

Mode d'emploi de QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit (Manuel)



50

Version 2



Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro
Pour une utilisation avec QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



Numéro de référence



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE



1130780FRCA

Table des matières

Utilisation prévue.....	4
Utilisateur prévu	4
Description et principe	5
Résumé et explication	5
Principe de la procédure	5
Matériel fourni.....	7
Contenu de la trousse	7
Composants de la trousse.....	8
Matériel nécessaire, mais non fourni	9
Réactifs supplémentaires.....	9
Consommables	9
Équipement.....	9
Avertissements et précautions	10
Informations sur la sécurité	10
Informations d'urgence.....	11
Précautions	11
Élimination	12
Conservation et manipulation des réactifs	13
Stabilité pendant l'utilisation	13
Conservation et manipulation des échantillons	14
Procédure	15
Protocole : Isolation de l'ADN génomique de sections de tissu FFPE.....	21

Contrôle de la qualité	25
Limitations.....	26
Caractéristiques de performances.....	27
Guide de dépannage.....	28
Symboles.....	30
Annexe : Manipulation.....	33
Pour commander	34
Historique des révisions du document.....	35

Utilisation prévue

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit est un système utilisant une technologie de membrane à base de silice (technologie QIAamp) pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques fixés dans le formaldéhyde et enrobés dans la paraffine (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).

Il est destiné pour la préparation manuelle des échantillons et ne produit aucun résultat de test qualitatif ou quantitatif.

Utilisateur prévu

Seuls des professionnels tels que des techniciens et des médecins dûment formés aux techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic in vitro (DIV) sont habilités à utiliser ce produit.

Description et principe

Résumé et explication

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit est utilisée pour la purification de l'ADN de sections de tissu FFPE. Elle utilise la microtechnologie QIAamp DNA bien établie pour la purification de l'ADN génomique et mitochondrial à partir d'échantillons de petits volumes ou de petites tailles. La trousse combine les propriétés de liaison sélective d'une membrane à base de silice avec des volumes d'élution flexibles.

Les conditions de lyse permettent à l'ADN génomique d'être purifié efficacement à partir de sections de tissu FFPE sans incubation pendant une nuit. Après la digestion à la protéinase K, l'incubation à une température élevée élimine partiellement la réticulation de l'ADN libéré par le formaldéhyde, ce qui améliore possiblement le rendement, ainsi que les performances de l'ADN dans les essais effectués en aval. Notez que l'ADN isolé à partir d'échantillons FFPE possède habituellement un poids moléculaire inférieur à celui de l'ADN provenant d'échantillons frais ou congelés. Le degré de fragmentation dépend du type et de l'âge de l'échantillon, ainsi que des conditions utilisées pour la fixation.

Après la lyse de l'échantillon, la procédure simple de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit permet le traitement simultané de plusieurs échantillons.

Il incombe à l'utilisateur de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire et non couvertes par les études de la performance QIAGEN® décrites dans ce manuel.

Principe de la procédure

La procédure pour QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit comprend 6 étapes (Figure 1) :

- Élimination de la paraffine : La paraffine est dissoute dans le xylène, puis éliminée.
- Lyse : Les échantillons sont lysés à 56 °C dans des conditions dénaturantes avec la protéinase K.

- Chauffage : Incubation at 90 °C pour éliminer la réticulation par le formaldéhyde.
- Liaison : L'ADN se lie à la membrane alors que les contaminants passent à travers la membrane.
- Lavage : Le reste des contaminants est éliminé par lavage.
- Éluion : L'ADN pure et concentré est élué de la membrane.

Procédure pour QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

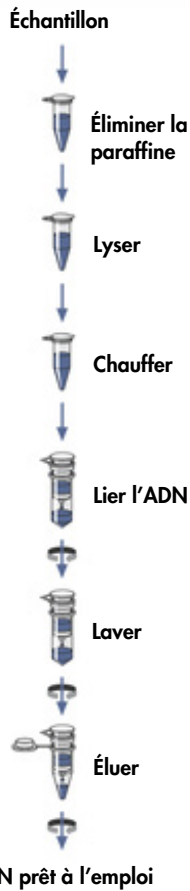



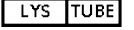


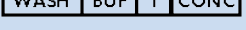






Figure 1. Procédure de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Matériel fourni

Contenu de la trousse

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	(50)
N° de référence	60404
Nombre de préparations	50

	Nom	Symboles	Quantité
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Colonnes QIAamp MinElute avec tubes de lavage)		50
WT	Wash Tubes (Tubes de lavage) (2 ml)		3 x 50
ET	Elution Tubes (Tubes d'élution) (1,5 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Tubes de lyse) (2 ml)		50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Tampon de lyse tissulaire)		10 ml
AL	Lysis Buffer (Tampon de lyse)*		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Tampon de lavage 1)* (concentré)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Tampon de lavage 2)† (concentré)		13 ml
ATE	Elution Buffer (Tampon d'élution)†		12 ml
PK	Protéinase K		1,25 ml
–	Mode d'emploi (Manuel)		1

* Contient un sel de guanidine. Non compatible avec les désinfectants contenant un javellisant. Voir la page 10 pour Avertissements et précautions.

