

Instructions d'utilisation (manuel) du RNeasy[®] DSP FFPE Kit



Version 2

IVD

Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour utilisation avec le RNeasy DSP FFPE Kit

CE

REF

73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne

R1 MAT

1127532FR

Sommaire

Utilisation prévue	4
Utilisateurs prévus	4
Description et principe	5
Résumé et explications	5
Principes de la procédure	6
Matériel fourni.....	8
Contenu du kit.....	8
Composants du kit.....	9
Matériel nécessaire, mais non fourni	10
Avertissements et précautions	11
Informations de sécurité.....	11
Informations d'urgence.....	12
Précautions	12
Conservation et manipulation des réactifs	14
Stabilité à l'utilisation	14
Composants du kit.....	14
Procédure	15
Remarques importantes avant de commencer.....	15
Préparation des tampons.....	16
Étapes préliminaires.....	17
Protocole : purification de l'ARN total à partir de coupes de tissu FFPE	18
Contrôle de la qualité.....	22

Limitations.....	22
Caractéristiques de performances.....	23
Mise au rebut.....	24
Guide de dépannage.....	25
Symboles.....	28
Coordonnées.....	30
Annexe : Remarques générales sur la manipulation de l'ARN.....	31
Informations pour commander.....	34
Historique des révisions du document.....	35

Utilisation prévue

Le RNeasy DSP FFPE Kit est un système destiné à la purification manuelle d'ARN total à partir de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE).

Il déploie un protocole sur colonne de centrifugation en silice optimisé et comprend l'élimination enzymatique de l'ADN résiduel.

Le RNeasy DSP FFPE Kit est destiné à être utilisé dans le cadre de diagnostics in vitro

Utilisateurs prévus

Ce produit est destiné à l'usage des professionnels, tels que les techniciens et les médecins formés aux techniques de la biologie moléculaire.

Description et principe

Résumé et explications

Le RNeasy DSP FFPE Kit est spécialement conçu pour la purification d'ARN total à partir de coupes de tissu fixé au formol et inclus en paraffine (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE). En isolant des molécules d'ARN contenant plus de 70 nucléotides, le kit permet de récupérer des fragments d'ARN utilisables pour des applications telles que la RT-PCR.

En raison des conditions de fixation et d'inclusion, les acides nucléiques dans les échantillons FFPE sont généralement fragmentés et modifiés chimiquement par le formaldéhyde. Les acides nucléiques isolés à partir d'échantillons FFPE ont donc souvent un poids moléculaire inférieur à ceux provenant d'échantillons frais ou congelés. Le degré de fragmentation dépend du type et de l'âge de l'échantillon ainsi que des conditions de fixation, d'inclusion et de stockage de l'échantillon. Pour la normalisation des processus de pré-examen pour le tissu FFPE, nous recommandons de procéder conformément à la norme ISO 20166-1:2018 « Analyses de diagnostic moléculaire in vitro — Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) — Partie 1 : ARN extrait ».

Bien que la modification du formaldéhyde ne puisse être détectée dans les dosages de contrôle qualité standard, tels que l'électrophorèse sur gel ou l'analyse de type laboratoire sur puce, elle interfère fortement avec les analyses enzymatiques.

Bien que le RNeasy DSP FFPE Kit soit optimisé pour inverser le plus de modifications possible du formaldéhyde sans dégradation supplémentaire de l'ARN, les acides nucléiques purifiés à partir d'échantillons FFPE ne doivent pas être utilisés dans des applications en aval nécessitant un ARN de taille complète. Certaines applications peuvent nécessiter des modifications pour permettre l'utilisation d'ARN fragmenté (p. ex., conception de petits amplicons pour la RT-PCR). Pour la synthèse de l'ADNc, il convient d'utiliser des amorces aléatoires ou spécifiques à un gène à la place des amorces oligo-dT.

La coloration des coupes FFPE peut également affecter la qualité et la performance de l'ARN dans les applications en aval. Cela vaut particulièrement pour de nombreux protocoles de coloration immunohistochimique

Principes de la procédure

La procédure RNeasy DSP FFPE utilise la technologie largement utilisée RNeasy pour la purification de l'ARN. Des conditions de lyse spécialement optimisées permettent une purification efficace de l'ARN total à partir de coupes de tissu FFPE. L'étape de digestion de la DNase I élimine efficacement la contamination de l'ADN, y compris les molécules fortement fragmentées.

