

Mode d'emploi du QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit (Manuel)



50

Version 2



Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne



1127632FRCA

Table des matières

Utilisation prévue.....	4
Utilisateur prévu	4
Description et principe	5
Volumes d'échantillon	5
Lyse des échantillons.....	7
Adsorption sur la membrane de la colonne QIAamp Mini	7
Élimination des contaminants résiduels.....	7
Élution des acides nucléiques purifiés.....	8
Rendement et taille des acides nucléiques	8
Description des protocoles.....	9
Résumé et explication	9
Matériel fourni.....	10
Contenu de la trousse	10
Composants de la trousse.....	11
Matériel nécessaire, mais non fourni	12
Réactifs supplémentaires.....	12
Consommables	12
Équipement.....	13
Avertissements et précautions	14
Information sur la sécurité.....	14
En cas d'urgence.....	15
Précautions	15

Mise au rebut	16
Conservation et manipulation des réactifs	17
Stabilité d'utilisation	17
Conservation et manipulation des échantillons	18
Procédure	19
Préparation des tampons et des réactifs.....	26
Protocole Breeze : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain.....	29
Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin.....	34
Contrôle de la qualité	39
Limitations.....	39
Caractéristiques de performances.....	40
Références	41
Guide de dépannage.....	42
Symboles.....	45
Annexe A : recommandation pour la séparation et la conservation du plasma sanguin.....	48
Annexe B : remarques générales sur la manipulation d'ARN	50
Pour commander	51
Historique des révisions du document.....	52

Utilisation prévue

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit est un système qui utilise une technologie de membrane à base de silice (technologie QIAamp) pour isoler et purifier manuellement l'ADN et l'ARN libres circulants à partir d'échantillons de plasma sanguin humain.

L'utilisation du QIAamp DSP Circulating NA Kit est réservée au diagnostic in vitro.

Utilisateur prévu

Seuls des professionnels tels que des techniciens et des médecins dûment formés aux techniques de biologie moléculaire sont habilités à utiliser ce produit.

Description et principe

La procédure QIAamp DSP Circulating NA comprend 4 étapes (lyse, liaison, lavage et élution) et elle s'effectue à l'aide de colonnes QIAamp Mini sur le système QIAvac. Cette procédure complète permet de limiter la contamination croisée entre échantillons et accroît la sécurité de l'utilisateur lorsqu'il manipule des échantillons potentiellement infectieux.

La procédure simple est adaptée au traitement simultané de 24 échantillons maximum en moins de 2 heures.

Volumes d'échantillon

Les colonnes QIAamp Mini lient des acides nucléiques fragmentés qui ne font pas plus de 20 nt, mais le rendement dépend du volume d'échantillon et de la concentration des acides nucléiques circulants dans l'échantillon (en général 1 à 100 ng/ml dans le plasma). La procédure QIAamp DSP Circulating NA a été optimisée pour des volumes d'échantillon allant jusqu'à 5 ml.

Procédure avec le
QIAamp DSP Circulating NA Kit

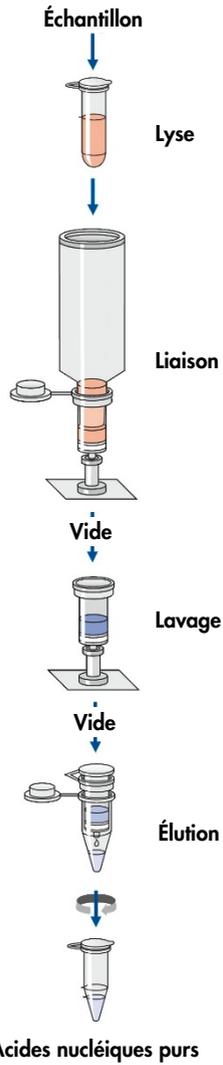


Figure 1. Présentation de la procédure avec le QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Lyse des échantillons

En général, les acides nucléiques libres circulants dans les liquides biologiques sont liés à des protéines ou contenus dans des vésicules, il faut donc une lyse efficace pour les libérer en vue d'une liaison sélective à la colonne QIAamp Mini. Ainsi, les échantillons sont lysés dans des conditions hautement dénaturantes à température élevée en présence de protéinase K et de Buffer ACL, cela garantit l'inactivation des DNases et RNases et la libération des acides nucléiques des protéines, lipides et vésicules liés.

Adsorption sur la membrane de la colonne QIAamp Mini

Pour permettre une liaison optimale des acides nucléiques circulants à la membrane, les conditions de liaison sont favorisées par l'ajout de Buffer ACB au lysat. Les lysats sont ensuite transférés sur une colonne QIAamp Mini, et les acides nucléiques circulants sont absorbés à partir d'un grand volume sur la membrane en silice à mesure que le lysat traverse celle-ci sous l'effet d'une pression négative. Le sel et les conditions d'acidité (pH) garantissent que la plupart des protéines et d'autres contaminants, susceptibles d'inhiber la PCR et d'autres réactions enzymatiques en aval, ne sont pas retenus sur la membrane de la colonne QIAamp Mini.

Un collecteur à vide (p. ex. le QIAvac 24 Plus avec le QIAvac Connecting System) et une pompe à vide capable de produire un vide de ~800 à 900 mbar (p. ex. QIAGEN® Vacuum Pump) sont nécessaires au protocole. Un régulateur de vide (Vacuum Regulator doit être utilisé (il fait partie du QIAvac Connecting System) afin de surveiller efficacement la pression négative et de libérer correctement le vide.

Élimination des contaminants résiduels

Les acides nucléiques demeurent liés à la membrane, tandis que les contaminants sont éliminés efficacement au moyen d'un lavage en 3 étapes.

Élution des acides nucléiques purifiés

L'élution s'effectue avec le Buffer AVE. En une seule étape, les acides nucléiques circulants de très grande pureté sont élués dans le Buffer AVE, équilibré à température ambiante. Un volume d'élution flexible de 50 à 150 µl peut être appliqué. Si des concentrations d'acides nucléiques plus importantes sont nécessaires, vous pouvez réduire le volume d'élution jusqu'à 20 µl. Les volumes d'élution inférieurs à 50 µl donnent des éluats d'acides nucléiques plus concentrés mais peuvent réduire le rendement total.

Le volume d'éluat récupéré peut aller jusqu'à 5 µl de moins que le volume de tampon d'élution appliqué à la colonne.

Rendement et taille des acides nucléiques

Les rendements des acides nucléiques circulants isolés à partir d'échantillons biologiques sont en général inférieurs à 1 µg, ils sont donc difficiles à déterminer à l'aide d'un spectrophotomètre. Le rendement absolu de l'ADN et l'ARN circulants obtenus à partir d'un échantillon à l'aide du QIAamp DSP Circulating NA Kit varie d'un échantillon à l'autre, d'un individu à l'autre et dépend aussi d'autres facteurs (p. ex. comme le stade d'une maladie). En outre, l'ARN vecteur présent dans les acides nucléiques extraits domine bien souvent les valeurs d'absorbance UV (voir page 27). Des méthodes d'amplification quantitative sont recommandées pour la détermination des rendements.

La répartition de taille des acides nucléiques circulants purifiés avec le QIAamp DSP Circulating NA Kit peut être vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose ou par hybridation à une sonde marquée avec cible spécifique (1) ou une solution d'électrophorèse microfluidique (p. ex. Agilent® Bioanalyzer).

Description des protocoles

Deux protocoles différents sont présentés dans le présent manuel.

- Le « Protocole Breeze : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain » (page 29) est destiné au traitement de 5 ml de plasma maximum par paliers de 1 ml, il a été optimisé pour réduire les temps de manipulation et de production.
- Le « Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain » (page 34) est destiné au traitement de 5 ml de plasma maximum par paliers de 1 ml, il est identique au protocole du *Manuel du QIAamp DSP Circulating NA Kit* version 1, révision 3 (R3).

