

Instructions d'utilisation (Manuel) du QIAsymphony[®] DSP DNA Mini Kit (fiche de protocole)

Protocoles Tissue_LC_200_V7_DSP et Tissue_HC_200_V7_DSP

Version 2



Pour utilisation diagnostique in vitro

À utiliser avec les QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (192)



937236



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne

R1

La fiche de protocole disponibles sous forme électronique peut être trouvée sous l'onglet resource (ressources) de la page produit sur www.qiagen.com.

Informations générales

Le QIASymphony DSP DNA Kit est destiné à être utilisé dans le cadre de diagnostics in vitro.

Ces protocoles sont destinés à une purification d'ADN total à partir de tissus et de tissus fixés à la formaline et enrobés de paraffine (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) en utilisant le QIASymphony SP et le QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

En fonction du type d'échantillon, il est recommandé d'utiliser le protocole pour faible teneur (Low Content, LC) ou pour teneur élevée (High Content, HC). Les tissus donneront des rendements d'ADN accrus en étant traités avec le protocole pour teneur élevée, mais il est possible d'utiliser le protocole pour faible teneur, associé à un petit volume d'élution (50 µl), si une concentration d'ADN élevée est requise. Concernant le tissu FFPE, il est recommandé d'utiliser le protocole pour faible teneur.

Protocole pour faible teneur

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (réf. 937236)
Échantillons	Tissu FFPE et tissu* Jusqu'à 4 coupes de tissu FFPE, chacune ayant une épaisseur maximale de 10 µm, ou 8 coupes ayant une épaisseur maximale de 5 µm et une surface spécifique allant jusqu'à 250 mm ² , peuvent être combinées dans une préparation.
Nom du protocole	Tissue_LC_200_V7_DSP
Jeu de témoins d'analyse par défaut	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Volume d'élution	50 µl, 100 µl, 200 µl ou 400 µl
Version logicielle requise	Version 4.0 ou ultérieure
Configuration logicielle requise pour une utilisation IVD	Default Profile 1

* Consulter le protocole pour teneur élevée pour plus d'informations sur les échantillons tissulaires.

Protocole pour teneur élevée

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (réf. 937236)
Échantillons	Tissu Si aucune information sur le rendement escompté n'est disponible, il est recommandé de commencer avec 25 mg de matériel de prélèvement. En fonction du rendement obtenu, il est possible d'augmenter la taille de l'échantillon dans les préparations suivantes.
Nom du protocole	Tissue_HC_200_V7_DSP
Jeu de témoins d'analyse par défaut	ACS_TissueHLC_200_V7_DSP
Volume d'élution	50, 100, 200 ou 400 µl
Version logicielle requise	Version 4.0 ou ultérieure
Configuration logicielle requise pour une utilisation IVD	Default Profile 1

Matériel nécessaire, mais non fourni

Pour tous les types d'échantillon

- Tampon ATL, 4x 50 ml (référence 939016)
- Pour minimiser le contenu en ARN : DNase-free RNase A (solution-mère de 100 mg/ml)

Pour un tissu FFPE (déparaffinisation sans xylène)

- Solution de déparaffinage (référence 939018)

Pour un tissu FFPE (déparaffinisation avec du xylène)

- Xylène (99 à 100 %)
- Éthanol (96-100 %)*

Tiroir « Sample » (Échantillon)

Type d'échantillon	Tissu FFPE et tissu
Volume d'échantillon	220 µl (requis par échantillon, par protocole)*
Volume d'échantillon traité	200 µl
Tubes d'échantillon primaires	n/a
Tubes d'échantillon secondaires	Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire disponible dans l'onglet resource (ressources) sur la page du produit à l'adresse www.qiagen.com .
Inserts	Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire disponible dans l'onglet resource (ressources) sur la page du produit à l'adresse www.qiagen.com .

* Pour les protocoles à contenu élevé et faible, le système ne reconnaît pas si le volume de l'échantillon est inférieur à 220 µl car le transfert de l'échantillon est effectué sans détection du niveau de liquide. Il convient donc de s'assurer que le volume d'entrée d'échantillon est de 220 µl.

S.O. = sans objet.

Tiroir « Reagents and Consumables » (Réactifs et consommables)

Position A1 et/ou A2	Cartouche de réactif (RC)
Position B1	S.O.
Support de portoir à cônes 1-17	Pointes à filtre jetables, 200 µl ou 1 500 µl
Support de boîtes 1-4	Boîtes contenant des cartouches de préparation d'échantillons ou 8-Rod Covers

S.O. = sans objet.

* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé car il contient d'autres substances, telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

Tiroir « Waste » (Déchets)

Support de boîtes 1-4

Vider les boîtes

Support pour sac-poubelle

Sac-poubelle

Support pour flacon à déchets liquides

Flacon à déchets liquides vide

Tiroir « Eluate » (Éluat)

Portoir d'éluat (il est recommandé d'utiliser la fente 1, position de refroidissement)

Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com.

Matériel en plastique requis

Matériel en plastique	Un lot 24 échantillons*	Deux lots 48 échantillons*	Trois lots 72 échantillons*	Quatre lots 96 échantillons*
Disposable filter-tips, 200 µl†	26	50	74	98
Disposable filter-tips, 1500 µl†	72	136	200	264
Sample prep cartridges§	21	42	63	84
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

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

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

‡ Le nombre de pointes à filtre requises correspond à 1 inventaire par RC.

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

¶ Il y a douze manchons pour 8-Rod Covers/boîte.

Remarque : les nombres de pointes à filtre indiqués peuvent différer des nombres affichés sur l'écran tactile en fonction des paramètres. Il est recommandé de charger le nombre maximal de cônes possible.

Volume d'éluat

Le volume d'éluat est sélectionné sur l'écran tactile. En fonction du type d'échantillon et de la teneur en ADN, le volume final peut varier jusqu'à un volume inférieur de 15 µl par rapport au volume sélectionné. En raison de l'éventuelle variation du volume d'éluat, il est recommandé de vérifier le volume d'éluat réel lors de l'utilisation d'un système de préparation automatisée des dosages, qui ne vérifie pas le volume d'éluat avant le transfert. Une éluat en volumes plus petits augmente la concentration d'ADN finale, mais diminue légèrement le rendement. Il est recommandé d'utiliser un volume d'éluat approprié pour l'application prévue en aval.

Préparation des échantillons

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

Pour des recommandations générales sur la collecte, le transport et le stockage, se référer à la ligne directrice approuvée du CLSI MM13-A « Collecte, transport, préparation et stockage des échantillons pour les méthodes moléculaires ».

Étapes préliminaires

- Vérifier l'absence de précipité blanc dans le tampon ATL. Si nécessaire, procéder à une incubation pendant 30 minutes à 37 °C en secouant occasionnellement pour dissoudre le précipité.
- Régler un thermomixeur ou un agitateur-incubateur à la température requise pour le prétraitement respectif.

Tissus

Des tissus frais ou congelés peuvent être utilisés pour la purification d'ADN. Le rendement et la qualité d'ADN dépendront du type de tissu, de la source et des conditions de stockage. Un tissu frais peut être découpé en petits morceaux et stocké à une température de -20 °C ou de -80 °C avant traitement. En général, il est recommandé d'utiliser le protocole pour teneur élevée qui donnera des rendements d'ADN accrus. Le protocole pour faible teneur, associé au volume d'élution de 50 µl, n'est recommandé que si des concentrations d'ADN élevées sont nécessaires pour une analyse en aval. Si aucune information sur le rendement escompté n'est disponible, il est recommandé de commencer avec 25 mg de matériel de prélèvement en utilisant le protocole pour teneur élevée et le volume d'élution de 200 µl. En fonction du rendement obtenu, il est possible d'augmenter la taille de l'échantillon ou de diminuer le volume d'élution dans les préparations suivantes. Garder à l'esprit qu'une surcharge de préparations combinée à de petits volumes d'élution peut entraîner des résidus de particules magnétiques dans l'éluat et pourrait compromettre la pureté de l'ADN et l'analyse en aval.

Remarque : lorsque l'on travaille avec des échantillons de tissus congelés, il convient tenir compte de la norme ISO 20184-3:2021 (E) pour l'extraction automatisée de AN à partir d'échantillons de tissus congelés.

Remarque : la stabilité de l'échantillon dépend fortement de divers facteurs et est liée à l'application spécifique en aval. Il incombe à l'utilisateur de consulter le mode d'emploi de l'application en aval spécifique utilisée dans son laboratoire et/ou de valider l'ensemble de la procédure pour établir des conditions de stockage appropriées.