Dans un premier temps, toute la paraffine est éliminée des coupes de tissu FFPE par traitement avec la Deparaffinization Solution. Ensuite, les échantillons sont incubés dans un tampon de lyse optimisé, qui contient de la protéinase K pour libérer l'ARN des coupes. Une courte incubation à une température plus élevée inverse partiellement la réticulation liée à la formaline des acides nucléiques libérés, améliorant le rendement et la qualité de l'ARN, ainsi que les performances de l'ARN dans les dosages enzymatiques en aval. Ceci est suivi d'un traitement à la DNase I optimisé pour éliminer l'ADN génomique, y compris les très petits fragments d'ADN souvent présents dans les échantillons FFPE après une fixation au formol prolongée et/ou des temps de stockage longs. Ensuite, le lysat est mélangé au Buffer RBC. De l'éthanol est ajouté pour fournir des conditions de fixation appropriées pour l'ARN, puis l'échantillon est déposé sur une RNeasy MinElute spin column, où l'ARN total se lie à la membrane et où les contaminants sont efficacement éliminés. L'ARN est ensuite élué dans au moins 14 µl d'eau sans RNase.

Procédure RNeasy DSP FFPE

Coupes de tissu FFPE

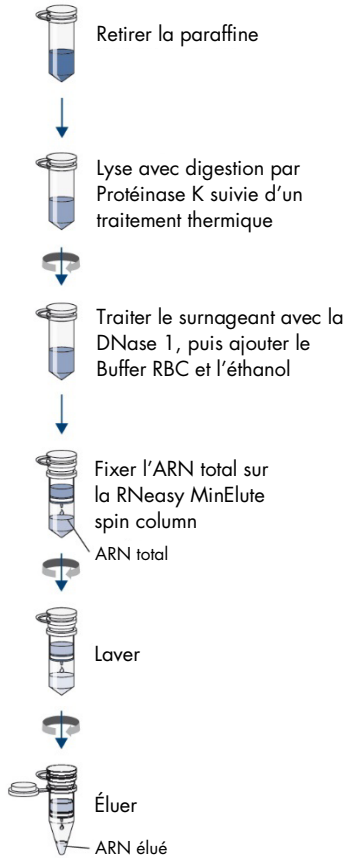


Figure 1. Procédure de purification de l'ARN à partir de tissu FFPE avec le RNeasy DSP FFPE Kit.

Matériel fourni

Contenu du kit

RNeasy DSP FFPE Kit	(50)
N° de réf.	73604
Nombre de préparations	50

	Identité	Symboles	Quantité
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Columns (rose) (chacune dans un tube de prélèvement de 2 ml)	COL	50
ET	Elution Tubes (tubes d'éluion) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (tubes de lyse) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (tubes de lavage) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K (Protéinase K)	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (DNase I sans RNase) (lyophilisée)	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (eau sans RNase)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE† (concentré)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v2	RNeasy DSP FFPE Kit Handbook (manuel du RNeasy DSP FFPE Kit)		1

* Contient du sel de guanidine. Incompatible avec tout désinfectant contenant de l'eau de Javel. Voir page 11 pour les informations de sécurité.

† Avant la première utilisation, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, non dénaturé) comme indiqué sur le flacon et décrit à la page 16 pour obtenir une solution pratique.

Composants du kit

Les principaux composants du kit sont détaillés ci-dessous.

Tableau 1. Réactifs fournis contenant des ingrédients actifs

Réactif		Composants	Volume
Symbole	Nom		
DPS	Deparaffinization Solution	Hexadécane	≥90 % à ≤100 % p/p
RBC	Buffer RBC	Chlorhydrate de guanidine	≥30 % à 70 % p/p
PKD	Buffer PKD	Aucun	–
PK	Proteinase K (Protéinase K)	Protéinase K	≥ 1 % à < 3 % p/p
DN	RNase-Free DNase I (DNase I sans RNase) (lyophilisée)	DNase	≥90 % à ≤100 % p/p
RNFW	RNase-Free Water (eau sans RNase)	Aucun	–
DBB	DNase Booster Buffer	Aucun	–
RPE	Buffer RPE (concentré)	Aucun	–

Afin de fausser le moins possible les résultats diagnostiques générés après l'isolement d'ARN, on doit utiliser des solutions témoins adéquates pour les applications en aval.

Matériel nécessaire, mais non fourni

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) correspondantes, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Vérifier que les appareils ont été contrôlés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

- Pointes de pipettes et pipettes stériles, exemptes de RNase
- Microcentrifugeuse (avec rotor pour tubes de 2 ml)
- Vortex
- Éthanol à 96–100 % (ne pas utiliser d'alcool dénaturé contenant d'autres substances telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone)
- Gants jetables
- Bloc chauffant avec fonction d'agitation capable d'incubation à 56 °C–80 °C

Avertissements et précautions

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 à l'organisme de régulation du pays de l'utilisateur et/ou du patient.

