

Février 2023

PAXgene[®] Blood RNA Kit (Manuel) Instructions d'utilisation



Version 3 (V3)

IVD

Pour utilisation diagnostique in vitro



REF

762174



PreAnalytiX[®] GmbH
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Suisse

Produit par QIAGEN[®] GmbH pour PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R2

MAT

1130774FR

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

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Sauf indication contraire, PreAnalytiX, le logo PreAnalytiX et toutes les autres marques commerciales appartiennent à PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

Accord de licence limitée pour le PAXgene Blood RNA Kit

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

1. Le produit doit être utilisé uniquement avec les composants du kit, conformément aux protocoles fournis et à ce manuel. PreAnalytiX® 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 et www.preanalytix.com.
2. Hormis les licences énoncées expressément, PreAnalytiX n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit est sous licence pour une utilisation unique et il ne peut être réutilisé, remis à neuf ou revendu.
4. PreAnalytiX rejette notamment toutes autres licences, expresse ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes.
6. PreAnalytiX peut faire appliquer les interdictions de ce contrat de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de ce contrat de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir www.qiagen.com et www.preanalytix.com.

HB-3009-002 BD-8945 1130774FR © 2023 PreAnalytiX GmbH, tous droits réservés.

Distributeurs PreAnalytiX

Les produits PreAnalytiX sont fabriqués et distribués par QIAGEN et BD pour PreAnalytiX.

Table des matières

Table des matières	3
Utilisation prévue	6
Utilisateurs prévus	6
Description et principe	7
Introduction	7
Principe et procédure	7
Prélèvement et stabilisation de l'échantillon	8
Extraction de l'ARN	8
Isolation manuelle de l'ARN	9
Isolation automatisée de l'ARN	11
Matériel fourni	14
Contenu du kit	14
Composants du kit	15
Matériel nécessaire, mais non fourni	16
Pour tous les protocoles	16
Pour le protocole manuel	16
Pour le protocole automatisé	17
Avertissements et précautions	18
Informations de sécurité	18
Informations d'urgence	18
Précautions	19
Stockage et manipulation des réactifs	22

Stabilité à l'utilisation	22
Prélèvement, stockage et manipulation des échantillons	23
Protocole : isolation manuelle d'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes	24
Protocole : isolation automatique de l'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	32
Limitations d'utilisation du produit	40
Contrôle de la qualité.....	40
Caractéristiques des performances.....	41
Prélèvement et stabilisation de l'échantillon	41
Isolation manuelle de l'ARN.....	46
Isolation automatisée de l'ARN	54
Stabilité de l'ARN isolé.....	57
Remarques importantes.....	58
Utilisation du QIAcube Connect MDx	58
Démarrage du QIAcube Connect MDx	58
Installation des protocoles sur le QIAcube Connect MDx.....	60
Chargement du QIAcube Connect MDx.....	61
Colonnes de centrifugation (PSC, PRC), MCT et matériel en plastique du QIAcube Connect MDx.....	64
Mise au rebut.....	70
Références	71
Guide de dépannage	72
Symboles	74
Coordonnées.....	76

Annexe A : Remarques générales sur la manipulation de l'ARN	77
Annexe B : Quantification et détermination de la qualité de l'ARN total	79
Annexe C : Manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	81
Informations pour commander	83
Historique des révisions du document	85

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le PAXgene Blood RNA System est composé d'un tube de prélèvement sanguin (PAXgene Blood RNA tube, BRT) et d'un kit de purification d'acides nucléiques (PAXgene Blood RNA Kit). Il est conçu pour le prélèvement, la conservation et le transport d'échantillons sanguins, la stabilisation de l'ARN intracellulaire dans un tube d'échantillon fermé ainsi que l'isolement et la purification de l'ARN de l'hôte à partir de sang total pour la RT-PCR utilisée dans les tests diagnostiques moléculaires.

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

Indications d'utilisation

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

Utilisateurs prévus

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

Ce kit est réservé à un usage professionnel.

Description et principe

Introduction

Le prélèvement de sang total est la première étape de nombreux dosages moléculaires analysant l'ARN cellulaire. L'instabilité du profil d'ARN cellulaire in vitro constitue un grand problème. Des études menées par PreAnalytiX ont montré que le nombre de copies de chaque espèce d'ARNm dans le sang total peut changer plus de 1 000 fois pendant le stockage ou le transport à température ambiante (Rainen et al., 2002). Cela est dû à la dégradation rapide de l'ARN et à l'induction de l'expression de certains gènes après le prélèvement du sang. De telles modifications du profil d'expression de l'ARN rendent impossible l'obtention de résultats fiables lors d'études d'expression de gènes. Une méthode permettant de stabiliser le profil d'expression de l'ARN pendant et après la phlébotomie est donc essentielle pour une analyse exacte de l'expression de gènes dans le sang total humain.

Principe et procédure

PreAnalytiX a développé un système qui permet de prélever, stabiliser, conserver et transporter des échantillons de sang total humain, en combinaison avec un protocole rapide et efficace pour l'isolation d'ARN intracellulaire. Ce système requiert l'utilisation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pour le prélèvement du sang et la stabilisation d'ARN ainsi que le PAXgene Blood RNA Kit pour l'isolation manuelle ou automatisée d'ARN. Les protocoles manuel et automatisé fournissent des performances substantiellement équivalentes quant à la qualité et au rendement en ARN. Les données relatives aux performances des protocoles manuel (à partir de la page 46) et automatisé (à partir de la page 54) figurent dans ce manuel.

Le PAXgene Blood RNA System permet la normalisation des étapes de procédure pré-analytique, du prélèvement d'échantillon sanguin à l'isolement de l'ARN cellulaire selon la norme ISO 20186-1:2019, Analyses de diagnostic moléculaire in vitro – Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour le sang total veineux – Partie 1 : ARN cellulaire extrait.

Prélèvement et stabilisation de l'échantillon

Les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contiennent un réactif exclusif de stabilisation d'ARN. Cet additif protège les molécules d'ARN de la dégradation par les RNases et minimise les modifications ex vivo de l'expression de gènes. Les caractéristiques de performances du PAXgene Blood RNA System ont été établies avec les transcrits de gènes FOS et IL1B, qui peuvent être visualisés à partir de la page 41.

Extraction de l'ARN

Le PAXgene Blood RNA Kit a été développé pour l'isolation de l'ARN total à partir de 2,5 mL de sang total humain prélevé dans un PAXgene Blood RNA Tube (BRT). La procédure est simple et peut être réalisée manuellement ou de façon automatisée (voir figure 1 ou figure 3, page 10 ou 12, respectivement). Dans les deux protocoles, l'isolation commence par une étape de centrifugation afin de culotter les acides nucléiques dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Le culot est lavé et remis en suspension, puis l'ARN est isolé manuellement ou de façon automatisée. En principe, les deux protocoles suivent les mêmes étapes et utilisent les mêmes composants du kit.

Isolation manuelle de l'ARN

Dans le détail, le culot remis en suspension est incubé dans des tampons optimisés avec de la protéinase K (PK) pour digérer les protéines. Une étape de centrifugation supplémentaire avec la colonne de centrifugation PAXgene Shredder (PSC) est réalisée pour homogénéiser le lysat cellulaire et éliminer les débris cellulaires. Le surnageant de l'effluent est transféré dans un nouveau tube de microcentrifugation (MCT). De l'éthanol est ajouté pour optimiser les conditions de fixation et le lysat est déposé sur une colonne de centrifugation PAXgene RNA (PRC). Lors d'une brève centrifugation, l'ARN se fixe sélectivement sur la membrane de silice PAXgene et les contaminants passent à travers. Les contaminants restants sont éliminés par plusieurs étapes de lavage efficaces. La membrane est incubée avec de la DNase I (RNFD) entre la première et la deuxième étape de lavage pour supprimer toute trace d'ADN fixé. Après les étapes de lavage, l'ARN est élué dans le tampon d'éluion (BR5) et dénaturé thermiquement. Les caractéristiques de performances de l'isolation manuelle de l'ARN à l'aide du PAXgene Blood RNA System sont indiquées à la page 46.

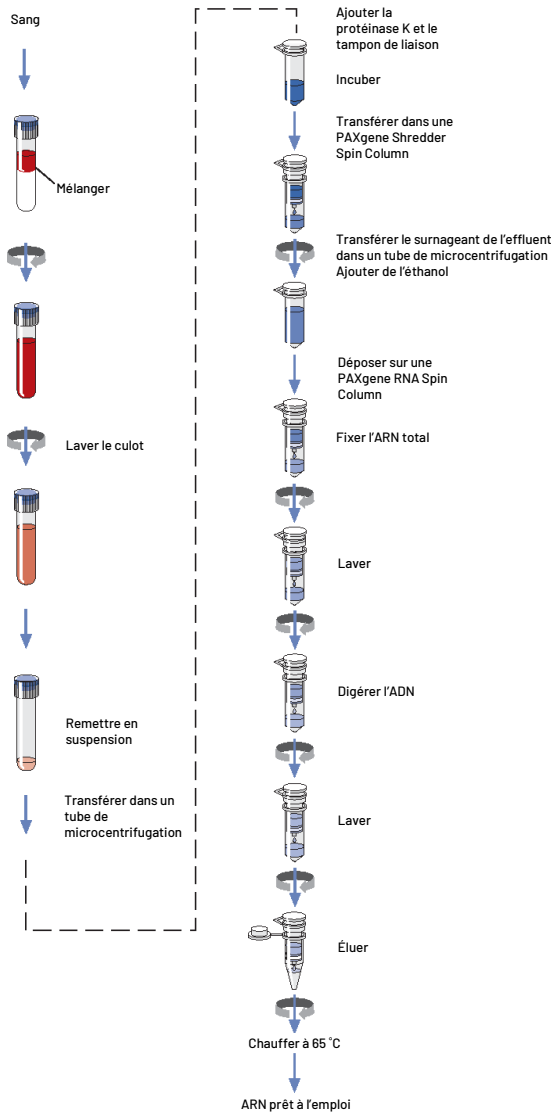


Figure 1 : Procédure manuelle PAXgene Blood RNA.

Isolation automatisée de l'ARN

L'isolation de l'ARN sanguin est automatisée sur le QIAGEN QIAcube Connect MDx. L'instrument innovant utilise une technologie avancée de traitement des colonnes de centrifugation QIAGEN, permettant l'intégration sans faille d'une préparation des échantillons automatisée de faible capacité au déroulement des opérations des procédures de laboratoire. La préparation des échantillons avec le QIAcube Connect MDx suit les mêmes étapes que la procédure manuelle (c'est-à-dire lyse, liaison, lavage et élution) et peut être effectuée avec le même PAXgene Blood RNA Kit.



Figure 2 : QIAcube Connect MDx.



Le QIAGEN QIAcube Connect MDx n'est pas disponible dans tous les pays. Pour plus d'informations, contacter les Services techniques de QIAGEN.

Le protocole d'isolation automatique de l'ARN consiste en 2 parties (ou protocoles) : « PAXgene Blood RNA Part A » (à partir du sang dans le PAXgene Blood RNA Tube à l'éluion) et « PAXgene Blood RNA Part B » (après éluion dans l'ARN prêt à l'emploi), avec une brève intervention manuelle entre les 2 parties (voir figure 3).

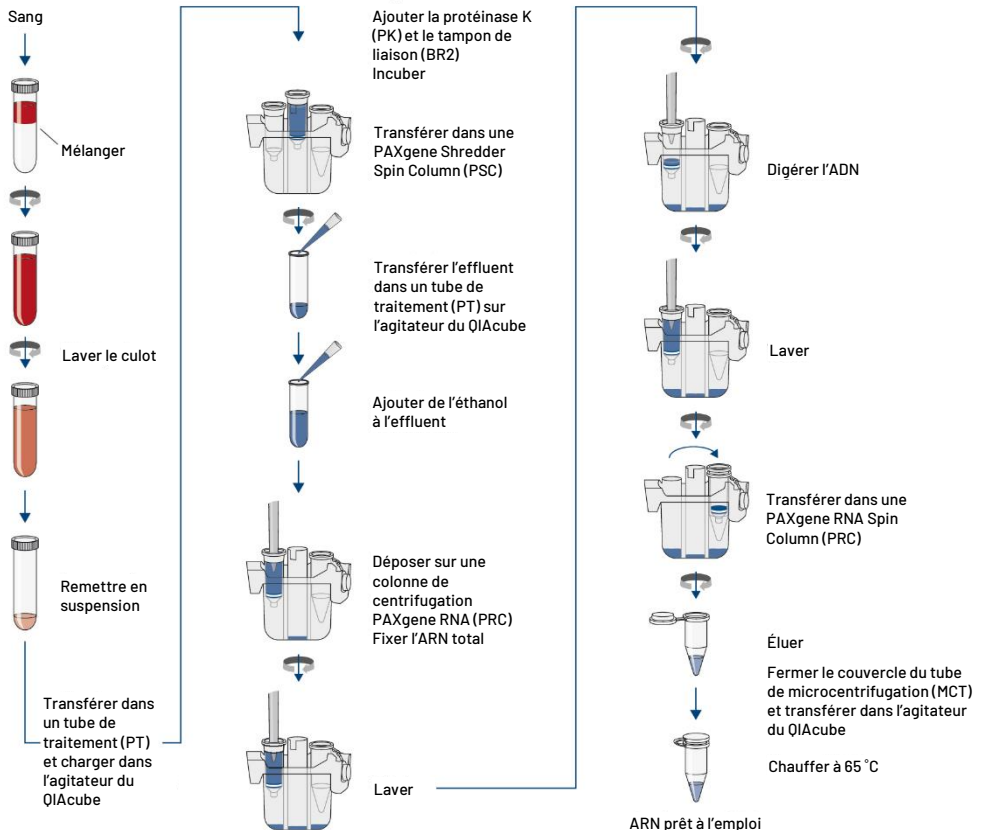



Figure 3 : Procédure automatisée PAXgene Blood RNA.

