

Août 2015

Fiche de protocole du QIAasymphony® SP

Tissue_LC_200_V7_DSP et
Tissue_HC_200_V7_DSP (validé par les utilisateurs
pour le kit QIAasymphony DSP DNA Mini)

Ce document est la fiche de protocole du *Tissue_LC_200_V7_DSP* et du *Tissue_HC_200_V7_DSP*
(validée par les utilisateurs pour le kit QIAasymphony DSP DNA Mini) sur le QIAasymphony SP, R1,
pour la version de kit n° 1.

Informations générales

Ces protocoles sont destinés à une purification d'ADN total à partir de cultures cellulaires et de cultures bactériennes en utilisant le QIAasymphony® SP et le kit QIAasymphony DSP DNA Mini.

En fonction du type d'échantillon, il est recommandé d'utiliser le protocole pour faible teneur (LC) ou pour teneur élevée (HC). Les cultures de cellules et de bactéries 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.

Le kit QIAasymphony DSP DNA Mini, associé aux protocoles Tissue_LC_200_V7_DSP et Tissue_HC_200_V7_DSP (validés par les utilisateurs pour le kit QIAasymphony DSP DNA Mini) pour la purification d'ADN total à partir de cultures cellulaires et de cultures bactériennes, est prévu pour des applications de biologie moléculaire. Le produit n'est pas destiné au diagnostic, à la prévention ou au traitement d'une maladie.

Remarque : Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider les performances en utilisant cette association pour toute procédure utilisée dans son laboratoire.

Protocole pour faible teneur

Kit	Kit QIAasymphony DSP DNA Mini (référence 937236)
Matériel de prélèvement	Cellules cellulaires et cultures bactériennes Tailles d'échantillon maximales recommandées : Pour les cultures cellulaire, 5×10^6 cellules Pour les cultures bactériennes, 1×10^9 cellules
Nom du protocole	Tissue_LC_200_V7_DSP
Jeu de contrôles 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

Protocole pour teneur élevée

Kit	Kit QIAasymphony DSP DNA Mini (référence 937236)
Matériel de prélèvement	Cellules cellulaires et cultures bactériennes Tailles d'échantillon maximales recommandées : Pour les cultures cellulaire, 1×10^7 cellules Pour les cultures bactériennes, 4×10^9 cellules
Nom du protocole	Tissue_HC_200_V7_DSP
Jeu de contrôles d'analyse par défaut	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Volume d'élution	100 µl, 200 µl ou 400 µl
Version logicielle requise	Version 4.0

Matériel nécessaire mais non fourni

Pour tous les types d'échantillon

- Pour réduire la teneur en ARN : RNase A (solution mère à 100 mg/ml) (référence 19101)

Pour les bactéries à Gram négatif

- Tampon ATL (référence 19076)

Pour les bactéries à Gram positif

- Tampon P1 (référence 19051)
- Lysozyme (solution mère à 100 mg/ml)

Pour les cultures cellulaires

- Tampon P1 (référence 19051)

Tiroir « Sample » (Échantillon)

Type d'échantillon	Cellules cellulaires et cultures bactériennes
Volume d'entrée 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	Voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks pour plus d'informations.
Éléments d'insertion	Dépendants du type de tube d'échantillon utilisé ; pour plus d'informations, voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

* Pour les deux protocoles à teneur élevée et à faible teneur, le système ne sera pas capable de déterminer si le volume d'échantillon est inférieur à 220 µl, car le transfert d'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.

n/a = non applicable.

Tiroir « Reagents and Consumables » (Réactifs et consommables)

Position A1 et/ou A2	Cartouche de réactifs
Position B1	n/a
Support de portoir de cônes 1 à 17	Cônes munis de filtre jetables, 200 µl ou 1 500 µl
Support de boîte d'unités 1 à 4	Boîtes d'unités contenant des cartouches de préparation d'échantillons ou des manchons pour 8 barreaux

n/a = non applicable.