Résumé et explication

Les acides nucléiques libres circulants sont présents dans le plasma humain, généralement sous forme de fragments courts d'une taille < 1 000 pb (ADN) ou < 1 000 nt (ARN) ou d'une taille minimale de 20 nt (micro-ARN). En général, la concentration d'acides nucléiques libres circulants dans le plasma sanguin humain est faible et varie considérablement d'un individu à l'autre, allant de 1 à 100 ng/ml dans les échantillons humains (2–6).

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit permet de purifier efficacement les acides nucléiques circulants à partir du plasma humain. Les échantillons peuvent être frais ou congelés. Les tubes de rallonge et le traitement sous vide du QIAvac 24 Plus permettent d'utiliser des volumes d'échantillon initiaux allant jusqu'à 5 ml, et les volumes d'élution flexibles entre 20 et 150 µl permettent la concentration des types d'acides nucléiques présents en faibles concentrations.

L'ADN ou l'ARN génomique libre circulant élué est prêt à l'emploi dans des applications en aval ou peut être conservé. L'utilisateur doit optimiser la quantité de plasma et le volume d'élution pour sa cible spécifique et ses applications en aval au sein du laboratoire.

Matériel fourni

Contenu de la trousse

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
N° de référence	61504
Nombre de préparations	50

	Identité	Symboles	Quantité
QIAamp Mini	QIAamp Mini Columns with Wash Tubes (Colonnes QIAamp Mini avec tubes de lavage [WT]) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Prolongateurs de colonne) (20 ml)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tubes (Tubes de lavage) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (Tubes d'éluion) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Connecteurs d'aspiration)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer (Tampon de lyse)*	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer (Tampon de liaison)* (concentré)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (Tampon de lavage 1)* (concentré)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (Tampon de lavage 2)† (concentré)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer (Tampon d'éluion)† (bouchons violets)	ELU BUF	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K	PROTK	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (ARN vecteur) (bouchons rouges)	CAR RNA	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini Columns with Wash Tubes (Colonnes QIAamp Mini avec tubes de lavage [WT]) (2 ml)	COL	50
	Manuel	H B	1

* Contient un sel chaotropique. Voir page 14 pour les **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 actif	Concentration
Symbole	Nom		
ACL	Lysis Buffer (Tampon de lyse)	Thiocyanate de guanidine	≥ 30 pour < 50 % p/p
ACB	Binding Buffer (Tampon de liaison) (concentré)	Thiocyanate de guanidine	≥ 30 pour < 50 % p/p
ACW1	Wash Buffer 1 (Tampon de lavage 1) (concentré)	Chlorhydrate de guanidine	≥ 30 pour < 60% p/p
ACW2	Wash Buffer 2 (Tampon de lavage 1) (concentré)	Aucun	–
AVE	Elution Buffer (Tampon d'élution) (bouchons violets)	Aucun	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K	Protéinase K	≥ 1 pour < 3% p/p
Carrier	Carrier RNA (ARN vecteur) (bouchons rouges)	Aucun	–

Contrôles et étalons

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

Matériel nécessaire, mais non fourni

Réactifs supplémentaires

- Éthanol (96 à 100 %) *
- Isopropanol (100 %)
- Glace pilée (uniquement pour le « Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain ».)
- Certains échantillons peuvent nécessiter une dilution au tampon phosphate salin (Phosphate-buffered Saline, PBS)

Consommables

- Pipettes (réglables)
- Pointes de pipette stériles (les pointes de pipette avec dispositifs anti-aérosols sont recommandées pour éviter toute contamination croisée)
- Microtubes sans nucléase de 1,5 ou 2 ml
- Tubes de centrifugation de 50 ml

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

Équipement

- Bain-marie ou bloc chauffant pouvant contenir des tubes de centrifugation de 50 ml à 56 °C ou 60 °C*
- Bloc chauffant ou composant similaire à 56 °C pouvant contenir des tubes de lavage de 2 ml (uniquement pour le protocole classique)*
- Mélangeur vortex
- Microcentrifugeuse (avec rotor pour tubes de 2 ml)*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (n° de réf. 19413)
- QIAvac Connecting System (n° de réf. 19419) ou équivalent
- Vacuum Pump (n° de réf. 84010 [États-Unis ou Canada], 84000 [Japon] ou 84020 [reste du monde]) ou pompe équivalente capable de produire un vide de -800 à -900 mbar
- Facultatif : VacValves (n° de réf. 19408)

* Assurez-vous que les instruments ont bien été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

Avertissements et précautions

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

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Information sur la sécurité

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire adapté, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour obtenir plus de renseignements, consultez 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.

AVERTISSEMENT Risque de blessures corporelles



N'AJOUTEZ PAS d'eau de Javel ni de solutions acides directement dans la préparation des échantillons.

Le Buffer ACL, le Buffer ACB et le Buffer ACW1 contiennent des sels de guanidine, qui sont susceptibles de former des composés très réactifs lorsqu'ils sont combinés avec de l'eau de Javel.

Si du liquide contenant ces tampons est renversé, nettoyez avec un détergent de laboratoire adapté et de l'eau. Si vous renversez un liquide contenant des agents potentiellement infectieux, nettoyez d'abord la zone concernée avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (V/V).

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

En cas d'urgence

CHEMTREC

États-Unis et Canada 1-800-424-9300

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

Précautions

Les indications suivantes de danger et de précaution s'appliquent aux composants du QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Buffer ACB



Contient : thiocyanate de guanidine. Danger ! Nocif en cas d'ingestion. Peut être nocif par contact avec la peau ou par inhalation. Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux. Toxique pour la vie aquatique avec effets à long terme. Le contact avec des acides libère un gaz très toxique. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. 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.

Buffer ACL



Contient : thiocyanate de guanidine. Danger ! Nocif en cas d'ingestion. Peut être nocif par contact avec la peau ou par inhalation. Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux. Toxique pour la vie aquatique avec effets à long terme. Le contact avec des acides libère un gaz très toxique. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. 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.

Buffer ACW1



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

Protéinase K



Contient : protéinase K. Danger ! Provoque une légère irritation cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. Porter un équipement de protection respiratoire. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position confortable pour la respiration. Éliminer le contenu/récipient dans un centre de traitement des déchets agréé.

Mise au rebut

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

Pour obtenir plus de renseignements, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne au 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 Mini doivent être conservées sèches entre 2 et 8 °C. Tous les tampons doivent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C). Les colonnes QIAamp Mini et les tampons peuvent être conservés dans ces conditions jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le carton de la trousse sans que leur performance ne soit compromise.

L'ARN vecteur lyophilisé peut être conservé à température ambiante (15 à 25 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du composant. L'ARN vecteur doit être dissous uniquement dans le Buffer AVE; l'ARN vecteur dissous doit être immédiatement ajouté au Buffer ACL tel que décrit page 30 pour le protocole Breeze et page 35 pour le protocole classique. Cette solution doit être fraîchement préparée. Les quantités inutilisées d'ARN vecteur dissous dans le Buffer AVE doivent être congelées sous forme d'aliquotes entre -30 °C et -15 °C.

Le QIAamp DSP Circulating NA Kit contient une solution de protéinase K prête à l'emploi qui est dissoute dans un tampon de conservation spécialement formulé. La protéinase K est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du composant lorsqu'elle est conservée à température ambiante (15 à 25 °C).

Stabilité d'utilisation

La trousse peut être utilisée pendant 12 mois après la première utilisation ou jusqu'à la date d'expiration, au premier des deux termes échu.

