

Mode d'emploi de QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit (Manuel)



Version 3



Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro
À utiliser avec QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE



1127543FRCA

Table des matières

Utilisation prévue	4
Utilisateur prévu	4
Description et principe	5
Lyse des cellules sanguines	5
Liaison de l'ADN génomique à la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini	5
Retrait des contaminants résiduels	6
Élution de l'ADN génomique pure	6
Rendement et qualité de l'ADN génomique	7
Purification automatisée sur l'instrument QIAcube Connect MDx.....	7
Résumé et explication	10
Matériel fourni.....	11
Contenu de la trousse	11
Composants de la trousse.....	12
Matériel nécessaire, mais non fourni	13
Réactifs supplémentaires.....	13
Consommables	13
Équipement.....	13
Pour la procédure de dépression uniquement.....	13
Pour la procédure automatisée uniquement.....	14
Avertissements et précautions	15
Renseignements sur la sécurité	15

Précautions	16
Mise au rebut	17
Conservation et manipulation des réactifs	18
Stabilité pendant l'utilisation	18
Prélèvement, conservation et manipulation des échantillons	19
Remarques importantes	21
Points importants avant de commencer un protocole	21
Préparation des réactifs et tampons	22
Manipulation des colonnes de centrifugation QIAamp Mini.....	23
Configuration du système de dépression QIAvac 24 Plus	24
Procédure	26
Protocole : Isolation et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang au moyen d'une microcentrifugeuse/purification automatisée sur l'instrument QIAcube Connect MDx.....	26
Protocole : Isolation et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang au moyen d'un système de dépression.....	31
Contrôle de la qualité	36
Limitations.....	37
Caractéristiques de performances.....	38
Guide de dépannage.....	39
Symboles.....	43
Pour commander	46
Historique des révisions du document.....	48

Utilisation prévue

Le QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit est un système utilisant une technologie de membrane à base de silice (technologie QIAamp) pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques.

L'utilisation de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit est réservée au diagnostic in vitro.

Utilisateur prévu

Seuls des professionnels tels que des techniciens et des médecins dûment formés aux techniques de biologie moléculaire sont habilités à utiliser ce produit.

Description et principe

Chaque procédure QIAamp DSP DNA Blood Mini comprend 4 étapes :

- La lyse des cellules dans l'échantillon de sang
- La liaison de l'ADN génomique dans le lysat cellulaire à la membrane d'une colonne de centrifugation QIAamp Mini
- Le lavage de la membrane
- L'élution de l'ADN génomique de la membrane

Ce manuel contient les protocoles pour deux autres procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini : la procédure de centrifugation qui nécessite une centrifugeuse ou peut être automatisée sur le QIAcube® Connect MDx (Figure 1), et la procédure de dépression qui nécessite une centrifugeuse et un système de dépression (voir le diagramme, page 9).

Lyse des cellules sanguines

Les échantillons sont lysés dans des conditions dénaturantes à température élevée. La lyse est effectuée en présence de QIAGEN® Protease (QP) et de tampon de lyse (AL).

Liaison de l'ADN génomique à la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini

Afin d'optimiser la liaison de l'ADN génomique à la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, de l'éthanol est d'abord ajouté aux lysats. Chaque lysat est ensuite appliqué à une colonne de centrifugation QIAamp Mini et l'ADN génomique est adsorbé sur la membrane de silice à mesure que le lysat traverse celle-ci sous l'effet du vide ou de la force centrifuge.

Retrait des contaminants résiduels

Lorsque l'ADN génomique reste lié à la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, les contaminants sont éliminés efficacement à l'aide, dans un premier temps, du tampon de lavage 1 (AW1), puis du tampon de lavage 2 (AW2).

Élution de l'ADN génomique pure

L'ADN génomique est élué de la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini en utilisant 50-200 µl de tampon d'éluion (AE). L'ADN élué est prêt à être utilisé dans différents dosages effectués en aval, y compris plusieurs dosages de diagnostic in vitro en aval. Amenez le tampon d'éluion (AE) à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) avant de le déposer sur la colonne.

Le volume de l'éluat peut être inférieur au volume du tampon d'éluion (AE) déposé sur la colonne de centrifugation, car une fraction du tampon d'éluion (AE) est retenue par la membrane de la colonne après la centrifugation. Le volume de l'éluat récupéré dépend de la nature de l'échantillon. L'ADN élué est recueilli dans des tubes d'éluion (ET) et peut être conservé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de 4 semaines. Pour une conservation à long terme, il est conseillé de conserver les tubes à -20 °C.

Remarque : La stabilité de l'éluat dépend fortement de plusieurs facteurs et de l'application spécifique en aval. Elle a été évaluée pour QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit avec des exemples d'applications en aval. Il incombe à l'utilisateur de consulter le mode d'emploi de l'application spécifique en aval utilisée dans son laboratoire et/ou de valider l'ensemble du flux de travail afin d'établir les conditions de conservation appropriées.

Rendement et qualité de l'ADN génomique

Le rendement en ADN dépend de l'échantillon et de la qualité du matériel de départ. Une élution effectuée dans de petits volumes augmente la concentration finale de l'ADN dans l'éluat, mais réduit légèrement le rendement en ADN. Il est conseillé d'utiliser un volume d'élution approprié pour l'application prévue en aval.

Le rendement et la qualité de l'ADN génomique isolé sont appropriés pour les procédures de détection en aval utilisées pour les diagnostics moléculaires, comme la PCR. Les dosages de diagnostic doivent être réalisés conformément aux instructions des fabricants.

Purification automatisée sur l'instrument QIAcube Connect MDx

Le QIAcube Connect MDx effectue l'isolation et la purification automatisées des acides nucléiques. Il est capable de traiter jusqu'à 12 échantillons par série d'analyses.



















La préparation des échantillons avec le QIAcube Connect MDx suit les mêmes étapes que la procédure manuelle (à savoir, lyse, liaison, lavage et élution), ce qui vous permet de continuer à utiliser QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit pour la purification d'ADN de haute qualité.

Si vous automatisez QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sur le QIAcube Connect MDx, celui-ci peut traiter moins de 50 échantillons en raison des volumes morts, de l'évaporation et de la consommation supplémentaire de réactifs par le pipettage automatisé. QIAGEN garantit uniquement 50 préparations d'échantillons avec l'utilisation manuelle de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.



Figure 1. Le QIAcube Connect MDx.

Les procédures de centrifugation et de dépression pour QIAamp DSP DNA Blood Mini

Procédure de centrifugation QIAamp	Procédure de dépression QIAamp	
Échantillon	Échantillon	
		
↓	↓	
		Lyse
↓	↓	
		Liaison
↓	↓	
		Vide
↓	↓	
		Lavage (Buffer AW1)
↓	↓	
		Vide
↓	↓	
		Lavage (Buffer AW2)
↓	↓	
		Vide
↓	↓	
		Élution
↓	↓	
↓	↓	

Lisez les protocoles (page 26 et 31) attentivement avant de commencer.

Dans LT, ajoutez 20 µl de QP, 200 µl d'échantillon et 200 µl d'AL.
Mélangez au vortex pendant 15 s.
Incubez pendant 10 min à 56 °C.
Ajoutez 200 µl d'éthanol.
Mélangez au vortex pendant 15 s.

Transférez le lysat dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini.
Procédure de centrifugation : Centrifugez pendant 1 min à 6000 x g.