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

Composants de la trousse

Les principaux composants de la trousse sont décrits ci-dessous.

Tableau 1. Ingrédients actifs dans les réactifs fournis

Réactif		Ingrédient(s) actif(s)	Concentration (p/p) [%]
Symbole	Nom		
ATL	Buffer ATL	Sodium dodécyl sulfate	≥ 1 à < 10
AL	Buffer AL	Chlorhydrate de guanidine Acide maléique	> 30 à < 50 ≥ 0,1 à < 1
AW1	Buffer AW1	Chlorhydrate de guanidine Éthanol	≥ 50 à < 70 ≥ 10 à < 90
AW2	Buffer AW2	Éthanol	≥ 10 à < 90
ATE	Buffer ATE	Aucun	-
PK	Proteinase K (Protéinase K)	Protéinase K	≥ 1 à < 10

Afin de limiter les risques d'impact négatif sur les résultats diagnostiques obtenus après l'isolation de l'ADN, des contrôles appropriés doivent être utilisés pour les applications en aval.

Matériel nécessaire, mais non fourni

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire approprié, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour obtenir plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Réactifs supplémentaires

- Xylène
- Éthanol (96–100 %) *

Consommables

- Si la décision est prise de ne pas utiliser les tubes fournis dans la trousse, nous recommandons des tubes de microcentrifugation de 1,5 ou 2 ml (pour les étapes de la lyse) et des tubes de microcentrifugation de 1,5 ml (pour les étapes de l'élution) (p. ex., vendus par Sarstedt®, n° de réf. 72.690). Nous recommandons des tubes de forme conique exempts de DNase/RNase avec des bouchons sécurisés. Il incombe à l'utilisateur de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire et non couvertes par les études de la performance QIAGEN.
- Pipettes et pointes de pipette (pour prévenir toute contamination croisée, nous recommandons fortement l'utilisation de pointes de pipette équipées d'un dispositif anti-aérosol)

Équipement†

- Thermomixeur‡, incubateur orbital chauffé, bloc chauffant ou bain-marie pour une incubation à 56 °C, 70 °C et 90 °C
- Microcentrifugeuse† avec rotor pour tubes de 2 ml
- Mélangeur vortex

* N'utilisez pas de l'alcool dénaturé, car il contient d'autres substances telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

† Avant leur utilisation, assurez-vous que les instruments ont bien été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

‡ Pour garantir le bon traitement des échantillons dans les procédures QIAamp DSP DNA FFPE, nous recommandons fortement que les instruments soient étalonnés conformément aux recommandations de leurs fabricants.

Avertissements et précautions

Conformément à la gestion des risques de QIAGEN, toutes les mesures de contrôle des risques prévues ont été mises en œuvre dans la conception du produit. Le risque global résiduel est jugé acceptable et l'utilisation de l'instrument est jugée sécuritaire. Ce manuel contient des instructions, des avertissements et des précautions pour assurer la sécurité et les performances de l'instrument. Ils doivent être strictement suivis.

Sachez que vous pourriez être tenu de consulter votre réglementation locale pour signaler les incidents graves survenus en lien avec le dispositif au fabricant et/ou à son représentant autorisé et à l'autorité réglementaire de la région de l'utilisateur et/ou du patient.

Informations sur la sécurité

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire approprié, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour obtenir plus d'informations, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne en format PDF pratique et compact sur www.qiagen.com/safety, où vous pouvez les trouver, les afficher et les imprimer pour chaque trousse et composant de trousse QIAGEN.

MISE EN GARDE N'AJOUTEZ PAS de javellisant ni de solutions acides directement dans les déchets de préparation des échantillons.



- Le Buffer AL et le Buffer AW1 contiennent du chlorhydrate de guanidine, qui est susceptible de former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec un javellisant.
- Si du liquide contenant ces tampons est renversé, nettoyez avec un détergent de laboratoire approprié et de l'eau. Si vous renversez un liquide contenant des agents potentiellement infectieux, nettoyez d'abord la zone avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (V/V).

