l'agitateur, à côté de chaque tube de traitement. Cela permet de détecter les échantillons pendant le contrôle du chargement.



Vérifier que l'adaptateur pour agitateur installé (2 ml, tubes safe-lock, marqués par un « 2 », fourni avec le QIAcube) est le bon.



Si moins de 12 échantillons sont traités, veiller à charger le portoir de l'agitateur comme illustré dans la figure 21, page 46. Il est impossible de traiter 1 ou 11 échantillons.

9. Fermer la porte de l'appareil QIAcube (voir figure 15, page 39).

10. Sélectionner le protocole « PAXgene Blood RNA Part A » et le lancer.

Suivre les instructions indiquées sur l'écran tactile du QIAcube.



S'assurer que les deux parties du programme (A et B) sont installées sur le QIAcube (voir « Installation des protocoles sur le QIAcube », page 38).



Le QIAcube réalise des contrôles du chargement des échantillons, des pointes de pipette, des adaptateurs pour rotor et des flacons de réactif.

11. Une fois le protocole « PAXgene Blood RNA Part A » terminé, ouvrir la porte de l'appareil QIAcube (voir figure 15, page 39). Retirer et jeter les colonnes de

centrifugation PAXgene RNA (PRC) des adaptateurs pour rotor ainsi que les tubes de traitement (PT) vides de l'agitateur.



Au cours du cycle, l'appareil transfère les colonnes de centrifugation de la position 1 de l'adaptateur pour rotor (position de couvercle L1) à la position 3 (position de couvercle L2) (voir figure 19, page 44).

12. Fermer les couvercles de tous les tubes de microcentrifugation (MCT) de 1,5 ml contenant l'ARN purifié dans les adaptateurs pour rotor (position 3, position de couvercle L3 ; voir figure 19, page 44). Transférer les tubes de microcentrifugation (MCT) de 1,5 ml dans l'adaptateur pour agitateur du QIAcube (voir figure 17, page 42).

13. Fermer la porte de l'appareil QIAcube (voir figure 15, page 39).

14. Sélectionner le protocole « PAXgene Blood RNA Part B » et le lancer.

Suivre les instructions indiquées sur l'écran tactile du QIAcube.



Ce programme incube les échantillons à 65 °C et dénature les ARN pour les applications en aval. Même si l'application en aval inclut une étape de dénaturation à la chaleur, ne pas sauter cette étape. Une dénaturation des ARN suffisante est essentielle pour garantir l'efficacité optimale des applications en aval.

15. Une fois le programme « PAXgene Blood RNA Part B » terminé, ouvrir la porte de l'appareil QIAcube (voir figure 15, page 39). Placer immédiatement les tubes de microcentrifugation (MCT) contenant les ARN purifiés sur de la glace.



AVERTISSEMENT : surface chaude. L'agitateur peut atteindre une température de 70 °C. Éviter de le toucher lorsqu'il est chaud.



Ne pas laisser les ARN purifiés dans le QIAcube. Dans la mesure où les échantillons ne sont pas refroidis, les ARN purifiés peuvent se dégrader. Il n'est donc pas recommandé de lancer des préparations d'échantillons sans surveillance pour la nuit.

16. Si les échantillons d'ARN ne sont pas utilisés immédiatement, les conserver à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dans la mesure où l'ARN reste dénaturé après des congélations/décongélations répétées, il est inutile de répéter le protocole d'incubation à la chaleur (« PAXgene Blood RNA Part B »). En cas d'utilisation des échantillons d'ARN dans un test diagnostique, respecter les consignes du fabricant.

Pour une quantification correcte de l'ARN par mesure de l'absorbance à 260 nm, nous recommandons la dilution des échantillons dans du tampon Tris-HCl à 10 mM et pH 7,5*. La dilution de l'échantillon dans de l'eau exempte de RNase peut conduire à l'obtention de valeurs faussement basses.

Pour la mise à zéro du spectrophotomètre, utiliser un blanc avec la même proportion de tampon d'élution (BR5) et de tampon Tris-HCl que celle des échantillons à mesurer. Le tampon d'élution (BR5) présente une forte absorbance à 220 nm, pouvant induire un bruit de fond élevé des valeurs d'absorbance si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement réglé.