Toutes les atténuations prévues ont été mises en œuvre lorsque cela était possible à ce stade du développement du produit et ont été systématiquement contrôlées. Sur la base de la gestion des risques, le risque résiduel global est jugé acceptable et l'utilisation de l'appareil est considérée comme sûre. Il n'y a pas de risque résiduel pour le RNeasy DSP FFPE Kit.

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Lire attentivement toutes les instructions avant d'utiliser le kit.

Informations de sécurité

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, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF à l'adresse www.qiagen.com/safety, où il est possible de trouver, consulter et imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

AVERTISSEMENT Risque de blessure personnelle



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

Les tampons du RNeasy DSP FFPE Kit contiennent de l'azoture de sodium. Si les tampons du kit sont renversés, nettoyer avec un détergent de laboratoire approprié et de l'eau. Si le liquide déversé contient des agents potentiellement infectieux, nettoyer dans un premier temps la zone concernée à l'eau accompagnée d'un détergent de laboratoire, puis à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v).

Informations d'urgence

CHEMTREC

Aux États-Unis et au Canada 1-800-424-9300

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

Précautions

Les mentions de danger et les conseils de prudence applicables aux composants du RNeasy DSP FFPE Kit sont indiqués ci-dessous.

PKD, RPE, RNF, DBB

Contient : azoture de sodium. Avertissement ! Peut être nocif en cas d'ingestion. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

Deparaffinization Solution



Contient : hexadécane. Danger ! Peut être mortel en cas d'ingestion et pénètre dans les voies respiratoires. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires. Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour les organismes aquatiques. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. NE PAS provoquer de vomissements. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans une installation de traitement des déchets agréée.

Proteinase K



Contient : protéinase K. Danger ! Provoque une légère irritation cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. 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. Éliminer le contenu/récipient dans une installation de traitement des déchets agréée.

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/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. 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.

Buffer RBC



Contient : chlorhydrate de guanidine. Avertissement ! Nocif par ingestion ou par inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

DNase Booster Buffer



Avertissement ! Provoque une légère irritation cutanée. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Conservation et manipulation des réactifs

La DNase I sans RNase et les RNeasy MinElute spin columns doivent être conservées entre 2 et 8 °C dès leur réception. Les tampons peuvent être conservés à température ambiante (15–25 °C). Dans ces conditions, le kit peut être conservé comme indiqué par la date d'expiration sur l'étiquette de la boîte sans aucune diminution des performances.

Ne pas utiliser le RNeasy DSP FFPE Kit après la date limite d'utilisation.

Stabilité à l'utilisation

Le kit peut être utilisé pendant 10 mois après sa première utilisation ou jusqu'à sa date de péremption.

Composants du kit

Les dates d'expiration de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions correctes de conservation, le produit conserve ses performances pendant la période de stabilité, à condition que les mêmes lots de composants soient utilisés.

Pour une conservation de la DNase I après reconstitution à long terme, répartir la solution en aliquotes à usage unique et la stocker entre -15 et -30 °C pendant 10 mois maximum. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées jusqu'à 8 semaines à 2–8 °C. Ne pas recongeler les aliquotes après la décongélation.

Éviter l'exposition des réactifs à la lumière UV (p.ex. pour la décontamination) en raison du risque associé de vieillissement prématuré.

Procédure

Remarques importantes avant de commencer

Échantillons de départ

Les procédures standard de fixation au formol et d'enrobage de paraffine entraînent toujours une fragmentation et une réticulation significatives des acides nucléiques. Pour limiter l'étendue de la fragmentation et de la réticulation des acides nucléiques, veiller à :

- Utiliser des échantillons de tissu d'une épaisseur inférieure à 5 mm pour permettre une pénétration complète par le formol
- Fixer les échantillons tissulaires dans du formol neutre tamponné à 4–10 % aussi rapidement que possible après l'ablation chirurgicale
- Utiliser un temps de fixation de 24 heures maximum (des temps de fixation plus longs provoquent une fixation excessive et fragmentation plus élevée des acides nucléiques, ce qui se traduit par de mauvaises performances lors des dosages en aval)
- Déshydrater soigneusement les échantillons avant leur inclusion
- Utiliser de la paraffine à faible point de fusion pour l'inclusion

Le matériel de départ pour la purification de l'ARN doit être des coupes de tissu FFPE, chacune ayant une épaisseur maximale de 20 μm . Les coupes plus épaisses peuvent donner des rendements d'acides nucléiques plus faibles, même après une incubation prolongée avec de la protéinase K. Il est possible de regrouper jusqu'à 4 coupes, chacune ayant une épaisseur maximale de 10 μm , dans une préparation. Vous pouvez regrouper plus de 4 coupes si la somme totale de leur épaisseur est de 40 μm ou moins (par ex. huit coupes de 5 μm d'épaisseur).