Le culot d'acides nucléiques centrifugé, lavé et remis en suspension (voir « Extraction de l'ARN », page 8) est transféré du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) dans des tubes de traitement (PT), qui sont placés sur l'agitateur thermique du plan de travail du QIAcube Connect MDx. L'opérateur sélectionne et lance le protocole « PAXgene Blood RNA Part A » (PAXgene Blood RNA – Partie A) depuis le menu. Le QIAcube Connect MDx réalise les étapes du protocole jusqu'à l'élution de l'ARN dans le tampon d'élution (BR5). L'opérateur transfère les MCT qui contiennent l'ARN purifié dans l'agitateur thermique du QIAcube Connect MDx. Il lance alors le protocole « PAXgene Blood RNA Part B » (PAXgene Blood RNA – Partie B) depuis le menu et le QIAcube Connect MDx effectue la dénaturation thermique. Les caractéristiques de performances de l'isolation automatique de l'ARN à l'aide du PAXgene Blood RNA System sur le QIAcube Connect MDx figurent à la page 54.

Matériel fourni

Contenu du kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
N° de référence			762174
Nombre de dispositifs de prélèvement			50
Nom du composant	Description	Symbole	Quantité
BR1	Resuspension Buffer (tampon de resuspension)	RES BUF	20 mL
BR2	Binding Buffer (tampon de liaison)*	BIND BUF	18 mL
BR3	Wash Buffer (tampon de lavage) 1*	WASH BUF 1	45 mL
BR4	Wash Buffer 2 (tampon de lavage 2) (concentré) [†]	WASH BUF 2 CONC	11 mL
BR5	Elution buffer (tampon d'éluion)	ELU BUF	6 mL
RNFW	RNase-Free Water (eau exempte de RNase) (flacon)	PEL WASH	2 × 125 mL
PK	Proteinase K (protéinase K, couvercle vert)	PROTK	2 × 1,4 mL
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (colonnes de centrifugation PAXgene RNA, rouges) [‡]	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Collection Tubes (2 mL) (tubes de prélèvement [2 mL]) [§]	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Bouchons de sécurité BD Hemogard)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 mL) (tubes de microcentrifugation, [1,5 mL]) [§]	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I, exempte de RNase, lyophilisée)	DNA REM	1500 unités Kunitz [¶]
RDD	DNA Digestion Buffer (tampon de digestion de l'ADN, couvercle blanc)	DNA DIG BUF	2 × 2 mL
DRB	DNase Resuspension Buffer (tampon de resuspension de la DNase, tube, couvercle lilas)	DNase RES BUF	2 mL
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (colonnes de centrifugation PAXgene Shredder, lilas) [‡]	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Manuel	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Version 3) (Manuel du PAXgene Blood RNA Kit [version 3])		1

- * N'est pas compatible avec des produits désinfectants contenant de l'eau de javel. Contient un sel de guanidine. Voir page 18 pour les Informations de sécurité.
- † Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 % v/v, de qualité analytique) dans le flacon, comme indiqué sur l'étiquette, pour obtenir une solution prête à l'emploi.
- ‡ Chaque colonne est emballée dans un blister destiné à une utilisation unique. Veuillez consulter les informations de sécurité pour les consignes de mise au rebut.
- § Les tubes sont disponibles en sacs plastiques et chaque tube est exclusivement destiné à une utilisation unique. Veuillez consulter les informations de sécurité pour les consignes de mise au rebut.
- ¶ Les unités Kunitz sont souvent utilisées pour mesurer la DNase I et sont définies comme la quantité de DNase I qui provoque une augmentation d' A_{260} de 0,001 par minute et par millilitre à 25 °C et pH 5,0, avec de l'ADN hautement polymérisé comme substrat (Kunitz, M. [1950] *J. Gen. Physiol.* 33, 349 et 363).

Composants du kit

Nom du composant	Description	Ingrédient actif	Concentration
BR1	Resuspension Buffer (tampon de resuspension)	Aucun	-
BR2	Binding Buffer (tampon de liaison)	Thiocyanate de guanidine	≥ 30 à < 50 % p/p
BR3	Wash Buffer (tampon de lavage) 1	Thiocyanate de guanidine Éthanol	≥ 10 à < 20 % p/p ≥ 3 à < 10 % p/p
BR4	Wash Buffer 2 (tampon de lavage 2)(concentré)	Aucun	-
BR5	Elution buffer (tampon d'éluion)	Aucun	-
RNFW	RNase-Free Water (eau exempte de RNase)(flacon)	Aucun	-
PK	Proteinase K (protéinase K, couvercle vert)	Protéinase K	≥ 1 à < 3 % p/p
RNFD	DNase I, RNase-free (DNase I, exempte de RNase, lyophilisée)	DNase	≥ 90 à ≤ 100 % p/p
RDD	DNA Digestion Buffer (tampon de digestion de l'ADN, couvercle blanc)	Aucun	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (tampon de resuspension de la DNase, tube, couvercle lilas)	Aucun	-

Matériel nécessaire, mais non fourni

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, portez toujours une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur des produits.

Pour tous les protocoles

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX ; N° de réf. 762165)
- Éthanol (96 à 100 % v/v, de qualité analytique)
- Pipettes* (10 µL – 4 mL)
- Pointes de pipette stériles, avec dispositif anti-aérosol et exemptes de RNase†
- Éprouvette graduée‡
- Centrifugeuse* capable d'atteindre 3 000 à 5 000 × g et équipée d'un rotor à godets oscillants adaptés aux PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitateur vortex*
- Glace pilée
- Stylo indélébile pour l'étiquetage

Pour le protocole manuel

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

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

† S'assurer de bien lire les consignes sur la manipulation de l'ARN (voir l'annexe A, page 75).

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

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

Pour le protocole automatisé

- Ciseaux
- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, N° de réf. 9003070)

Consommables du QIAcube Connect MDx :

- Filter-Tips, 1 000 µL (1024)(QIAGEN, N° de réf. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 mL (6)(QIAGEN, N° de réf. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24)(QIAGEN, N° de réf. 990394)†

Accessoires du QIAcube Connect MDx :

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, N° de réf. 990392)†

Services groupés pour QIAcube Connect MDx :

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, N° de réf. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, N° de réf. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, N° de réf. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, N° de réf. no 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, N° de réf. 9003075)

* S'assurer que le dispositif et l'instrument sont vérifiés, entretenus et calibrés régulièrement selon les instructions du fabricant.

† Également incluses dans le Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, N° de réf. 990395).

Avertissements et précautions

Pour les clients dans l'Union européenne, noter qu'il peut être nécessaire de rapporter tout incident grave survenant en lien avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente du pays membre où l'utilisateur et/ou le patient réside.

Pour les clients en dehors de l'Union européenne, notez qu'il peut être nécessaire de consulter la réglementation locale avant de signaler tout incident grave survenant en lien avec le produit au fabricant et/ou son représentant agréé et à l'organisme de régulation du pays de l'utilisateur et/ou du patient.

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques et de matières biologiques dangereuses, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF, pratique et compact, à l'adresse www.qiagen.com/safety, où il est possible de trouver, de consulter et d'imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

- Tous les produits chimiques et biologiques sont potentiellement dangereux. Les prélèvements et échantillons de sang sont potentiellement infectieux et doivent être traités comme du matériel présentant un risque biologique.
- Jeter les déchets biologiques dangereux et les déchets produits par le kit conformément aux procédures de sécurité locales.

Informations d'urgence

CHEMTREC

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

Précautions

En cas de manipulation de sang, prendre des précautions universelles pour éviter tout risque d'exposition potentielle à des pathogènes transmis par le sang (par ex. VIH, hépatite B et autres virus transmis par le sang). Utiliser des gants, des blouses, des protections pour les yeux, d'autres équipements de protection individuelle et des contrôles techniques pour protéger de l'exposition au sang. Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles au format PDF compact et pratique sur www.preanalytix.com, où vous pouvez trouver consulter et imprimer les FDS pour ce kit.

ATTENTION



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

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

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

Les déchets de préparation des échantillons, comme le surnageant des étapes de centrifugation lors de l'isolation d'ARN, doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Utiliser des récipients présentant un risque biologique pour éliminer le matériel biologique. Éliminer les déchets selon les réglementations et procédures locales de votre établissement.

Les composants spécifiques du PAXgene Blood RNA Kit sont destinés à une utilisation unique. Voir le Contenu du kit à la page 14 pour des informations sur chaque composant.

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

Buffer BR2



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

Buffer BR3



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

DNase I



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

Stockage et manipulation des réactifs

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

Le RNase-Free DNase Set, qui contient la DNase I (RNFD), le tampon de digestion de l'ADN (RDD) et le tampon de resuspension de la DNase (DRB), est livré à température ambiante. Stocker tous les composants du RNase-Free DNase Set immédiatement après réception à la température indiquée sur l'étiquette. Dans des conditions de stockage appropriées, le kit est stable jusqu'à la date limite d'utilisation figurant sur la boîte.

Prêter attention aux dates de péremption et aux conditions de conservation imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. Ne pas utiliser de composants périmés ou stockés dans de mauvaises conditions.

Stabilité à l'utilisation

Après la première utilisation du kit, les réactifs sont stables dans les flacons d'origine aux températures et jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette de la boîte du kit.

Les réactifs versés dans les flacons de réactif du QIAcube Connect MDx sont stables pour 3 mois de conservation à température ambiante (15–25 °C).

La DNase I reconstituée (RNFD) est stable entre 2 et 8 °C pendant 6 semaines dans le flacon en verre d'origine (solution mère).

Les aliquotes à usage unique de la solution mère dans des MCT de 1,5 mL (fournis avec le kit) sont stables pour 9 mois de conservation à -20°C . Après décongélation, les aliquotes à usage unique sont stables pour 6 semaines de conservation à une température de 2 à 8°C .

Prélèvement, stockage et manipulation des échantillons

Le PAXgene Blood RNA Kit doit être utilisé avec du sang prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes. Le sang doit être prélevé dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conformément aux instructions du manuel du PAXgene Blood RNA Tube. Si nécessaire, voir l'annexe C (page 81) pour des recommandations sur la manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement dangereux. Les caractéristiques de performances du PAXgene Blood RNA System ont été établies avec les transcrits de gènes FOS et IL1B, qui peuvent être visualisés aux pages 42–45.

Protocole : isolation manuelle d'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes

Points importants avant de commencer

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

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

- Déposer avec précaution l'échantillon sur la colonne de centrifugation (PSC, PRC) sans en mouiller le bord.
- Changer systématiquement les pointes de pipette entre les transferts de liquide. Utiliser des pointes de pipette équipée d'un dispositif anti-aérosols.

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

Étapes préliminaires

- Le sang doit être prélevé dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conformément aux instructions du *manuel du PAXgene Blood RNA Tube*. Si nécessaire, voir l'annexe C (page 81) pour des recommandations sur la manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Après prélèvement du sang, incuber les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pendant au moins 2 h à température ambiante afin d'assurer une lyse complète des cellules sanguines et la précipitation de l'ARN. L'incubation du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant une nuit peut augmenter les rendements. Si l'incubation initiale du sang à température ambiante pendant 2 h n'a pas été effectuée avant le stockage à 2–8 °C, –20 °C ou –70 °C, laisser le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) se stabiliser à température ambiante et l'incuber 2 h avant de commencer la procédure.
- Lire les informations de sécurité page 18.

- Lire les consignes sur la manipulation de l'ARN (annexe A, page 77).
- Vérifier que les instruments utilisés, comme les pipettes et l'agitateur-incubateur, sont contrôlés et calibrés régulièrement, conformément aux recommandations du fabricant.
- Les étapes 5 et 20 requièrent l'utilisation d'un agitateur-incubateur. Régler la température de l'agitateur-incubateur à 55 °C.
- Le tampon de liaison (BR2) peut former un précipité au cours de sa conservation. Si nécessaire, chauffer à 37 °C pour dissoudre.
- Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 % v/v, de qualité analytique) dans le flacon, comme indiqué sur l'étiquette, pour obtenir une solution prête à l'emploi.
- Lors de la première utilisation du RNase-Free DNase Set, préparer une solution mère de DNase I. Dissoudre la DNase I (RNFD ; 1 500 unités Kunitz)* dans 550 µL de tampon de remise en suspension de la DNase (DRB) fourni. Prendre garde à ne pas perdre de DNase I (RNFD) en ouvrant le flacon. Ne pas vortexer la DNase I reconstituée (RNFD). La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. La solution de DNase I doit être mélangée uniquement en retournant délicatement le flacon plusieurs fois.
- La DNase I reconstituée (RNFD) peut être conservée entre 2 et 8 °C dans le flacon en verre d'origine (solution mère) ou à -20 °C après avoir retiré la solution mère du flacon en verre et l'avoir divisée en aliquotes à usage unique (utiliser le MCT de 1,5 mL fourni dans le kit ; il y en a suffisamment pour 5 aliquotes). Les aliquotes décongelées peuvent être conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas recongeler les aliquotes après la décongélation.
- Lors de la reconstitution et de l'aliquotage de la DNase I (RNFD), veiller à bien respecter les consignes sur la manipulation de l'ARN (annexe A, page 77).