Pour la quantification dans le tampon Tris-HCl, utiliser la relation

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Voir annexe B, page 66.

17. Retirer le portoir de flacons de réactif du plan de travail du QIAcube (voir figure 17, page 42), puis fermer tous les flacons à l'aide de couvercles correctement marqués. Le tampon présent dans les flacons peut être conservé à température ambiante ($15\text{ à }25\text{ }^{\circ}\text{C}$) pendant un maximum de 3 mois. Retirer et éliminer les réactifs restants dans les tubes de traitement (PT) dans les emplacements pour tubes de microcentrifugation du QIAcube (voir figure 17, page 42). Retirer et éliminer les adaptateurs pour rotor de la centrifugeuse (voir figure 17, page 42). Vider le tiroir à déchets du QIAcube (voir figure 15, page 39). Fermer la porte de l'appareil QIAcube et arrêter ce dernier à l'aide de l'interrupteur d'alimentation (voir figure 15, page 39).

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

Guide de résolution des problèmes

Ce guide peut vous aider à résoudre les problèmes qui peuvent se poser. 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 du service technique de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes vos questions sur les informations et les protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir la dernière page ou le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

ARN dégradé

Contamination par des RNases



Veiller à ne pas contaminer les réactifs avec des RNases tout au long de la procédure de purification ou des analyses ultérieures (voir annexe A, page 65).

Faible rendement en ARN

a) Moins de 2,5 ml de sang ont été collectés dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



S'assurer que 2,5 ml de sang sont prélevés dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT ; consulter le *manuel du PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Concentration de l'ARN mesurée dans de l'eau



L'ARN doit être dilué dans du Tris-Cl 10 mM, pH 7,5*, pour une quantification exacte (voir annexe B, page 66).



c) Débris cellulaires transférés dans la colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC) aux étapes 9 et 10 du protocole manuel





Éviter de transférer de larges particules au moment de pipetter le surnageant à l'étape 7 du protocole manuel (le transfert des petits débris n'affecte pas la procédure).

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

Commentaires et suggestions

- | | |
|---|--|
| d) Le surnageant n'a pas été entièrement éliminé à l'étape 3 |  <p>S'assurer que tout le surnageant est éliminé. S'il est décanté, supprimer les gouttes du bord du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) en le tamponnant sur une serviette en papier. Prendre les précautions appropriées afin d'éviter tout risque de contamination croisée.</p> |
| e) Après prélèvement dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT), le sang a été incubé pendant moins de 2 heures |  <p>Incuber le sang dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant au moins 2 heures après le prélèvement.</p> |

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

- | | |
|--|---|
| a) De l'eau a été utilisée pour diluer l'ARN pour la mesure du rapport A_{260}/A_{280} |  <p>Utiliser du Tris-Cl 10 mM, pH 7,5, pour diluer l'ARN avant de mesurer sa pureté* (voir annexe B, page 66).</p> |
| b) Le spectrophotomètre n'a pas été correctement mis à zéro |  <p>Pour la mise à zéro du spectrophotomètre, utiliser un blanc avec la même proportion de tampon d'élution (BR5) et de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, que celle des échantillons à mesurer. Le tampon d'élution (BR5) présente une forte absorbance à 220 nm, pouvant induire un bruit de fond élevé des valeurs d'absorbance si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement réglé.</p> |

Dysfonctionnement de l'appareil

- | | |
|-----------------------------------|--|
| Utilisation du QIAcube incorrecte | Lire le <i>manuel d'utilisation du QIAcube</i> , en portant une attention particulière à la section sur la résolution des problèmes. S'assurer que le QIAcube est correctement entretenu, conformément au <i>manuel d'utilisation du QIAcube</i> . |
|-----------------------------------|--|

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

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

Manipulation de l'ARN



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

Manipulation générale



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

Des protocoles d'élimination des RNases sur le matériel en verre ou dans les solutions sont disponibles dans des guides généraux de biologie moléculaire comme Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Annexe B : quantification et détermination de la qualité de l'ARN total