Pour les tissus présentant un contenu d'ADN particulièrement élevé, il est recommandé d'utiliser moins de coupes par préparation afin d'éviter toute contamination par ADN de l'ARN purifié.

En l'absence d'informations sur la nature de votre échantillon de départ, il est recommandé de commencer avec un nombre maximal de 2 coupes par préparation. En fonction du rendement et de la pureté de l'ARN, il peut être possible d'utiliser jusqu'à 4 coupes dans les préparations suivantes. Cependant, une surcharge de la RNeasy MinElute spin column peut réduire considérablement le rendement et la qualité de l'ARN.

Préparation des tampons

Préparation de la solution mère de DNase I

Préparer la solution mère de DNase I en dissolvant la DNase I lyophilisée dans 550 µl d'eau sans RNase. Afin d'éviter la perte de DNase I, ne pas ouvrir le flacon. Injecter de l'eau sans RNase dans le flacon à l'aide d'une aiguille et d'une seringue sans RNase. Mélanger doucement en retournant le flacon. Ne pas vortexer.

Dans certains cas, le flacon de DNase I peut sembler vide. Cela est dû à la fixation d'enzyme lyophilisée au septum. Afin d'éviter la perte de DNase I, ne pas ouvrir le flacon. À la place, dissoudre la DNase I à l'aide d'une aiguille et d'une seringue comme décrit ci-dessous.

Remarque : 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.

Remarque : veiller à ce que le volume total d'eau sans RNase soit injecté dans le flacon.

Du matériel insoluble peut rester après la dissolution de la DNase I. En raison du processus de production, du matériel insoluble peut être présent dans la DNase I lyophilisée. Ceci n'affecte pas les performances de la DNase I.

Pour une conservation de longue durée de la DNase I, retirer la solution mère du flacon, la répartir en aliquotes à usage unique et la conserver entre -15 et -30 °C pendant 10 mois maximum. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées jusqu'à 8 semaines à 2–8 °C. Ne pas recongeler les aliquotes après la décongélation.

Préparation du Buffer RPE

Ajouter 4 volumes (44 ml) d'éthanol (96–100 %) au flacon contenant 11 ml de concentré de Buffer RPE. Cocher la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté.

Remarque : avant de commencer la procédure, mélanger le Buffer RPE reconstitué en l'agitant.

Étapes préliminaires

- Si vous utilisez le RNeasy DSP FFPE Kit pour la première fois, lisez « Remarques importantes avant de commencer » (page 15)
- Si vous utilisez l'ARN pour la première fois, lisez « Annexe : Remarques générales sur la manipulation de l'ARN » (page 30).
- Le Buffer RBC contient un sel de guanidine et n'est donc pas compatible avec les réactifs de désinfection contenant de l'eau de Javel. Voir page 11 pour les informations de sécurité.
- Sauf indication contraire, effectuer toutes les étapes de la procédure à température ambiante (entre 15 et 25 °C). Pendant la procédure, travailler rapidement, sans interruption.
- Effectuer toutes les étapes de centrifugation à l'aide d'une microcentrifugeuse maintenue à 15–25 °C. Si vous utilisez une microcentrifugeuse réfrigérée, veiller à régler la température sur 20–25 °C, sinon un refroidissement important en dessous de 15 °C peut avoir lieu.
- Dans la procédure ci-dessous, ▲ indique les volumes à utiliser pour traiter 1–2 coupes par échantillon, et ● indique les volumes à utiliser pour traiter 3–4 coupes par échantillon.

- Si vous utilisez du Buffer RPE et de la DNase I sans RNase pour la première fois, veiller à les reconstituer comme décrit dans « Préparation des tampons » (page 16).
- Amener tous les tampons à température ambiante (entre 15 et 25 °C). Mélanger le Buffer RPE reconstitué en l'agitant.
- Régler un mixeur thermique à 56 °C pour les étapes 5 et 9. Pour réduire le temps d'attente, régler un deuxième mixeur thermique sur 80 °C pour l'utiliser à l'étape 9.
- Remarque : ne pas interrompre la procédure de purification, car l'augmentation du temps d'incubation peut entraîner la perte ou la dégradation de l'ARN. La durée moyenne de traitement de 12 échantillons maximum en parallèle est d'environ 130 minutes.