Conservation et manipulation des échantillons

Conservation et manipulation du sang

Pour éviter la dégradation des acides nucléiques libres et la libération des acides nucléiques cellulaires, nous recommandons de conserver le sang total pendant au maximum 6 heures entre 2 et 8 °C (p. ex. échantillons avec EDTA). Si vous utilisez des tubes de prélèvement sanguin stabilisés, appliquez les conditions de conservation du fabricant. Nous vous recommandons de valider ces conditions au regard de votre application en aval et de votre cible.

Conservation et manipulation du plasma

Il est recommandé de procéder à la séparation du plasma et à l'isolement des acides nucléiques immédiatement après le prélèvement de sang si vous utilisez l'EDTA comme anticoagulant, tout particulièrement pour l'ARN. Pour une conservation de courte durée, vous pouvez conserver le plasma jusqu'à 24 heures entre 2 et 8 °C.

Pour une conservation plus longue, les aliquotes de plasma issues de tubes de prélèvement sanguin stabilisés ou non stabilisés peuvent être conservées à -20 °C, à -80 °C jusqu'à 12 mois (uniquement pour l'ADN) ou à -80 °C pendant 4 semaines (pour l'ARN).

Conservation des acides nucléiques élués

Les acides nucléiques élués sont prélevés dans des tubes d'éluion de 1,5 ml (fournis). Les acides nucléiques circulants purifiés peuvent être conservés jusqu'à 24 heures entre 2 et 8 °C. Au-delà de 24 heures, il est recommandé de conserver l'ADN entre -30 °C et -15 °C et l'ARN entre -90 °C et -60 °C en vue d'applications en aval.

Procédure

Points importants avant de commencer

QIAvac 24 Plus

Le QIAvac 24 Plus est conçu pour le traitement sous vide rapide et efficace de jusqu'à 24 colonnes de centrifugation QIAGEN en parallèle. Les échantillons et les solutions de lavage sont aspirés à travers les membranes des colonnes par pression négative au lieu d'être centrifugés, ce qui permet une plus grande rapidité et une réduction du temps de manipulation dans les procédures de purification.

Associé au QIAvac Connecting System, le QIAvac 24 Plus peut être utilisé comme un système traversant. L'échantillon ayant traversé la colonne est recueilli dans une bouteille de déchets distincte.

Pour la maintenance du QIAvac 24 Plus, reportez-vous aux consignes de manipulation du *Manuel du QIAvac 24 Plus*.

Traitement des colonnes QIAamp Mini sur le QIAvac 24 Plus

Les colonnes QIAamp Mini sont traitées sur le QIAvac 24 Plus en utilisant les VacConnectors jetables et les VacValves réutilisables. Les VacValves (en option) sont insérées directement dans les fentes luer du collecteur QIAvac 24 Plus et assurent un débit régulier, facilitant le traitement parallèle d'échantillons de différents volumes. Elles doivent être utilisées si les débits des échantillons diffèrent de façon importante afin d'assurer un vide constant. Les VacConnectors sont des connecteurs jetables qui s'adaptent entre les colonnes QIAamp Mini et les VacValves ou entre les colonnes QIAamp Mini et les fentes luer du QIAvac 24 Plus. Ils empêchent le contact direct entre la colonne de centrifugation et la VacValve pendant la purification, permettant ainsi d'éviter la contamination croisée entre les échantillons.

Les VacConnectors doivent être mis au rebut après une seule utilisation. Compte tenu des grands volumes de solution utilisés, le QIAvac Connecting System (ou un système similaire équipé de flacons à déchets) est requis (voir la Figure 2).

Consignes de manipulation du QIAvac 24 Plus

- Placez toujours le QIAvac 24 Plus sur une paillasse ou une surface de travail sécurisée. En cas de chute, le collecteur du QIAvac 24 Plus peut se fissurer.
- Rangez toujours le QIAvac 24 Plus dans un endroit propre et sec. Pour les procédures de nettoyage, consultez le *Manuel du QIAvac 24 Plus*.
- Les composants du QIAvac 24 Plus ne sont pas résistants à certains solvants (Tableau 2). Si ces solvants sont renversés sur l'unité, rincez-la abondamment à l'eau.
- Pour garantir une performance constante, n'appliquez pas de silicone ou de graisse pour vide sur aucune partie du collecteur QIAvac 24 Plus.
- Faites toujours preuve de prudence et portez des lunettes de sécurité lorsque vous travaillez à proximité d'un collecteur à vide sous pression.
- Contactez les services techniques QIAGEN ou votre distributeur local pour obtenir des informations sur les pièces de rechange.
- La pression négative est la pression différentielle entre l'intérieur du collecteur à vide et l'atmosphère (pression atmosphérique standard 1 013 millibars ou 760 mm Hg) et peut être mesurée à l'aide du QIAvac Connecting System (voir la Figure 2). Les protocoles exigent une pompe à vide capable de produire un vide de -800 à -900 mbar (p. ex. QIAGEN® Vacuum Pump). Les pressions négatives plus importantes doivent être évitées. L'utilisation de pressions négatives inférieures à celles recommandées peut réduire le rendement et la pureté des acides nucléiques et accroître le risque de membranes obstruées.

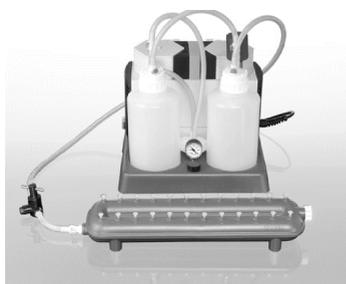


Figure 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System et Vacuum Pump.

Tableau 2. Propriétés de résistance chimique du QIAvac 24 Plus

Résistant à		Non résistant à
Acide acétique	Sels chaotropiques	Benzène
Acide chromique	Alcools concentrés	Phénol
SDS	Chlorure de sodium	Chloroforme
Tween™ 20	Urée	Toluène
Javellisant	Acide chlorhydrique	Éthers
Hydroxyde de sodium		

Configuration du QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Connectez le QIAvac 24 Plus à une source de vide. Si vous utilisez le QIAvac Connecting System, connectez le système au collecteur et à la source de vide comme décrit en Annexe A du *Manuel du QIAvac 24 Plus*.
2. Insérez une VacValve (en option) dans chaque fente luer du QIAvac 24 Plus qui doit être utilisé (voir la Figure 3). Bouchez les fentes luer inutilisées à l'aide des bouchons luer ou fermez la VacValve insérée.

Les VacValves doivent être utilisées si les débits des échantillons diffèrent de façon importante afin d'assurer un vide constant.

3. Insérez un VacConnector dans chaque VacValve (voir la Figure 3).

Effectuez cette étape juste avant de commencer la purification pour éviter d'exposer les VacConnectors à des contaminants potentiels dans l'air.

4. Placez les colonnes QIAamp Mini dans les VacConnectors sur le collecteur (voir la Figure 3).

Remarque : sortez le tube de lavage de son emballage et mettez-le de côté pour le protocole de purification.

5. Insérez un prolongateur de colonne (20 ml) dans chaque colonne QIAamp Mini (voir la Figure 3).

Remarque : insérez fermement le prolongateur de colonne dans la colonne QIAamp Mini pour éviter toute fuite d'échantillon.

6. Pour la purification des acides nucléiques, suivez les instructions des protocoles. Jetez les VacConnectors de manière appropriée après utilisation.

Laissez le couvercle de la colonne QIAamp Mini ouvert pendant l'application de la pression négative.

Arrêtez la pompe à vide entre chaque étape pour assurer l'application d'un vide homogène pendant le traitement. Pour libérer plus rapidement le vide, vous devez utiliser un Vacuum Regulator (régulateur de vide) (il fait partie du QIAvac Connecting System).