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

Procédure

1. Centrifuger le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 min entre 3 000 et 5 000 x *g* dans un rotor à godets oscillants.



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



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

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

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

3. Resuspendre complètement le culot en vortexant puis centrifuger pendant 10 min entre 3 000 et 5 000 x *g* dans un rotor à godets oscillants. Éliminer complètement le surnageant.

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



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

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

5. À l'aide d'une pipette, déposer l'échantillon dans un MCT de 1,5 mL. Ajouter 300 µL de tampon de liaison (BR2) et 40 µL de protéinase K (PK). Vortexer pendant 5 s et incuber pendant 10 min à 55 °C dans l'agitateur-incubateur, entre 400 et 1 400 tr/min. Après incubation, régler la température de l'agitateur-incubateur à 65 °C (pour l'étape 20).



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

6. À l'aide d'une pipette, transférer le lysat directement sur une PSC (lilas) placée dans un PT de 2 mL et centrifuger pendant 3 min à vitesse maximale (mais sans dépasser 20 000 x g).



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

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



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

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



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

9. À l'aide d'une pipette, déposer 700 µL d'échantillon sur la PRC (rouge) placée dans un PT de 2 mL et centrifuger pendant 1 min entre 8 000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne de centrifugation (PRC) dans un nouveau PT de 2 mL et jeter l'ancien PT contenant l'effluent.

10. À l'aide d'une pipette, déposer le reste de l'échantillon sur la PRC et centrifuger pendant 1 min entre 8 000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne de centrifugation (PRC) dans un nouveau PT de 2 mL et jeter l'ancien PT contenant l'effluent.



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

11. À l'aide d'une pipette, déposer 350 µL de tampon de lavage 1 (BR3) sur la PRC. Centrifuger pendant 1 min entre 8 000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne de centrifugation (PRC) dans un nouveau PT de 2 mL et jeter l'ancien PT contenant l'effluent.

12. Dans un MCT de 1,5 mL, ajouter 10 µL de solution mère de DNase I (RNFD) à 70 µL de tampon de digestion de l'ADN (RDD). Mélanger en tapotant légèrement sur le tube avec le doigt et centrifuger brièvement pour récupérer les gouttelettes sur les parois du tube.

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



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

13. À l'aide d'une pipette, déposer le mélange d'incubation de la DNase I (RNFD) (80 µL) directement sur la membrane de la PRC et laisser incuber pendant 15 min sur la paillasse entre 20 et 30 °C.



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

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



Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Vérifier que l'éthanol a bien été ajouté au tampon de lavage 2 (BR4) avant utilisation (voir « Étapes préliminaires », page 25).

16. Ajouter une nouvelle fois 500 µL de tampon de lavage 2 (BR4) à la PRC. Centrifuger pendant 3 min entre 8 000 et 20 000 x g.
17. Jeter le PT contenant l'effluent et placer la PRC dans un nouveau PT de 2 mL. Centrifuger pendant 1 min entre 8 000 et 20 000 x g.
18. Jeter le PT contenant l'effluent. Placer la PRC dans un MCT de 1,5 mL et à l'aide d'une pipette, déposer 40 µL de tampon d'éluion (BR5) directement sur la membrane de la PRC. Centrifuger 1 min entre 8 000 et 20 000 x g afin d'éluier l'ARN.

Il est très important d'humidifier complètement la membrane avec le tampon d'éluion (BR5) afin d'assurer une efficacité maximale de l'éluion.
19. Répéter l'étape d'éluion (étape 18) comme décrit avec 40 µL de tampon d'éluion (BR5) et le même MCT.
20. Incuber l'éluant pendant 5 min à 65 °C dans l'agitateur-incubateur (de l'étape 5) sans agitation. Après incubation, le mettre directement sur de la glace.



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

Ne pas dépasser la durée ou la température d'incubation.

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

Puisque l'ARN reste dénaturé après plusieurs cycles de congélation/décongélation, il n'est pas nécessaire de répéter l'incubation à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si les échantillons d'ARN sont utilisés dans un dosage diagnostique, respecter les consignes du fabricant.

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

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



Pour la quantification dans le tampon Tris-HCl, utiliser la relation $A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/mL}$. Voir annexe B, page 79.

22. Fermer tous les flacons contenant du tampon et de l'eau exempte de RNase, les flacons et les tubes contenant des enzymes et des tampons d'enzymes et les sachets contenant des matières plastiques du kit utilisé pour le protocole. Conserver le contenu restant du kit, tel que décrit dans la section « Stockage et manipulation des réactifs » (page 22) et « Stabilité à l'utilisation » (page 22) jusqu'à la prochaine utilisation.

* Lorsque vous manipulez des produits chimiques, portez toujours une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur des produits.

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

Points importants avant de commencer

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

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

- À l'aide d'une pipette, déposer avec précaution l'échantillon au fond du PT sans humidifier le bord.
- Changer systématiquement les pointes de pipette entre les transferts de liquide. Utiliser des pointes de pipette équipée d'un dispositif anti-aérosols.

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

Étapes préliminaires

- Le sang doit être prélevé dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) conformément aux instructions du *manuel du PAXgene Blood RNA Tube*. Si nécessaire, voir l'annexe C (page 81) pour des recommandations sur la manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Après prélèvement du sang, incuber les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) pendant au moins 2 h à température ambiante afin d'assurer une lyse complète des cellules sanguines et la précipitation de l'ARN. L'incubation du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant une nuit peut augmenter les rendements. Si le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) a été conservé à 2–8 °C, à –20 °C ou à –70 °C après prélèvement du sang, le laisser revenir à température ambiante, puis le garder pendant 2 h à température ambiante avant de commencer la procédure.
- Lire les informations de sécurité page 18.
- Lire « Remarques importantes », page 58.
- Lire les consignes sur la manipulation de l'ARN (annexe A, page 77).
- Lire le manuel d'utilisation du QIAcube Connect MDx approprié et toute autre information fournie avec l'instrument en portant une attention particulière aux informations de sécurité.
- S'assurer que les dispositifs et instruments utilisés, comme les pipettes et le QIAcube Connect MDx, sont contrôlés et calibrés régulièrement conformément aux recommandations du fabricant.

- Le tampon de liaison (BR2) peut former un précipité au cours de sa conservation. Si nécessaire, chauffer à 37 °C pour dissoudre.
- Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter un volume approprié d'éthanol (96 à 100 % v/v, de qualité analytique) dans le flacon, comme indiqué sur l'étiquette, pour obtenir une solution de travail.
- Lors de la première utilisation du RNase-Free DNase Set, préparer une solution mère de DNase I. Dissoudre la DNase I (RNFD ; 1 500 unités Kunitz)* dans 550 µL de tampon de remise en suspension de la DNase (DRB) fourni. Prendre garde à ne pas perdre de DNase I (RNFD) en ouvrant le flacon. Ne pas vortexer la DNase I reconstituée (RNFD). La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. La solution de DNase I doit être mélangée uniquement en retournant délicatement le flacon plusieurs fois.
- La DNase I reconstituée (RNFD) peut être conservée entre 2 et 8 °C dans le flacon en verre d'origine (solution mère) ou à -20 °C après avoir retiré la solution mère du flacon en verre et l'avoir divisée en aliquotes à usage unique (utiliser le MCT de 1,5 mL fourni dans le kit ; il y en a suffisamment pour 5 aliquotes). Les aliquotes décongelées peuvent être conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas recongeler les aliquotes après la décongélation.
- Lors de la reconstitution et de l'aliquotage de la DNase I (RNFD), veiller à bien respecter les consignes sur la manipulation de l'ARN (annexe A, page 77).
- Installer le bon adaptateur pour agitateur (fourni avec les QIAcube Connect MDx ; utiliser l'adaptateur pour tubes safe-lock de 2 mL marqués par un « 2 ») et placer le portoir de l'agitateur en haut de l'adaptateur.
- Vérifier le tiroir à déchets et le vider si nécessaire.
- Installer tous les protocoles pertinents si cela n'a pas encore été fait au cours des cycles précédents. Pour le QIAcube Connect MDx, il faut télécharger tous les protocoles du fichier zip correspondant. Voir « Installation des protocoles sur le QIAcube Connect MDx », page 60.

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

Procédure

1. Fermer le capot du QIAcube Connect MDx et allumer l'instrument à l'aide de l'interrupteur d'alimentation (voir figure 15, page 59).

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

2. Ouvrir le capot du QIAcube Connect MDx et charger les réactifs et le matériel en plastique nécessaires dans l'instrument. Voir « Chargement du QIAcube Connect MDx », page 61.

Pour gagner du temps, le chargement peut être réalisé au cours de l'une ou des deux étapes de centrifugation de 10 min (étapes 3 et 5).

3. Centrifuger le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) 10 min entre 3 000 et 5 000 x g dans un rotor à godets oscillants.



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



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

4. Éliminer le surnageant en le versant ou en l'aspirant à l'aide d'une pipette. Si le surnageant est décanté, prendre garde à ne pas perturber le culot et sécher le bord du tube avec une serviette en papier propre. Ajouter 4 mL d'eau exempte de RNase (RNFW) sur le culot et fermer le tube avec un nouveau bouchon de sécurité BD Hemogard (fourni avec le kit).
5. Resuspendre complètement le culot en vortexant puis centrifuger pendant 10 min entre 3 000 et 5 000 x g dans un rotor à godets oscillants. Éliminer complètement le surnageant.

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



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

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

7. À l'aide d'une pipette, déposer l'échantillon dans un tube de 2 mL PT.



Utiliser les PT de 2 mL inclus dans le PAXgene Blood RNA Kit.

8. Charger les PT ouverts contenant l'échantillon dans l'agitateur du QIAcube Connect MDx (voir figure 18, page 63). Les positions des échantillons sont numérotées pour faciliter leur chargement. Insérer les broches du portoir de l'agitateur (fourni avec le QIAcube Connect MDx) dans les emplacements au bord du portoir de l'agitateur, à côté de chaque PT. Cela permet de détecter les échantillons pendant le contrôle du chargement.



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



Si moins de 12 échantillons sont traités, veiller à charger le portoir de l'agitateur comme illustré dans la figure 22, page 67. Il est impossible de traiter un (1) ou 11 échantillons. Les numéros de position dans le portoir de l'agitateur correspondent aux numéros de position dans la centrifugeuse.

9. Fermer le capot du QIAcube Connect MDx (voir figure 15, page 59).

10. Sélectionner le protocole « PAXgene Blood RNA Part A » (PAXgene Blood RNA – Partie A) et le lancer.

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



S'assurer que les deux parties du programme (A et B) sont installées sur le QIAcube Connect MDx (voir « Installation des protocoles sur le QIAcube Connect MDx », page 60).



L'instrument réalise des contrôles du chargement des échantillons, des pointes de pipette, des adaptateurs pour rotor et des flacons de réactif.

11. Une fois le protocole « PAXgene Blood RNA Part A » terminé, ouvrir le capot du QIAcube Connect MDx (voir figure 15, page 59). Retirer et jeter les PRC des adaptateurs pour rotor ainsi que les PT vides de l'agitateur.



Au cours du cycle, l'instrument transfère les colonnes de centrifugation de la position 1 de l'adaptateur pour rotor (position de couvercle L1) à la position 3 (position de couvercle L2) (voir figure 20, page 65).

12. Fermer les couvercles de tous les MCT 1,5 mL contenant de l'ARN purifié dans les adaptateurs pour rotor (position 3, position de couvercle L3 ; voir figure 20, page 65). Transférer les MCT de 1,5 mL dans l'adaptateur pour agitateur du QIAcube Connect MDx (voir figure 18, page 63).

13. Fermer le capot du QIAcube Connect MDx (voir figure 15, page 59).

14. Sélectionner le protocole « PAXgene Blood RNA Part B » (PAXgene Blood RNA – Partie B) et le lancer.

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



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

15. Une fois le programme « PAXgene Blood RNA Part B » terminé, ouvrir le capot du QIAcube Connect MDx (voir figure 15, page 59). Placer immédiatement les MCT contenant les ARN purifiés sur de la glace.



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



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

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

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

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

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



Pour la quantification dans le tampon Tris-HCl, utiliser la relation $A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/mL}$. Voir annexe B, page 79.

* Lorsque vous manipulez des produits chimiques, portez toujours une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur des produits.

17. Retirer le portoir pour flacons de réactif du plan de travail du QIAcube Connect MDx (voir figure 18, page 63), puis fermer tous les flacons de réactif à l'aide de couvercles correctement marqués. Fermer tous les flacons contenant du tampon et de l'eau exempte de RNase, les flacons et les tubes contenant des enzymes et des tampons d'enzymes et les sachets contenant des matières plastiques du kit utilisé pour le protocole. Conserver le contenu restant du kit et les flacons de réactif comme décrit dans les sections « Stockage et manipulation des réactifs » (page 22) et « Stabilité à l'utilisation » (page 22) jusqu'à la prochaine utilisation.