Procédure de dépression : Appliquez le vide.

Procédure de centrifugation : Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT), ajoutez 500 µl de tampon de lavage 1 (AW1) et centrifugez pendant 1 min à 6000 x g.

Procédure de dépression : Ajoutez 750 µl de tampon de lavage 1 (AW1) et appliquez le vide.

Procédure de centrifugation : Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT), ajoutez 500 µl de tampon de lavage 2 (AW2) et centrifugez pendant 1 min à la vitesse maximale (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min).

Procédure de dépression : Ajoutez 750 µl de tampon de lavage 2 (AW2) et appliquez le vide.

Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans le tube de lavage (WT).

Centrifugez pendant 3 min à la vitesse maximale (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min).

Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans le tube d'élué (ET).

Ajoutez 50-200 µl de tampon d'élué (AE) et incubez pendant 1 min.

Centrifugez pendant 1 min à 6000 x g.

Résumé et explication

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit utilise une technologie bien établie pour fournir un moyen rapide et facile d'isoler et de purifier l'ADN génomique à partir de 200 µl de sang total.

Les procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini, qui sont conçues pour le traitement simultané de plusieurs échantillons de sang, produisent de l'ADN purifié prêt à l'emploi. Les procédures sont adaptées à l'utilisation de sang total frais ou congelé et de sang traité au citrate ou à l'EDTA.

La séparation préalable des leucocytes n'est pas nécessaire. Les procédures ne nécessitent ni extraction au phénol/chloroforme ni précipité d'alcool et n'exigent qu'une interaction minimale de l'utilisateur, ce qui permet de manipuler en toute sécurité les échantillons potentiellement infectieux. Les procédures sont conçues pour minimiser la contamination croisée entre les échantillons. L'ADN purifié est prêt à être utilisé pour la PCR ou d'autres applications, ou il peut être conservé à -20 °C à long terme.

Les procédures simples de centrifugation et de dépression QIAamp DSP sont adaptées au traitement simultané de plusieurs échantillons. Certaines des procédures de centrifugation QIAamp peuvent être entièrement automatisées sur l'instrument QIAcube Connect MDx pour une standardisation accrue et une plus grande facilité d'utilisation (page 7).

Pour la procédure de dépression, un collecteur à vide (p. ex. le QIAvac 24 Plus avec le QIAvac Connecting System) et une pompe à vide capable de produire une dépression d'environ 800-900 mbar (p. ex. le QIAGEN Vacuum Pump) sont nécessaires pour le protocole. Un Vacuum Regulator doit être utilisé (composant du QIAvac Connecting System) pour une surveillance aisée de la dépression et une évacuation facile du vide.

Matériel fourni

Contenu de la trousse


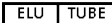

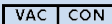
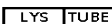




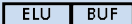



QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

N° de référence

61104

Nombre de préparations

50

	Nom	Symboles	Quantité
5	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (Colonnes de centrifugation QIAamp Mini avec tubes de lavage (WT)) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Tubes d'éluion) (1,5 ml)	 	50
VC	VacConnectors (Connecteurs d'aspiration)		50
LT	Lysis Tubes (Tubes de lyse) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Tubes de lavage) (2 ml)		3 x 50
AL	Lysis Buffer (Tampon de lyse)*		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Tampon de lavage 1) [†] (concentré)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Tampon de lavage 2) [†] (concentré)		13 ml
AE	Elution Buffer (Tampon d'éluion) [‡]		25 ml
PS	Protease Solvent (Solvant de protéase) [‡]		2 ml
QP	QIAGEN Protease [§]		1 flacon
-	Mode d'emploi (Manuel)		1

* Si vous automatisez QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sur l'instrument QIAcube Connect MDx, celui-ci peut traiter moins de 50 échantillons en raison des volumes morts, de l'évaporation et de la consommation supplémentaire de réactifs par le pipetage automatisé. QIAGEN garantit uniquement 50 préparations d'échantillons avec l'utilisation manuelle de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

[†] Contient du chlorhydrate de guanidine. Non compatible avec les désinfectants contenant un javellisant. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section Renseignements sur la sécurité à la page 15.

[‡] Contient de l'azote de sodium comme agent de conservation.

[§] Volume de resuspension de 1,2 ml. Consultez la section « Préparation des réactifs et tampons » à la page 22.

Composants de la trousse

Les principaux composants de la trousse contenant les ingrédients actifs sont décrits ci-dessous.

Réactif	Ingrédients actifs	Concentration (p/p) [%]
QIAGEN Protease	Subtilisine	≥ 0 à ≤ 100
AL	Chlorhydrate de guanidine Acide maléique	≥ 30 à < 50 $\geq 0,1$ à < 1
AW1	Chlorhydrate de guanidine	≥ 50 à < 70

Matériel nécessaire, mais non fourni

Réactifs supplémentaires

- Éthanol (96–100 %) *

Consommables

- Pipettes† et embouts de pipette (afin de prévenir toute contamination croisée, il est fortement conseillé d'utiliser des embouts de pipette équipées de dispositifs anti-aérosols)
- Gants jetables

Équipement

- Bloc chauffant† pour la lyse des échantillons à 56 °C (pour microtubes à essai de 1,5 ml)
- Microcentrifugeuse†
- Éprouvette graduée (50 ml)
- Mélangeur vortex

Pour la procédure de dépression uniquement

- Système de dépression QIAvac 24 Plus (n° de réf. 19413) ou équivalent†
- VacValves (n° de réf. 19408)
- QIAvac Connecting System (n° de réf. 19419)
- Vacuum Pump (n° de réf. 84020)
- Vacuum Regulator (n° de réf. 19530)

* N'utilisez pas d'alcool dénaturé, ce qui contient d'autres substances telles que du méthanol ou de la méthyléthylcétone.

† Pour garantir le bon traitement des échantillons dans les procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini, il est fortement conseillé que les instruments (p. ex. les pipettes et les blocs chauffants) soient vérifiés et calibrés conformément aux recommandations de leurs fabricants.

Pour la procédure automatisée uniquement

- Instrument QIAcube Connect MDx (n° de réf. 9003070)*
- Rotor Adapters (n° de réf. 990394)
- Rotor Adapter Holder (n° de réf. 990392)
- Sample Tubes CB (n° de réf. 990382; tube initial d'échantillon)
- Shaker Rack Plugs (n° de réf. 9017854)
- Reagent Bottles, 30 ml (n° de réf. 990393)
- Filter Tips, 1000 µl (n° de réf. 990352)
- Filter Tips, 200 µl (n° de réf. 990332)
- SafeSeal Tube, 1,5 ml (Sarstedt®, n° de réf. 72.706)

* Pour garantir le bon traitement des échantillons dans les procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini, il est fortement conseillé que les instruments (p. ex. les pipettes et les blocs chauffants) soient vérifiés et calibrés conformément aux recommandations de leurs fabricants.

Avertissements et précautions


Sachez que vous pourriez être tenu de consulter votre réglementation locale pour signaler les incidents graves survenus en lien avec le dispositif au fabricant et/ou à son représentant autorisé et l'autorité réglementaire de la région de l'utilisateur et/ou du patient.

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.

Lisez attentivement toutes les consignes avant d'utiliser la trousse.

Renseignements sur la sécurité

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire adapté, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour obtenir plus de renseignements, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne en format PDF pratique et compact sur www.qiagen.com/safety, où vous pouvez les trouver, les afficher et les imprimer pour chaque trousse et composant de trousse QIAGEN.