Protocole : purification de l'ARN total à partir de coupes de tissu FFPE

1. À l'aide d'un scalpel, découpez la paraffine en excès du bloc d'échantillon.
2. Faites des coupes de 5–20 µm d'épaisseur.
Si la surface de l'échantillon a été exposée à l'air, mettez au rebut les 2–3 premières coupes.
3. Placer immédiatement les coupes dans un tube de microcentrifugation de ▲ 1,5 ou ● 2 ml et fermer le couvercle.
4. Ajouter ▲ 160 ou ■ 320 µl de Deparaffinization Solution, vortexer vigoureusement pendant 10 s et centrifuger brièvement pour amener l'échantillon au fond du tube.
5. Incuber à 56 °C pendant 3 min, puis laisser refroidir pendant 5 min à température ambiante.
Si la Deparaffinization Solution est utilisée en quantité insuffisante ou si une quantité trop importante de paraffine est transférée dans l'échantillon, la Deparaffinization Solution peut devenir cireuse ou solide après le refroidissement. Dans ce cas, ajouter de la Deparaffinization Solution par incréments de 160 µl et répéter l'étape 5.
6. Ajouter ▲ 150 ou ● 240 µl de Buffer PKD et mélanger au vortex pendant 3 s.
7. Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g.

8. Ajouter 10 µl de protéinase K à la phase inférieure transparente et mélanger en pipetant doucement 10 fois de haut en bas (ne pas mélanger les phases séparées).
9. Incuber à 56 °C pendant 15 min à 1100 tr/min, puis à 80 °C pendant 15 min à 1100 tr/min.

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 80 °C.

Remarque : il n'est pas nécessaire de procéder à une digestion complète du tissu par la protéinase K pour obtenir un rendement maximum d'ARN. Toutefois, l'étape d'incubation à 80 °C est cruciale.

Remarque importante : veiller à ce que le bloc chauffant ait atteint 80 °C avant de débiter l'incubation de 15 min. L'incubation à 80 °C pendant 15 min est essentielle pour l'inversion des réticulations du formaldéhyde et les performances optimales de l'ARN dans les applications en aval, telles que la RT-PCR en temps réel.

10. Centrifuger brièvement et transférer ▲ 145 ou ● 230 µl de la phase inférieure incolore dans un nouveau tube de microcentrifugation de 1,5 ml.
11. Incuber sur de la glace pendant 3 min. Puis centrifuger pendant 15 min à 20 000 x g.
12. Transférer le surnageant dans un nouveau tube de microcentrifugation de 2 ml, en veillant à ne pas perturber le culot.

Le culot contient des débris de tissu insolubles, y compris de l'ADN réticulé.

13. Ajouter le DNase Booster Buffer équivalent à un dixième du volume total d'échantillon (▲ 14,5 ou ● 23 µl) et 10 µl de solution mère de DNase I. Mélanger en retournant le tube. Centrifuger brièvement pour prélever le liquide résiduel sur les parois du tube.

Remarque : La DNase I est fournie lyophilisée et doit être reconstituée comme décrit dans la section « Préparation de la solution mère de DNase I », page 16.

Remarque : la DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation. Mélanger uniquement en retournant doucement le tube plusieurs fois. Ne pas vortexer.

14. Incuber à température ambiante pendant 15 min.

15. Ajouter ▲ 320 ou ● 500 µl de Buffer RBC pour ajuster les conditions de fixation et bien mélanger le lysat en le vortexant pendant 3 secondes et centrifuger brièvement.
16. Ajouter ▲ 720 µl ou ■ 1200 µl d'éthanol (96–100 %) à l'échantillon. Ne pas centrifuger. Passer immédiatement à l'étape 17.

Des précipités peuvent être visibles après l'ajout d'éthanol. Cela n'affecte pas la procédure.

17. Bien mélanger en pipetant 5 fois de haut en bas et transférer 700 µl de l'échantillon, y compris tout précipité qui peut s'être formé, dans une RNeasy MinElute spin column placée dans un tube de prélèvement de 2 ml. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 15 s à $\geq 8\ 000 \times g$. Jeter le tube de prélèvement avec l'effluent* et placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (fourni).
18. Répéter l'étape 17 (sans mélange supplémentaire) jusqu'à ce que l'échantillon entier soit passé à travers la RNeasy MinElute spin column.

19. Ajouter 500 µl de Buffer RPE à la RNeasy MinElute spin column. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 15 s à $\geq 8\ 000 \times g$. Jeter le tube de prélèvement avec l'effluent* et placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (fourni).

Remarque : le Buffer RPE est fourni sous forme de concentré. S'assurer que l'éthanol est ajouté avant utilisation comme décrit dans la section « Préparation du Buffer RPE ».

20. Ajouter 500 µl de Buffer RPE à la RNeasy MinElute spin column. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 2 min à $\geq 8\ 000 \times g$ pour nettoyer la membrane de la colonne de centrifugation. Jeter le tube de prélèvement contenant l'effluent† et placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (fourni).

