

Février 2017

Fiche de protocole du QIAasympphony® SP

circDNA_2000_DSP_V1 et
circDNA_4000_DSP_V1

Le présent document constitue la fiche des protocoles QIAasympphony circDNA_2000_DSP_V1 et circDNA_4000_DSP_V1 version 1, R1

Informations générales

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Ce protocole s'applique à la purification de l'ADN libre circulant humain réalisée à partir d'urine et de plasma humains frais ou congelés avec QIAasymphony SP et le kit QIAasymphony DSP Circulating DNA.

Kit	QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (kit QIAasymphony DSP Circulating DNA) (référence 937556)
Matériel de prélèvement	Plasma humain : avec traitement anticoagulant à l'EDTA ou au citrate, ou stabilisation pour l'ADNlc Urine humaine : non stabilisée ou stabilisée
Nom de protocole	circDNA_2000_DSP_V1 circDNA_4000_DSP_V1
Jeu de contrôles d'analyse par défaut	ACS_circDNA_2000_DSP_V1 ACS_circDNA_4000_DSP_V1
Volume d'élution	60 µl
Version logicielle requise	Version 4.0.3 ou supérieure

Tiroir à échantillons « Sample »

Type d'échantillon	Plasma humain (voir « Préparation du matériel de prélèvement ») et urine humaine (stabilisée ou non)
Volume d'échantillon	Dépend du type de tube utilisé pour l'échantillon. Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Resource (Ressources), sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com .
Tubes d'échantillon primaires	n/a
Tubes d'échantillon secondaires	Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com .
Inserts	n/a
Autre	La protéinase K doit être ajoutée dans la fente A (positions 1 et/ou 2)

n/a = non applicable.

Préparation de la protéinase K dans le tiroir à échantillons « Sample »

Le kit QIAasymphony DSP Circulating DNA contient une solution de protéinase K prête à l'emploi qui peut être conservée à température ambiante.

Remarque : Les tubes contenant la protéinase K sont placés dans un porte-tubes. Le(s) tube(s) contenant la protéinase K doi(ven)t être placé(s) en positions 1 et/ou 2 dans la fente A du tiroir à échantillons « Sample ». Pour connaître le type de tube requis, voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com.

Nombre d'échantillons*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11.660 ml†
96	11,660 ml	22.220 ml†

* Pour chaque échantillon, les volumes requis sont de 110 µl pour le protocole circDNA_2000_DSP et de 220 µl pour le protocole circDNA_4000_DSP, plus un volume mort supplémentaire de 1.100 µl [(n x 110 ou 220 µl) + 1.100 µl].

† Pour le protocole circDNA_4000_DSP : si plus de 48 échantillons sont traités, utiliser un second tube. Le volume de chargement maximal par tube est de 11.660 µl. Dans le second tube, un volume mort supplémentaire de 1.100 µl est requis.

Tiroir à réactifs et consommables « Reagents and Consumables »

Position A1 et/ou A2	Cartouche de réactifs
Position B1	n/a
Supports de cônes 1–18	Cônes munis de filtres jetables, 200 µl ou 1.500 µl
Supports de boîte 1–4	Boîtes d'unités contenant des cartouches de préparation d'échantillons ou des manchons pour 8 barreaux

n/a = non applicable.

Tiroir « Waste » (Poubelle)

Supports de boîte 1–4	Boîtes d'unités vides
Support pour sac poubelle	Sac poubelle
Support pour flacon à déchets liquides	Flacon à déchets liquides vide

Tiroir « Eluate » (Éluat)

Portoir d'éluat (il est recommandé d'utiliser la fente 1, position de refroidissement)	Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com .
---	---

Matériel en plastique requis

Protocole circDNA_2000_DSP

Matériel en plastique	Un lot 24 échantillons*	Deux lots 48 échantillons*	Quatre lots 96 échantillons*
Cônes munis de filtres jetables, 200 µl^{†‡}	24	48	96
Cônes munis de filtres jetables, 1500 µl^{†‡}	64	120	232
Cartouches de préparation d'échantillons[§]	15	30	60
Manchons pour 8 barreaux[¶]	3	6	12

* L'utilisation de moins de 24 échantillons par lot réduit le nombre requis de cônes munis de filtres jetables par cycle.