<p>MISE EN GARDE</p> 	<p>N'AJOUTEZ PAS de javellisant ni de solutions acides directement dans les déchets de préparation des échantillons.</p>
---	--

- Le tampon de lyse (AL) et le tampon de lavage 1 (AW1) contiennent du chlorhydrate de guanidine, qui est susceptible de former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec du javellisant. Si du liquide contenant ces tampons est renversé, nettoyez avec un détergent de laboratoire adapté et de l'eau. Si vous renversez un liquide contenant des agents potentiellement infectieux, nettoyez d'abord la zone concernée avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (V/V). Si les flacons de tampon sont endommagés ou fuit, portez des gants et des lunettes de protection avant de jeter les flacons afin d'éviter de vous blesser ou de blesser d'autres personnes.

- QIAGEN n'a pas testé les déchets liquides produits par les procédures QIAamp DSP DNA Blood Mini pour déterminer s'ils contenaient des matériaux infectieux résiduels. Une contamination des déchets liquides par des matériaux infectieux résiduels est improbable mais ne peut être exclue complètement. Par conséquent, les déchets liquides doivent être traités comme des déchets infectieux et doivent être manipulés et éliminés conformément à la réglementation de sécurité locale en vigueur.
- Les échantillons sont potentiellement infectieux. Mettez au rebut les échantillons et les autres déchets produits par les dosages conformément aux procédures de sécurité locales.

Coordonnées en cas d'urgence

CHEMTREC

États-Unis et Canada 1-800-424-9300

À l'extérieur des États-Unis et du Canada +1 703-527-3887

Précautions

Les indications suivantes de danger et de précaution s'appliquent aux composants de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Buffer AL



Contient : chlorhydrate de guanidine et acide maléique. Avertissement! Peut être nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une réaction allergique cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : Demander un avis médical/consulter un médecin. Retirer les vêtements contaminés et les laver avant leur réutilisation. Éliminer le contenu/récipient dans un centre de traitement des déchets agréé.

Buffer AW1



Contient : chlorhydrate de guanidine. Avertissement! Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. Retirer les vêtements contaminés et les laver avant leur réutilisation. Éliminer le contenu/récipient dans un centre de traitement des déchets agréé.

QIAGEN Protease



Contient : subtilisine. Danger! Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Provoque de graves lésions oculaires. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut provoquer une irritation des voies respiratoires. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. Porter un équipement de protection respiratoire. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position confortable pour la respiration.

Mise au rebut

Les déchets contiennent des échantillons et de réactifs. Puisque ces déchets peuvent contenir des matières toxiques ou infectieuses, ils doivent être mis au rebut de manière appropriée. Consultez les règles de sécurité locales en matière de mise au rebut.

Pour obtenir plus de renseignements, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne au format PDF sur www.qiagen.com/safety, où vous pouvez les trouver, les afficher et les imprimer pour chaque trousse et composant de trousse QIAGEN.

Conservation et manipulation des réactifs

Il convient de porter une attention particulière aux dates d'expiration et aux conditions de conservation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. N'utilisez pas des composants périmés ou mal conservés.

Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini doivent être conservées à une température comprise entre 2 °C et 8 °C dès leur réception et elles peuvent être utilisées jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte de la trousse.

Remarque : Pour s'assurer que les composants de différentes trousse ne sont pas mélangés, veuillez étiqueter les colonnes de centrifugation QIAamp Mini avec les numéros de lot respectifs.

Tous les tampons peuvent être conservés à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) jusqu'à la date d'expiration figurant sur la boîte.

La QIAGEN Protease (QP) lyophilisée peut être conservée à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) jusqu'à la date d'expiration de la trousse sans perte de son efficacité.

Stabilité pendant l'utilisation

La QIAGEN Protease (QP) reconstituée est stable pendant une période d'un an au maximum lorsqu'elle est conservée entre 2 °C et 8 °C, mais pas au-delà de la date d'expiration de la trousse. Vous devez éviter de conserver la solution mère de QIAGEN Protease (QP) à température ambiante pendant de longues périodes.

Le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué et le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué sont stables pendant une durée d'un an au maximum lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C), mais pas au-delà de la date d'expiration de la trousse.

Pour la préparation des tampons de la procédure automatisée, suivez les instructions fournies dans le *manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube Connect MDx* (qui se trouve sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur le site www.qiagen.com).

Prélèvement, conservation et manipulation des échantillons

Remarque : La stabilité de l'échantillon dépend fortement de plusieurs facteurs et de l'application spécifique en aval. Elle a été évaluée avec des exemples d'applications en aval. Il incombe à l'utilisateur de consulter le mode d'emploi de l'application spécifique en aval utilisée dans son laboratoire et/ou de valider l'ensemble du flux de travail afin d'établir les conditions de conservation appropriées.

Pour connaître les recommandations générales en matière de prélèvement, de transport et de conservation, consultez la directive MM13-A approuvée par le CLSI intitulée « Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods (Prélèvement, transport, préparation et conservation des échantillons pour les méthodes moléculaires) ». De plus, vous devez suivre les instructions du fabricant du dispositif de prélèvement des échantillons sélectionné pour la préparation, la conservation, le transport et la manipulation générale des échantillons. Indépendamment des instructions du fabricant des tubes de prélèvement sanguin, l'extraction d'ADN génomique à partir de sang total veineux doit être effectuée conformément à la norme ISO 20186-2:2019 (E).

Remarque : Selon la norme ISO 20186-2:2019(E), l'héparine retrouvée dans les tubes de prélèvement sanguin peut affecter la pureté des acides nucléiques isolés, et son éventuel transfert dans les éluats peut inhiber certaines applications en aval. Par conséquent, il est conseillé d'utiliser des échantillons de sang traités à l'EDTA ou au citrate comme anticoagulant.

Si vous utilisez des échantillons de sang frais dans les tubes primaires, mélangez soigneusement les échantillons de sang (p. ex. en retournant les tubes plusieurs fois) avant le transfert des échantillons. Les échantillons congelés (maximum de 3 cycles de congélation/décongélation) doivent être décongelés rapidement dans un bain-marie à 37 °C avec une légère agitation pour produire un mélange homogène, puis équilibrés à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) avant de commencer la procédure. N'utilisez pas des échantillons de sang ayant été congelés et décongelés plus de 3 fois. Pour que le transfert des échantillons soit fiable, il faut éviter la formation de mousse dans les tubes d'échantillons. Évitez la formation de caillots dans les échantillons et transférez les échantillons sans les caillots. Les cryoprécipités formés pendant la décongélation des échantillons congelés obstrueront la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini ou pourraient nuire à la procédure automatisée sur l'instrument QIAcube Connect MDx. Si des cryoprécipités sont visibles, évitez de les aspirer.

Le rendement et la qualité de l'ADN purifié dépendent des conditions de conservation du sang. Des échantillons de sang plus frais peuvent produire de meilleurs résultats. Pour une conservation à court terme (durée maximale de 10 jours), il est conseillé de les conserver à une température entre 2 °C et 8 °C. Cependant, pour les applications nécessitant une taille de fragment maximale, comme un buvardage de Southern, il est conseillé de les conserver à une température entre 2 °C et 8 °C d'une durée maximale de 3 jours, le taux de dégradation de l'ADN sera faible après cette période. Pour une conservation à long terme (plus de 10 jours), prélevez le sang dans des tubes contenant un anticoagulant standard (de préférence l'EDTA, si de l'ADN de haut poids moléculaire est nécessaire) et conservez les tubes à une température de -20 °C ou -80 °C.