Remarque : Chaque VacValve peut être fermée séparément quand l'échantillon est complètement passé à travers la colonne de centrifugation, ce qui permet de traiter en parallèle des échantillons de différents volumes ou viscosités.

7. Après le traitement des échantillons, nettoyez le QIAvac 24 Plus (voir la section « Nettoyage et décontamination du QIAvac 24 Plus » dans le *manuel du QIAvac 24 Plus*).

Remarque : Buffers ACL, ACB et ACW1 sont incompatibles avec les agents de désinfection contenant de l'eau de Javel. Voir page 14 pour les Avertissements et précautions.

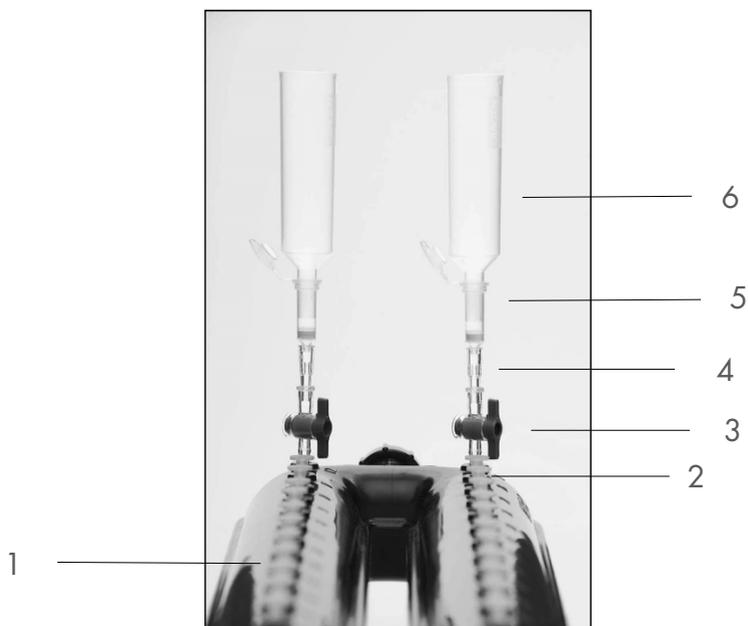
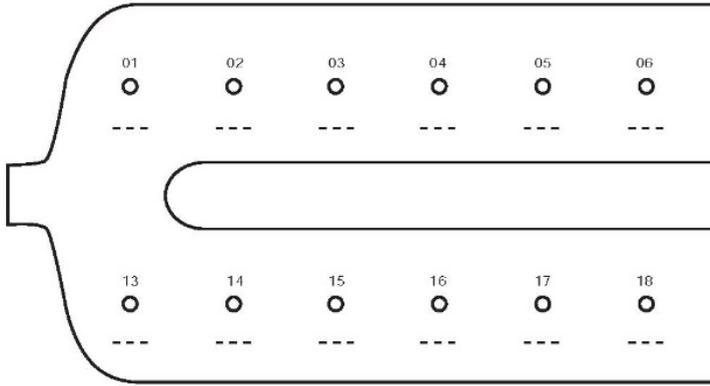


Figure 3. Configuration du QIAvac 24 Plus avec les colonnes QIAamp Mini en utilisant des VacValves, des VacConnectors et des prolongateurs de colonne.

- | | | | |
|---|---|---|-------------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Fente luer du QIAvac 24 Plus (fermée par un bouchon luer) | 5 | Colonne QIAamp Mini |
| 3 | VacValve* | 6 | Prolongateur de colonne |

Nous recommandons d'étiqueter les tubes et les colonnes QIAamp Mini qui seront utilisés sur le système de pression négative QIAvac 24 Plus conformément au modèle présenté sur la Figure 4 afin de ne pas mélanger les échantillons. Cette figure peut être photocopiée et étiquetée avec les noms des échantillons.

* À acheter séparément.



Date : _____

Opérateur : _____

ID de l'analyse : _____

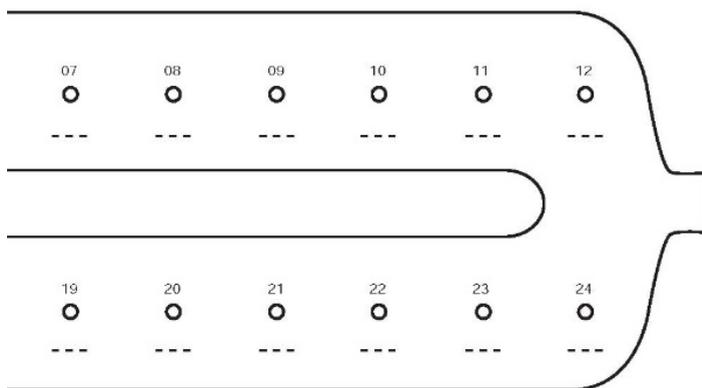


Figure 4. Schéma d'étiquetage des tubes et des colonnes QIAamp Mini utilisés sur le système de pression négative QIAvac 24 Plus.

Préparation des tampons et des réactifs

Buffer ACB

Avant emploi, ajoutez 200 ml d'isopropanol (100 %) à 300 ml de Buffer ACB concentré pour obtenir 500 ml de Buffer ACB. Mélangez bien après l'ajout d'isopropanol.

Buffer ACW1 *

Avant emploi, ajoutez 25 ml d'éthanol (96 à 100 %) à 19 ml de Buffer ACW1 concentré pour obtenir 44 ml de Buffer ACW1. Mélangez bien après l'ajout d'éthanol.

Buffer ACW2 †

Avant emploi, ajoutez 30 ml d'éthanol (96 à 100 %) à 13 ml de Buffer ACW2 concentré pour obtenir 43 ml de Buffer ACW2. Mélangez bien après l'ajout d'éthanol.

Ajout d'ARN vecteur au Buffer ACL*

L'ARN vecteur a 2 objectifs : tout d'abord, il améliore la liaison des acides nucléiques à la membrane QIAamp Mini, notamment s'il y a peu de molécules cibles dans l'échantillon. Ensuite, l'ajout de grandes quantités d'ARN vecteur réduit le risque de dégradation de l'ARN dans les rares cas où les molécules de RNase ont échappé à la dénaturation par les sels chaotropiques et les détergents dans le Buffer ACL.

* Contient un sel chaotropique. Voir page 14 pour les **Avertissements et précautions**.

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

La quantité d'ARN vecteur lyophilisé fournie est suffisante pour le volume de Buffer ACL fourni dans la trousse. La concentration recommandée d'ARN vecteur a été ajustée de sorte que le protocole QIAamp DSP Circulating NA puisse être utilisé comme un système de purification générique compatible avec différents systèmes d'amplification, et elle est adaptée à de nombreuses cibles d'ARN et d'ADN.

Les différents systèmes d'amplification varient en efficacité en fonction de la quantité totale d'acides nucléiques présents dans la réaction. Les éluats de la trousse contiennent à la fois des acides nucléiques circulants et de l'ARN vecteur, et la plupart du temps la quantité d'ARN vecteur dépasse nettement la quantité d'acides nucléiques circulants. Ainsi, la quantification des acides nucléiques circulants isolés d'après les valeurs d'absorbance UV n'est pas correcte, car les résultats de ces mesures sont déterminés par la présence d'ARN vecteur.

Afin d'obtenir les plus hauts niveaux de sensibilité dans les réactions d'amplification, il peut être nécessaire de réduire la quantité d'ARN vecteur ajoutée au Buffer ACL.

Pour les systèmes d'amplification nécessitant des amorces oligo dT, aucun ARN vecteur ne doit être ajouté pendant l'isolement des acides nucléiques libres circulants.