Retirer et éliminer les réactifs restants dans les PT dans les emplacements du MCT du QIAcube Connect MDx. Retirer et éliminer les adaptateurs pour rotor de la centrifugeuse. Vider le tiroir à déchets du QIAcube Connect MDx (voir figure 15, page 59). Fermer le capot de l'instrument et l'arrêter à l'aide de l'interrupteur d'alimentation.

Limitations d'utilisation du produit

Le PAXgene Blood RNA Kit est conçu pour l'isolation d'ARN intracellulaire à partir de sang total humain ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leucocytes/mL) pour des applications de diagnostic in vitro. Il n'est pas destiné à l'isolation d'ADN génomique ou d'acides nucléiques viraux à partir de sang total humain. En raison du nombre limité de transcrits validés pour les spécifications de stabilisation (transcrits de gènes FOS et IL1B), les caractéristiques de performance n'ont pas été établies pour tous les transcrits. Il revient aux utilisateurs d'examiner leurs données et celles du fabricant afin d'évaluer la nécessité d'une validation pour d'autres transcrits. Les composants du kit sont destinés à être utilisés uniquement dans le protocole manuel et automatique décrit dans le présent mode d'emploi.

Voir le *manuel du PAXgene Blood RNA Tube* pour des informations sur l'utilisation des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Contrôle de la qualité

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

Caractéristiques des performances

Prélèvement et stabilisation de l'échantillon

Les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contiennent un réactif exclusif de stabilisation d'ARN. Cet additif protège les molécules d'ARN de la dégradation par les RNases et minimise les modifications ex vivo de l'expression de gènes. Les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) sont conçus pour le prélèvement de sang total humain et la stabilisation d'ARN cellulaire jusqu'à 3 jours entre 18 et 25 °C (figure 4 et figure 5, pages 42 et 43, respectivement) ou jusqu'à 5 jours entre 2 et 8 °C (figure 6 et figure 7, pages 44 et 45). En outre, le sang stabilisé peut être conservé congelé. Les données actuellement disponibles démontrent une stabilisation d'ARN cellulaire d'au moins 11 ans quand le sang stabilisé est conservé à -20 °C ou à -70 °C*. Pour plus d'informations sur les études de stabilité à plus long terme, consulter www.preanalytix.com ou contacter les services techniques QIAGEN.

La durée de la stabilisation d'ARN peut varier selon le type d'ARN cellulaire et l'application en aval utilisée. En raison du nombre limité de transcrits validés pour les spécifications de stabilisation (transcrits de gènes FOS et IL1B), les caractéristiques de performance n'ont pas été établies pour tous les transcrits. Il revient aux utilisateurs d'examiner leurs données et celles du fabricant afin d'évaluer la nécessité d'une validation pour d'autres transcrits.

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

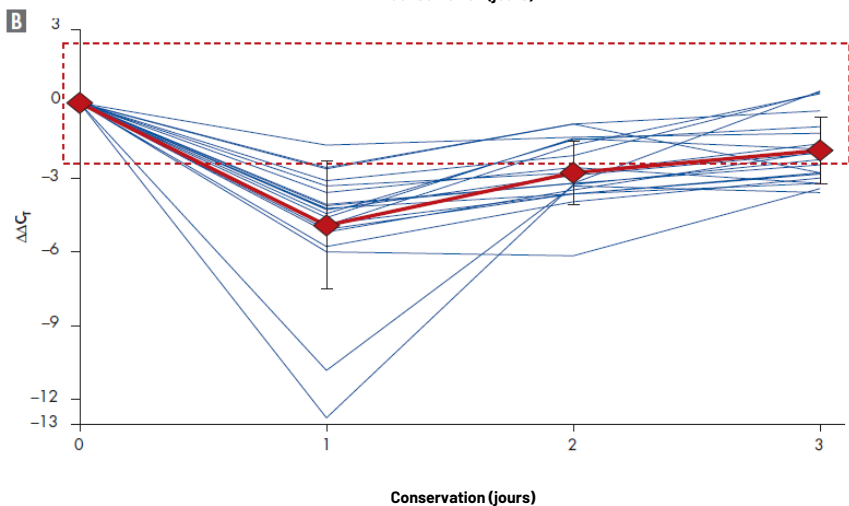
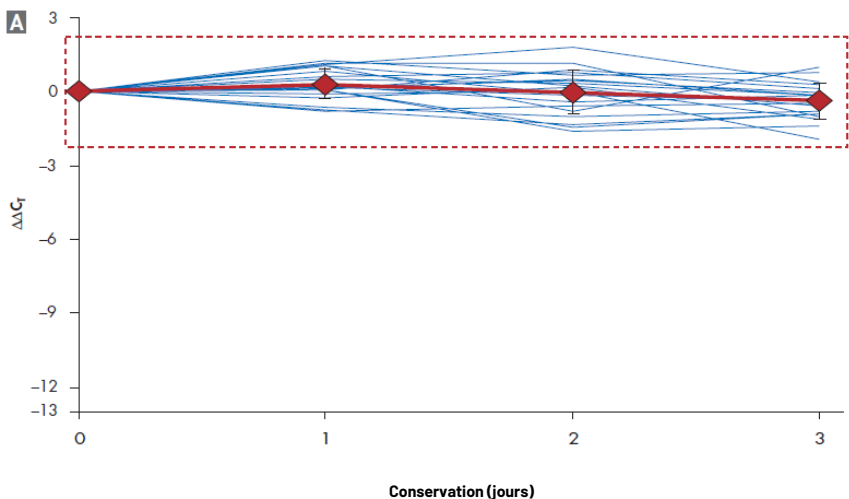


Figure 4 : Stabilité de l'ARN dans les échantillons sanguins entre 18 et 25 °C : FOS. Des échantillons de sang ont été prélevés sur 10 donneurs apparemment sains, en duplicats, et conservés à une température comprise entre 18 et 25 °C pendant la durée indiquée, avant l'isolation d'ARN total. **[A]** Le sang a été prélevé et conservé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). L'ARN total a été purifié à l'aide du PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Les échantillons de sang ont été prélevés et conservés dans des tubes de prélèvement sanguin ordinaires, contenant de l'EDTA comme anticoagulant, et l'ARN total a été purifié en suivant une méthode d'isolation organique classique avec lavage de l'ARN sur membrane de silice. Les niveaux de transcription relatifs de FOS ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées dans un graphique avec leur moyenne et écart-type. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3\sigma$ la précision totale du dosage ($2,34 C_T$).

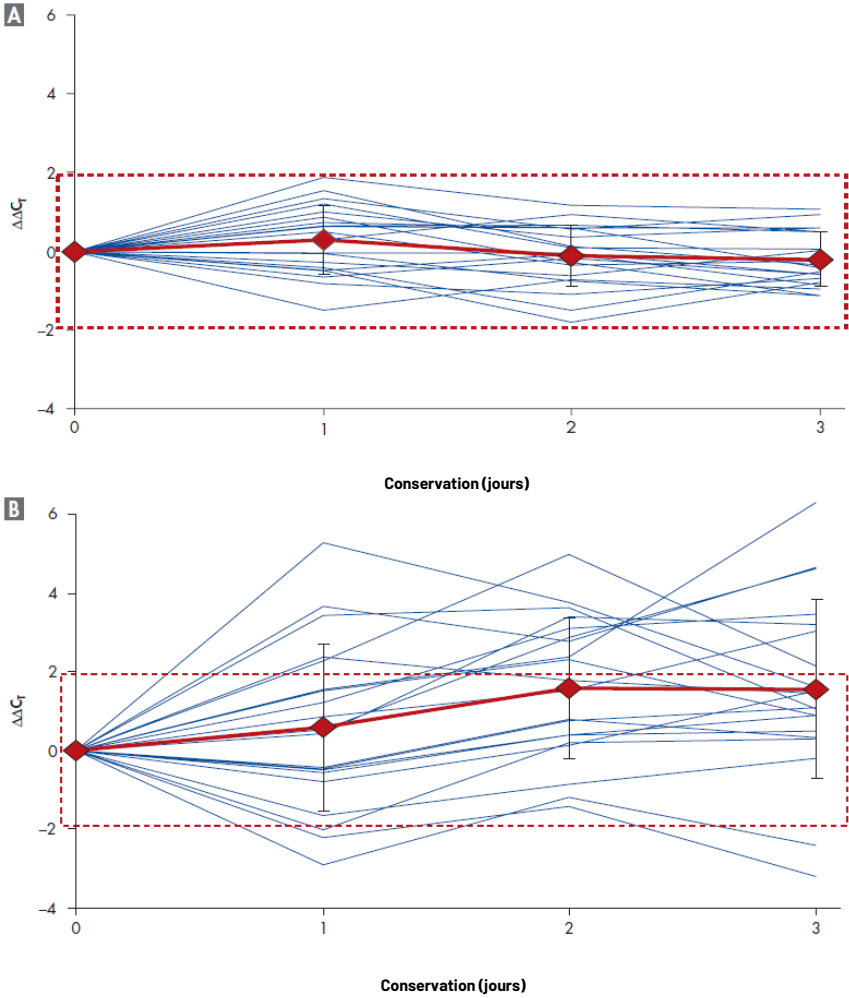


Figure 5 : Stabilité de l'ARN dans les échantillons sanguins entre 18 et 25 °C : IL1B. Le sang a été prélevé et l'ARN total purifié, après conservation à une température de 18 à 25 °C, comme décrit dans la figure 4. Les niveaux relatifs de transcription d'IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées dans un graphique avec leur moyenne et écart-type. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3 \times$ la précision totale du dosage (1,93 C_T).

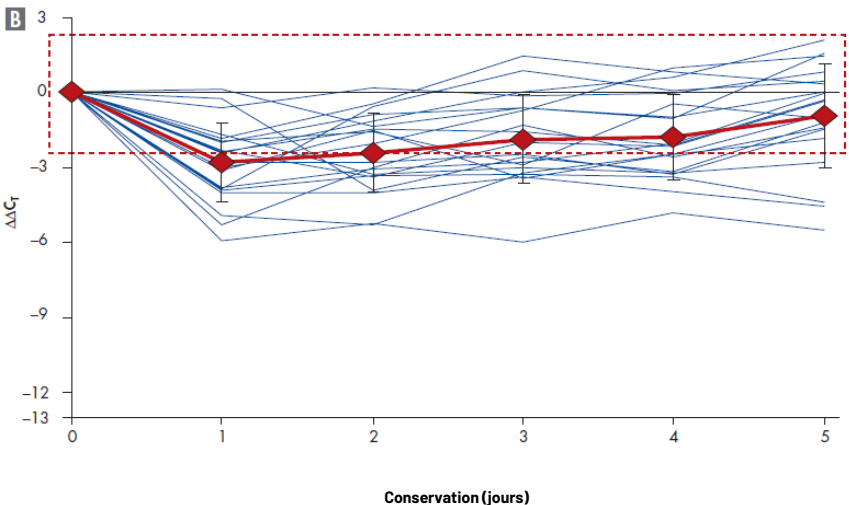
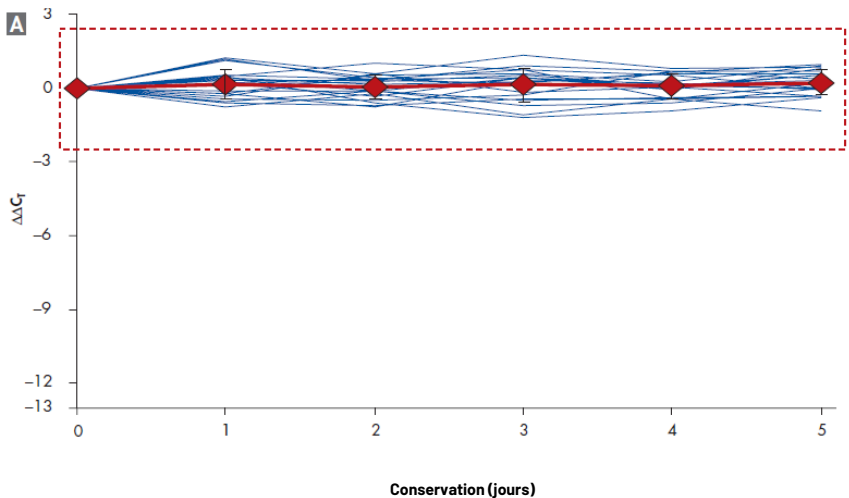


Figure 6 : Stabilité de l'ARN dans les échantillons sanguins entre 2 et 8 °C : FOS. Des échantillons de sang ont été prélevés sur 10 donneurs, en duplicats, et conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant la durée indiquée, avant l'isolation d'ARN total. **[A]** Le sang a été prélevé et conservé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). L'ARN total a été purifié à l'aide du PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** Les échantillons de sang ont été prélevés et conservés dans des tubes de prélèvement sanguin ordinaires, contenant de l'EDTA comme anticoagulant, et l'ARN total a été purifié en suivant une méthode d'isolation organique classique avec lavage de l'ARN sur membrane de silice. Les niveaux de transcription relatifs de FOS ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées dans un graphique avec leur moyenne et écart-type. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3x$ la précision totale du dosage ($2,34 C_T$).