Remarque : après la centrifugation, retirer la RNeasy MinElute Spin Column du tube de prélèvement pour lui éviter tout contact avec le surplus. Dans le cas contraire, une contamination par l'éthanol aura lieu.

* L'effluent contient du Buffer RBC et n'est donc pas compatible avec l'eau de Javel. Voir page 8 pour les informations de sécurité.

† L'effluent contient du Buffer RBC et n'est donc pas compatible avec l'eau de Javel. Voir page 8 pour les informations de sécurité.

21. Ouvrir le couvercle de la colonne de centrifugation, puis centrifuger à pleine vitesse pendant 5 min. Jeter le tube de prélèvement avec l'effluent.

Pour éviter d'endommager leurs couvercles, placer les colonnes de centrifugation dans la centrifugeuse en laissant au moins une position vide entre les colonnes. Orienter les couvercles de façon à ce qu'ils pointent dans la direction opposée à la rotation du rotor (p.ex. si le rotor tourne dans le sens des aiguilles d'une montre, orienter les couvercles dans le sens inverse).

Il est important de faire sécher la membrane de la colonne de centrifugation, car l'éthanol résiduel peut créer des interférences avec les réactions suivantes. La centrifugation avec les couvercles ouverts permet d'assurer l'absence de contamination d'éthanol pendant l'élution de l'ARN.

22. Placer la RNeasy MinElute spin column dans un nouveau tube de prélèvement de 1,5 ml (fourni). Ajouter 14–32 µl d'eau sans RNase directement au centre de la membrane de la colonne de centrifugation. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 1 minute à pleine vitesse pour éluer l'ARN.

L'élution avec des volumes d'eau sans RNase plus faibles donne des concentrations d'ARN total plus élevées, mais des rendements d'ARN plus faibles.

Remarque : si vous prévoyez d'obtenir une faible quantité d'ARN, nous vous recommandons d'utiliser un tube à faible fixation (non fourni) pour l'élution. Le volume mort moyen de la RNeasy MinElute spin column est de 2 µl : l'élution avec 14 µl d'eau sans RNase fournit environ 12 µl d'éluat.

23. Stocker les éluats d'ARN entre -60 et -90 °C ou entre -15 et -30 °C pendant 12 semaines au maximum.

Remarque : la stabilité des éluats dépend de la quantité et du type d'ARN isolé, du volume d'élution et des conditions de stockage. Nous recommandons aux utilisateurs de déterminer la stabilité des éluats en fonction de leurs besoins particuliers.

Contrôle de la qualité

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

Limitations

Les performances du système ont été déterminées lors d'études d'évaluation des performances en purifiant de l'ARN humain à partir d'échantillons fixés au formol et inclus en paraffine.

Il est de la responsabilité des utilisateurs de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans leur laboratoire et non couvertes par les études d'évaluation de la performance QIAGEN.

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

Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés à la lumière des autres observations cliniques ou résultats biologiques disponibles.

Caractéristiques de performances

Les caractéristiques de performances applicables sont disponibles dans l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com.

Mise au rebut

Les déchets contiennent des échantillons et des réactifs. Ceux-ci peuvent contenir des matières toxiques ou infectieuses et doivent être mis au rebut de manière appropriée. Reportez-vous aux règles de sécurité en vigueur concernant les procédures de mise au rebut.

Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF à l'adresse www.qiagen.com/safety, où il est possible de trouver, consulter et imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

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 dans notre centre d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des services techniques QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et/ou protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosage (pour les coordonnées, visitez le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

RNeasy MinElute spin column obstruée

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Trop de matériel de départ | Réduire la quantité de matériel de départ. Il est essentiel d'utiliser la quantité appropriée de matériel de départ (voir page 15). |
| b) | Température de centrifugation trop basse | La température de centrifugation doit être de 15–25 °C. Certaines centrifugeuses peuvent refroidir sous 15 °C même en cas de réglage à 20 °C. Cela peut causer la formation de précipités pouvant obstruer la RNeasy MinElute spin column. Si cela se produit, régler la température de centrifugation à 25 °C. |

Faible rendement en ARN

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Mauvaise qualité du matériel de départ | Les échantillons fixés pendant plus de 24 heures ou stockés sur une période très longue peuvent contenir très peu d'ARN utilisable.
Les coupes montées sur lames de microscope peuvent donner très peu d'ARN utilisable en raison d'une exposition prolongée à l'air. |
| b) | Trop de matériel de départ | Le chargement excessif de la RNeasy MinElute spin column réduit considérablement les rendements d'acides nucléiques. Réduire la quantité de matière de départ (voir page 15). |
| c) | ARN toujours lié à la membrane de la RNeasy MinElute spin column | Répéter l'élué de l'ARN, mais incubé la RNeasy MinElute spin column sur la paillasse pendant 10 minutes avec du RNF _W avant la centrifugation. |
| d) | Mauvais stockage des tampons/réactifs | Les RNeasy MinElute spin columns et la DNase I doivent être conservées à une température de 2–8 °C à l'arrivée du kit. Vérifier la bonne température de stockage, car l'exposition à des températures plus élevées sur des périodes plus longues peut entraîner une perte de fonctionnalité. |

Valeur faible du rapport A_{260}/A_{280}

De l'eau a été utilisée pour diluer l'acide nucléique pour la mesure A_{260}/A_{280}

Utiliser 10 mM Tris Cl, pH 7,5, non de l'eau, pour diluer l'échantillon avant de mesurer la pureté.