Ajoutez 1 550 µl de Buffer AVE* dans le tube contenant 310 µg d'ARN vecteur lyophilisé pour obtenir une solution d'une concentration de 0,2 µg/µl. Dissolvez soigneusement l'ARN vecteur, divisez-le en aliquotes d'une taille pratique et conservez-le entre -30 °C et -15 °C. Évitez les cycles de congélation/décongélation des aliquotes d'ARN vecteur à répétition.

Notez que l'ARN vecteur n'est pas soluble dans le Buffer ACL. Il doit d'abord être dissous dans le Buffer AVE, puis ajouté au Buffer ACL.

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

Calculez le volume du mélange Buffer ACL-ARN vecteur nécessaire par lot d'échantillons en respectant les tableaux des protocoles. Sélectionnez le nombre d'échantillons à traiter simultanément.

Mélangez délicatement en retournant le tube ou le flacon 10 fois. Pour éviter la formation de mousse, ne passez pas le tube au vortex.

Remarque : la procédure de préparation des échantillons est optimisée pour un maximum de 1,0 µg d'ARN vecteur par échantillon. S'il s'avère qu'il est mieux pour votre système d'amplification d'utiliser moins d'ARN vecteur, transférez uniquement la quantité requise d'ARN vecteur dissous dans les tubes contenant le Buffer ACL. Pour chaque microgramme d'ARN vecteur nécessaire par préparation, ajoutez 5 µl d'ARN vecteur dissous au Buffer ACL. (L'utilisation de moins de 1,0 µg d'ARN vecteur par échantillon peut être pertinente et être validée pour chaque type d'échantillon spécifique et essai effectué en aval.)

Protocole Breeze : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain

Ce protocole concerne la purification d'ADN et d'ARN circulant à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain et a été optimisé pour réduire les temps de manipulation et de production. Pour les procédures existantes validées par l'utilisateur impliquant le QIAamp DSP Circulating NA Kit version 1/R3, consultez la section « Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain » (page 34).

Points importants avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (15 à 25 °C).
- Arrêtez la pompe à vide entre chaque étape pour assurer l'application d'un vide homogène pendant toutes les étapes du protocole.
Remarque : la pression de la Vacuum Pump doit être entre -800 et -900 mbar.
- Équilibrez les échantillons à température ambiante.
- Ajoutez du PBS pour que le volume de l'échantillon se rapproche le plus possible du volume exact (1 à 5 ml).
- Configurez le QIAvac 24 Plus comme décrit page 21.
- Préchauffez un bain-marie ou un bloc chauffant à 56 °C. Il sera utilisé avec des tubes de centrifugation de 50 ml à l'étape 3.
- Équilibrez les colonnes de centrifugation QIAamp Mini pendant au moins 1 heure à température ambiante avant emploi.
- Veillez à ce que le Buffer ACB, le Buffer ACW1 et le Buffer ACW2 aient été préparés (ajout d'isopropanol ou d'éthanol) conformément aux instructions de la page 26.
- Ajoutez l'ARN vecteur reconstitué dans le Buffer AVE au Buffer ACL conformément aux instructions du Tableau 3.

Tableau 3. Volume de Buffer ACL et d'ARN vecteur (dissous dans le Buffer AVE) requis pour traiter des échantillons de plasma sanguin humain de 1 à 5 ml

Configuration par ml de plasma	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Nombre d'échantillons	Buffer ACL (ml)					ARN vecteur dans le Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procédure : protocole Breeze

1. Pipettez QIAGEN Proteinase K, plasma et Buffer ACL **dans cet ordre** dans un tube de centrifugation de 50 ml (non fourni).

Configuration	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Fermez le bouchon et mélangez au vortex par petites impulsions 5 fois 2 secondes.
Assurez-vous qu'un vortex visible se forme dans le tube. Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le Buffer ACL soient mélangés soigneusement pour donner une solution homogène.

Remarque : n'interrompez pas la procédure à ce moment-là. Passez sans attendre à l'étape 3 pour démarrer l'incubation de la lyse.

3. Incubez à 56 °C (± 1 °C) pendant 15 minutes (± 1).
4. Remplacez le tube sur la paillasse puis dévissez le bouchon.
5. Ajoutez du Buffer ACB au lysat dans le tube. Choisissez le volume en fonction de la configuration de l'étape 1.

Configuration	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Fermez le bouchon et mélangez bien au vortex par petites impulsions 5 fois 2 secondes.
Assurez-vous qu'un vortex visible se forme dans le tube. Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que le lysat et le Buffer ACB soient mélangés soigneusement pour donner une solution homogène.
7. Incubez le mélange lysat–Buffer ACB dans le tube pendant 5 minutes (± 1) à température ambiante.

8. Insérez la colonne QIAamp Mini dans le VacConnector sur le QIAvac 24 Plus (voir la section « Configuration du QIAvac 24 Plus vacuum manifold », page 21). Insérez un prolongateur de colonne de 20 ml dans la colonne QIAamp Mini ouverte.

Veillez à insérer fermement le prolongateur de colonne dans la colonne QIAamp Mini pour éviter toute fuite d'échantillon.

Remarque : conservez le tube de lavage pour la centrifugation de séchage de l'étape 13.

9. Ajoutez délicatement le lysat de l'étape 7 au prolongateur de colonne de la colonne QIAamp Mini. Actionnez la Vacuum Pump. Une fois tous les lysats complètement aspirés par les colonnes, arrêtez la pompe à vide puis relâchez la pression jusqu'à 0 mbar. Ôtez délicatement le prolongateur de colonne et mettez-le au rebut.

Notez que les volumes de lysat importants (près de 18 ml avec un échantillon initial de 5 ml) peuvent mettre jusqu'à 20 minutes pour traverser la membrane de la QIAamp Mini sous l'effet de la pression négative.

Pour libérer plus rapidement et efficacement la pression négative, vous devez utiliser le Vacuum Regulator (il fait partie du QIAvac Connecting System).

Remarque : pour éviter toute contamination croisée, veillez à ne pas rapprocher les colonnes QIAamp Mini pendant que vous retirez les prolongateurs de colonne.

10. Ajoutez 600 µl de Buffer ACW1 dans la colonne QIAamp Mini. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et actionnez la Vacuum Pump. Une fois que tout le Buffer ACW1 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, arrêtez la Vacuum Pump et relâchez la pression jusqu'à 0 mbar.

11. Ajoutez 750 µl de Buffer ACW2 dans la colonne QIAamp Mini. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et actionnez la Vacuum Pump. Une fois que tout le Buffer ACW2 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, arrêtez la Vacuum Pump et relâchez la pression jusqu'à 0 mbar.

12. Ajoutez 750 µl d'éthanol (96 à 100 %) dans la colonne QIAamp Mini. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et actionnez la Vacuum Pump. Une fois que tout l'éthanol est passé à travers la colonne de centrifugation, arrêtez la pompe à vide et relâchez la pression jusqu'à 0 mbar.

13. Fermez le couvercle de la colonne QIAamp Mini. Retirez le VacConnector du collecteur à vide et mettez-le au rebut. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml (de l'étape 8) puis centrifugez à pleine vitesse (20 000 g ; 14 000 tr/min) pendant 3 minutes ($\pm 0,5$).
14. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage neuf de 2 ml. Ouvrez le couvercle et incubez l'ensemble à température ambiante pendant 3 minutes pour sécher complètement la membrane.
15. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube d'élution propre de 1,5 ml (fourni) et mettez au rebut le tube de lavage de 2 ml de l'étape 14. Ajoutez délicatement 20 à 150 μ l de Buffer AVE au centre de la membrane de la colonne QIAamp Mini. Fermez le couvercle et incubez à température ambiante pendant 3 minutes ($\pm 0,5$)

Important : veillez à ce que le Buffer AVE d'élution soit équilibré à température ambiante (15 à 25 °C). Si l'élution est effectuée en petits volumes (< 50 μ l), le tampon d'élution doit être distribué au centre de la membrane pour une élution parfaite des acides nucléiques liés.