Tiroir « Waste » (Poubelle)

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

Tiroir « Eluate » (Éluat)

Portoir d'éluat (il est recommandé d'utiliser le slot 1, position de refroidissement)	Voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks pour plus d'informations.
--	---

Matériel en plastique requis

Matériel en plastique	Un lot, 24 échantillons*	Deux lots, 48 échantillons*	Trois lots, 72 échantillons*	Quatre lots, 96 échantillons*
Cônes à filtre jetables, 200 µl†	26	50	74	98
Cônes à filtre jetables, 1 500 µl†	72	136	200	264
Cartouches de préparation d'échantillons§	21	42	63	84
Manchons pour 8 barreaux¶	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 à filtre/par portoir.

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

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

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

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

Volume d'élution

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

Préparation de matériel de prélèvement

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

Remarque importante avant de commencer

- Les particules magnétiques du QIAasymphony entraînent la co-purification de l'ARN et de l'ADN si tous deux sont présents dans l'échantillon. Afin de minimiser le contenu en ARN dans l'échantillon, ajouter de la RNase A à l'échantillon à l'étape indiquée dans le protocole de pré-traitement respectif.

Avant de commencer

- Si le tampon ATL est utilisé, vérifier qu'il ne contient pas de précipité blanc. Si nécessaire, procéder à une incubation pendant 30 minutes à 37 °C en secouant occasionnellement pour dissoudre le précipité.
- Régler un ThermoMixer® ou un agitateur-incubateur à la température requise pour le pré-traitement respectif.*

Cultures cellulaires

Il est possible d'utiliser des cultures cellulaires fraîches ou congelées. Nous recommandons d'appliquer le protocole pour teneur élevée en cas de concentration jusqu'à 1×10^7 cellules. Le protocole pour faible teneur donnera des rendements d'ADN plus faibles et n'est recommandé que si une concentration d'ADN élevée est requise, conjointement avec un petit volume d'élution (50 µl). Les culots de cellules congelées doivent être remis en suspension dans du tampon P1 comme indiqué dans le protocole de pré-traitement.

Protocole de pré-traitement pour cultures cellulaires

1. Centrifuger une quantité maximale de 1×10^7 cellules à 300 x g pendant 5 minutes à température ambiante (15–25 °C). Extraire le surnageant et l'éliminer, en veillant à ne pas déstabiliser le culot de cellules.

Remarque : Le culot cellulaire peut être conservé à une température de –20 °C ou de –70 °C en vue d'une utilisation ultérieure, ou peut être utilisé immédiatement.

2. Remettre le culot en suspension dans 220 µl de tampon P1 et transférer l'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 2 ml (non fourni).
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 kit QIAasymphony DSP DNA Mini.

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

4. Placer le tube dans un ThermoMixer ou un agitateur-incubateur et incuber à 56 °C en agitant à 900 tr/min pendant 30 minutes à 2 heures.

Remarque : La durée de la lyse dépend du type de cellule et de la quantité de cellules. Si la lyse est inachevée après 2 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 pas la préparation.

5. Pour réduire la teneur en ARN dans l'échantillon, ajouter 4 µl de RNase A (100 mg/ml) et incuber le tout pendant 2 minutes à température ambiante (15-25 °C) avant de poursuivre avec l'étape 6.
6. 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 minutes à température ambiante avant de transférer le surnageant dans les tubes d'échantillon. Pour une liste complète des tubes d'échantillon compatibles, voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Nous recommandons d'utiliser des tubes de 2 ml (par ex. Sarstedt®, référence 72.693 ou 72.608).

Bactéries

Il est possible d'utiliser des cultures bactériennes fraîches ou congelées. Nous recommandons d'appliquer le protocole pour teneur élevée en cas de concentration jusqu'à 4×10^9 cellules. Le protocole pour faible teneur donnera des rendements d'ADN plus faibles et n'est recommandé que si une concentration d'ADN élevée est requise, conjointement avec un petit volume d'élution (50 µl). La croissance bactérienne est habituellement déterminée en mesurant la densité optique (DO) de la culture bactérienne avec un spectrophotomètre. Cependant, les lectures de DO dépendent fortement du type de spectrophotomètre utilisé et des espèces bactériennes mesurées. En conséquence, nous recommandons de calibrer le spectrophotomètre en corrélant les DO mesurées avec le nombre de cellules bactériennes. Les culots congelés doivent être remis en suspension dans du tampon P1 (bactéries à Gram positif) ou du tampon ATL (bactéries à Gram négatif), comme indiqué dans le protocole de prétraitement.