[†] Il y a 32 cônes munis de filtres par portoir.

[‡] Le nombre requis de cônes munis de filtres correspond à 1 inventaire par cartouche de réactifs.

[§] Il y a 28 cartouches de préparation des échantillons/boîte.

[¶] Il y a douze manchons pour 8 barreaux/boîte.

Protocole circDNA_4000_DSP

Matériel en plastique	Un lot 24 échantillons*	Deux lots 48 échantillons*	Quatre lots 96 échantillons*
Cônes munis de filtres jetables, 200 µl ^{†‡}	24	48	96
Cônes munis de filtres jetables, 1500 µl ^{†‡}	104	200	392
Cartouches de préparation d'échantillons [§]	18	36	72
Manchons pour 8 barreaux [¶]	3	6	12

* L'utilisation de moins de 24 échantillons par lot réduit le nombre requis de cônes munis de filtres jetables par cycle.

† Il y a 32 cônes munis de filtres par portoir.

‡ Le nombre requis de cônes munis de filtres correspond à 1 inventaire par cartouche de réactifs.

§ Il y a 28 cartouches de préparation des échantillons/boîte.

¶ Il y a douze manchons pour 8 barreaux/boîte.

Remarque : Les nombres indiqués de cônes munis de filtres peuvent être différents des nombres affichés sur l'écran tactile en fonction des paramètres. Il est recommandé de charger le nombre maximal de cônes possible.

Volume d'élution

Volume d'élution choisi	Volume d'élution initial
60 µl	75 µl

Le volume d'élution est sélectionné sur l'écran tactile. Le volume d'élution disponible moyen est ≥ 60 µl. Dans des cas particuliers, le volume d'éluat final pour des échantillons uniques peut atteindre jusqu'à 5 µl de moins que le volume sélectionné (par ex., 55 µl). Il est recommandé de vérifier le volume d'éluat réel lors de l'utilisation d'un système de préparation automatisée des analyses, qui ne vérifie pas le volume d'éluat avant le transfert.

Stockage des éluats

Il est recommandé de retirer la plaque d'éluats du tiroir à éluats « Eluate » dès la fin du cycle. Les plaques d'élution peuvent être laissées dans le QIA Symphony SP après la fin du cycle, si celui-ci se termine au cours de la nuit (16 heures au maximum, durée du cycle comprise ; conditions environnementales recommandées :

18–26 °C et 20–75 % d'humidité relative). Selon la température et le degré d'humidité, l'éluat peut subir une condensation ou une évaporation.

Après la préparation de l'échantillon, les éluats peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant 1 mois maximum. Pour un stockage de longue durée, placer les éluats à –20 °C ou à –80 °C. Les éluats congelés ne doivent pas être dégelés plus de 3 fois.

Préparation du matériel de prélèvement

En cas de 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.

Remarques importantes avant de commencer

- Éviter la formation de mousse dans ou sur les échantillons.
- Amener tous les échantillons à température ambiante (15–25 °C) avant de lancer le cycle.

Plasma humain

Les échantillons de sang traités avec de l'EDTA ou du citrate comme anticoagulant peuvent être utilisés pour la préparation de plasma. Du plasma préparé à partir de tubes de prélèvement de sang stabilisé pour l'ADNlc peut également être utilisé. Le plasma est obtenu conformément aux spécifications du fabricant.

Il est recommandé de procéder à la séparation du plasma immédiatement après le don de sang lorsque de l'EDTA ou du citrate est utilisé comme anticoagulant.

Pour certaines applications en aval, il peut être nécessaire d'exclure ou de minimiser la présence d'acides nucléiques dans les vésicules. Dans ce cas, il est recommandé de réaliser une étape de centrifugation haute vitesse à 16.000 x g pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) après la génération initiale du plasma.