- Les échantillons sont potentiellement infectieux. Mettez au rebut les échantillons et les autres déchets produits par les dosages conformément aux procédures de sécurité locales.

Informations d'urgence

CHEMTREC

États-Unis et Canada 1-800-424-9300

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

Précautions

Buffer AL



Contient : chlorhydrate de guanidine et acide maléique. Avertissement! Peut être nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Peut provoquer une réaction allergique cutanée. Si l'irritation des yeux persiste : Demander un avis médical/consulter un médecin. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Retirer les vêtements contaminés et les laver avant leur réutilisation. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment avec de l'eau et du savon. En cas d'irritation de la peau : Demander un avis médical/consulter un médecin. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection.

Buffer ATL



Avertissement! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation de la peau : Demander un avis médical/consulter un médecin.

Buffer AW1



Contient : chlorhydrate de guanidine. Avertissement! Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. Éliminer le contenu/récipient dans un centre de traitement des déchets agréé. Retirer les vêtements contaminés et les laver avant leur réutilisation. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection.

Proteinase K



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

Élimination

Les déchets contiennent des échantillons et des réactifs. Ces déchets peuvent contenir des matières toxiques ou infectieuses, et ils doivent être mis au rebut correctement. Consultez les règles de sécurité locales en matière de mise au rebut.

Pour obtenir plus d'informations, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne en format PDF sur www.qiagen.com/safety, où vous pouvez les trouver, les afficher et les imprimer pour chaque trousse et composant de trousse QIAGEN.

Conservation et manipulation des réactifs

Les colonnes QIAamp MinElute doivent être conservées à une température de 2–8 °C dès leur réception et peuvent être utilisés jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte de la trousse.

Tous les tampons peuvent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte de la trousse, si les flacons ne sont pas ouverts.

Stabilité pendant l'utilisation

Le Buffer AW1 et le Buffer AW2 reconstitués peuvent être conservés à température ambiante (15–25 °C) pendant un (1) an ou jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte de la trousse, selon la période la plus courte.

Conservation et manipulation des échantillons

Le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit a été conçu pour être utilisé avec des échantillons FFPE.

La stabilité de l'ADN dépend de divers facteurs tels que la collecte, la manipulation, la préparation et les conditions de stockage des échantillons, qui peuvent avoir une incidence sur son utilisation dans l'application en aval. Il est important de consulter le mode d'emploi de l'application spécifique en aval et/ou de vérifier et de valider l'ensemble de la procédure pour établir des conditions appropriées.

Pour des informations générales sur les procédures de laboratoire pour la collecte, la manipulation, la préparation et les conditions de stockage des échantillons FFPE, veuillez vous référer à la norme ISO 20166-3:2018 « Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) — Partie 3 : ADN extrait » et au document du CLSI MM13-A « Collecte, transport, préparation et stockage des échantillons pour les méthodes moléculaires; ligne directrice approuvée ».

L'ADN est élué dans le Buffer ATE, puis il peut être utilisé immédiatement dans les réactions d'amplification ou conservé (les conditions dépendent des exigences de l'utilisateur). Consultez les manuels de trousse correspondants pour connaître les conditions de conservation recommandées pour les applications en aval spécifiques de QIAGEN.

Procédure

Remarques importantes avant de commencer

- Les réactifs fournis dans QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit doivent être utilisés uniquement avec les autres réactifs de la même trousse. Aucun des réactifs de la trousse ne doit être remplacé pour assurer une performance optimale.
- Après avoir reçu la trousse, vérifiez que ses composants ne sont pas endommagés. Si les emballages ou les flacons de tampon sont endommagés, contactez les services techniques QIAGEN ou votre distributeur local. En cas de renversement de liquide, consultez la section « Avertissements et précautions », page 10. N'utilisez pas des composants endommagés, car cela pourrait réduire la performance de la trousse.
- N'utilisez pas les composants d'autres trousse avec la trousse que vous êtes en train d'utiliser, sauf si les numéros de lot sont identiques.
- Évitez toute contamination microbienne des réactifs de la trousse.
- Cette trousse doit être utilisée uniquement par du personnel formé aux pratiques de laboratoire de diagnostic in vitro.
- Portez toujours des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation des réactifs et des échantillons afin d'empêcher leur contamination par la surface de la peau ou du matériel de laboratoire poussiéreux. Les mains et les particules de poussières peuvent transporter des bactéries et des moisissures. Ce sont les sources de contamination les plus courantes. Changez fréquemment de gants et gardez les tubes bien fermés.
- Les tampons non utilisés, la solution ayant traversé la colonne et les restes des échantillons doivent être éliminés conformément aux procédures locales.
- Si vous utilisez votre propre matériel en plastique, il est recommandé d'utiliser des tubes coniques en polypropylène jetables, à faible liaison et exempts de DNase/RNase de 1,5–2 ml avec des bouchons sécurisés tout au long de la procédure de purification.
- Effectuez toutes les étapes de centrifugation à température ambiante (15–25 °C).
- Tous les tampons doivent être conservés à température ambiante (15–25 °C) et bien mélangés avant leur utilisation.