Protocole de prétraitement pour bactérie à Gram négatif

1. Collecter au maximum 4×10^9 cellules par centrifugation à 5 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C). Extraire le surnageant et l'éliminer, en veillant à ne pas déstabiliser le culot de bactéries.

Remarque : Le culot cellulaire peut être conservé à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en vue d'une utilisation ultérieure, ou peut être utilisé immédiatement.

2. Remettre le culot de bactéries en suspension dans $220\text{ }\mu\text{l}$ de tampon ATL et transférer l'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 2 ml (non fourni).
3. Ajouter $20\text{ }\mu\text{l}$ de protéinase K et mélanger en tapotant le tube.

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

4. Placer le tube dans un ThermoMixer ou un agitateur-incubateur et incuber à $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitant à 900 tr/min pendant 30 minutes à 2 heures.

Remarque : La durée de la lyse dépend du type de cellule et de la quantité de cellules. Si la lyse est inachevée après 2 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.

5. Pour réduire la teneur en ARN dans l'échantillon, ajouter $4\text{ }\mu\text{l}$ de RNase A (100 mg/ml) et incuber le tout pendant 2 minutes à température ambiante avant de poursuivre avec l'étape 6.
6. Transférer avec soin $220\text{ }\mu\text{l}$ du lysat dans des tubes d'échantillon qui sont compatibles avec le porte-tubes du QIASymphony SP.

Remarque : Si les lysats contiennent du matériel de prélèvement non digéré, procéder à une centrifugation à pleine vitesse pendant 2 minutes à température ambiante avant de transférer le surnageant dans les tubes d'échantillon. Pour une liste complète des tubes d'échantillon compatibles, voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Nous recommandons d'utiliser des tubes de 2 ml (par ex., Sarstedt, référence 72.693 ou 72.608).

Protocole de prétraitement pour bactérie à Gram positif

1. Collecter au maximum 4×10^9 cellules par centrifugation à $5\,000 \times g$ pendant 10 minutes à température ambiante ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Extraire le surnageant et l'éliminer, en veillant à ne pas déstabiliser le culot de bactéries.

Remarque : Le culot cellulaire peut être conservé à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en vue d'une utilisation ultérieure, ou peut être utilisé immédiatement.

2. Remettre le culot de bactéries en suspension dans $200\text{ }\mu\text{l}$ de tampon P1 et transférer l'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 2 ml (non fourni).
3. Ajouter $20\text{ }\mu\text{l}$ de lysozyme (100 mg/ml) et mélanger en tapotant le tube.
4. Placer le tube dans un ThermoMixer ou un agitateur-incubateur et incuber à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitant à 900 tr/min pendant 30 minutes à 2 heures.

Remarque : La durée de la lyse dépend du type de cellule et de la quantité de cellules.

5. Ajouter $20\text{ }\mu\text{l}$ de protéinase K et mélanger en tapotant le tube.

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

6. Incuber à 56 °C sous agitation à 900 tr/min pendant 30 minutes.
7. Pour réduire la teneur en ARN dans l'échantillon, ajouter 4 µl de RNase A (100 mg/ml) et incuber le tout pendant 2 minutes à température ambiante avant de poursuivre avec l'étape 8.
8. Transférer avec soin 220 µl du lysat dans des tubes d'échantillon qui sont compatibles avec le porte-tubes du QIASymphony SP.

Remarque : Si les lysats contiennent du matériel de prélèvement non digéré, procéder à une centrifugation à pleine vitesse pendant 2 minutes à température ambiante avant de transférer le surnageant dans les tubes d'échantillon. Pour une liste complète des tubes d'échantillon compatibles, voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Nous recommandons d'utiliser des tubes de 2 ml (par ex., Sarstedt, référence 72.693 ou 72.608).

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

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Groupe QIAGEN) ; Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.) ; ThermoMixer® (Eppendorf AG). Les noms déposés, les marques de commerce, etc., cités dans le présent document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi. 08/2015 HB-0977-S09-001
© 2015 QIAGEN, tous droits réservés.