Le volume d'élution est flexible et peut être adapté selon les exigences des applications effectuées en aval.

L'élution avec des volumes plus faibles de Buffer AVE donne des concentrations supérieures d'acides nucléiques mais peut réduire le rendement total.

Le volume d'éluat récupéré peut aller jusqu'à 5 μ l de moins que le volume d'élution appliqué à la membrane de la colonne QIAamp Mini.

Remarque : pour les faibles rendements d'acides nucléiques (AN), il est recommandé d'utiliser un tube de faible liaison pour l'élution (non fourni).

16. Centrifugez dans une microcentrifugeuse à pleine vitesse (20 000 g ; 14 000 tr/min) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.

Remarque : orientez les bouchons des tubes d'élution à l'opposé de la rotation du rotor (p. ex. si le rotor tourne dans le sens horaire, orientez les bouchons dans le sens antihoraire).

Protocole classique : purification des acides nucléiques circulants à partir de 1 à 5 ml de plasma sanguin humain

Ce protocole est identique à celui du *Manuel du QIAamp DSP Circulating NA Kit*, révision 3 (R3), à utiliser, par exemple, avec des procédures existantes validées par l'utilisateur pour 1 à 5 ml de plasma humain.

Points importants avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (15 à 25 °C).
- Arrêtez la pompe à vide entre chaque étape pour assurer l'application d'un vide homogène pendant toutes les étapes du protocole.
Remarque : la pression de la Vacuum Pump doit être entre -800 et -900 mbar.
- Équilibrez les échantillons à température ambiante.
- Ajoutez du PBS pour que le volume de l'échantillon se rapproche le plus possible du volume exact (1 à 5 ml).
- Configurez le QIAvac 24 Plus comme décrit page 21.
- Préchauffez un bain-marie ou un bloc chauffant à 60°C. Il sera utilisé avec des tubes de centrifugation de 50 ml à l'étape 3.
- Préchauffez un bloc chauffant à 56 °C. Il sera utilisé avec des tubes de lavage de 2 ml à l'étape 14.
- Équilibrez les colonnes de centrifugation QIAamp Mini pendant au moins 1 heure à température ambiante avant emploi.
- Veillez à ce que le Buffer ACB, le Buffer ACW1 et le Buffer ACW2 aient été préparés (ajout d'isopropanol ou d'éthanol) conformément aux instructions de la page 26.
- Ajoutez l'ARN vecteur reconstitué dans le Buffer AVE au Buffer ACL conformément aux instructions du Tableau 4.

Tableau 4. Volume de Buffer ACL et d'ARN vecteur (dissous dans le Buffer AVE) requis pour traiter des échantillons de plasma sanguin humain de 1 à 5 ml

Configuration par ml de plasma	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Nombre d'échantillons	Buffer ACL (ml)					ARN vecteur dans le Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procédure : protocole classique

1. Pipettez QIAGEN Proteinase K, plasma et Buffer ACL dans cet ordre dans un tube de centrifugation de 50 ml (non fourni).

Configuration	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Fermez le bouchon et mélangez au vortex par petites impulsions pendant 30 s.

Assurez-vous qu'un vortex visible se forme dans le tube. Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le Buffer ACL soient mélangés soigneusement pour donner une solution homogène.

Remarque : n'interrompez pas la procédure à ce moment-là. Passez sans attendre à l'étape 3 pour démarrer l'incubation de la lyse.

3. Incubez à 60 °C (± 1 °C) pendant 30 minutes (± 2).
4. Remplacez le tube sur la paillasse puis dévissez le bouchon.
5. Ajoutez du Buffer ACB au lysat dans le tube. Choisissez le volume en fonction de la configuration de l'étape 1.

Configuration	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Fermez le bouchon et mélangez bien au vortex par petites impulsions pendant 30 secondes. Assurez-vous qu'un vortex visible se forme dans le tube. Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que le lysat et le Buffer ACB soient mélangés soigneusement pour donner une solution homogène.
7. Incubez le mélange lysat–Buffer ACB dans le tube pendant 5 minutes (± 1) sur un lit de glace.

8. Insérez la colonne QIAamp Mini dans le VacConnector sur le QIAvac 24 Plus (voir la section « Configuration du QIAvac 24 Plus vacuum manifold », page 21). Insérez un prolongateur de colonne de 20 ml dans la colonne QIAamp Mini ouverte.

Veillez à insérer fermement le prolongateur de colonne dans la colonne QIAamp Mini pour éviter toute fuite d'échantillon.

Remarque : conservez le tube de lavage pour la centrifugation de séchage de l'étape 13.

9. Ajoutez délicatement le lysat de l'étape 7 au prolongateur de colonne de la colonne QIAamp Mini. Actionnez la Vacuum Pump avec une pression de -800 à -900 mbar. Une fois tous les lysats complètement aspirés par les colonnes, arrêtez la pompe à vide puis relâchez la pression jusqu'à 0 mbar. Ôtez délicatement le prolongateur de colonne et mettez-le au rebut.

Notez que les volumes de lysat importants (près de 18 ml avec un échantillon initial de 5 ml) peuvent mettre jusqu'à 20 minutes pour traverser la membrane de la QIAamp Mini sous l'effet de la pression négative.

Pour libérer plus rapidement et efficacement la pression négative, vous devez utiliser le Vacuum Regulator (il fait partie du QIAvac Connecting System).

Remarque : pour éviter toute contamination croisée, veillez à ne pas rapprocher les colonnes QIAamp Mini pendant que vous retirez les prolongateurs de colonne.

10. Ajoutez 600 μ l de Buffer ACW1 dans la colonne QIAamp Mini. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et actionnez la Vacuum Pump. Une fois que tout le Buffer ACW1 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, arrêtez la Vacuum Pump et relâchez la pression jusqu'à 0 mbar.
11. Ajoutez 750 μ l de Buffer ACW2 dans la colonne QIAamp Mini. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et actionnez la Vacuum Pump. Une fois que tout le Buffer ACW2 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, arrêtez la Vacuum Pump et relâchez la pression jusqu'à 0 mbar.
12. Ajoutez 750 μ l d'éthanol (96 à 100 %) dans la colonne QIAamp Mini. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et actionnez la Vacuum Pump. Une fois que tout l'éthanol est passé à travers la colonne de centrifugation, arrêtez la pompe à vide et relâchez la pression jusqu'à 0 mbar.

13. Fermez le couvercle de la colonne QIAamp Mini. Retirez le VacConnector du collecteur à vide et mettez-le au rebut. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml (de l'étape 8) puis centrifugez à pleine vitesse (20 000 g ; 14 000 tr/min) pendant 3 minutes ($\pm 0,5$).
14. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage neuf de 2 ml. Ouvrez le couvercle et incubez l'ensemble à 56 °C (± 1 °C) pendant 10 minutes (± 1) pour sécher complètement la membrane.
15. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube d'élution propre de 1,5 ml (fourni) et mettez au rebut le tube de lavage de 2 ml de l'étape 13. Ajoutez délicatement 20 à 150 μ l de Buffer AVE au centre de la membrane de la colonne QIAamp Mini. Fermez le couvercle et incubez à température ambiante pendant 3 minutes ($\pm 0,5$).

Important : veillez à ce que le Buffer AVE d'élution soit équilibré à température ambiante (15 à 25 °C). Si l'élution est effectuée en petits volumes (< 50 μ l), le tampon d'élution doit être distribué au centre de la membrane pour une élution parfaite des acides nucléiques liés.

Le volume d'élution est flexible et peut être adapté selon les exigences des applications effectuées en aval.

L'élution avec des volumes plus faibles de Buffer AVE donne des concentrations supérieures d'acides nucléiques mais peut réduire le rendement total.

