

Août 2015

Fiche de protocole du QIAAsymphony® SP

Tissue_LC_200_V7_DSP et Tissue_HC_200_V7_DSP

Ce document est la fiche de protocole du *Tissue_LC_200_V7_DSP* et du *Tissue_HC_200_V7_DSP* sur le QIAAsymphony SP, R2, pour la version de kit n° 1.

Informations générales

Pour utilisation en diagnostic 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 (FFPE) en utilisant le QIASymphony® SP et le kit QIASymphony 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 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 (référence 937236)
Matériel de prélèvement	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

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

Protocole pour teneur élevée

Kit	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (référence 937236)
Matériel de prélèvement	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_Tissue_HC_200_V7_DSP
Volume d'éluion	100 µl, 200 µl ou 400 µl
Version logicielle requise	Version 4.0

Matériel nécessaire, mais non fourni

Pour tous les types d'échantillon

- Tampon ATL, 4x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, référence 939016)
- Pour réduire la teneur en ARN : DNase-free RNase A (solution-mère de 100 mg/ml)

Pour un tissu FFPE (déparaffinage sans xylène)

- Solution de déparaffinage (Deparaffinization Solution, référence 939018)

Pour un tissu FFPE (déparaffinage avec du xylène)

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

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

Tiroir « Sample » (Échantillon)

Type d'échantillon	Tissu FFPE et tissu
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.
Inserts	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 réactif
Position B1	n/a
Support de portoir de cônes 1 à 17	Cônes munis de filtre jetables, 200 µl ou 1500 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 la fente 1, position de refroidissement)	Voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks pour plus d'informations.
---	---

Matériel en plastique requis

Matériel en plastique	One batch, 24 samples*	Two batches, 48 samples*	Three batches, 72 samples*	Four batches, 96 samples*
Cônes munis de filtres jetables, 200 µl†‡	26	50	74	98
Cônes munis de filtres jetables, 1500 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 munis de filtres par portoir.

‡ Le nombre requis de cônes munis de filtres correspond à 1 inventaire par cartouche de réactif.

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

¶ Il y a douze manchons pour 8 barreaux par 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

Lors de la 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 QIA Symphony 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

- 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 pré-traitement respectif.*

Tissus

Un tissu frais ou congelé peut être utilisé pour la purification d'ADN. Le rendement et la qualité d'ADN obtenus 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. Sachez 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.

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

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 kit QIASymphony DSP DNA Mini.

4. Placer le tube dans un ThermoMixer 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 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. Homogénéiser l'échantillon en le pipetant de manière répétée.

Remarque : Si des fragments de substances insolubles sont encore présents, procéder à une centrifugation à 3000 x g pendant 1 minute.

7. Transférer avec soin 220 µl du surnageant dans des tubes d'échantillon qui sont compatibles avec le porte-tubes du QIASymphony SP.

Pour une liste complète des tubes d'échantillon compatibles, voir www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Il est recommandé d'utiliser des tubes de 2 ml (par exemple, Sarstedt, référence 72.693 ou 72.608).

Tissu FFPE

Les procédures standard de fixation à la formaline et d'enrobage de paraffine 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 vous ne disposez d'aucune information sur la nature de votre échantillon de départ, il est recommandé de commencer avec un nombre maximal de 3 coupes dans une préparation unique. 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 : 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 kit manuel QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue.

Protocole de prétraitement pour un tissu FFPE

Méthode 1 : déparaffinage à l'aide d'une solution de déparaffinage

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 tampon ATL aux coupes.
5. Ajouter 20 µl de protéinase K.

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

6. Ajouter 160 µl ou 320 µl d'une solution de déparaffinage (voir le tableau ci-dessous) et mélanger par vortexage.

Thickness of sections	Number of sections	Volume of Deparaffinization 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 thermomixeur ou un agitateur-incubateur et l'incuber à une température de 56 °C pendant 1 heure en l'agitant à une vitesse de 1000 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 1 heure. Si la lyse est inachevée après 1 heure, 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 pas la préparation.

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

Remarque : L'incubation à 90 °C dans un tampon 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'une seule unité de chauffage, laisser l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C jusqu'à ce que l'unité de chauffage ait atteint 90 °C.

9. Pour réduire la teneur en ARN dans l'échantillon, ajouter 2 µl de RNase A (100 mg/ml) à la phase inférieure et incuber le tout pendant 2 minutes à température ambiante avant de poursuivre avec l'étape 10. Laisser l'échantillon revenir à la température ambiante avant d'ajouter la RNase A.

10. Procéder à une centrifugation à pleine vitesse pendant 1 minute à température ambiante.

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

Méthode 2 : déparaffinage avec du 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 secondes.
4. Procéder à une centrifugation à pleine vitesse pendant 2 minutes à température ambiante.
5. Retirer le surnageant par pipetage. Ne pas retirer 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. Procéder à une centrifugation à pleine vitesse pendant 2 minutes à température ambiante.
8. Retirer le surnageant par pipetage. Ne pas retirer le culot.
Remarque : Retirer avec soin tout l'éthanol résiduel en utilisant un cône de pipette fin.
9. Ouvrir le tube et incuber à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 10 minutes 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. Remettre 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 kit QIASymphony DSP DNA Mini.
12. Incuber à 56 °C pendant 1 heure (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 heure. Si la lyse est inachevée après 1 heure, 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 pas la préparation.
13. Procéder à une incubation à 90 °C pendant 1 heure.
Remarque : L'incubation à 90 °C dans un tampon 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'une seule unité de chauffage, laisser l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C jusqu'à ce que l'unité de chauffage ait atteint 90 °C.
14. Centrifuger brièvement l'échantillon, afin de chasser les gouttes présentes dans le capuchon.
15. Pour réduire la teneur en ARN dans l'échantillon, ajouter 2 µl de RNase A (100 mg/ml) et incuber le tout pendant 2 minutes à température ambiante avant de poursuivre avec l'étape 16. Laisser l'échantillon revenir à la 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 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. Il est recommandé d'utiliser des tubes de 2 ml (par exemple, Sarstedt, référence 72.693 ou 72.608).

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques des produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN approprié. 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®, QIAamp®, 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-S01-002 © 2012–2015 QIAGEN, tous droits réservés.