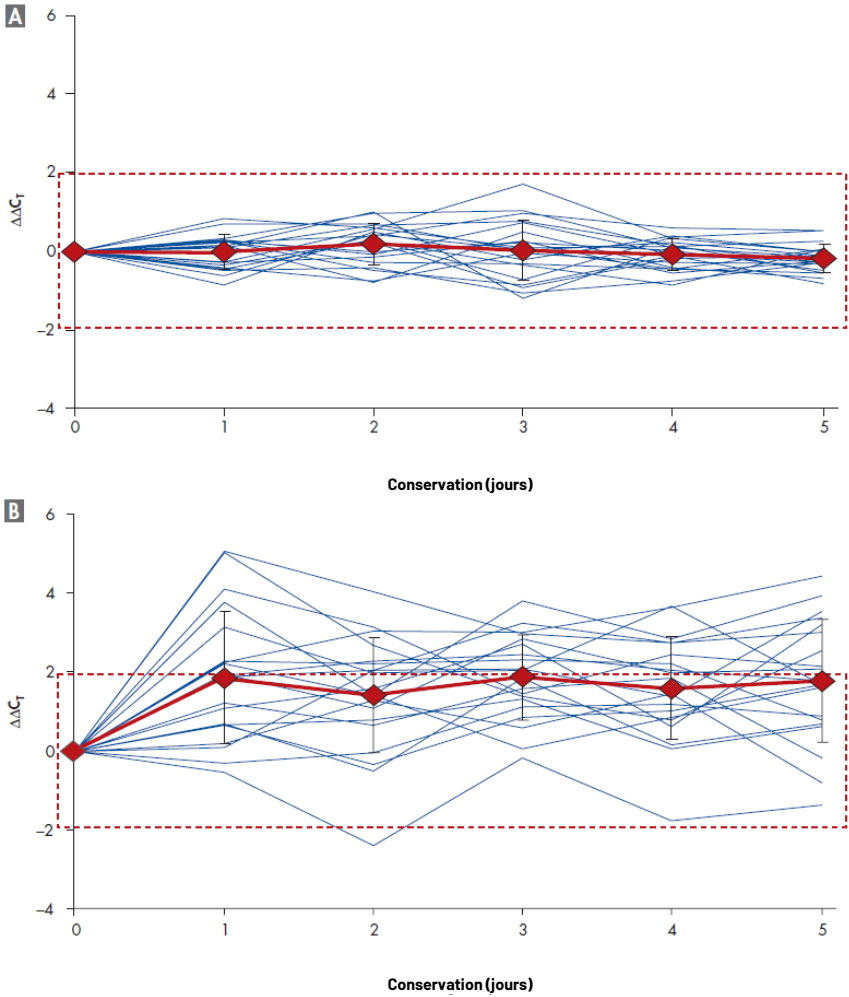


Figure 7 : Stabilité de l'ARN dans les échantillons sanguins entre 2 et 8 °C : IL1B. Le sang a été prélevé et l'ARN total purifié, après conservation à une température de 2 à 8 °C, comme décrit dans la figure 6. Les niveaux relatifs de transcription d'IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées dans un graphique avec leur moyenne et écart-type. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3 \times$ la précision totale du dosage (1,93 C_T).

Isolation manuelle de l'ARN

L'ARN total isolé avec le PAXgene Blood RNA System est pur. Avec le protocole manuel, le rapport A_{260}/A_{280} se situe entre 1,8 et 2,2 et une proportion d'ADN génomique $\leq 1\%$ (p/p) est présente dans $\geq 95\%$ des échantillons. Ces valeurs ont été mesurées par une real-time PCR quantitative d'une séquence du gène de l'actine bêta. Au moins 95 % des échantillons ne présentent aucune inhibition de la RT-PCR lorsque l'éluat compte pour un maximum de 30 % du volume réactionnel.

Avec le protocole manuel, la moyenne du temps de préparation d'un échantillon (selon les données d'un lot de 12 préparations d'échantillons) est d'environ 90 min*, dont seulement 40 min de manipulation. Le rendement en ARN obtenu avec 2,5 mL de sang total humain sain est $\geq 3\ \mu\text{g}$ pour $\geq 95\%$ des échantillons traités. Puisque les rendements dépendent fortement du donneur, les rendements individuels peuvent varier. Pour les différents donneurs, le PAXgene Blood RNA System offre des rendements en ARN reproductibles et répétables (figure 8 et figure 9, pages 47 et 48, respectivement) et des résultats de RT-PCR également reproductibles et répétables (figure 10 et figure 11, pages 52 et 53, respectivement), ce qui le rend parfaitement adapté aux tests de diagnostic clinique.

La figure 8 (page 47) illustre la répétabilité et la reproductibilité globales du PAXgene Blood RNA System. D'autres études ont été menées pour démontrer l'influence des différents lots du PAXgene Blood RNA Kit ainsi que des différents opérateurs sur la reproductibilité du rendement en ARN et sur les performances de la RT-PCR en temps réel. Puisque ces études ont été effectuées avec un pool d'échantillons sanguins et non avec des échantillons prélevés individuellement dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), les résultats ne reflètent pas la répétabilité du système, y compris les différences entre les prélèvements sanguins : ils reflètent uniquement la répétabilité de la préparation des échantillons (voir figure 9, page 48).

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

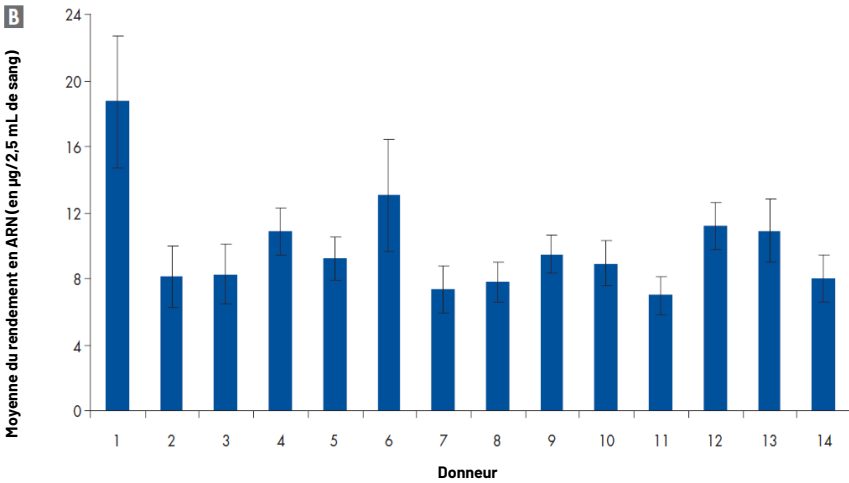
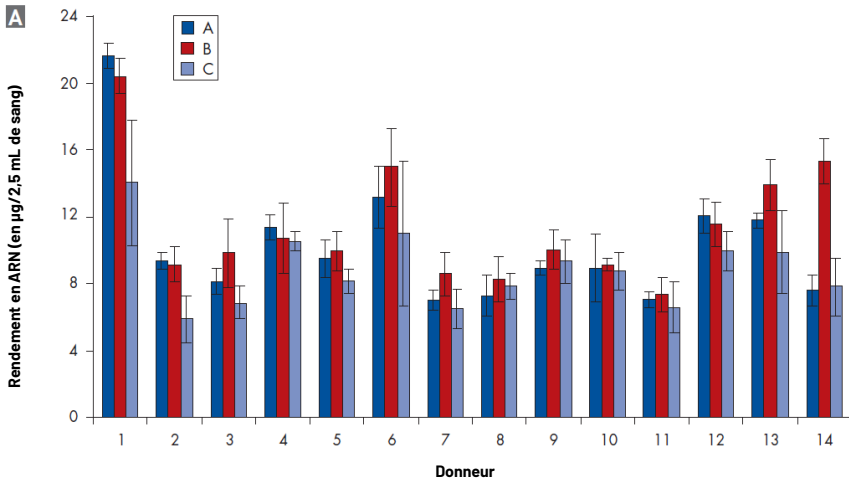


Figure 8 : Reproductibilité et répétabilité de l'isolation d'ARN. Des échantillons de sang en quatre exemplaires, prélevés sur 14 donneurs, ont été traités manuellement par chacun des 3 techniciens (A, B et C). Trois équipements ont été utilisés et tous les échantillons préparés par un même technicien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

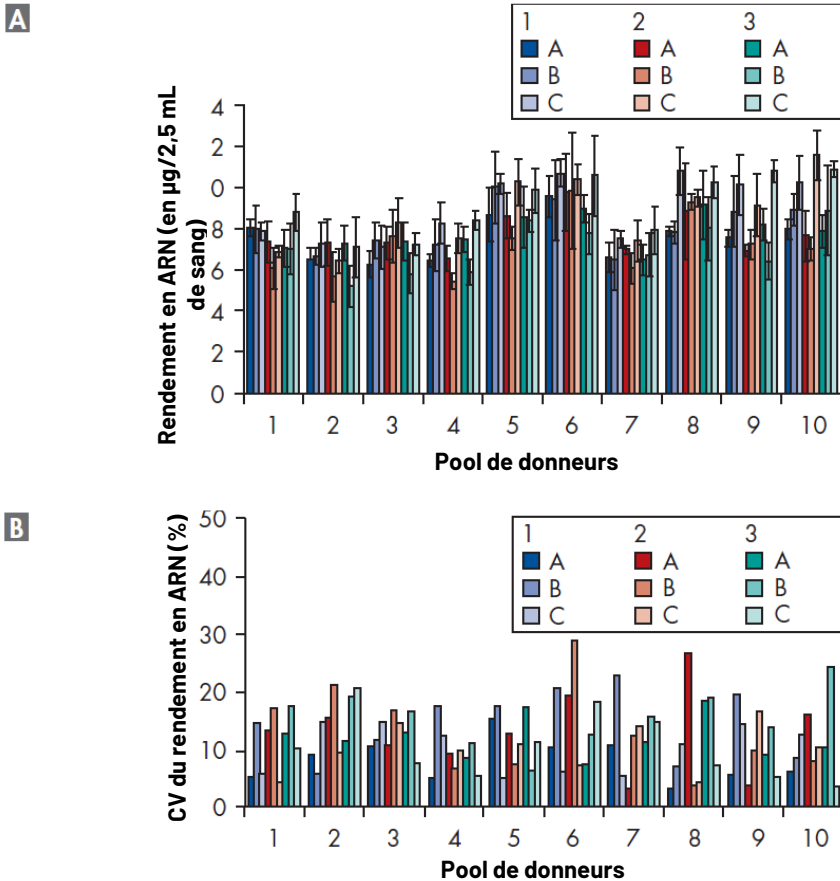


Figure 9 : Répétabilité et reproductibilité du rendement en ARN d'un pool d'échantillons sanguins avec différents opérateurs et différents lots de PAXgene Blood RNA Kit. Les échantillons sanguins de 30 donneurs différents ont été prélevés dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT ; 12 tubes par donneur, soit 360 tubes au total). Le contenu des tubes de 3 donneurs a été poolé puis réaliquoté en 36 échantillons. Ces 36 échantillons par pool de 3 donneurs ont été traités manuellement par 3 opérateurs différents. Chaque opérateur a utilisé 3 lots de PAXgene Blood RNA Kit différents pour l'isolation d'ARN et a traité des échantillons en quatre exemplaires de chacun des 10 pools de donneurs. **[A]** Rendement en ARN et écart-type pour chaque combinaison opérateur-lot. Les échantillons de sang en quatre exemplaires provenant de 10 pools de donneurs ont été traités par 3 opérateurs différents (A, B et C) avec chacun des 3 lots de kits (1, 2 et 3). Les rendements moyens (colonnes) et les écarts-types (barres d'erreur) sont indiqués pour chaque échantillon en quatre exemplaires du même pool de donneurs pour des opérateurs et lots de kits différents. **[B]** Coefficient de variation (CV) du rendement en ARN par pool de donneurs pour toutes les combinaisons opérateur-lot (A, B, C ; 1, 2, 3) calculé à partir de la moyenne et de l'écart-type du rendement représentés dans la figure 9A.

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

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

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

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

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

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

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

Combinaison des données	Pool de donneurs 1 ($5,1 \times 10^6$ cellules/mL)			Pool de donneurs 6 ($6,5 \times 10^6$ cellules/mL)		
	Rendement moyen (μg)	É-T (μg)	CV (%)	Rendement moyen (μg)	É-T (μg)	CV (%)
Lot 1, tous les techniciens	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Pool de donneurs 9 ($8,4 \times 10^6$ cellules/mL)			Pool de donneurs 10 ($10,2 \times 10^6$ cellules/mL)		
	Rendement moyen (μg)	É-T (μg)	CV (%)	Rendement moyen (μg)	É-T (μg)	CV (%)
Lot 1, tous les techniciens	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Analyse détaillée de 4 pools de donneurs représentatifs. Les pools ont été sélectionnés en fonction de la numérotation leucocytaire et reflètent les valeurs hautes, médianes et basses de la plage normale de numérotation leucocytaire ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucocytes/mL). La numérotation leucocytaire représente la valeur moyenne de 3 numérotations leucocytaires de 3 donneurs par pool de donneurs.