Quantification de l'ARN

Les concentration en ARN doivent être déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm (A_{260}) dans un spectrophotomètre. Afin d'obtenir une mesure fiable, les valeurs doivent se trouver dans l'intervalle linéaire du spectrophotomètre. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 44 µg d'ARN par ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Cette relation est uniquement valable pour les mesures réalisées dans du Tris-HCl* 10 mM, pH 7,5. Par conséquent, s'il est nécessaire de diluer l'échantillon d'ARN, cela doit être fait dans du Tris-HCl 10 mM. Comme expliqué ci-dessous (voir « Pureté de l'ARN », page 67), le rapport entre les valeurs d'absorbance à 260 et 280 nm permet d'estimer la pureté de l'ARN. Lors de la mesure des échantillons d'ARN, s'assurer que les cuvettes sont exemptes de RNase. Pour la mise à zéro du spectrophotomètre, utiliser un blanc avec la même proportion de tampon d'élution (BR5) et de tampon Tris-HCl que celle des échantillons à mesurer. Le tampon d'élution (BR5) présente une forte absorbance à 220 nm, pouvant induire un bruit de fond élevé des valeurs d'absorbance si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement réglé. Un exemple du calcul de la concentration et du rendement en ARN est présenté ci-dessous.

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

Volume de l'échantillon d'ARN = 80 µl
 Dilution (1/15) = 10 µl d'échantillon d'ARN + 140 µl de Tris-HCl
 10 mM, pH 7,5
 Mesure de l'absorbance de l'échantillon dilué dans une cuvette exempte de RNase.
 A_{260} = 0,3
 Concentration de l'échantillon = $44 \times A_{260} \times \text{facteur de dilution}$
 = $44 \times 0,3 \times 15$
 = 198 µg/ml
 Rendement total = concentration x volume de l'échantillon en millilitres
 = 198 µg/ml x 0,08 ml
 = 15,8 µg d'ARN

Pureté de l'ARN

Le rapport des valeurs d'absorbance à 260 nm et 280 nm (A_{260}/A_{280}) permet d'estimer la pureté de l'ARN par rapport aux contaminants absorbant les UV (p.ex. les protéines). Toutefois, le rapport A_{260}/A_{280} est considérablement influencé par le pH. Un pH faible entraîne une réduction du rapport A_{260}/A_{280} et de la sensibilité à la contamination par les protéines*. Pour garantir la fiabilité des valeurs, nous recommandons de mesurer l'absorbance dans du tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Le rapport A_{260}/A_{280} de l'ARN pur est compris entre 1,8 et 2,2 dans le Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Pour la mise à zéro du spectrophotomètre, utiliser un blanc avec la même proportion de tampon d'élution (BR5) et de tampon Tris-HCl que celle des échantillons à mesurer. Le tampon d'élution (BR5) présente une forte absorbance à 220 nm, pouvant induire un bruit de fond élevé des valeurs d'absorbance si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement réglé.

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

Annexe C : manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



Les recommandations suivantes de BD peuvent aider à manipuler les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Voir le *manuel du PAXgene Blood RNA Tube* pour de plus amples informations sur les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Instructions pour retirer le bouchon BD Hemogard

1. Tenir le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) d'une main en plaçant le pouce directement sous le bouchon BD Hemogard. (Pour plus de stabilité, poser le bras sur une surface solide.) Avec l'autre main, tourner le bouchon BD Hemogard tout en poussant vers le haut avec le pouce JUSQU'À CE QUE LE BOUCHON EN CAOUTCHOUC SOIT DESSERRÉ.
2. Retirer le pouce avant de soulever le bouchon. NE PAS continuer de pousser le bouchon avec le pouce pour finir d'ouvrir le PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Attention : si le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contient du sang, l'exposition à un risque biologique est possible. Afin de prévenir tout risque de blessures pendant l'ouverture du tube, il est important que le pouce utilisé pour pousser le bouchon vers le haut soit retiré du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) dès que le bouchon BD Hemogard est desserré.
3. Retirer le bouchon du PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Dans le cas peu probable où la partie en plastique se détacherait du bouchon en caoutchouc, NE PAS LE RÉASSEMBLER. Retirer avec précaution le bouchon en caoutchouc du PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instructions pour la pose du bouchon secondaire BD Hemogard

1. Remettre le bouchon sur le PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Tourner et pousser fermement vers le bas jusqu'à ce que le bouchon soit bien repositionné. Il est nécessaire que le bouchon soit complètement enfoncé pour qu'il reste fermement sur le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant les manipulations.