- Réglez un thermomixeur ou un incubateur orbital chauffé à 56 °C pour son utilisation à l'étape 9. Si un thermomixeur ou un incubateur orbital chauffé n'est pas disponible, un bloc chauffant ou un bain-marie peut être utilisé à sa place.
- Si le Buffer AL ou le Buffer ATL contient un précipité, dissolvez ce précipité en le chauffant à 70 °C et en l'agitant délicatement.
- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions ci-dessous.
- Les procédures de contrôle de la qualité QIAGEN comportent un test fonctionnel pour chaque lot de trousse. Par conséquent, il convient de ne pas mélanger les réactifs issus de différents lots de trousse et de ne pas combiner les réactifs issus de différents lots de réactifs.

Préparation des tampons

Préparation du Buffer ATL

- Avant de commencer la procédure, vérifiez si un précipité s'est formé dans le Buffer ATL. Le cas échéant, dissolvez le précipité en le chauffant à 70 °C et en l'agitant délicatement.

Préparation du Buffer AL

- Avant de commencer la procédure, vérifiez si un précipité s'est formé dans le Buffer AL. Le cas échéant, dissolvez le précipité en le chauffant à 70 °C et en l'agitant délicatement.

Préparation du Buffer AW1

- Ajoutez 25 ml d'éthanol (96–100 %)* au flacon contenant 19 ml de Buffer AW1 concentré. Cochez la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. Le Buffer AW1 reconstitué peut être conservé à température ambiante (15–25 °C) pendant un an ou jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte de la trousse, selon la période la plus courte. Nous vous recommandons d'inscrire la date de reconstitution sur l'étiquette du flacon de tampon.

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

Préparation du Buffer AW2

- Ajoutez 30 ml d'éthanol (96–100 %)* au flacon contenant 13 ml de Buffer AW2 concentré. Cochez la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. Le Buffer AW2 reconstitué peut être conservé à température ambiante (15–25 °C) pendant un an ou jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte de la trousse, selon la période la plus courte. Nous vous recommandons d'inscrire la date de reconstitution sur l'étiquette du flacon de tampon.

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

Matériel de départ

Le matériel de départ pour la purification de l'ADN comprend des sections de tissu FFPE (idéalement fraîchement coupées). Plusieurs sections peuvent être combinées dans une (1) préparation. Si vous n'avez aucune information sur la nature de votre matériel de départ, nous vous recommandons de commencer avec 3 sections par préparation au maximum.

L'utilisateur doit optimiser le nombre de sections, l'épaisseur des sections et la surface des sections pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire. Si la trousse est utilisée avec une application en aval de QIAGEN, consultez le manuel correspondant pour obtenir les instructions.

* N'utilisez pas de l'alcool dénaturé, car il contient d'autres substances telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

Procédure de manipulation pour éviter les contaminations croisées

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

- Ne remplissez pas trop les tubes de tissu.
- Changez les scalpels entre les échantillons lors du grattage des tissus.
- Appliquez avec précaution l'échantillon ou la solution sur la colonne QIAamp MinElute. Pipettez l'échantillon dans la colonne QIAamp MinElute sans en mouiller le bord.
- Changez systématiquement les pointes de pipette entre chaque transfert de liquides. Nous recommandons l'utilisation de pointes de pipette équipées d'un dispositif anti-aérosol.
- Utilisez toujours de nouveaux tubes de lavage lorsque vous effectuez les étapes de lavage des échantillons.
- Assurez-vous que les bouchons des tubes sont fermés solidement avant le mélange au vortex et la centrifugation.
- Assurez-vous que la colonne QIAamp MinElute est fermée solidement avant la centrifugation.
- Après toutes les étapes de vortex par petites impulsions et les étapes d'incubation à 90 °C, centrifugez les tubes de microcentrifugation par petites impulsions afin de retirer les gouttes présentes à l'intérieur des bouchons.
- Ouvrez une (1) seule colonne QIAamp MinElute à la fois et prenez soin d'éviter de générer des aérosols.
- Changez toujours de scalpel entre les échantillons.
- Changez systématiquement les pointes de pipette entre chaque transfert de liquides. Afin de minimiser tout risque de contamination croisée, nous conseillons fortement l'utilisation de pointes de pipette équipées d'un dispositif anti-aérosol et d'éviter l'utilisation de pipettes pour usage répétitif.
- Utilisez toujours des gants jetables et vérifiez régulièrement qu'ils ne sont pas contaminés par du matériel de l'échantillon. Jetez les gants si vous soupçonnez qu'ils sont devenus contaminés.
- Ouvrez un (1) seul tube à la fois.