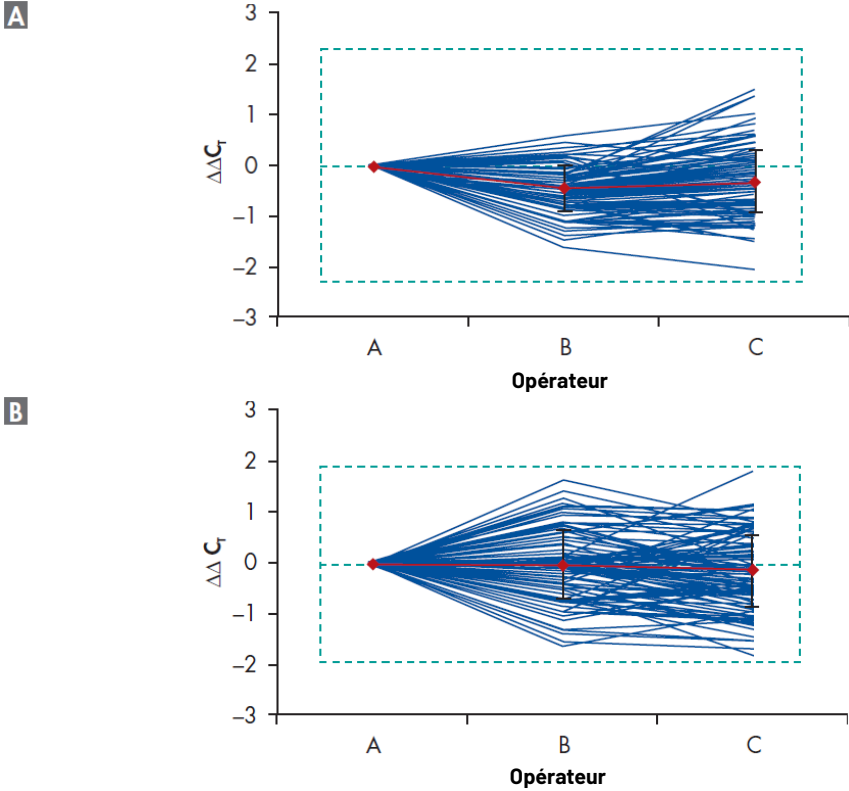


Figure 10 : Reproductibilité de la RT-PCR entre les opérateurs. L'ARN purifié au cours de l'analyse décrite dans la figure 9 a été utilisé pour une RT-PCR en temps réel. Les niveaux de transcription relatifs de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr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

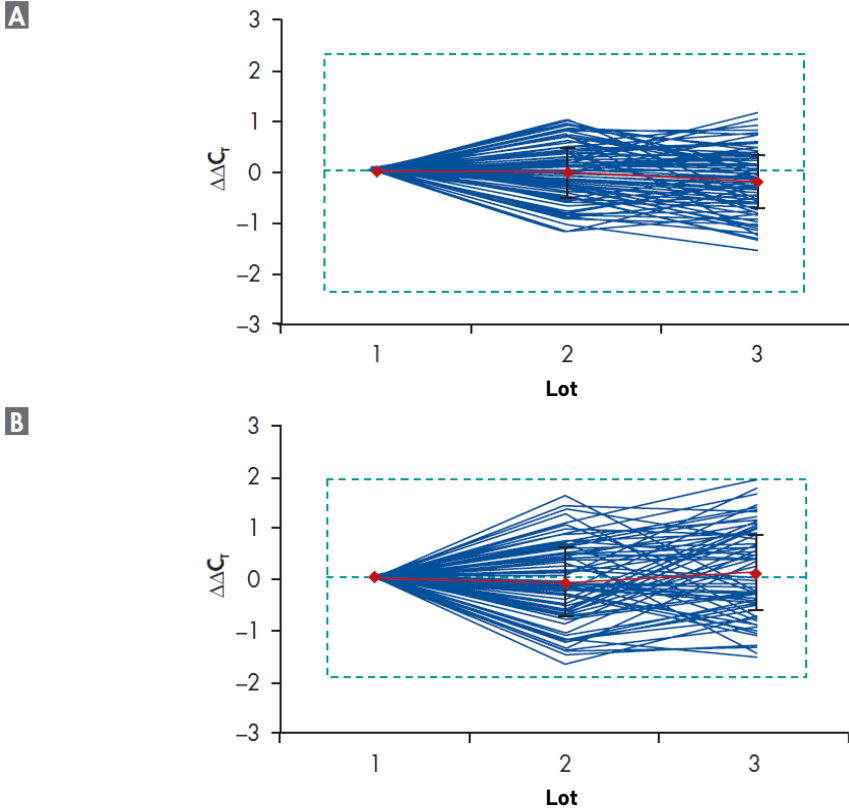


Figure 11 : Reproductibilité de la RT-PCR entre les lots du kit. L'ARN purifié au cours de l'analyse décrite dans la figure 9 a été utilisé pour une RT-PCR en temps réel. Les niveaux de transcription relatifs de [A] FOS et [B] IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, à l'aide d'ARNr 18S comme étalon interne. Les valeurs de tous les échantillons sont représentées graphiquement en fonction des valeurs pour le lot de kit 1 (10 pools de donneurs x 3 opérateurs x 4 réplicats = 120 jeux de données pour chaque gène), avec les moyennes (lignes rouges) et les écarts-types (barres noires) de tous les échantillons. Les lignes pointillées correspondent à $\pm 3 \times$ la précision totale des dosages (FOS : 2,34 C_T ; IL1B : 1,93 C_T).

Tableau 2 : Résumé des données de RT-PCR des figure 10 et figure 11

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

Opérateur : technicien de laboratoire ayant effectué l'analyse.

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

É-T : écart-type.

Les valeurs moyennes de $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) et les écarts-types sont indiqués pour les données représentées dans la figure 10 et la figure 11.

Isolation automatisée de l'ARN

Le rendement en ARN obtenu avec 2,5 mL de sang total humain sain est $\geq 3 \mu\text{g}$ pour $\geq 95 \%$ des échantillons traités. Figure 12 (page 55) indique les rendements en ARN sur un total de 216 échantillons préparés par 3 techniciens selon le protocole automatisé avec 3 lots du kit. Puisque ces études ont été effectuées avec des échantillons sanguins poolés et non avec des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuels, les résultats ne reflètent pas le rendement en ARN attendu avec des échantillons individuels de prélèvements sanguins. Puisque les rendements dépendent fortement des donneurs, les rendements individuels peuvent varier (figure 12, page 55).

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

L'ARN isolé avec le PAXgene Blood RNA System et le protocole automatisé est pur, comme l'indiquent l'absence d'inhibition de la RT-PCR et les valeurs du rapport A_{260}/A_{280} comprises entre 1,8 et 2,2. L'ADN génomique est présent à $\leq 1\%$ (p/p) dans $\geq 95\%$ des échantillons, comme le démontre la real-time PCR quantitative d'une séquence du gène de l'actine bêta. La figure 13 et la figure 14 (page 56) représentent le rapport A_{260}/A_{280} ainsi que l'ADN génomique relatif d'un total de 216 échantillons préparés à l'aide du protocole automatisé par 3 opérateurs avec 3 lots du kit.

Rendement en ARN ($\mu\text{g}/2,5\text{ mL}$ de sang) sur QIAcube Connect MDx

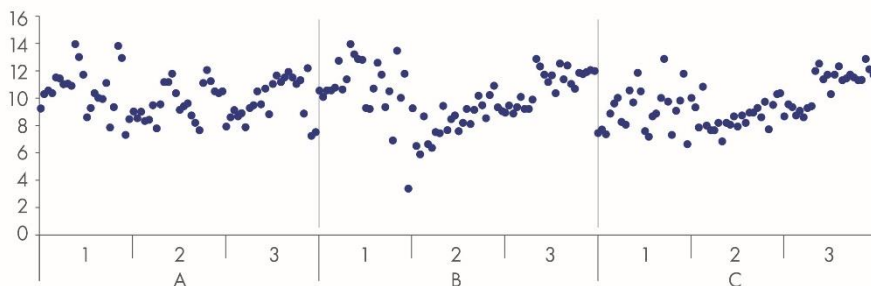


Figure 12 : Rendement en ARN – traitement automatisé avec le QIAcube Connect MDx. Les échantillons sanguins de donneurs individuels ont été prélevés dans des PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Le contenu des tubes a été poolé dans 6 pools de donneurs, puis réaliquoté. Un total de 216 tubes (c.-à-d. 36 par pool) a été traité par 3 opérateurs différents (A, B, C). Chaque opérateur a utilisé 3 lots différents (1, 2, 3) du PAXgene Blood RNA Kit pour l'isolation automatisée et a traité des échantillons en quatre exemplaires de chacun des pools de 6 donneurs sur le QIAcube Connect MDx. Les rendements en ARN de chaque échantillon sont présentés pour chaque combinaison opérateur-lot.

Pureté de l'ARN (A_{260}/A_{280}) sur QIAcube Connect MDx

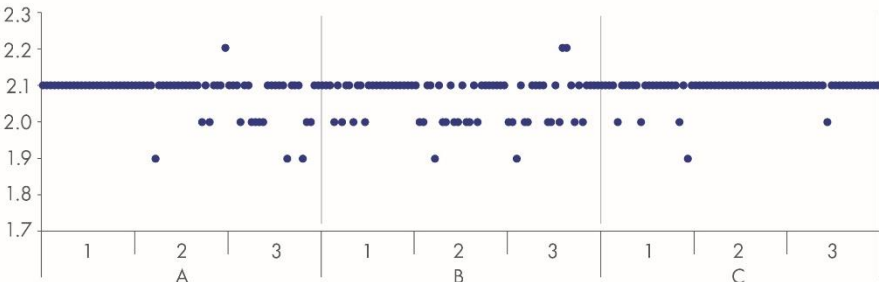


Figure 13 : Pureté de l'ARN (valeurs A_{260}/A_{280}) : traitement automatisé avec le QIAcube Connect MDx. L'ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) à l'aide de 3 lots différents (1, 2, 3) du PAXgene Blood RNA Kit et du QIAcube Connect MDx dans l'expérience décrite sous la Figure 12. Les valeurs du rapport A_{260}/A_{280} de tous les échantillons sont présentées pour chaque combinaison opérateur-lot.

ADN génomique (p/p)[%] sur QIAcube Connect MDx

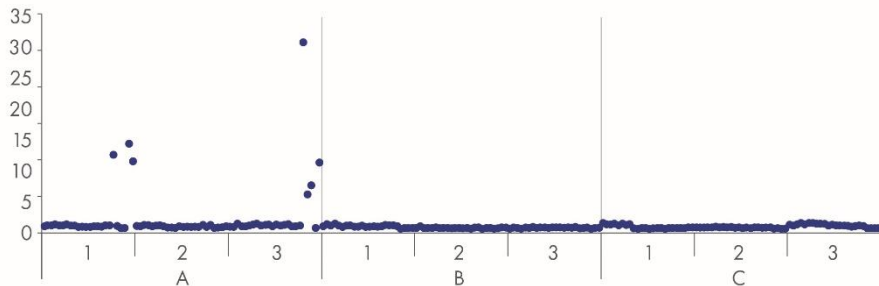


Figure 14 : Pureté de l'ARN (contamination par l'ADN génomique en %) dans la procédure automatisée avec le QIAcube Connect MDx. L'ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) à l'aide de 3 lots différents (1, 2, 3) du PAXgene Blood RNA Kit et du QIAcube Connect MDx dans l'expérience décrite sous la figure 12. Les quantités d'ADN génomique (p/p) de tous les échantillons sont présentées pour chaque combinaison opérateur-lot.

Le protocole automatique d'isolation de l'ARN avec le PAXgene Blood RNA System fournit des résultats de RT-PCR reproductibles et répétables, de sorte que le système est très adapté aux analyses cliniques et diagnostiques.

Stabilité de l'ARN isolé

Les échantillons d'ARN isolés à partir de PAXgene Blood RNA Tubes remplis de sang avec le PAXgene Blood RNA Kit sont stables pendant 5 ans à une température de -20°C et 7 ans à -70°C (en point final des études).

Remarques importantes

Utilisation du QIAcube Connect MDx

Veiller à bien savoir utiliser le QIAcube Connect MDx. Lire le mode d'emploi de l'instrument et toutes autres informations fournies avec l'instrument, en prêtant notamment attention aux informations de sécurité, avant de lancer les protocoles PAXgene Blood RNA automatiques.

Démarrage du QIAcube Connect MDx

Fermer le capot du QIAcube Connect MDx et allumer l'instrument à l'aide de l'interrupteur d'alimentation (voir figure 15, page 59).

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



Vue avant du QIAcube Connect MDx



Écran tactile déployé



Vue arrière du QIAcube Connect MDx (gauche)



Vue arrière du QIAcube Connect MDx (droite)

Figure 15 : Caractéristiques externes du QIAcube Connect MDx.