Après prélèvement et centrifugation, le plasma peut être conservé à température ambiante pendant 7 jours maximum et à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 14 jours maximum. Pour une conservation de plus longue durée, il est recommandé de congeler les aliquotes à –20 °C ou –80 °C. Le plasma congelé ne doit pas être dégelé plus de 3 fois. Un processus de congélation/décongélation répété entraîne la dénaturation et la précipitation des protéines, ce qui peut réduire le rendement en acides nucléiques libres circulants. Si des cryoprécipités sont visibles dans les échantillons, centrifuger à 6.800 x g pendant 3 minutes à température ambiante (15–

25 °C), puis transférer les surnageants dans un tube d'échantillon secondaire sans remuer les culots (voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com). Commencer la procédure de purification immédiatement.

Urine humaine

En raison de la dégradation rapide de l'ADN libre circulant après le recueil des urines, il est fortement recommandé de stabiliser ces échantillons immédiatement.

Urine humaine stabilisée

L'urine stabilisée peut être stockée à température ambiante (15–25 °C) ou à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 7 jours maximum. Pour une conservation de plus longue durée, il est recommandé de congeler les aliquotes à –20 °C ou –80 °C.

Les échantillons d'urine stabilisée ne nécessitent aucun traitement préalable. Après stabilisation, il est recommandé de centrifuger les échantillons d'urine à faible vitesse (1.900 x g) pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) pour éliminer les cellules avant l'extraction de l'ADN libre circulant. Si des précipités sont visibles dans les surnageants après centrifugation, chauffer les échantillons jusqu'à 25 °C au bain-marie afin de dissoudre les précipités. Avant de lancer un cycle, transférer les échantillons d'urine stabilisée dans un tube d'échantillon secondaire, puis charger ce tube sur le porte-échantillons (voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com).

Urine humaine « non stabilisée »

Avant de commencer un protocole utilisant le tampon ATL, vérifier l'absence de précipité dans le tampon. Si nécessaire, le dissoudre par un chauffage à 70 °C au bain-marie sous agitation modérée. Aspirer les bulles formées à la surface du tampon ATL.

Remarque : Le tampon ATL (Buffer ATL, 4 x 50 ml, référence 939016) n'est pas inclus dans le kit QIASymphony DSP Circulating DNA et doit être commandé séparément.

Il est recommandé de centrifuger les échantillons d'urine immédiatement après leur recueil, à faible vitesse (1.900 x g) pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) pour éliminer les cellules. Les échantillons d'urine non stabilisée nécessitent un traitement préalable.

Important : Amener les échantillons à température ambiante (15–25 °C) avant de commencer l'étape de prétraitement.

Important : La centrifugation et le prétraitement doivent être réalisés dans les 4 heures suivant le recueil de l'échantillon d'urine.

- Mélanger 2.500 µl d'urine (circDNA_2000_DSP) ou 4.500 µl d'urine (circDNA_4000_DSP) avec 250 µl ou 450 µl de tampon ATL, respectivement.
- Incuber les échantillons à température ambiante (15–25 °C) pendant 1 heure.
- Centrifuger les échantillons à 1.900 x g pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C).

Si des précipités sont visibles dans le surnageant après centrifugation, chauffer les échantillons jusqu'à 25 °C au bain-marie afin de dissoudre les précipités.

- Transférer les surnageants dans un tube d'échantillon secondaire, puis charger ce tube sur le porte-échantillons (voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com).

Important : La stabilité et l'intégrité de l'ADN libre circulant sont restreintes dans l'urine non stabilisée. Il est recommandé de charger au maximum un lot de 24 échantillons par cycle QIAAsymphony pour minimiser la durée de présence des échantillons d'urine sur l'appareil.

Substances interférentes

Les échantillons de plasma fortement concentrés en gammaglobuline (> 30 g/l) peuvent nuire à la récupération de l'ADN libre circulant.

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques des produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN approprié. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des QIAGEN Technical Services ou du distributeur local.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAAsymphony® (groupe QIAGEN). Les noms déposés, les marques de commerce, etc., cités dans le présent document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.
02/2017 HB-2309-S01-001
© 2017 QIAGEN, tous droits réservés.