Remarques importantes

Points importants avant de commencer un protocole

- Après avoir reçu la trousse, vérifiez que ses composants ne sont pas endommagés. Si les emballages ou les flacons de tampon sont endommagés, contactez les services techniques QIAGEN ou votre distributeur local. En cas de renversement de liquide, voir la section « Renseignements sur la sécurité » (page 15). N'utilisez pas des composants de trousse endommagés, car cela peut réduire la performance de la trousse.
- Changez systématiquement les embouts de pipette entre les transferts de liquides. Afin de minimiser tout risque de contamination croisée, il est fortement conseillé d'utiliser des embouts de pipette équipés de dispositifs anti-aérosols.
- Utilisez systématiquement des gants jetables tout au long de la procédure et vérifiez régulièrement qu'ils ne sont pas contaminés par du matériel de l'échantillon. Jetez les gants lorsqu'ils sont contaminés.
- Afin de minimiser le risque de contamination croisée, ouvrez seulement un tube à la fois.
- Après toutes les étapes d'agitation, centrifuger les tubes de microcentrifugation par petites impulsions afin de retirer les gouttes présentes sur l'intérieur des couvercles. L'utilisateur doit maintenir la traçabilité des échantillons durant toute la procédure.
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C).
- N'utilisez pas les composants d'autres trousse avec la trousse que vous êtes en train d'utiliser, sauf si les numéros de lot sont identiques.
- Évitez la contamination microbienne des réactifs de la trousse.
- Pour minimiser le risque d'infection par des matériaux potentiellement infectieux, il est conseillé de travailler sous écoulement d'air laminaire jusqu'à la fin de la lyse des échantillons.
- Cette trousse doit uniquement être utilisée par du personnel formé aux pratiques de laboratoire de diagnostic in vitro.

Préparation des réactifs et tampons

- Préparation de la QIAGEN Protease

Ajoutez 1,2 ml de solvant de protéase (PS) au flacon de QIAGEN Protease (QP) lyophilisée et mélangez soigneusement. Pour éviter la formation de mousse, mélangez en retournant le flacon plusieurs fois. Vérifiez que la QIAGEN Protease (QP) est complètement dissoute.

Important : N'ajoutez pas de QIAGEN Protease (QP) directement au tampon de lyse (AL).

- Préparation du tampon de lavage 1

À l'aide d'une éprouvette graduée, ajoutez 25 ml d'éthanol (96–100 %) au flacon contenant 19 ml de concentré de tampon de lavage 1 (AW1). Conservez le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C).

Important : Mélangez toujours le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué en retournant le flacon plusieurs fois avant de commencer la procédure.

- Préparation du tampon de lavage 2

À l'aide d'une éprouvette graduée, ajoutez 30 ml d'éthanol (96–100 %) au flacon contenant 13 ml de concentré de tampon de lavage 2 (AW2). Conservez le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C).

Important : Mélangez toujours le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué en retournant le flacon plusieurs fois avant de commencer la procédure.

- Préparation du tampon d'éluion

Un flacon de tampon d'éluion (AE) est fourni avec la trousse. Pour éviter la contamination du tampon d'éluion (AE), il est fortement conseillé d'utiliser des embouts de pipette équipés de dispositifs anti-aérosols lors du pipetage du tampon d'éluion (AE) du flacon et de reboucher le flacon immédiatement après.

Important : Le tampon d'éluion (AE) contient de l'azoture de sodium comme conservateur qui présente une absorbance à 260 nm. Par conséquent, vérifiez que le blanc contient la même concentration d'azoture de sodium que l'éluat lors de la quantification de l'ADN dans l'éluat par mesure de l'absorbance à 260 nm, lors de la détermination de la pureté de l'ADN dans l'éluat par mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm, ou lors du balayage de l'absorbance dans la plage de 220 nm à 350 nm. Par exemple, en cas de préparation de l'éluat pour une mesure de l'absorbance en diluant 50 µl d'éluat dans 100 µl d'eau, il convient de préparer le blanc en diluant 50 µl de tampon d'éluion (AE) dans 100 µl d'eau. Pour les dilutions, utilisez de l'eau fraîche et distillée.

Manipulation des colonnes de centrifugation QIAamp Mini

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

- Transférer avec précaution l'échantillon ou la solution vers la colonne de centrifugation QIAamp Mini. Déposez l'échantillon dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini à l'aide d'une pipette sans mouiller le bord de la colonne.
- Évitez de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec l'embout de pipette.
- Ouvrir une seule colonne de centrifugation QIAamp Mini à la fois et prendre garde à ne pas générer d'aérosols.

Configuration du système de dépression QIAvac 24 Plus

Assurez-vous de correctement configurer la colonne de centrifugation QIAamp Mini, le VacConnector (VC) et la VacValve (voir la Figure 2).

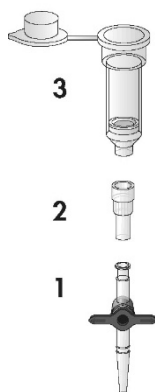


Figure 2. Assemblage des composants de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit pour le traitement des échantillons sous vide. (1) VacValve, (2) VacConnector (VC) et (3) colonne de centrifugation QIAamp Mini.

Si la procédure de dépression est appliquée avec le système de dépression QIAvac 24 Plus, il est conseillé d'étiqueter les tubes de lyse (LT), les tubes d'éluion (ET) et les colonnes de centrifugation QIAamp Mini selon le schéma de la Figure 3 (voir la page suivante), afin d'éviter de mélanger les échantillons. Cette figure peut être photocopiée et étiquetée avec les noms des échantillons. Il est conseillé d'utiliser un schéma similaire avec d'autres systèmes de dépression ou dans le cadre de la procédure de centrifugation.

Date : _____

Opérateur : _____

ID de la série d'analyses : _____

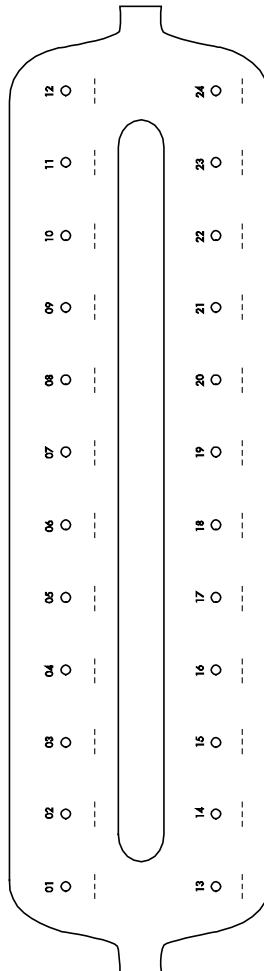


Figure 3. Schéma d'étiquetage des tubes de lyse (LT), des tubes d'élution (ET) et des colonnes de centrifugation QIAamp Mini utilisés sur le système de dépression QIAvac 24 Plus.

Procédure

Protocole : Isolation et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang au moyen d'une microcentrifugeuse/purification automatisée sur l'instrument QIAcube Connect MDx

Pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique des échantillons de 200 µl de sang total traités à l'EDTA ou au citrate, avec une microcentrifugeuse ou de façon automatisée sur le QIAcube Connect MDx.