Pour commander

| Produit | Contenu | Réf. |
|--|--|--------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50) | 50 colonnes de centrifugation PAXgene, 50 colonnes de centrifugation Shredder, tubes de traitement, DNase I exempt de RNase, réactifs et tampons exempts de RNase. À utiliser avec les PAXgene Blood RNA Tubes | 762174 |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100) | 100 tubes de prélèvement sanguin | 762165 |
| Produits complémentaires pouvant être commandés chez QIAGEN | | |
| Starter Pack, QIAcube | Le pack comprend : portoirs pour flacons de réactif (3) ; bandes d'étiquettes pour portoir (8) ; pointes à filtre de 200 µl (1 024) ; pointes à filtre de 1 000 µl (1 024) ; pointes à filtre de 1 000 µl à grand diamètre (1 024) ; flacons de réactif de 30 ml (18) ; adaptateurs pour rotor (240) ; support d'adaptateur pour rotor | 990395 |
| Filter-Tips, 1000 µl (1024) | Pointes à filtres jetables, stériles, sur portoirs | 990352 |
| Reagent Bottles, 30 ml (6) | Flacons de réactif (30 ml) avec couvercles ; paquet de 6 à utiliser avec le portoir pour flacons de réactif du QIAcube | 990393 |
| Rotor Adapters (10 x 24) | Pour 240 préparations : 240 adaptateurs pour rotor jetables à utiliser avec le QIAcube | 990394 |
| Reagent Bottle Rack | Portoir destiné à accueillir 6 flacons de réactif de 30 ml sur le plan de travail du QIAcube | 990390 |

| | | |
|----------------------|--|--------|
| Rotor Adapter Holder | Support pour 12 adaptateurs pour rotor jetables à utiliser avec le QIAcube | 990392 |
|----------------------|--|--------|

Produits complémentaires pouvant être commandés chez BD*

| | | |
|--------------------------------|--|--------|
| Blood Collection Set | BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set : aiguille 21G, 0,75'' (0,8 x 19 mm), tube de 12'' (305 mm) avec raccord Luer ; 50 par boîte, 200 par carton | 367286 |
| BD Vacutainer One-Use Holder | Carton pour diamètre de seulement 13 mm et 16 mm ; 1 000/carton | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | Tubes de 13 x 75 mm pour prélèvement de 4,0 ml au maximum avec bouchon BD Hemogard rouge et étiquette en papier ; 100/boîte, 1 000/carton | 368975 |

* Ces accessoires pour le prélèvement du sang sont des produits courants qui peuvent être utilisés avec les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Pour en savoir plus sur ces accessoires, notamment pour savoir comment les commander, consulter www.preanalytix.com.

Pour les dernières informations sur les licences et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation de PreAnalytiX ou de QIAGEN. Les manuels de kit et les manuels d'utilisation de PreAnalytiX et de QIAGEN sont disponibles sur www.preanalytix.com et sur www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès du service technique de PreAnalytiX.

Historique des révisions du manuel

| Document et révision | Modifications | Date |
|----------------------|--|--------------|
| HB-0101-004, R2 | Modifications pour la mise en conformité avec les dispositions du SGH dans l'ensemble de ce document | Juin 2015 |
| HB-0101-005, R3 | Nouvelle maquette ; révisions du protocole automatisé et des données sur les performances ; réactualisation des informations de sécurité pour la mise en conformité avec les dispositions du SGH ; modifications des détails de l'appareil et de la déclaration sur les limites d'utilisation du produit | Février 2019 |
| HB-0101-006, R3 | Correction du nom du kit dans le tableau de contenu du kit p. 5. | Janvier 2020 |