Centrifugation

Les colonnes QIAamp MinElute s'adaptent à la plupart des tubes de microcentrifugation standard de 1,5–2 ml. La centrifugation des colonnes QIAamp MinElute est effectuée à environ 6000 x g afin de réduire le bruit de la centrifugeuse. Une centrifugation à vitesse maximale n'affectera pas les rendements en ADN. Cependant, la centrifugation des colonnes QIAamp MinElute à vitesse maximale est nécessaire pour deux (2) étapes de la procédure : l'étape de centrifugation sèche après le lavage des membranes et l'étape de l'élution. Une centrifugation à vitesse maximale est également nécessaire pour faire descendre l'échantillon après le traitement au xylène et le lavage à l'éthanol.

Toutes les étapes de centrifugation doivent être effectuées à température ambiante (15–25 °C). Une centrifugation à basse température peut entraîner une extraction sous-optimale.

Traitement des colonnes QIAamp MinElute dans une microcentrifugeuse

- Fermez toujours les colonnes QIAamp MinElute avant de les placer dans la microcentrifugeuse.
- Évitez de toucher la membrane de la colonne QIAamp MinElute avec la pointe de la pipette.
- Veuillez noter que les fractions ayant traversé la colonne peuvent contenir des déchets dangereux et qu'elles doivent être éliminées de manière appropriée.
- Pour un traitement efficace de plusieurs échantillons en parallèle, nous conseillons de remplir un portoir de tubes de lavage pour y transférer les colonnes QIAamp MinElute après leur centrifugation. Les tubes de lavage utilisés qui contiennent la solution ayant traversé la colonne peuvent être éliminés, et les nouveaux tubes de lavage contenant les colonnes QIAamp MinElute peuvent être placés directement dans la microcentrifugeuse.
- Assurez-vous de maintenir la traçabilité des échantillons tout au long de la procédure.

Élution de l'ADN purifié

Pour les applications en aval qui nécessitent de petits volumes de départ (p. ex. certains dosages de PCR), l'utilisation d'un éluat plus concentré peut augmenter la sensibilité du dosage, mais peut également entraîner une augmentation de la concentration d'inhibiteurs potentiels.

Néanmoins, une augmentation du volume d'élution diminuera la concentration d'ADN dans l'éluat.

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

Il incombe à l'utilisateur d'optimiser le volume d'élution pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire. Consultez les manuels des trousse afin de connaître les volumes d'élution recommandés pour des applications en aval spécifiques de QIAGEN.

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

Protocole : Isolation de l'ADN génomique de sections de tissu FFPE

Procédure

1. À l'aide d'un scalpel, retirez l'excès de paraffine du bloc d'échantillon.
2. Coupez des sections en suivant les pratiques de laboratoire standard (voir « Matériel de départ », page 17). L'utilisateur doit optimiser le nombre de sections, l'épaisseur des sections et la surface des sections pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire. Assurez-vous de maintenir la traçabilité des échantillons tout au long de la procédure.
3. Grattez immédiatement le tissu des sections à l'aide d'un scalpel stérile pour les transférer dans un tube de lyse (fourni). Assurez-vous que tout le tissu disponible est placé dans le tube. Ajoutez 1 ml de xylène à l'échantillon, fermez le bouchon et mélangez vigoureusement au vortex jusqu'à ce que la paraffine soit dissoute (p. ex., 10 secondes). Assurez-vous que le tube est complètement fermé pour éviter un déversement de xylène, une contamination croisée entre les échantillons et un contact possible avec le xylène.
Remarque : Utilisez le xylène dans une hotte à flux d'air laminaire ou toute autre enceinte appropriée.
4. Centrifugez à vitesse maximale pendant environ 2 minutes à température ambiante pour recueillir le culot de tissu. Si aucun culot de tissu n'a été formé, répétez cette étape.
Remarque : Une centrifugation à basse température peut entraîner une extraction sous-optimale.
5. Retirez le surnageant en le pipettant. Conservez le culot.
Le surnageant contient du xylène, qui est un déchet dangereux. Il doit être éliminé de manière appropriée conformément à la réglementation locale.
6. Ajoutez 1 ml d'éthanol (96–100 %) au culot de tissu et mélangez vigoureusement au vortex. L'éthanol extrait le xylène résiduel de l'échantillon et doit être éliminé de manière appropriée.