Contamination de l'ADN au cours d'expériences en aval

- a) Trop de matériel de départ Pour certains types de tissu, l'efficacité de l'élimination de l'ADN peut être réduite en cas de traitement de très grandes quantités. Si l'ARN élué contient une contamination importante par l'ADN, essayer de traiter moins de coupes de tissu par préparation.
- b) Le tissu présente une forte teneur en ADN Lors du traitement de très grandes quantités de tissus riches en ADN (par exemple, thymus), l'ADN peut ne pas être complètement digéré. Répéter la procédure de purification en utilisant moins de coupes de tissu.
Vérifier si la DNase I a été stockée correctement, comme décrit dans « Stockage et manipulation des réactifs » et « Préparation de la solution mère de DNase I ».
- c) Transcription inverse avec une quantité insuffisante d'ARN La plupart des transcriptases inverses sont conçues pour une utilisation avec environ 1 μ g d'ARN. Si la transcription inverse est effectuée avec de très faibles quantités d'ARN, il est recommandé d'utiliser une transcriptase inverse spécialement conçue pour la transcription inverse hautement sensible.
-

L'ARN ne réagit pas bien dans des applications/dosages en aval











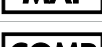

- a) ARN fragmenté ou bloqué en raison de la modification du formaldéhyde L'incubation à 80 °C au cours de la procédure RNeasy DSP FFPE est cruciale pour obtenir des performances optimales de l'ARN dans la transcription inverse et d'autres applications enzymatiques en aval. S'assurer que la température d'incubation est maintenue à 80 °C pendant toute la durée d'incubation de 15 minutes.
Bien que l'incubation à 80 °C élimine certaines modifications du formaldéhyde, l'ARN purifié à partir de coupes FFPE n'est pas une matrice optimale pour les réactions enzymatiques. Nous recommandons de n'utiliser que des amorces aléatoires ou des amorces spécifiques à un gène pour la synthèse de l'ADNc. Nous recommandons également de garder les amplicons aussi courts que possible pour la PCR (< 500 nucléotides).








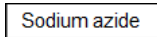

Commentaires et suggestions

- b) Transfert d'éthanol Lors du second lavage avec le Buffer RPE, s'assurer de centrifuger à $\geq 8\,000 \times g$ pendant 2 minutes à une température de 15–25 °C pour sécher la membrane de la RNeasy MinElute spin column. Après la centrifugation, retirer avec précautions la colonne du tube de prélèvement pour lui éviter tout contact avec l'effluent. Placer ensuite la colonne dans un nouveau tube de prélèvement et centrifuger à pleine vitesse pendant 5 minutes.
- c) Transfert de sel durant l'élution d'ARN Vérifier que le Buffer RPE a été reconstitué en ajoutant le bon volume d'éthanol et que le tampon est à température ambiante (15–25 °C).
- d) Transcription inverse avec une quantité insuffisante d'ARN La plupart des transcriptases inverses sont conçues pour une utilisation avec environ 1 µg d'ARN. Si la transcription inverse est effectuée avec de très faibles quantités d'ARN, il est recommandé d'utiliser une transcriptase inverse, spécialement conçue pour la transcription inverse hautement sensible.

Symboles

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

Symbole	Définition du symbole
 Σ <N>	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	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
	À réception
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	N° de réf.
	Numéro de lot
	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
	Composants (c.-à-d. liste des éléments inclus)
	Contient (contenu)

Symbole	Définition du symbole
	Quantité (flacons, tubes)
	Numéro d'article du commerce global
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi (manuel) et n représente le numéro de révision
	Limite de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	Attention
	Protéinase K
	Azoture de sodium
	Identificateur unique d'appareil

Coordonnées

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 : 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 RNases. Faire attention à ne pas introduire des RNases par inadvertance dans l'échantillon d'ARN pendant ou après la purification. Lors de la manipulation de l'ARN, afin de créer et de maintenir un environnement exempt de RNase, prendre les précautions suivantes au cours du prétraitement et de l'utilisation des récipients jetables ou non jetables et des solutions.