PreAnalytiX Worldwide

Les produits PreAnalytiX sont commercialisés par QIAGEN et BD

Australia • Orders 03 9840 9800 • Fax 03 9840 9888 • Technical 1 800 243 066
Austria • Orders 0800 28 10 10 • Fax 0800 28 10 19 • Technical 0800 28 10 11
Belgium • Orders 0800 79612 • Fax 0800 79611 • Technical 0800 79556
Brazil • Orders 0800 557779 • Fax 55 11 5079 4001 • Technical 0800 557779
Canada • Orders 800 572 9613 • Fax 800 713 5951 • Technical 800 DNA-PREP (800 362 7737)
China • Orders 0086 21 3865 3865 • Fax 0086 21 3865 3965 • Technical 800 988 0325, 800 988 0327
Denmark • Orders 80 885945 • Fax 80 885944 • Technical 80 885942
Finland • Orders 0800 914416 • Fax 0800 914415 • Technical 0800 914413
France • Orders 01 60 920 926 • Fax 01 60 920 925 • Technical 01 60 920 930 • Offers 01 60 920 928
Germany • Orders 02103 29 12000 • Fax 02103 29 22000 • Technical 02103 29 12400
Hong Kong • Orders 800 933 965 • Fax 800 930 439 • Technical 800 930 425
Ireland • Orders 1800 555 049 • Fax 1800 555 048 • Technical 1800 555 061
Italy • Orders 02 33430411 • Fax 02 33430426 • Technical 800 787980
Japan • Telephone 03 5547 0811 • Fax 03 5547 0818 • Technical 03 5547 0811
Korea (South) • Orders 1544 7145 • Fax 1544 7146 • Technical 1544 7145
Luxembourg • Orders 8002 2076 • Fax 8002 2073 • Technical 8002 2067
Mexico • Orders 01 800 7742 639 • Fax 01 800 1122 330 • Technical 01 800 7742 639
The Netherlands • Orders 0800 0229592 • Fax 0800 0229593 • Technical 8000 0229602
Norway • Orders 800 18859 • Fax 800 18817 • Technical 800 18712
Singapore • Orders 65 67775366 • Fax 65 67785177 • Technical 65 67775366
Spain • Orders 91 630 7050 • Fax 91 630 5145 • Technical 91 630 7050
Sweden • Orders 020 790282 • Fax 020 790582 • Technical 020 798328
Switzerland • Orders 055 254 22 11 • Fax 055 254 22 13 • Technical 055 254 22 12
UK • Orders 01293 422 911 • Fax 01293 422 922 • Technical 01293 422 999
USA • Orders 800 426 8157 • Fax 800 718 2056 • Technical 800 DNA-PREP (800 362 7737)

www.qiagen.com www.PreAnalytiX.com

Argentina, Uruguay and Paraguay • Orders 0800 444 5523
Australia • Orders 1 800 656 100 • Fax 1 800 656 110
Austria • Orders 43 1 7063660 • Fax 43 1 706366011
Belgium • Orders 32 53720556 • Fax 32 53720549
Brazil • Orders 0800 55 5654
Canada • Orders 800 268 5430 • Fax 800 565 0897
Denmark • Orders 45 43 43 45 66 • Fax 45 43 96 56 76
East Europe, Middle East & Africa (EMA) • Orders 971 4 3379525 • Fax: 971 4 03379551
Finland • Orders 358 9 88 70 780 • Fax 358 9 88 70 7816
France • Orders 33 4 76 68 36 36
Germany • Orders 49 6221 3050 • Fax 49 6221 305216
Italy • Orders 39 2 48240 500 • Fax 39 2 48240 344
The Netherlands • Orders 31 20 582 9420 • Fax 31 20 582 9421
New Zealand • Orders 0800 572 468 • Fax 0800 572 469
Spain • Orders 34 91 848 8104 • Fax 34 91 848 8115
Sweden • Orders 46 8 775 51 00 • Fax 46 8 645 08 08
Switzerland • Orders 41 61 4852224 • Fax 41 61 4852200
UK • Orders 0800 917 8776
USA • Orders 888 237 2762 • Fax 800 847 2220 • Technical 800 631 0174

www.bd.com www.PreAnalytiX.com