7. Centrifugez à vitesse maximale pendant environ 2 minutes à température ambiante.

Retirez le surnageant avec soin par pipettage. Ne retirez pas le culot.

Retirez soigneusement l'éthanol résiduel à l'aide d'une pointe de pipette fine. Ouvrez le tube et incubez entre 15–40 °C jusqu'à ce que tout l'éthanol résiduel se soit évaporé.

L'élimination de l'éthanol résiduel est très importante pour la réussite de l'extraction.

Remarque : Une température d'incubation plus basse ralentit l'évaporation, tandis qu'une température plus élevée peut trop assécher le culot, ce qui le rendrait difficile à remettre en suspension.

8. Remettez en suspension le culot dans 180 µl de Buffer ATL. Ajoutez 20 µl de protéinase K et mélangez au vortex.

Remarque : Le culot doit être bien remis en suspension dans le Buffer ATL pour assurer une récupération maximale.

9. Incubez à 56 °C pendant environ 1 heure (jusqu'à ce que l'échantillon ait été complètement lysé).

10. Incubez à 90 °C pendant 1 heure.

L'incubation à 90 °C dans le Buffer ATL inverse partiellement la modification des acides nucléiques par le formaldéhyde. Des périodes d'incubation plus courtes ou des températures d'incubation plus basses peuvent avoir un impact sur la qualité et la quantité d'ADN. Si vous utilisez un (1) seul bloc chauffant, laissez l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C, jusqu'à ce que le bloc chauffant atteigne 90 °C.

11. Centrifugez brièvement le tube pour retirer les gouttes présentes à l'intérieur du bouchon.

12. Ajouter 200 µl de Buffer AL à l'échantillon et mélangez vigoureusement au vortex.

Ensuite, ajoutez 200 µl d'éthanol (96–100 %) et mélangez à nouveau vigoureusement au vortex.

Il est très important que l'échantillon, le Buffer AL et l'éthanol soient bien mélangés immédiatement au vortex ou par pipettage pour produire une solution homogène. Le Buffer AL et l'éthanol peuvent être prémélangés, puis ajoutés en une (1) seule étape, pour gagner du temps lors du traitement de plusieurs échantillons. Un précipité blanc peut se former lors de l'ajout du Buffer AL et de l'éthanol. Ce précipité n'interfère pas avec la procédure QIAamp. Utilisez toujours un mélange frais et jetez-le immédiatement après utilisation.

13. Centrifugez brièvement le tube pour retirer les gouttes présentes à l'intérieur du bouchon.
14. Transférez le lysat entier dans la colonne QIAamp MinElute (dans un tube de lavage de 2 ml) avec précaution sans mouiller le rebord, fermez le couvercle, puis centrifugez à 6 000 x g pendant ≥ 1 minute. Placez la colonne QIAamp MinElute dans un tube de lavage propre de 2 ml (fourni) et jetez le tube de lavage contenant la solution ayant traversé la colonne.

Si le lysat n'a pas complètement traversé la membrane après la centrifugation, centrifugez une nouvelle fois à une vitesse plus élevée jusqu'à ce que la surface de la colonne QIAamp MinElute soit vide.

15. Ouvrez avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajoutez 500 μ l de Buffer AW1 reconstitué sans mouiller le bord. Fermez le couvercle et centrifugez à 6 000 x g pendant ≥ 1 minute. Placez la colonne QIAamp MinElute dans un tube de lavage propre de 2 ml et mettez au rebut le tube de lavage contenant la solution ayant traversé la colonne.
16. Ouvrez avec précaution la colonne QIAamp MinElute et ajoutez 500 μ l de Buffer AW2 reconstitué sans mouiller le bord. Fermez le couvercle et centrifugez à 6000 x g pendant ≥ 1 min. Placez la colonne QIAamp MinElute dans un tube de lavage propre de 2 ml et mettez au rebut le tube de lavage contenant la solution ayant traversé la colonne.