- | | |
|--|--|
| <p>① Écran tactile</p> <p>② Capot</p> <p>③ Tiroir à déchets</p> <p>④ Interrupteur d'alimentation</p> | <p>⑤ 2 ports USB du côté gauche de l'écran tactile ; 2 ports USB à l'arrière de l'écran tactile (module Wi-Fi branché à 1 port USB)</p> <p>⑥ Port Ethernet RJ-45</p> <p>⑦ Prise du câble d'alimentation</p> <p>⑧ Sortie d'air de refroidissement</p> |
|--|--|

Écran tactile

Le QIAcube Connect MDx est piloté à l'aide d'un écran tactile. L'écran tactile permet à l'opérateur d'utiliser l'instrument et le guide pendant la configuration du plan de travail. Durant le traitement des échantillons, l'écran tactile montre l'état du protocole et le temps restant.





Figure 16 : Écran tactile déployé du QIAcube Connect MDx.

Installation des protocoles sur le QIAcube Connect MDx

L'installation initiale d'un protocole peut être nécessaire avant de pouvoir exécuter le premier cycle de préparation d'ARN sur le QIAcube Connect MDx. Installer les protocoles « PAXgene Blood RNA Part A » (PAXgene Blood RNA – Partie A) et « PAXgene Blood RNA Part B » (PAXgene Blood RNA – Partie B).

Les protocoles pour le QIAcube Connect MDx sont disponibles sur **www.qiagen.com** et doivent être téléchargés sur la clé USB fournie avec l'instrument. Ces protocoles doivent ensuite être transférés sur l'instrument à l'aide du port USB.

Le port USB (situé derrière le panneau de l'écran tactile ; voir figure 15, page 59) permet de connecter la clé USB fournie avec l'instrument au QIAcube Connect MDx. Les fichiers de données, tels que les fichiers journaux ou fichiers de rapport, peuvent également être transférés de l'instrument vers la clé USB à l'aide du port USB.

-  Le port USB doit être utilisé uniquement avec la clé USB fournie par QIAGEN. Ne pas connecter d'autres périphériques sur ce port.
-  Ne pas retirer la clé USB pendant le téléchargement de protocoles, le transfert de fichiers de données ou l'exécution d'un protocole.


Pour plus de détails sur la façon de télécharger des protocoles sur le QIAcube Connect MDx, consulter le manuel de l'instrument.

Chargement du QIAcube Connect MDx

Pour gagner du temps, le chargement peut être réalisé au cours de l'une ou des deux étapes de centrifugation de 10 min (étapes 3 et 5) dans « Protocole : isolation automatique de l'ARN total à partir de sang total humain prélevé dans les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) », page 32.

Flacons de réactif

Avant chaque cycle sur le QIAcube Connect MDx, remplir soigneusement les 4 flacons de réactif avec les réactifs indiqués dans le tableau 3 (page 62) jusqu'à la marque de niveau maximal ou, si cela s'avère impossible, jusqu'au niveau que permettent d'atteindre les volumes de tampons fournis dans le PAXgene Blood RNA Kit. Marquer les flacons et les couvercles clairement avec les noms des tampons et placer les flacons de réactif remplis dans les positions appropriées du portoir pour flacons de réactif. Placer le portoir sur le plan de travail de l'instrument comme illustré (figure 17 et figure 18, pages 62 et 63, respectivement).

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

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

i Les volumes de tampon fournis dans le PAXgene Blood RNA Kit (50) sont suffisants pour un maximum de 7 cycles de préparations d'ARN sur le QIACube Connect MDx avec un nombre d'échantillons compris entre 2 et 12 par cycle. En général, les cycles comprenant un faible nombre d'échantillons par cycle doivent être évités afin de traiter un total de 50 échantillons par kit. La réalisation de plus de 7 cycles de préparation d'ARN peut entraîner un manque de tampons pour le traitement des derniers échantillons.

Tableau 3 : Positions sur le portoir pour flacons de réactif

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

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

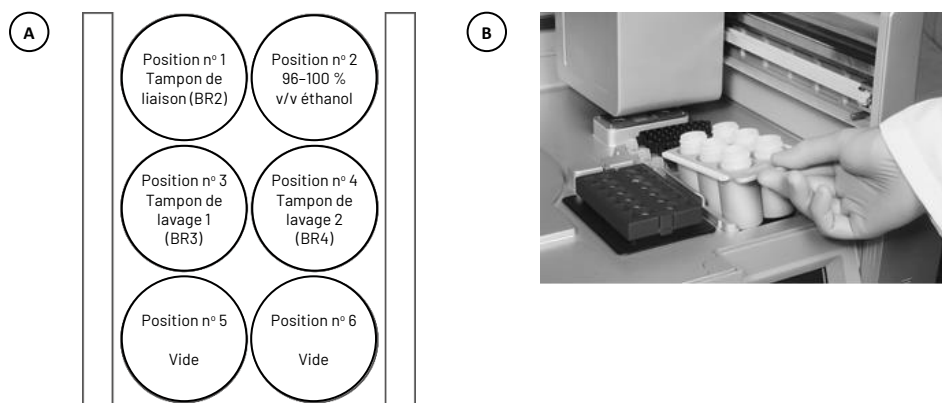


Figure 17 : Chargement du portoir pour flacons de réactif. [A] Schéma des positions et du contenu des flacons sur le portoir pour flacons de réactif. **[B]** Chargement du portoir dans le QIACube Connect MDx.

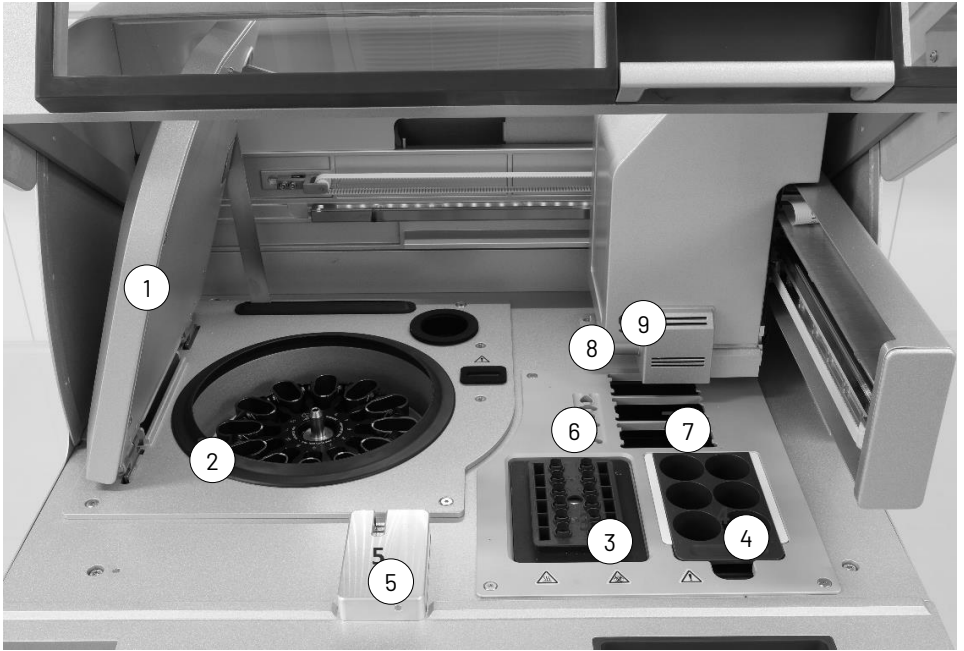


Figure 18 : Vue de l'intérieur du QIAcube Connect MDx.

- | | | | |
|---|--|---|---|
| 1 | Couvercle de la centrifugeuse | 6 | Emplacements de MCT |
| 2 | Centrifugeuse | 7 | 3 emplacements pour portoirs à pointes de pipette |
| 3 | Agitateur | 8 | Emplacements pour l'élimination des pointes de pipette et des colonnes |
| 4 | Reagent Bottle Rack | 9 | Bras robotisé (inclut un dispositif de pipetage à 1 canal, une pince, un capteur ultrasonique et optique ainsi qu'une LED UV) |
| 5 | Capteur de pointes de pipette et verrouillage du capot | | |

Colonnes de centrifugation (PSC, PRC), MCT et matériel en plastique du QIAcube Connect MDx

Placer 2 portoirs remplis avec des pointes de pipette à filtre de 1 000 μ L dans le QIAcube Connect MDx (voir figure 18, page 63). Remplir de nouveau les portoirs avec des pointes de pipette lorsque cela s'avère nécessaire.

i Utiliser uniquement des pointes de pipette à filtre de 1 000 μ L conçues pour utilisation avec le QIAcube Connect MDx.

Marquer les adaptateurs pour rotor et les MCT pour chaque échantillon à l'aide d'un stylo indélébile. Ouvrir les PSC à utiliser et couper le couvercle complètement à l'aide de ciseaux (voir la figure 19).

i Pour que la pince robotisée de l'instrument QIAcube Connect MDx fonctionne correctement, retirer complètement (couper) les couvercles et toutes les parties en plastique les reliant aux PSC (voir figure 19). Autrement, la pince robotisée ne peut pas saisir les PSC correctement.

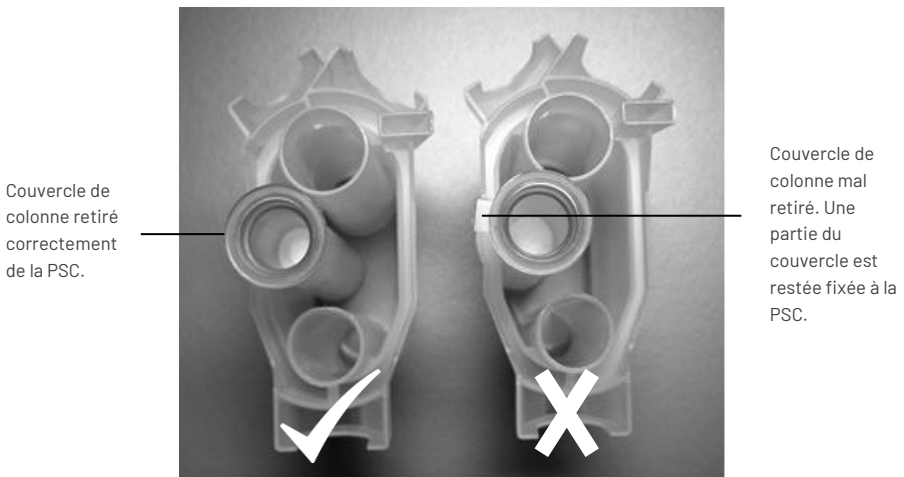


Figure 19 : Chargement de la PSC. La PSC est chargée en position médiane dans l'adaptateur pour rotor. Couper le couvercle avant de charger la colonne PSC.

Charger la PSC (sans couvercle, voir figure 19, page 64), la PRC et le MCT étiqueté dans les positions appropriées de chaque adaptateur pour rotor étiqueté, comme indiqué dans le tableau 4 et la figure 20.



S'assurer que les couvercles des colonnes de centrifugation (PRC) et du MCT sont enfoncés sur toute leur longueur au fond des emplacements, sur le bord de l'adaptateur pour rotor ; sinon, ils seront coupés pendant la centrifugation.

Tableau 4 : Consommables en plastique dans l'adaptateur pour rotor

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

* Utiliser les MCT (1,5 mL) inclus dans le PAXgene Blood RNA Kit.

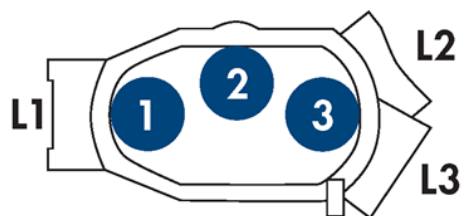


Figure 20 : Positions dans l'adaptateur pour rotor. L'adaptateur pour rotor possède trois positions de tube (1 à 3) et 3 positions de couvercles (L1 à L3).

Chargement de la centrifugeuse

Charger les adaptateurs pour rotor montés dans les godets de la centrifugeuse du QIAcube Connect MDx, comme illustré dans la figure 21 ci-dessous.



Si moins de 12 échantillons sont traités, veiller à charger le rotor de la centrifugeuse de manière équilibrée radialement (voir figure 22, page 67). Tous les godets de la centrifugeuse doivent être montés avant de lancer l'exécution du protocole, même s'il y a moins de 12 échantillons à traiter. Il est impossible de traiter un seul échantillon ou 11 échantillons.



Figure 21 : Chargement de la centrifugeuse sur le QIAcube Connect MDx. Charger les adaptateurs pour rotor montés dans les godets de la centrifugeuse.