Le volume d'éluat récupéré peut aller jusqu'à 5 μ l de moins que le volume d'élution appliqué à la colonne QIAamp Mini.

Remarque : pour les faibles rendements d'acides nucléiques (AN), il est recommandé d'utiliser un tube de faible liaison pour l'élution (non fourni).

16. Centrifugez dans une microcentrifugeuse à pleine vitesse (20 000 g ; 14 000 tr/min) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.

Remarque : orientez les bouchons des tubes d'élution à l'opposé de la rotation du rotor (p. ex. si le rotor tourne dans le sens horaire, orientez les bouchons dans le sens antihoraire).

Contrôle de la qualité

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

Limitations

Les performances du systèmes pour l'isolement des acides nucléiques libres circulants ont été déterminées avec des échantillons de plasma humain issus des tubes de prélèvement sanguin suivants :

- K2-EDTA (Beckton Dickinson and Company, n° de réf. 367525)
- PAXgene® Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, n° de réf. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, n° de réf. 218962)

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 : Test And Methodology.

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

Caractéristiques de performances

Les caractéristiques de performances figurent sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur www.qiagen.com.

Références

1. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis. Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Humana Press.
3. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem.* **56**, 1210-1211.
4. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 541-563.
5. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* **10**, 21.
6. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med.* **57**, 932-953.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour obtenir plus de renseignements, 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, reportez-vous au site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Peu ou pas d'acides nucléiques dans l'éluat

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Utilisation de plasma non stabilisé | Les échantillons de plasma non stabilisé peuvent accélérer la dégradation de l'ADN. Nous recommandons de suivre la norme CEN/TS 16835-3:2015. Répétez la procédure de purification avec de nouveaux échantillons. |
| b) | Délai trop important entre le prélèvement sanguin et la préparation du plasma | Il se peut que les cellules sanguines nucléées se désintègrent et libèrent l'ADN génomique dans le plasma, diluant ainsi l'acide nucléique cible. |
| c) | Plusieurs cycles de congélation/décongélation des échantillons | Les cycles de congélation/décongélation à répétition doivent être évités, ils peuvent entraîner la dégradation de l'ADN. Utilisez toujours des échantillons frais ou des échantillons qui n'ont été décongelés qu'une seule fois. |
| d) | Faible concentration d'ADN cible dans les échantillons | Les échantillons de plasma sont restés à température ambiante trop longtemps. Répétez la procédure de purification avec de nouveaux échantillons.
Remarque : certains individus peuvent présenter une faible concentration d'AN libres dans le plasma, il convient alors d'opter pour un volume d'échantillon plus important et un faible volume d'éluat. |
| e) | Lyse d'échantillon inefficace dans le Buffer ACL | Si le QIAGEN Proteinase K a été soumis à une température élevée pendant une longue période, il a pu perdre de son efficacité. Répétez la procédure avec de nouveaux échantillons et du QIAGEN Proteinase K frais. |
| f) | Mélange Buffer ACL-ARN vecteur pas suffisamment mélangé | Mélangez le Buffer ACL et l'ARN vecteur en retournant délicatement le tube de Buffer ACL-ARN vecteur au moins 10 fois. |

Commentaires et suggestions

- | | | |
|----|---|--|
| g) | L'éthanol utilisé titre à moins de 96 à 100 % | Répétez la procédure de purification avec de nouveaux échantillons et un éthanol de 96 à 100 %. N'utilisez pas d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone. |
| h) | Buffer ACB préparé de façon incorrecte | Assurez-vous que le Buffer ACB concentré a été reconstitué avec le bon volume d'isopropanol (pas d'éthanol, voir page 26). |
| i) | Buffer ACW1 ou Buffer ACW2 préparé de façon incorrecte | Assurez-vous que le Buffer ACW1 et le Buffer ACW2 concentrés ont été dilués avec le bon volume d'éthanol (voir page 26). Répétez la procédure de purification avec de nouveaux échantillons. |
| j) | Buffer ACW1 ou Buffer ACW2 préparé avec de l'éthanol à 70 % | Assurez-vous que le Buffer ACW1 et le Buffer ACW2 concentrés ont été dilués avec de l'éthanol de 96 à 100 % (voir page 26). Répétez la procédure de purification avec de nouveaux échantillons. |

L'ADN ou l'ARN n'est pas utilisable dans les réactions enzymatiques en aval

- | | | |
|----|------------------------------------|---|
| a) | Peu ou pas d'ADN dans l'éluat | Consultez la section précédente « Peu ou pas d'acides nucléiques dans l'éluat » pour connaître les raisons possibles. Augmentez si possible la quantité d'éluat ajoutée à la réaction. |
| b) | Volume d'éluat incorrect utilisé | Déterminez le volume maximal d'éluat adapté à votre application en aval. Réduisez ou augmentez en conséquence le volume d'éluat ajouté à l'application en aval. Le volume d'éluat peut être adapté proportionnellement.
Remarque : l'éluat avec des volumes plus faibles de Buffer AVE donne des concentrations supérieures d'acides nucléiques mais peut réduire le rendement total. |
| c) | Tampons mal mélangés | Les sels et l'éthanol contenus dans le Buffer ACW2 de lavage peuvent se séparer si le mélange repose trop longtemps entre deux analyses. Vous devez toujours mélanger soigneusement les tampons avant chaque analyse. |
| d) | Interférences dues à l'ARN vecteur | Si la présence d'ARN vecteur dans l'éluat perturbe la réaction enzymatique en aval, il peut être nécessaire de réduire la quantité d'ARN vecteur ou de la supprimer totalement. |

Manipulation générale

- | | | |
|----|------------------------------|---|
| a) | Colonne QIAamp Mini obstruée | Si le débit est réduit, vous pouvez rallonger la durée de la pression négative.

Vous pouvez aussi fermer la VacValve, si vous en utilisez une, et désolidariser avec soin l'ensemble prolongateur de colonne–VacConnector–VacValve de la colonne QIAamp Mini sans perdre le lysat contenu dans le prolongateur de colonne. |
|----|------------------------------|---|

Désolidarisez la colonne QIAamp Mini du collecteur à vide, placez-la dans un tube de lavage de 2 ml et centrifugez-la à pleine vitesse jusqu'à ce que l'échantillon ait entièrement traversé la membrane. Remplacez l'ensemble prolongateur de colonne–VacConnector–VacValve contenant le lysat restant. Actionnez la pompe à vide, ouvrez la VacValve puis continuez à charger le lysat restant.

Répétez la procédure ci-dessus si la colonne QIAamp Mini est de nouveau obstruée.

Des cryoprécipités peuvent se former dans le plasma en raison des cycles de congélation/décongélation à répétition. Ils peuvent obstruer la colonne QIAamp Mini. N'utilisez pas un plasma qui a été congelé et décongelé plusieurs fois.

Si vous observez des cryoprécipités, clarifiez l'échantillon par centrifugation pendant 5 minutes à 16 000 g.

b) Volumes d'éluat variables

Des échantillons différents peuvent modifier le volume de l'éluat final. Le volume d'éluat récupéré peut aller jusqu'à 5 µl de moins que le volume d'éluat appliqué à la colonne QIAamp Mini.

c) Pression négative de –800 à –900 mbar non atteinte

Le collecteur à vide est mal fermé. Appuyez bien sur le couvercle du collecteur à vide une fois la pression négative activée. Vérifiez si la pression négative est atteinte.

Le joint du couvercle QIAvac est usé. Examinez le joint du collecteur et remplacez-le si nécessaire.

Les VacValves sont usées. Retirez toutes les VacValves et insérez les VacConnectors directement dans les extensions luer. Insérez les colonnes QIAamp Mini dans les VacConnectors, fermez le couvercle des colonnes et activez la pression négative. Vérifiez si la pression négative est atteinte. Remplacez les VacValves si nécessaire.