Points importants avant de commencer


- La procédure ci-dessous fournit des instructions pour le traitement d'un seul échantillon de sang. Toutefois, il est possible de traiter simultanément plusieurs échantillons. Le nombre dépend de la capacité de la microcentrifugeuse utilisée.
- Le traitement automatisé de 2 à 10 ou 12 échantillons peut être effectué sur l'instrument QIAcube Connect MDx.
- Pour l'automatisation, suivez les instructions fournies sur l'interface utilisateur (QIAcube Connect MDx) et consultez le *manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube Connect MDx* (qui se trouve sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur le site www.qiagen.com).

Étapes à suivre avant de commencer



- Équilibrez les échantillons de sang à température ambiante et prenez soin de bien les mélanger.
- Assurez-vous que tous les réactifs et les colonnes de centrifugation QIAamp Mini (dans les emballages fermés) sont équilibrés à température ambiante.

- Préchauffez un bloc chauffant à 56 °C. Il sera utilisé à l'étape 4 (requis pour la procédure manuelle et la procédure automatisée avec la lyse manuelle en dehors de l'instrument).
- Veillez à ce que le tampon de lavage 1 (AW1), le tampon de lavage 2 (AW2) et la QIAGEN Protease (QP) soient préparés conformément aux instructions indiquées dans la section « Préparation des réactifs et tampons » à la page 22.
- Si nécessaire, dissolvez les précipités présents dans le tampon de lyse (AL) par incubation à 56 °C.
- Les procédures du contrôle de la qualité QIAGEN utilisent un test fonctionnel pour chaque lot de trousse. Par conséquent il convient de ne pas mélanger les réactifs issus de différents lots de trousse et de ne pas combiner les réactifs issus de différents lots de réactifs.

Procédure


- Pour la procédure manuelle avec une microcentrifugeuse, suivez les étapes 1–15.
 - Cette procédure peut être automatisée en 3 versions différentes :
 - Volume d'élution : 100 µl entièrement automatisée (automatisation à partir de l'étape 1)
 - Volume d'élution : 200 µl entièrement automatisée (automatisation à partir de l'étape 1)
 - Lyse manuelle : partiellement automatisée avec une lyse manuelle en dehors de l'instrument et des volumes d'élution de 100 à 200 µl par incréments de 10 µl (automatisation à partir de l'étape 5)
1. Pipettez 20 µl de QIAGEN protease (QP) dans un tube de lyse (LT).
 -  Vérifiez la date d'expiration de la protéase reconstituée avant utilisation.
 2. Ajoutez 200 µl d'échantillon de sang au tube de lyse (LT).

3. Ajoutez 200 µl de tampon de lyse (AL) au tube de lyse (LT), fermez le couvercle, et mélangez au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 s.
 - ❗ Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le tampon de lyse (AL) soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène.
 - ❗ Comme le tampon de lyse (AL) présente une viscosité élevée, veillez à bien ajouter le bon volume de tampon de lyse (AL) en pipettant soigneusement et en utilisant une pipette appropriée.
 - ❗ N'ajoutez pas de QIAGEN Protease (QP) directement au tampon de lyse (AL).
4. Incubez à 56 °C pendant 10 min.
5. Centrifugez le tube de lyse (LT) pendant ≥ 5 s à la vitesse maximale pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
 - ❗ Si la lyse manuelle (étapes 1–5) a été effectuée de façon externe, les étapes suivantes (étapes 6–15) peuvent être automatisées sur l'instrument QIAcube Connect MDx en utilisant le protocole de lyse manuelle.
6. Ajoutez 200 µl d'éthanol (96–100 %) au tube de lyse (LT), fermez le couvercle, et mélangez au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 s.
7. Centrifugez le tube de lyse (LT) pendant ≥ 5 s à la vitesse maximale pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
8. Déposez avec précaution la totalité du lysat récupéré à l'étape 7 dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec l'embout de pipette.
 - ❗ Pour le traitement de plusieurs échantillons, n'ouvrez qu'un tube de lyse (LT) à la fois.
9. Fermez le couvercle de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifugez à environ 6000 x g pendant 1 min. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage (WT) propre et mettez le tube contenant le filtrat au rebut.

-  Si le lysat n'est pas complètement passé à travers la membrane après la centrifugation à 6000 x g (8000 tr/min), centrifugez encore 1 min à la vitesse maximale (jusqu'à 20 800 x g).
-  Si le lysat ne passe toujours pas à travers la membrane pendant la centrifugation, mettez l'échantillon au rebut et répétez l'isolation et la purification avec un nouvel échantillon, en commençant par l'étape 1 de la page 27.

10. Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 500 µl de tampon de lavage 1 (AW1) sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec l'embout de pipette.
11. Fermez le couvercle de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifugez à environ 6000 x g pendant 1 min. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage (WT) propre et mettez le tube contenant le filtrat au rebut.
12. Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 500 µl de tampon de lavage 2 (AW2) sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec l'embout de pipette.
13. Fermez le couvercle de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifugez à la vitesse maximale (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pendant 1 min. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage (WT) propre et mettez le tube contenant le filtrat au rebut.

Centrifugez à la vitesse maximale (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pendant 3 min pour sécher parfaitement la membrane.

-  L'omission de la centrifugation à sec pourrait conduire à une inhibition du dosage effectué en aval.
14. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube d'élution (ET) et jetez le tube de lavage (WT) contenant le filtrat. Ouvrez avec précaution le couvercle de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et appliquez 50 à 200 µl de tampon d'élution (AE) au centre de la membrane.

- ❗ Il est important d'utiliser un nouveau tube d'élution (ET) pour éviter toute contamination par le tampon de lavage résiduel qui pourrait inhiber le dosage effectué en aval.
- ❗ Il est particulièrement important de déposer le tampon d'élution (AE) au centre de la membrane pour les petits volumes d'élution, afin d'optimiser la récupération des acides nucléiques et du tampon d'élution (AE).

15. Fermez le couvercle et incubez à température ambiante pendant 1 min. Centrifugez à environ 6000 x g (8000 tr/min) pendant 1 min afin d'éluer l'ADN.

- ❗ Orientez les couvercles des tubes d'élution (ET) de manière 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, orientez les couvercles dans le sens inverse des aiguilles d'une montre).
- ❗ En cas d'automatisation de toutes les procédures, retirez les éluats de l'instrument directement après la fin de la série d'analyses et conservez-les correctement.

Protocole : Isolation et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang au moyen d'un système de dépression

Pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique des échantillons de 200 µl de sang total traités à l'EDTA ou au citrate, avec un système de dépression tel que le système de dépression QIAvac 24 Plus.

Information importante avant de commencer

La procédure ci-dessous fournit des instructions pour le traitement d'un seul échantillon de sang. Cependant, jusqu'à 24 échantillons peuvent être traités simultanément sur le système de dépression QIAvac 24 Plus.