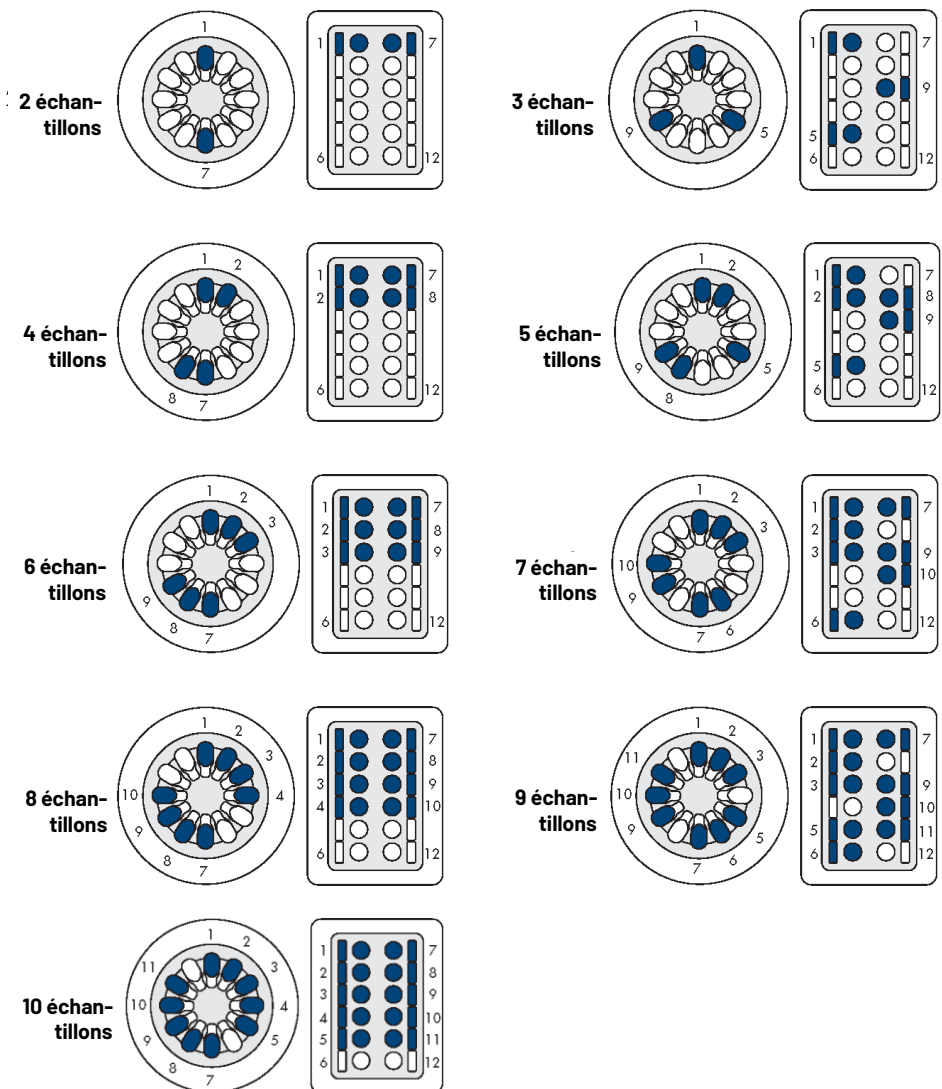


Figure 22 : Chargement de la centrifugeuse et de l'agitateur. Les positions de la centrifugeuse et de l'agitateur sont illustrées pour le traitement de deux (2) à dix (10) échantillons. Il est impossible de traiter un (1) ou 11 échantillons. Pour le traitement de 12 échantillons, toutes les positions de la centrifugeuse et de l'agitateur sont chargées (image non montrée).

Tubes de réaction

Retirer les PT laissés dans les emplacements du MCT après les cycles précédents (voir figure 18, page 63). Remplir 3 PT avec la quantité de réactifs indiquée dans le tableau 5 en fonction du nombre d'échantillons prévus dans le cycle.

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



Utiliser les PT de 2 mL inclus dans le PAXgene Blood RNA Kit. Marquer les tubes clairement avec le nom des réactifs et les placer en position appropriée dans les emplacements pour MCT, comme indiqué dans le tableau 6 (page 69).



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

Veiller à pipeter uniquement le volume requis, comme indiqué dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Volume de réactifs requis dans les PT pour les emplacements de MCT

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

Tableau 6 : Emplacements de MCT

	Position		
	A	B	C
Contenu	Protéinase K	Mélange d'incubation de la DNase I	Tampon d'éluion (BR5)
Tube	Tube de réaction*	Tube de réaction*	Tube de réaction*

* Utiliser les PT de 2 mL inclus dans le PAXgene Blood RNA Kit.

Mise au rebut

Pour une mise au rebut sûre après le prélèvement de l'échantillon et l'isolation manuelle de l'ARN, consulter les informations et précautions de sécurité aux pages 18 et 19, respectivement.

En outre, pour l'isolation automatisée de l'ARN à l'aide du QIAcube Connect MDx, consulter la figure 21 et la figure 22, pages 66 et 67 respectivement, en indiquant les emplacements dédiés pour les pointes et les colonnes utilisées pour la mise au rebut.

Références

Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. 48, 1883-90.






Sambrook J and Russell D W (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

International Organization for Standardization (2019) Molecular in vitro diagnostic examinations – Specifications for pre-examination processes for venous whole blood – Part 1: Isolated cellular RNA (ISO Standard No. 20186-1:2019).

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

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous permettre de résoudre les problèmes éventuels. Pour de plus amples informations, consulter également la page de la foire aux questions (Frequently Asked Questions, FAQ) dans notre Centre d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques du service technique QIAGEN seront ravis de répondre à toutes vos questions sur les informations et les protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosages (pour les coordonnées, voir la dernière page ou le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions	
ARN dégradé	
a) Contamination par RNases	 Veiller à ne pas contaminer les réactifs avec des RNases tout au long de la procédure de purification ou des analyses ultérieures (voir annexe A, page 77).
Faible rendement en ARN	
b) Moins de obtenu avec 2,5 mL de sang ont été collectés dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 S'assurer que avec 2,5 mL de sang sont prélevés dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT ; consulter le <i>manuel du PAXgene Blood RNA Tube</i>)
c) Concentration de l'ARN mesurée dans de l'eau	 L'ARN doit être dilué dans du Tris-Cl 10 mM, pH 7,5*, pour une quantification exacte (voir annexe B, page 79).
d) Débris cellulaires transférés dans la PRC aux étapes 9 et 10 du protocole manuel	 Éviter de transférer de larges particules au moment de pipeter le surnageant à l'étape 7 du protocole manuel (le transfert des petits débris n'affecte pas la procédure).
e) Le surnageant n'a pas été entièrement éliminé à l'étape 3	 S'assurer que tout le surnageant est éliminé. S'il est décanté, supprimer les gouttes du bord du PAXgene Blood RNA Tube (BRT) en le tamponnant sur une serviette en papier. Prendre les précautions appropriées afin d'éviter tout risque de contamination croisée.




* Lorsque vous manipulez des produits chimiques, portez toujours une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur des produits.

Commentaires et suggestions	
f) Après prélèvement dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT), le sang a été incubé pendant moins de 2 h	 Incuber le sang dans le PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pendant au moins 2 h après le prélèvement.
Valeur faible du rapport A_{260}/A_{280}	
g) De l'eau a été utilisée pour diluer l'ARN pour la mesure du rapport A_{260}/A_{280}	 Utiliser du Tris-Cl 10 mM, pH 7,5, pour diluer l'ARN avant de mesurer sa pureté* (voir annexe B, page 79).
h) Le spectrophotomètre n'a pas été correctement mis à zéro	 Pour la mise à zéro du spectrophotomètre, utiliser un blanc avec la même proportion de tampon d'éluion (BR5) et de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, que celle des échantillons à mesurer. Le tampon d'éluion (BR5) présente une forte absorbance à 220 nm, pouvant induire un bruit de fond élevé des valeurs d'absorbance si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement réglé.
Dysfonctionnement de l'appareil	
i) Le QIAcube Connect MDx n'a pas fonctionné correctement	Lire le <i>manuel d'utilisation du QIAcube Connect MDx</i> , en portant une attention particulière à la section sur le dépannage. S'assurer que l'instrument est correctement entretenu, comme expliqué dans le manuel d'utilisation.

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

Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et les étiquettes. Des symboles supplémentaires sont expliqués dans le Contenu du kit (page 6).

Symbole	Définition du symbole
V<N1>	Version <N1> du produit
 <N2>	Contient des réactifs pour <N2> tests
	Consulter le mode d'emploi
	À utiliser avant
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Numéro de référence
LOT	Numéro de lot
MAT	Référence produit
COMP	Composants
NUM	Numéro
KU	Unités Kunitz
ADD	Ajouter
CONT	Contient
RCNS	Reconstitué

DNase

Désoxyribonucléase I

EtOH

Éthanol

GITC

Isothiocyanate de guanidine

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Code article international



Limite de température



Limite de température maximale



Fabricant

EC REP

Représentant européen agréé conformément au règlement (UE) 2017/746



Remarque importante



Ajout d'éthanol

CE

Marquage CE. Ce produit est conforme aux exigences de la réglementation (UE) 2017/746 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

UDI

Identificateur unique d'appareil



Attention



AVERTISSEMENT : Surface chaude

Coordonnées

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

Pour bénéficier d'une assistance technique et obtenir plus d'informations, consultez notre Centre d'assistance technique à l'adresse **www.qiagen.com/Support**, appelez le 00800-22-44-6000 ou contactez l'un des Services techniques QIAGEN ou l'un de ses distributeurs locaux (voir la quatrième de couverture ou le site **www.qiagen.com**).

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

Manipulation de l'ARN



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

Manipulation générale



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

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

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

Quantification de l'ARN

Les concentrations en ARN doivent être déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm (A_{260}) dans un spectrophotomètre. Afin d'obtenir une mesure fiable, les valeurs doivent se trouver dans l'intervalle linéaire du spectrophotomètre. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 44 µg d'ARN par mL ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$). Cette relation est uniquement valable pour les mesures réalisées dans du Tris-HCl 10 mM pH 7,5.* Par conséquent, s'il est nécessaire de diluer l'échantillon d'ARN, cela doit être fait dans du Tris-HCl 10 mM. Comme expliqué ci-dessous (voir « Pureté de l'ARN », page 80), le rapport entre les valeurs d'absorbance à 260 et 280 nm permet d'estimer la pureté de l'ARN. Lors de la mesure des échantillons d'ARN, s'assurer que les cuvettes sont exemptes de RNase. Pour la mise à zéro du spectrophotomètre, utiliser un blanc avec la même proportion de tampon d'élution (BR5) et de tampon Tris-HCl que celle des échantillons à mesurer. Le tampon d'élution (BR5) présente une forte absorbance à 220 nm, pouvant induire un bruit de fond élevé des valeurs d'absorbance si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement réglé. Un exemple du calcul de la concentration et de la quantification en ARN est présenté ci-dessous.

* Lorsque vous manipulez des produits chimiques, portez toujours une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur des produits.

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

Pureté de l'ARN

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

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

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



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

Instructions pour retirer le bouchon BD Hemogard

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

Instructions pour la pose du bouchon secondaire BD Hemogard

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

Informations pour commander

Produit	Table des matières	N° de réf.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, tubes de traitement, DNase I exempte de RNase, réactifs et tampons exempts de RNase. À utiliser avec les PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tubes de prélèvement sanguin	762165
Produits complémentaires pouvant être commandés chez QIAGEN pour l'isolation automatisée de l'ARN sur QIAcube		
Starter Pack, QIAcube	Le pack comprend : portoirs pour flacons de réactif (3) ; bandes d'étiquettes pour portoir (8) ; pointes à filtre de 200 µL (1 024) ; pointes à filtre de 1 000 µL (1 024) ; pointes à filtre de 1 000 µL à grand diamètre (1 024) ; flacons de réactif de 30 mL (18) ; adaptateurs pour rotor (240) ; support d'adaptateur pour rotor	990395
Filter-Tips, 1 000 µL (1 024)	Pointes à filtres jetables, stériles, sur portoirs	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Reagent Bottles (réactif de 30 mL) avec couvercles ; paquet de 6 à utiliser avec le portoir pour flacons de réactif du QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Pour 240 préparations : 240 adaptateurs pour rotor jetables à utiliser avec le QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Portoir destiné à accueillir 6 flacons de réactif de 30 mL sur le plan de travail du QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Support pour 12 adaptateurs pour rotor jetables ; pour utilisation avec le QIAcube	990392

Produit	Table des matières	N° de réf.
Produits complémentaires pouvant être commandés chez BD pour le prélèvement sanguin avec les PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	Aiguille 21G, 0,75 pouce (0,8 x 19 mm), tube de 12 pouces (305 mm) avec raccord Luer ; 50 par boîte, 200 par carton	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	Aiguille 21G 3/4 pouces (0,8 x 19 mm), tube de 12 pouces (305 mm) avec adaptateur luer. 50/boîte, 200/carton	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Carton seulement pour diamètre de 13 mm et 16 mm ; 1 000/carton	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Tubes de 13 x 75 mm pour prélèvement de réactif de 4,0 mL avec bouchon BD Hemogard rouge et étiquette en papier ; 100/boîte, 1 000/carton	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	Tubes de 13 x 75 mm pour prélèvement de réactif de 3,0 mL avec bouchon BD Hemogard transparent et étiquette translucide ; 100/boîte, 1 000/carton	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	Tubes de 13 x 75 mm pour prélèvement de réactif de 3,0 mL avec bouchon BD Hemogard transparent et étiquette en papier ; 100/boîte, 1 000/carton	366703

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

Historique des révisions du document

Date	Changements
[R1], avril 2022	Première version IVDR
[R2], Février 2023	Modification de l'adresse de PreAnalytiX GmbH de « Feldbachstrasse » en « Garstligweg 8 ». Ajout de produits BD dans les informations pour commander. Réactualisation des informations de sécurité.

Remarques



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

**Better samples
More to explore**

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Pour en savoir plus, consulter : www.preanalytix.com

HB-3009-002 02/2023

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