Il faut éviter tout contact entre la colonne QIAamp MinElute et la solution ayant traversé la colonne. Assurez-vous d'équilibrer le rotor de la centrifugeuse. Certains rotors de centrifugation peuvent vibrer pendant la décélération, ce qui entraîne un contact entre la solution ayant traversé la colonne qui contient de l'éthanol et la colonne QIAamp MinElute. Faites attention lorsque vous retirez la colonne QIAamp MinElute et le tube de lavage du rotor, car cela peut également entraîner un contact entre la solution ayant traversé la colonne et la colonne QIAamp MinElute.

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

Le transfert d'éthanol dans l'éluat peut causer des interférences dans les applications en aval.

18. Placez la colonne QIAamp MinElute dans un tube d'élution propre de 1,5 ml (fourni) et jetez le tube de lavage contenant la solution ayant traversé la colonne. Ouvrez avec précaution le couvercle de la colonne QIAamp MinElute et appliquez 20–200 µl de Buffer ATE au centre de la membrane.

Important : Si vous utilisez des petits volumes d'élution (< 50 µl), distribuez le Buffer ATE au centre de la membrane pour assurer une élution complète de l'ADN lié. Les colonnes QIAamp MinElute offrent une flexibilité dans le choix du volume d'élution. Choisissez le volume en fonction des exigences de l'application en aval. Rappelez-vous que le volume récupéré sera d'environ 5 µl inférieur au volume d'élution appliqué sur la colonne.

19. Fermez le bouchon et incubez à température ambiante (15–25 °C) pendant au moins 1 minute. Centrifugez à vitesse maximale (environ 20 000 x g) pendant ≥ 1 minute. L'incubation de la colonne QIAamp MinElute contenant le Buffer ATE pendant environ 5 minutes à température ambiante avant la centrifugation peut augmenter le rendement en ADN.

Contrôle de la qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Limitations

La performance de la trousse a été établie à l'aide de tissus FFPE pour l'isolation de l'ADN génomique.

Une fixation insuffisante ou excessive peut avoir une incidence sur la qualité de l'ADN, ce qui se traduit par des performances médiocres dans les essais effectués en aval.

Le formaldéhyde résiduel peut inhiber l'étape de digestion à la protéinase K; déshydratez soigneusement les échantillons avant l'enrobage.

Il incombe à l'utilisateur de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire et non couvertes par les études de la performance QIAGEN.

Afin de limiter les risques d'impact négatif sur les résultats diagnostiques, des contrôles appropriés doivent être utilisés pour les applications en aval. Pour une validation ultérieure, il est conseillé de suivre les directives de la Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques (ICH) exposées dans *ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology*.

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

En utilisant QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, tout ARN présent dans l'échantillon pourrait être copurifié avec l'ADN.

Caractéristiques de performances

Les caractéristiques de performances applicables se trouvent sous l'onglet Ressources de la page du produit sur www.qiagen.com.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se présenter. Pour obtenir plus d'informations, consultez également la page de la Foire aux Questions (Frequently Asked Questions, FAQ) de notre centre d'assistance technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des services techniques QIAGEN sont toujours ravis de répondre à vos questions concernant les informations et/ou les protocoles mentionnés dans ce manuel ou sur les échantillons et les technologies de dosage (pour connaître les coordonnées, visitez le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Colonnes QIAamp MinElute obstruées

- | | |
|---|--|
| a) Trop de matériel de départ | Réduisez la quantité de matériel de départ. Il est essentiel d'utiliser la bonne quantité de matériel de départ (voir page 17). |
| b) Température de centrifugation trop basse | La température de centrifugation doit être de 15–25 °C. Certaines centrifugeuses peuvent se refroidir à une température inférieure à 15 °C même lorsqu'elles sont réglées à 20 °C. Cela peut provoquer la formation de précipités qui peuvent obstruer les colonnes QIAamp MinElute. Si cela se produit, réglez la température de centrifugation à 15–25 °C. |

Faible rendement en ADN

- | | |
|---|--|
| a) Trop de matériel de départ | La surcharge de la QIAamp MinElute Spin Column réduit considérablement le rendement en acides nucléiques. Réduisez la quantité de matériel de départ (voir page 17). |
| b) L'ADN est toujours lié à la membrane de la RNeasy MinElute Spin Column | Répétez l'élution de l'ADN, mais incubez la colonne de centrifugation QIAamp MinElute sur la pailasse pendant 10 minutes avec du Buffer ATE (tampon d'élution) avant la centrifugation. |
| c) Conservation inappropriée des tampons/réactifs | Les QIAamp MinElute Spin Columns doivent être conservées à une température de 2–8 °C dès la réception de la trousse. Vérifiez la température de conservation recommandée, car une exposition à des températures plus élevées pendant de longues périodes peut entraîner une perte de fonctionnalité. |