Protocole de prétraitement pour un tissu

1. Transférer l'échantillon de tissu vers un tube de microcentrifugation de 2 ml (non fourni).
2. Ajouter 220 µl de tampon ATL.
3. Ajouter 20 µl de protéinase K et mélanger en tapotant le tube.

Remarque : utiliser la protéinase K provenant du portoir de tubes d'enzyme du QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Placer le tube dans un thermomixeur ou un agitateur-incubateur et l'incuber à une température de 56 °C en l'agitant à une vitesse de 900 tr/min jusqu'à ce que le tissu soit complètement lysé.

Remarque : le temps de lyse varie en fonction du type de tissu traité. Pour la plupart des tissus, la lyse est achevée en l'espace de 3 heures. Si la lyse est inachevée après 3 heures, comme l'indique la présence de substances insolubles ou de lysats très visqueux, le temps de lyse peut être prolongé ou les substances insolubles peuvent être éliminées par centrifugation comme décrit à l'étape 6. Une lyse jusqu'au lendemain est possible et n'affecte en rien la préparation.

5. Pour minimiser la teneur en ARN dans l'échantillon, ajouter 4 µl de RNase A (100 mg/ml) et incuber pendant 2 min à température ambiante (15 à 25 °C) avant de poursuivre avec l'étape 6.
6. Homogénéiser l'échantillon en le pipetant de manière répétée.

Remarque : si des morceaux de matière insoluble sont encore présents, centrifuger à 3 000 x g pendant 1 min.

7. Transférer avec soin 220 µl du surnageant dans des tubes d'échantillon qui sont compatibles avec le porte-tubes du QIASymphony SP.
8. Pour une liste complète des tubes à échantillons compatibles, consulter la liste des produits de laboratoire sur www.qiagen.com. Il est recommandé d'utiliser des tubes de 2 ml (par exemple, Sarstedt, n° de réf. 72.693 ou 72.608). 0.

Tissu FFPE

Les procédures standard FFPE entraînent toujours une fragmentation significative des acides nucléiques. Pour limiter l'étendue de la fragmentation d'ADN, veiller à :

- Fixer les échantillons tissulaires dans de la formaline à 4–10 % aussi rapidement que possible après l'ablation chirurgicale
- Utiliser un temps de fixation de 14 à 24 heures (des temps de fixation plus longs provoquent une fragmentation plus élevée de l'ADN, ce qui se traduit par de mauvaises performances lors des analyses en aval)
- Déshydrater soigneusement les échantillons avant de les enrober (la formaline résiduelle peut inhiber la digestion par la protéinase K)

L'échantillon de départ pour la purification de l'ADN doit être des coupes fraîchement préparées de tissu FFPE. Jusqu'à 4 coupes, chacune ayant une épaisseur maximale de 10 µm, ou 8 coupes ayant une épaisseur maximale de 5 µm et une surface spécifique allant jusqu'à 250 mm², peuvent être traitées dans une préparation. Si l'on ne dispose pas d'informations sur la nature du matériau de départ, nous vous recommandons de ne pas commencer avec plus de 3 sections dans une seule préparation. En fonction du rendement et de la pureté de l'ADN, il peut être possible d'utiliser jusqu'à 8 coupes dans les préparations suivantes.

Remarque : lorsqu'on travaille avec des tissus FFPE, il convient tenir compte de la norme ISO 20166-3:2018 (E) pour l'extraction automatisée d'AN à partir d'échantillons de tissus FFPE pour obtenir des informations supplémentaires sur la manipulation des échantillons.

Remarque : les protocoles pour tissu FFPE sont spécialement conçus pour n'entraîner que de faibles quantités d'ARN par co-purification. Il en résultera une valeur de mesure photométrique plus faible en comparaison des valeurs obtenues avec le QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit manuel.

Protocole de prétraitement pour un tissu FFPE

Méthode 1 : déparaffinisation à l'aide de la solution de déparaffinisation

1. À l'aide d'un scalpel, découper la paraffine en excès du bloc d'échantillon.
2. Effectuer jusqu'à 4 coupes d'une épaisseur de 10 µm ou jusqu'à 8 coupes d'une épaisseur de 5 µm.
Remarque : si la surface de l'échantillon a été exposée à l'air, mettre au rebut les 2-3 premières coupes.
3. Placer immédiatement les coupes dans un tube Sarstedt de 2 ml (non fourni, référence 72.693 ou 72.608) qui est compatible avec le porte-tubes du QIASymphony SP.
4. Ajouter 200 µl de Buffer ATL aux coupes.
5. Ajouter 20 µl de protéinase K.
Remarque : utiliser la protéinase K provenant du portoir de tubes d'enzyme du QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Ajouter 160 µl ou 320 µl d'une solution de déparaffinage (voir le tableau ci-après) et mélanger par vortexage.