Étapes à suivre avant de commencer

- Équilibrez les échantillons de sang à température ambiante et prenez soin de bien les mélanger.
- Assurez-vous que tous les réactifs et les colonnes de centrifugation QIAamp Mini (dans les emballages fermés) sont équilibrés à température ambiante.
- Préchauffez un bloc chauffant à 56 °C. Il sera utilisé à l'étape 4.
- Veillez à ce que le tampon de lavage 1 (AW1), le tampon de lavage 2 (AW2) et la QIAGEN Protease (QP) soient préparés conformément aux instructions indiquées dans la section « Préparation des réactifs et tampons » à la page 22.
- Si nécessaire, dissolvez les précipités présents dans le tampon de lyse (AL) par incubation à 56 °C.
- Pour limiter la contamination croisée, insérez un VacConnector (VC) dans chaque adaptateur luer du système de dépression.
- Assurez-vous que le flacon à déchets liquides du système de dépression est vide et que tous les raccords sont connectés correctement.
- Pour plus de détails sur le fonctionnement du système de dépression, notamment sa maintenance, reportez-vous au manuel fourni avec le système.

- Les procédures du contrôle de la qualité QIAGEN utilisent un test fonctionnel pour chaque lot de trousse. Par conséquent, il convient de ne pas mélanger les réactifs issus de différents lots de trousse et de ne pas combiner les réactifs issus de différents lots de réactifs.

Procédure

1. Pipettez 20 µl de QIAGEN Protease (QP) dans un tube de lyse (LT).
 - ❗ Vérifiez la date d'expiration de la protéase reconstituée avant utilisation.
2. Ajoutez 200 µl d'un échantillon de sang au tube de lyse (LT).
3. Ajoutez 200 µl de tampon de lyse (AL) au tube de lyse (LT), fermez le couvercle, et mélangez au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 s.
 - ❗ Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le tampon de lyse (AL) soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène.
 - ❗ Comme le tampon de lyse (AL) présente une viscosité élevée, veillez à bien ajouter le bon volume de tampon de lyse (AL) en pipettant soigneusement et en utilisant une pipette appropriée.
 - ❗ N'ajoutez pas de QIAGEN Protease (QP) directement au tampon de lyse (AL).
4. Incubez à 56 °C pendant 10 min.
5. Centrifugez le tube de lyse (LT) pendant ≥ 5 s à la vitesse maximale pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
6. Ajoutez 200 µl d'éthanol (96-100 %) au tube de lyse (LT), fermez le couvercle et mélangez au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 s.
7. Centrifugez le tube de lyse (LT) pendant ≥ 5 s à la vitesse maximale pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.

8. Insérez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans le VacConnector (VC) sur le système de dépression. Vérifiez que la principale vanne de dépression (entre le système de dépression et le collecteur à vide) et la vanne du capuchon à vis (sur le collecteur à vide) sont fermées. Mettez en marche la pompe à vide.

Mettez au rebut le tube de lavage (WT) (2 ml) dans lequel la colonne de centrifugation QIAamp Mini est placée dans le blister.

La dépression est appliquée uniquement au système de connexion (le cas échéant), et non au collecteur à vide.

9. Déposez avec précaution la totalité du lysat récupéré à l'étape 7 dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec l'embout de pipette.

i Pour le traitement de plusieurs échantillons, n'ouvrez qu'un tube de lyse (LT) à la fois.

10. Ouvrez la principale vanne de dépression. Une fois le lysat passé à travers la colonne de centrifugation QIAamp Mini, fermez la principale vanne de dépression et ouvrez la vanne du capuchon à vis du collecteur à vide afin de permettre l'évacuation du collecteur. Fermez la vanne du capuchon à vis une fois le vide du collecteur évacué.

Une fois la principale vanne de dépression fermée, la dépression est appliquée uniquement au système de connexion (le cas échéant), et non au collecteur à vide.

i Utilisez la vanne du capuchon à vis du collecteur à vide pour évacuer rapidement le vide.

i Pour le traitement de plusieurs colonnes de centrifugation QIAamp Mini en même temps, il est conseillé de fermer la VacValve de chaque colonne après le passage du lysat afin de réduire la durée de cette étape.

i Si le lysat n'est pas entièrement passé à travers la membrane au bout de 10 min, placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT), fermez le couvercle et centrifugez 3 min à 6000 x g (8000 tr/min) ou jusqu'à ce que le lysat soit complètement passé à travers la membrane. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un autre tube de lavage (WT) propre et passez à l'étape 10 du protocole de la page 33.



Si le lysat ne passe toujours pas à travers la membrane pendant la centrifugation, mettez l'échantillon au rebut et répétez l'isolation et la purification avec un nouvel échantillon, en commençant par l'étape 1 de la page 32.

11. Introduisez 750 µl de tampon de lavage 1 (AW1) dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec l'embout de pipette. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et fermez la principale vanne de dépression. Une fois le tampon de lavage 1 (AW1) passé à travers la colonne de centrifugation QIAamp Mini, fermez la principale vanne de dépression et ouvrez la vanne du capuchon à vis afin de permettre l'évacuation du collecteur. Fermez la vanne du capuchon à vis une fois le vide du collecteur évacué.

12. Introduisez 750 µl de tampon de lavage 2 (AW2) dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec l'embout de pipette. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et fermez la principale vanne de dépression. Une fois le tampon de lavage 2 (AW2) passé à travers la colonne de centrifugation QIAamp Mini, fermez la principale vanne de dépression et ouvrez la vanne du capuchon à vis afin de permettre l'évacuation du collecteur. Fermez la vanne du capuchon à vis une fois le vide du collecteur évacué.

13. Fermez le couvercle de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, retirez-la du système de dépression et jetez le VacConnector (VC). Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans le tube de lavage (WT) et centrifugez à la vitesse maximale (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pendant 3 min pour sécher la membrane complètement.



L'omission de la centrifugation à sec pourrait conduire à une inhibition du dosage effectué en aval.

14. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube d'élution (ET) et jetez le tube de lavage (WT) contenant le filtrat. Ouvrez avec précaution le couvercle de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et appliquez 50 à 200 µl de tampon d'élution (AE) au centre de la membrane.

- ❗ Il est important d'utiliser un nouveau tube d'élution (ET) pour éviter toute contamination par le tampon de lavage résiduel qui pourrait inhiber le dosage effectué en aval.
- ❗ Il est particulièrement important de déposer le tampon d'élution (AE) au centre de la membrane pour les petits volumes d'élution, afin d'optimiser la récupération des acides nucléiques et du tampon d'élution (AE).

15. Fermez le couvercle et incubez à température ambiante pendant 1 min. Centrifugez à $6000 \times g$ (8000 tr/min) pendant 1 min afin d'éluer l'ADN.

- ❗ Orientez les couvercles des tubes d'élution (ET) de manière 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, orientez les couvercles dans le sens inverse des aiguilles d'une montre).
- ❗ Suivez la procédure de maintenance pour le système de dépression après avoir exécuté ce protocole (voir le manuel fourni avec le système de dépression pour de plus amples renseignements).

Contrôle de la qualité

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

Limitations

La performance du système a été établie à l'aide de sang total pour l'isolation de l'ADN génomique.

Les renseignements sur l'utilisation de QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit se trouvent dans la section « Description et principe ». La procédure automatisée est décrite dans la section « Protocole : Isolation et purification de l'ADN génomique des échantillons de sang au moyen d'une microcentrifugeuse/purification automatisée sur l'instrument QIAcube Connect MDx ».

Il incombe à l'utilisateur de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire et non couvertes par les études 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. Pour une validation ultérieure, il est conseillé de suivre les directives de la Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques (ICH) exposées dans ICH Q2 (R1) « Validation of Analytical Procedures : Text And Methodology ».

Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés en tenant compte des autres observations cliniques ou résultats biologiques disponibles.

Caractéristiques de performances

Les caractéristiques de performances applicables sont indiquées sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur le site www.qiagen.com.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se présenter. Pour obtenir plus de renseignements, consultez également la page de la Foire aux Questions (Frequently Asked Questions, FAQ) de notre centre d'assistance technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des services techniques QIAGEN sont toujours ravis de répondre à vos questions concernant les renseignements et/ou les protocoles mentionnés dans ce manuel ou sur les échantillons et les technologies de dosage (pour connaître les coordonnées, consultez le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Manipulation générale

- a) Obstruction de l'embout de la pipette pendant le transfert d'un échantillon.
- Mélangez bien les échantillons de sang (p. ex. en retournant les tubes plusieurs fois) avant de transférer les échantillons. Les échantillons congelés doivent être dégelés rapidement dans un bain-marie à 37 °C en les agitant délicatement pour obtenir un mélange homogène, puis équilibrés à température ambiante (15 °C à 25 °C) avant de commencer la procédure.
- Évitez la formation de caillots dans les échantillons et transférez les échantillons sans les caillots. Les cryoprécipités formés pendant la décongélation des échantillons congelés obstrueront la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini ou pourraient nuire à la procédure automatisée.
- b) Obstruction de la colonne de centrifugation QIAamp Mini
- Flux de travail de la centrifugation :
- Si le lysat n'est pas complètement passé à travers la membrane après la centrifugation à 6000 x g (8000 tr/min), centrifugez encore 1 min à la vitesse maximale (jusqu'à 20 800 x g).
- Si le lysat ne passe toujours pas à travers la membrane pendant la centrifugation, mettez l'échantillon au rebut et répétez l'isolation et la purification avec un nouvel échantillon, en commençant par l'étape 1.
- Flux de travail de la dépression :
- Si le débit est réduit, la durée de la dépression peut être prolongée.
- Autrement, fermez la VacValve, si elle est en cours d'utilisation, puis retirez délicatement l'ensemble VacConnector–VacValve de la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans perdre du lysat.
- Retirez la colonne de centrifugation QIAamp Mini du collecteur à vide, placez-la dans un tube de lavage (WT) de 2 ml, puis centrifugez à la vitesse maximale jusqu'à ce que l'échantillon soit passé à travers la membrane. Remplacez l'ensemble VacConnector–VacValve contenant le lysat restant. Mettez en marche la pompe à vide, ouvrez la VacValve, puis continuez de charger le reste du lysat.

Commentaires et suggestions

Répétez la procédure ci-dessus si la colonne de centrifugation QIAamp Mini est toujours obstruée.

Si le lysat ne passe toujours pas à travers la membrane pendant la centrifugation, mettez l'échantillon au rebut et répétez l'isolation et la purification avec un nouvel échantillon, en commençant par l'étape 1.

Renseignements généraux

Des cryoprécipités pourraient s'être formés en raison d'un nombre élevé de cycles de congélation/décongélation. Ils pourraient obstruer la colonne de centrifugation QIAamp Mini. N'utilisez pas des échantillons de sang ayant été congelés et décongelés plus de 3 fois. Les échantillons congelés doivent être dégelés rapidement dans un bain-marie à 37 °C en les agitant délicatement pour obtenir un mélange homogène, puis équilibrés à température ambiante (15 °C à 25 °C) avant de commencer la procédure.

- c) Un précipité s'est formé dans le tampon de lyse (AL)
- Veuillez le dissoudre en incubant le tampon de lyse (AL) à 56 °C
- d) Volumes d'élution variables
- Le volume de l'éluat récupéré dépend de la nature de l'échantillon. Le volume de l'éluat peut être inférieur au volume du tampon d'élution (AE) déposé sur la colonne, car une fraction du tampon d'élution (AE) est retenue par la membrane de la colonne après la centrifugation. Appliquez le tampon d'élution (AE) au centre de la membrane. Il est particulièrement important de déposer le tampon d'élution (AE) au centre de la membrane pour les petits volumes d'élution, afin d'optimiser la récupération des acides nucléiques et du tampon d'élution (AE).
- e) Une dépression d'environ 800 à 900 mbar n'est pas atteinte.
- Le collecteur à vide n'est pas fermé solidement. Appuyez sur le couvercle du collecteur à vide après avoir mis en marche la pompe à vide. Vérifiez que la dépression est atteinte. Le joint d'étanchéité du QIAvac est usé. Vérifiez manuellement le joint d'étanchéité du collecteur à vide et remplacez-le, si nécessaire.
- Les VacValves sont usées. Retirez toutes les VacValves et insérez les VacConnectors (VC) directement dans les extensions luer. Insérez les colonnes de centrifugation QIAamp Mini dans les VacConnectors (VC), fermez le couvercle des colonnes, puis mettez en marche la pompe à vide. Vérifiez que la dépression est atteinte. Remplacez les VacValves, si nécessaire.
- Fuite dans la connexion de la pompe à vide. Fermez toutes les extensions luer avec les bouchons luer, puis mettez en marche la pompe à vide. Vérifiez que la dépression est stable après avoir mis en marche la pompe à vide (et le Vacuum Regulator est fermé). Échangez les connexions entre la pompe à vide et le collecteur à vide, si nécessaire.
- Si la dépression n'est toujours pas atteinte, remplacez la pompe à vide par une pompe plus puissante.

Commentaires et suggestions

-
- | | | |
|----|--|---|
| f) | Problèmes dans le flux de travail automatisé | Consultez le <i>manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube Connect MDx</i> (qui se trouve sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur le site www.qiagen.com). |
|----|--|---|
-

Faible rendement en ADN











- | | | |
|----|--|---|
| a) | Lyse des échantillons incomplète | <p>Si la QIAGEN Protease (QP) a été exposée à une température élevée pendant une longue période, elle peut perdre son activité. Répétez la procédure en utilisant de nouveaux échantillons et de la QIAGEN Protease (QP) fraîche.</p> <p>Vous devez dissoudre la QIAGEN Protease (QP) dans le Solvant de protéase (PS) en suivant les instructions ci-dessus. Pour éviter la formation de mousse, mélangez en retournant le flacon plusieurs fois. Vérifiez que la QIAGEN Protease (QP) est complètement dissoute. N'ajoutez pas de QIAGEN Protease (QP) directement au tampon de lyse (AL).</p> <p>Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le tampon de lyse (AL) soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène. Comme le tampon de lyse (AL) présente une viscosité élevée, veillez à bien ajouter le bon volume de tampon de lyse (AL) en pipettant soigneusement et en utilisant une pipette appropriée.</p> |
| b) | Utilisation d'un éthanol de pourcentage inférieur à 96–100 %. | Répétez la procédure de purification en utilisant de nouveaux échantillons et de l'éthanol à 96–100 %. N'utilisez pas d'alcool dénaturé, ce qui contient d'autres substances telles que du méthanol ou de la méthyléthylcétone. |
| c) | Préparation incorrecte du Buffer AW1 ou AW2 | Assurez-vous que les concentrés des Wash Buffers AW1 et AW2 sont dilués dans le volume d'éthanol à 96–100 % indiqué, puis mélangez en retournant les flacons plusieurs fois avant de commencer la procédure. |
| d) | Les échantillons de sang ne sont pas conservés correctement | <p>Le rendement et la qualité de l'ADN purifié dépendent des conditions de conservation du sang. Des échantillons de sang plus frais peuvent produire de meilleurs résultats. Pour une conservation à court terme (durée maximale de 10 jours), il est conseillé de les conserver à une température entre 2 °C et 8 °C. Cependant, pour les applications nécessitant une taille de fragment maximale, comme un buvardage de Southern, il est conseillé de les conserver à une température entre 2 °C et 8 °C d'une durée maximale de 3 jours, le taux de dégradation de l'ADN sera faible après cette période. Pour une conservation à long terme (plus de 10 jours), prélevez le sang dans des tubes contenant un anticoagulant standard (de préférence l'EDTA, si de l'ADN de haut poids moléculaire est nécessaire) et conservez les tubes à une température de -20 °C ou -80 °C.</p> |
| e) | Les échantillons congelés n'ont pas été mélangés correctement après leur décongélation | Les échantillons congelés doivent être dégelés rapidement dans un bain-marie à 37 °C en les agitant délicatement pour obtenir un mélange homogène, puis équilibrés à température ambiante (15 °C à 25 °C) avant de commencer la procédure. |