Manipulation générale

Lors de la préparation de l'ARN, veiller à toujours respecter les principes de technique microbiologique aseptique. 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 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 RNases due à la peau ou à 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.

Pour éliminer la contamination par RNases des surfaces de la paillasse, des consommables en plastique non jetables et de l'équipement de laboratoire (par ex. pipettes et cuves d'électrophorèse), il est recommandé d'utiliser du RNaseZap® (n° de réf. AM9780) d'Ambion®. Autrement, il est possible d'éliminer la contamination par RNases en utilisant des réactifs généraux de laboratoire. Pour décontaminer le matériel en plastique, rincer avec 0,1 NaOH, 1 mM EDTA puis de l'eau sans RNase (voir « Solution », page 33) ou rincer avec du chloroforme si le matériel en plastique est résistant au chloroforme. Pour décontaminer les cuves d'électrophorèse, nettoyer avec un détergent (par ex. SDS à 0,5 %), rincer avec de l'eau sans RNase, rincer avec de l'éthanol (si les cuves sont résistantes à l'éthanol) et les laisser sécher.

Consommables en plastique jetables

L'utilisation de tubes en polypropylène jetables et stériles est recommandée pour l'ensemble de la procédure. Ces tubes sont généralement exempts de RNase et ne nécessitent pas de traitement préalable pour désactiver les RNases.

Verrerie

La verrerie doit être traitée avant utilisation afin de s'assurer qu'elle est exempte de RNase. Avant utilisation, la verrerie utilisée pour la manipulation d'ARN doit être nettoyée avec un détergent, rincée soigneusement et chauffée au four à une température 240 °C pendant au moins 4 heures (toute la nuit si c'est plus pratique). L'autoclavage seul ne permet pas de désactiver totalement de nombreuses RNases. Il est également possible de traiter la verrerie au DEPC (pyrocarbonate de diéthyle), comme décrit dans « Solutions » ci-dessous.

Solution

Les solutions (eau et autres) doivent être traitées avec du DEPC à 0,1 %. Le DEPC est un inhibiteur puissant, mais pas total, des RNases. Il est couramment employé à la concentration de 0,1 % pour désactiver les RNases présentes sur la verrerie ou le matériel en plastique, ou pour obtenir des solutions et de l'eau exemptes de RNase. Le DEPC désactive les RNases par modification covalente. Ajouter 0,1 ml de DEPC à 100 ml de la solution à traiter et agiter vigoureusement pour amener le DEPC dans la solution. Laisser la solution incuber pendant 12 heures à 37 °C. Passer à l'autoclave pendant 15 minutes pour éliminer toute trace de DEPC. Le DEPC réagit avec les amines primaires et ne peut être utilisé directement pour traiter les tampons Tris. Le DEPC est très instable en présence de tampons Tris et se décompose rapidement en éthanol et en CO₂. Lors de la préparation des tampons Tris, traiter d'abord l'eau avec le DEPC puis dissoudre le Tris pour obtenir le tampon adapté. Des traces de DEPC suffisent à modifier les bases puriques de l'ARN par carbéthoxylation. Dans les systèmes acellulaires, l'efficacité de traduction de l'ARN carbéthoxylé est très faible. Toutefois, sa capacité à former des hybrides ADN:ARN ou ARN:ARN n'est pas gravement affectée, sauf si une forte proportion de bases puriques a été modifiée. Le DEPC résiduel doit toujours être éliminé des solutions ou des récipients par autoclavage ou chauffage à 100 °C pendant 15 minutes.

Remarque : les tampons RNeasy sont garantis exempts de RNase sans traitement par DEPC et sont donc exempts de toute contamination par DEPC.

Informations pour commander

Produit	Sommaire	N° de réf.
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute Spin Columns, tubes d'éluion, tubes de lavage, tubes de lyse, réactifs et tampons sans RNase	73604

Pour connaître les dernières informations sur les licences et les clauses de non-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.

Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, juin 2022	<p>Mise à jour à la version 2 du kit pour la conformité à l'IVDR.</p> <p>Aucune modification des protocoles ou des performances par rapport à la version 1 du kit</p> <p>Mise à jour des avertissements et précautions (ajout de risques résiduels, informations d'urgence)</p> <p>Ajout de la section Mise au rebut</p>

Accord de licence limitée pour le RNeasy DSP FPPE Kit

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

1. Le produit ne doit être utilisé qu'avec les composants fournis à l'intérieur du kit et conformément à ce manuel et aux protocoles fournis. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
1. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisation(s) ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
3. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
4. 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. QIAGEN 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 de procédure 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 le site www.qiagen.com.

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group) ; Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific ou ses filiales). 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-3027-001 1127532FR © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