Épaisseur des coupes	Nombre de coupes	Volume de Déparaffinization Solution
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Placer le tube dans un mélangeur chauffant ou un agitateur-incubateur et l'incuber à 56 °C pendant 1 h en l'agitant à 1 000 tr/min jusqu'à ce que les tissus soient complètement lysés.

Remarque : le temps de lyse varie en fonction du type de tissu traité. Pour la plupart des tissus, la lyse est achevée en l'espace de 1 heures. Si la lyse est inachevée après 1 heures, comme l'indique la présence de substances insolubles, le temps de lyse peut être prolongé ou les substances insolubles peuvent être sédimentées par centrifugation comme décrit à l'étape 10. Une lyse jusqu'au lendemain est possible et n'affecte en rien la préparation.

8. Procéder à une incubation à 90 °C pendant 1 h.

Remarque : l'incubation à 90 °C dans un Buffer ATL inverse partiellement la modification des acides nucléiques induite par le formaldéhyde. Des temps d'incubation plus longs ou des températures d'incubation plus élevées peuvent générer davantage d'ADN fragmenté. En cas d'utilisation d'un seul bloc chauffant, laisser l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C jusqu'à ce que le bloc chauffant ait atteint 90 °C.

9. Afin de limiter le contenu en ARN dans l'échantillon, ajouter 2 µl de RNase A (100 mg/ml) à la phase inférieure et incuber 2 min à température ambiante avant de passer à l'étape 10. Laisser l'échantillon revenir à température ambiante avant d'ajouter la RNase A.

10. Centrifuger à vitesse maximale pendant 1 min à température ambiante.

11. Transférer avec soin les tubes (contenant les deux phases) vers le porte-tubes du QIASymphony SP.

Méthode 2 : déparaffinisation au xylène

1. À l'aide d'un scalpel, découper la paraffine en excès du bloc d'échantillon.

2. Effectuer jusqu'à 4 coupes d'une épaisseur de 10 µm ou jusqu'à 8 coupes d'une épaisseur de 5 µm.

Remarque : si la surface de l'échantillon a été exposée à l'air, mettre au rebut les 2-3 premières coupes.

3. Placer immédiatement les coupes dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ou 2 ml (non fourni) et ajouter 1 ml de xylène à l'échantillon. Fermer le capuchon et mélanger énergiquement au vortex pendant 10 s.

4. Centrifuger à vitesse maximale pendant 2 min à température ambiante.

5. Retirer le surnageant par pipetage. Veiller à ne pas aspirer le culot.

6. Ajouter 1 ml d'éthanol (96 à 100 %) au culot et mélanger le tout par vortexage.

Remarque : l'éthanol extrait le xylène résiduel de l'échantillon.

7. Centrifuger à vitesse maximale pendant 2 min à température ambiante.

8. Retirer le surnageant par pipetage. Veiller à ne pas aspirer le culot.

Remarque : aspirer avec précaution tout l'éthanol résiduel à l'aide d'une pointe de pipette fin.

9. Ouvrir le tube et incuber à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 10 min ou jusqu'à ce que tout l'éthanol résiduel soit évaporé.

Remarque : l'incubation peut être effectuée à des températures allant jusqu'à 37 °C.

10. Mettre en suspension le culot dans 220 µl de tampon ATL.

11. Ajouter 20 µl de protéinase K et mélanger par vortexage.

Remarque : utiliser la protéinase K provenant du portoir de tubes d'enzyme du QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

12. Incuber à 56 °C pendant 1 h (ou jusqu'à ce que l'échantillon ait été complètement lysé).

Remarque : le temps de lyse varie en fonction du type de tissu traité. Pour la plupart des tissus, la lyse est achevée en l'espace de 1 heures. Si la lyse est inachevée après 1 heures, comme l'indique la présence de substances insolubles, le temps de lyse peut être prolongé ou les substances insolubles peuvent être éliminées par centrifugation comme décrit à l'étape 16. Une lyse jusqu'au lendemain est possible et n'affecte en rien la préparation.