La connexion à la pompe à vide n'est pas étanche. Fermez toutes les extensions luer avec les bouchons luer et actionnez la pompe à vide. Vérifiez si la pression négative est stable une fois la pompe actionnée (et si la vanne du Vacuum Regulator est fermée). Remplacez si nécessaire les raccords entre la pompe et le collecteur à vide.

Si la pression négative n'est toujours pas atteinte, remplacez la Vacuum Pump par un modèle plus puissant.

Symboles

Les symboles suivants figurent dans le mode d'emploi ou sont apposés sur l'emballage ou les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
	Contient des réactifs suffisants 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

Symbole

Définition du symbole

	Code article international
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
	À réception
	Ouvrir à la livraison; stocker les colonnes de centrifugation QIAamp Mini à une température comprise entre 2 et 8 °C
	Volume

Symbole

Définition du symbole

	Ajout
	Noter la date du jour après l'ajout d'éthanol au flacon
	Éthanol
	Noter la date du jour après l'ajout d'isopropanol au flacon
	Isopropanol
→	Entraîne
	Thiocyanate de guanidine
	Chlorhydrate de guanidine
	BRIJ 58
	Protéinase K
	Identifiant unique du dispositif

Annexe A : recommandation pour la séparation et la conservation du plasma sanguin

Pour les tubes de prélèvement sanguin de stabilisation (p. ex. PAXgene ccfDNA Tube ou Streck Cell-Free DNA Tube), respectez les consignes de séparation et conservation du plasma sanguin du fabricant. Nous vous recommandons de valider ces conditions au regard de votre application en aval et de votre cible.

Pour les BCT non stabilisés, nous recommandons de respecter la norme ISO 20186-3:2019 Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour le sang total veineux — Partie 3 : ADN libre circulant extrait du plasma ou la norme CEN/TS 17742 Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour le sang total veineux — ARN libre circulant extrait du plasma.

Pour isoler les acides nucléiques libres circulants à partir d'échantillons sanguins, nous recommandons de suivre ce protocole qui inclut une centrifugation à vitesse élevée, afin d'éliminer les débris cellulaires et ainsi de réduire la quantité d'ADN et d'ARN génomique ou cellulaire dans les échantillons.

1. Mettez du sang total EDTA dans des tubes BD Vacutainer® (ou d'autres tubes sanguins primaires contenant de l'EDTA comme anticoagulant) dans une centrifugeuse refroidie à 4 °C avec un rotor à angle variable et des godets appropriés.
2. Centrifugez les échantillons sanguins pendant 10 minutes à 1 900 g (3 000 tr/min) à 4 °C.
3. Aspirez soigneusement le surnageant de plasma sans perturber la couche d'interface entre le plasma et les cellules. Il est possible d'obtenir environ 4 à 5 ml de plasma à partir d'un tube sanguin primaire de 10 ml.

Remarque : le plasma peut être utilisé pour l'extraction des acides nucléiques circulants à cette étape. Toutefois, l'étape suivante de centrifugation à haute vitesse permet d'éliminer des débris cellulaires supplémentaires et d'éviter la contamination des acides nucléiques circulants par l'ADN et l'ARN génomiques provenant de la dégradation des cellules sanguines nucléées.

4. Le plasma aspiré est transféré dans un tube de centrifugation neuf.
5. Centrifugez les échantillons de plasma pendant 10 minutes à 16 000 g (dans un rotor à angle fixe) à 4 °C.

Cela permet l'élimination d'autres acides nucléiques liés aux débris cellulaires.

6. Retirez soigneusement et transférez le surnageant dans un nouveau tube sans perturber le culot.
7. Si le plasma doit être utilisé le jour même pour l'extraction des acides nucléiques, stockez-le entre 2 et 8 °C jusqu'au traitement ultérieur. Pour une conservation plus longue, les aliquotes de plasma issues de tubes de prélèvement sanguin non stabilisés ou stabilisés peuvent être stockées à -20 °C (ADN) ou -80 °C (ARN) pendant au moins 4 semaines. Avant d'utiliser le plasma pour l'extraction des acides nucléiques circulants, décongelez les tubes de plasma à température ambiante.
8. **Facultatif** : pour éliminer les cryoprécipités, centrifugez les échantillons de plasma pendant 5 minutes à 16 000 g (dans un rotor à angle fixe).

Facultatif : transférez le surnageant dans un nouveau tube puis commencez le protocole d'extraction des acides nucléiques circulants.

Annexe B : remarques générales sur la manipulation d'ARN

Manipulation d'ARN

Les ribonucléases (RNases) sont des enzymes très stables et très actives qui n'ont généralement pas besoin de cofacteurs pour fonctionner. Puisque les RNases sont difficiles à inactiver et que de très petites quantités d'enzyme suffisent à dégrader l'ARN, n'utilisez pas de matériel en plastique ou en verre sans le traiter au préalable contre une contamination possible par des RNases. Il est important de prendre des précautions particulières pour éviter d'introduire par inadvertance des RNases dans l'échantillon d'ARN pendant ou après la purification. Lors de la manipulation de l'ARN, afin de créer et de maintenir un environnement exempt de RNase, prenez les précautions suivantes au cours du prétraitement et de l'utilisation des récipients jetables ou non jetables et des solutions.

Manipulation générale

Une technique microbiologique aseptique appropriée doit être utilisée systématiquement lors de la manipulation d'ARN. Les mains et les particules de poussières peuvent transporter des bactéries et des moisissures. Il s'agit là des sources de contamination les plus courantes en ce qui concerne la contamination par des RNases. Portez toujours des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation de réactifs et d'échantillons d'ARN afin d'empêcher la contamination par des RNases présentes sur la surface de votre peau ou sur le matériel de laboratoire poussiéreux. Changez de gants fréquemment et gardez les tubes fermés autant que possible. Gardez l'ARN purifié sur de la glace lors du pipetage d'aliquotes pour des applications en aval.

Matériel en plastique jetable

L'utilisation de tubes en polypropylène jetables, stériles et exempts de RNase est recommandée pour l'ensemble de la procédure.

Pour commander

Produit	Table des matières	N° de réf.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Pour 50 préparations : colonnes QIAamp Mini, prolongateurs de colonne, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, réactifs, tampons et tubes de prélèvement	61504
Accessoires		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Collecteur à vide pour le traitement de 1 à 24 colonnes de centrifugation : QIAvac 24 Plus vacuum manifold, bouchons luer et raccords rapides	19413
Pompe à vide*	Pompe à vide universelle	84010 [États-Unis et Canada] 84000 [Japon] 84020 [reste du monde]
QIAvac Connecting System*	Système permettant de raccorder le collecteur à vide à la pompe à vide : inclut plateau, flacons à déchets, tuyaux, raccords, vanne, jauge et 24 VacValves	19419

* À utiliser avec les protocoles de pression négative.

Pour obtenir des renseignements actualisés et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consultez le manuel de la trousse ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des troussees et les manuels d'utilisation 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	Trousse IVDR version 2, aucune modification apportée aux protocoles ou aux données de performances par rapport à la version 1; ajout de l'isolement « manuel » dans l'utilisation prévue; mises à jour et corrections mineures

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Contrat de licence limitée pour le QIAamp DSP Circulating NA 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. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences 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, expresses ou tacites, 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 recouvrer 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, reportez-vous à www.qiagen.com.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, (Groupe QIAGEN); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Tween™ (ICI Americas Inc.). Les marques déposées, marques de commerce et autres marques citées dans ce document doivent être considérées comme protégées par la loi, même si elles ne sont pas spécifiquement signalées comme telles.

Juin 2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

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