Faible valeur A_{260}/A_{280}

- | | |
|--|--|
| Eau utilisée pour diluer les acides nucléiques pour la mesure de A_{260}/A_{280} | Utilisez du Tris-Cl 10 mM à pH 7,5, et non de l'eau, pour diluer l'échantillon avant de mesurer sa pureté. |
|--|--|












Faible performance de l'ADN dans les essais/applications en aval

Transfert d'éthanol

La centrifugation des colonnes QIAamp MinElute à vitesse maximale est nécessaire pour 2 étapes de la procédure : Lors du deuxième lavage avec le Buffer AW2, assurez-vous de centrifuger à $\geq 8\ 000 \times g$ pendant 2 minutes à une température de 15–25 °C pour assécher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp MinElute. Après la centrifugation, retirez soigneusement la colonne du tube de prélèvement, afin que la colonne n'entre pas en contact avec la solution ayant traversé la colonne. Placez ensuite la colonne dans un nouveau tube de prélèvement et centrifugez à pleine vitesse pendant 5 minutes. Une centrifugation à vitesse maximale est également nécessaire pour faire descendre l'échantillon après le traitement au xylène et le lavage à l'éthanol.

Symboles

Les symboles suivants apparaissent dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
 Σ <N>	Contient des volumes suffisants de réactifs pour <N> réactions
	Date limite d'utilisation
	Ce produit répond aux exigences de la réglementation européenne 2017/746 pour les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
	Composants
	Contient
	Nombre
	Code d'article international

Symbole	Définition du symbole
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Limites de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	Tenir à l'abri de la lumière du soleil
	Avertissement/mise en garde
	Protéinase K
	Azoture de sodium
	Dès la réception
	Noter la date du jour de l'ajout d'éthanol au flacon
	Éthanol

Symbole

Définition du symbole

ADD

Ajout

GuHCl

Chlorhydrate de guanidine

MALEIC ACID

Acide maléique

UDI

Identifiant unique du dispositif

Annexe : Manipulation

Manipulation générale

Portez toujours des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation des réactifs et des échantillons afin d'empêcher leur contamination par la surface de la peau ou du matériel de laboratoire poussiéreux. Les mains et les particules de poussières peuvent transporter des bactéries et des moisissures. Ce sont les sources de contamination les plus courantes. Changez fréquemment de gants et gardez les tubes bien fermés. Évitez toute contamination microbienne des réactifs de la trousse.

Matériel en plastique jetable

L'utilisation de tubes en polypropylène stériles et jetables est recommandée tout au long de la procédure.

Pour commander

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

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consultez le mode d’emploi de la trousse QIAGEN correspondante. Les modes d’emploi des trousse de QIAGEN sont disponibles sur www.qiagen.com ou peuvent être demandés aux services techniques QIAGEN ou au distributeur local.

Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, Juin 2022	<ul style="list-style-type: none">● Mise à jour de la trousse version 2 conformément au RDIV● Mise à jour de la Description et principe section● Mise à jour de la Matériel nécessaire, mais non fourni section● Mise à jour de la Avertissements et précautions section● Mise à jour de la Conservation et manipulation des réactifs section● Mise à jour de la Guide de dépannage section● Mise à jour de Annexe
R2, février 2023	<ul style="list-style-type: none">● Mise à jour de la section sur le stockage et la manipulation des échantillons

Contrat de licence limité pour QIAamp DSP DNA Kit

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

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis avec le produit et avec ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce panel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Certains de ces protocoles supplémentaires ont été fournis par des utilisateurs de QIAGEN pour des utilisateurs de QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences expressément énoncées, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou son utilisation ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette toutes les autres licences, explicites ou implicites, autres que celles expressément énoncées.
5. L'acheteur et l'utilisateur du panel s'engagent à ne pas prendre, ou autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter des actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions du présent accord de licence limité par tout tribunal et pourra récupérer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocat, en cas d'action en application du présent accord ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés à la trousse et/ou à ses composants.

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

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

Févr. 2023 HB-3033-002 1130780FRCA © 2023 QIAGEN, tous droits réservés.

Commandez sur www.qiagen.com/shop | Assistance technique support.qiagen.com |
Site Web www.qiagen.com