13. Procéder à une incubation à 90 °C pendant 1 h.

Remarque : l'incubation à 90 °C dans un Buffer ATL inverse partiellement la modification des acides nucléiques induite par le formaldéhyde. Des temps d'incubation plus longs ou des températures d'incubation plus élevées peuvent générer davantage d'ADN fragmenté. En cas d'utilisation d'un seul bloc chauffant, laisser l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C jusqu'à ce que le bloc chauffant ait atteint 90 °C.

14. Centrifuger brièvement l'échantillon, afin de chasser les gouttes présentes dans le capuchon.

15. Pour minimiser la teneur en ARN dans l'échantillon, ajouter 2 µl de RNase A (100 mg/ml) et incubé pendant 2 min à température ambiante avant de poursuivre avec l'étape 16. Laisser l'échantillon revenir à température ambiante avant d'ajouter la RNase A.

16. Transférer avec soin 220 µl du lysat dans des tubes d'échantillon qui sont compatibles avec le porte-tubes du QIA Symphony SP.

Remarque : si les lysats contiennent du matériel de prélèvement non digéré, procéder à une centrifugation à pleine vitesse pendant 2 min à température ambiante avant de transférer le surnageant dans les tubes d'échantillon. Pour une liste complète des tubes d'échantillons compatibles, consulter la liste des produits de laboratoire sur www.qiagen.com. Il est recommandé d'utiliser des tubes de 2 ml (par exemple, Sarstedt, n° de réf. 72.693 ou 72.608).

Stockage des éluats

Il est recommandé de retirer la plaque d'éluats du tiroir « Eluate » (Éluat) dès la fin du cycle. Les plaques d'élution peuvent être laissées dans le QIA Symphony SP après la fin du cycle si celui-ci se termine au cours de la nuit (12 heures au maximum, durée du cycle comprise ; conditions environnementales recommandées : 18–26 °C et 20–75 % d'humidité relative). Selon la température et le taux d'humidité, l'éluat peut subir une condensation ou une évaporation.

Pour un stockage à court terme, les éluats peuvent être conservés à température ambiante jusqu'à 2 semaines. Pour un stockage à long terme, nous recommandons un stockage entre 2 et 8 °C, -20 °C ou -80 °C.

Remarque : la stabilité de l'éluat dépend fortement de divers facteurs et est liée à l'application spécifique en aval. Elle a été établie pour le QIA Symphony DSP DNA Mini Kit en conjonction avec des applications exemplaires en aval. Il incombe à l'utilisateur de consulter le mode d'emploi de l'application en aval spécifique utilisée dans son laboratoire et/ou de valider l'ensemble de la procédure pour établir des conditions de stockage appropriées.

Remarque préliminaire importante

- Les particules magnétiques du QIA Symphony entraînent la co-purification de l'ARN et de l'ADN si tous deux sont présents dans l'échantillon. Si de l'ADN sans ARN est requis, ajouter de la RNase A à l'échantillon à l'étape indiquée dans le protocole de prétraitement respectif.





Limites et substances interférentes

Lors du développement du QIAasymphony DSP DNA Mini Kit, aucune substance interférente n'a été identifiée comme ayant un impact négatif sur la préparation de l'échantillon.

Remarque : des tests ont été effectués en utilisant des applications exemplaires en aval pour une évaluation de la qualité des acides nucléiques extraits. Cependant, différentes applications en aval peuvent avoir des exigences différentes en matière de pureté (c'est-à-dire l'absence de substances interférentes potentielles), de sorte que l'identification et le test des substances pertinentes doivent également être établis dans le cadre du développement de l'application en aval pour toute procédure impliquant les QIAasymphony DSP DNA Mini Kits.

Symboles

Les symboles suivants apparaissent dans ce document. Pour une liste complète des symboles utilisés dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et l'étiquetage, se reporter au manuel.

Symbole	Définition du symbole
	Ce produit est conforme aux exigences de la réglementation européenne 2017/746 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Fabricant

Historique des révisions

Révision	Description
R1, juin 2022	Version 2, révision 1 <ul style="list-style-type: none">Mise à jour de la version 2 pour la conformité à l'IVDAjout de la section Limitations et substances interférentesAjout de la section Stockage des éluatsAjout d'une section SymbolesMise à jour de la section Préparation du matériel de prélèvement

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 QIAGEN® correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group) ; BD™ (Becton Dickinson and Company) ; Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Les noms déposés, marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.
06/2022 HB-3029-S07-001 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.