Fiable performance de l'ADN dans les réactions en aval








- | | |
|--|---|
| a) Peu ou pas d'ADN dans l'éluat | Consultez la section « Faible rendement en ADN » ci-dessus pour connaître les raisons possibles. Augmentez la quantité d'éluat ajoutée à la réaction, si possible. |
| b) Utilisation d'un volume d'éluat inapproprié | Déterminez le volume maximum d'éluat approprié pour votre application en aval. Réduisez ou augmentez le volume d'éluat ajouté à l'application en aval en conséquence. Le volume d'éluat peut être ajusté proportionnellement. Une élution avec des volumes inférieurs de tampon d'élution (AE) produit une concentration plus élevée d'acides nucléiques, mais peut réduire le rendement. |
| c) Utilisation d'une quantité insuffisante d'ADN | Quantifiez l'ADN purifié par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm. |
| d) Utilisation d'une quantité excessive d'ADN | Un excès d'ADN peut inhiber certaines réactions enzymatiques. Quantifiez l'ADN purifié par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm. |
| e) Transfert d'inhibiteur possible | Assurez-vous d'effectuer une étape de centrifugation à sec avant l'élution pour prévenir une inhibition possible du dosage effectué en aval. Il est important d'utiliser un nouveau tube d'élution (ET) pour éviter toute contamination par le tampon de lavage résiduel qui pourrait inhiber le dosage effectué en aval. |

Symboles

Les symboles suivants peuvent être présentés dans le mode d'emploi ou apposés sur l'emballage ou les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
	Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions
	Date limite d'utilisation
	Ce produit répond aux exigences de la réglementation européenne 2017/746 pour les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	À réception
	Ouvrir à la livraison; conserver les colonnes de centrifugation QIAamp Mini à une température comprise entre 2 °C et 8 °C
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
	Composants

Symbole	Définition du symbole
CONT	Contient
NUM	Nombre
GTIN	Code article international
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Limites de température
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
VOL	Volume
	Noter la date du jour après l'ajout d'éthanol au flacon
ADD	Ajout
LYOPH	Lyophilisé
RCNS	Reconstituer dans

Symbole	Définition du symbole
	Éthanol
	Chlorhydrate de guanidine
	Subtilisine
	Produit
	Consulter le mode d'emploi
	Remarque importante
	Identifiant unique du dispositif

Pour commander

Produit	Table des matières	n° de réf.
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Pour 50 préparations : colonnes de centrifugation QIAamp Mini, tampons, réactifs, tubes, VacConnectors	61104
Produits connexes		
QIAcube Connect MDx*	Instrument et 1 an de garantie pièces et main d'œuvre	9003070
Accessoires		
QIAvac 24 Plus†	Collecteur à vide pour le traitement de 1 à 24 colonnes de centrifugation : comprend un QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, des bouchons luer et des raccords rapides	19413
Pompe à vide (230 V, 50 Hz)†	Pompe à vide universelle (capacité de 34 litres/min, 8 mbar de dépression absolue)	84020
VacConnectors (500)†	500 connecteurs jetables à utiliser avec les colonnes de centrifugation QIAamp sur les connecteurs luer	19407
VacValves (24)	24 valves à utiliser avec les systèmes de dépression QIAvac 24 et QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	À utiliser avec les collecteurs à vide QIAvac	19530
QIAvac Connecting System	Système permettant de connecter le collecteur à vide à la pompe à vide, comprenant un plateau, des flacon à déchets, des tubes, des raccords, une valve, une jauge et 24 VacValves	19419

Produit	Table des matières	n° de réf.
Rotor Adapters (10 x 24)	Pour 240 préparations : 240 adaptateurs de rotor à usage unique et 240 tubes d'éluion (1,5 ml), à utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990394
Rotor Adapter Holder	Support pour 12 adaptateurs de rotor à usage unique, à utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB (2 ml)	1000 tubes à bouchon à vis coniques sans collerette (2 ml), à utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Bouchons du portoir à agitateurs (12)	9017854
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Lot de 6 flacons de réactifs (30 ml) avec couvercles, à utiliser avec le QIAcube Connect MDx	990393
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Embouts à filtre jetables, sur portoirs (8 x 128). À utiliser avec l'instrument QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (1024)	Embouts à filtre jetables de grand calibre sur portoirs (8 x 128), non requis pour tous les protocoles. À utiliser avec l'instrument QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Embouts à filtre jetables, sur portoirs (8 x 128). À utiliser avec l'instrument QIAcube Connect MDx et les instruments QIASymphony SP/AS	990332

* Le QIAcube Connect MDx n'est pas disponible dans tous les pays. Pour obtenir plus de renseignements, contactez les services techniques QIAGEN.

† À utiliser avec les protocoles de dépression.

Pour obtenir des renseignements actualisés et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consultez le mode d'emploi de la trousse QIAGEN correspondante. Les modes d'emploi des trousse QIAGEN sont disponibles sur www.qiagen.com ou peuvent être demandés aux services techniques QIAGEN ou au distributeur local.

Historique des révisions du document

Révision	Description
R1, Juin 2022	<p>Version 3, révision 1</p> <ul style="list-style-type: none">● Mise à jour de la trousse à la version 3 par conformité aux exigences de l'IVDR● Mise à jour de Description et principe● Mise à jour de Matériel fourni (addition des ingrédients actifs) et Matériel nécessaire, mais non fourni● Mise à jour de Avertissements et précautions (ajout des sections Coordonnées en cas d'urgence et Mise au rebut)● Mise à jour de Conservation et manipulation des réactifs● Mise à jour de Prélèvement, conservation et manipulation des échantillons● Mise à jour de Remarques importantes et Procédures● Mise à jour de Limitations● Mise à jour de Caractéristiques de performances● Mise à jour de Symboles● Mise à jour de Pour commander

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Contrat de licence limité pour QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

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

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis avec le produit et avec ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce panel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. 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.
2. En dehors des licences expressément énoncées, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou son utilisation ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles expressément énoncées.
5. L'acheteur et l'utilisateur du panel s'engagent à ne pas prendre, ou autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter des actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions du présent accord de licence limité par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocat, en cas d'action en application du présent accord ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés à la trousse et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, consultez le site www.qiagen.com.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co. KG).

Juin 2022 HB-3030-001 1127543FRCA © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.

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