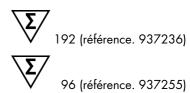
Mode d'emploi (manuel) du kit QlAsymphony® DSP DNA



Version 1



Pour utilisation en diagnostic in vitro

QIAsymphony DSP DNA Mini Kit

QIAsymphony DSP DNA Midi Kit





937236, 937255

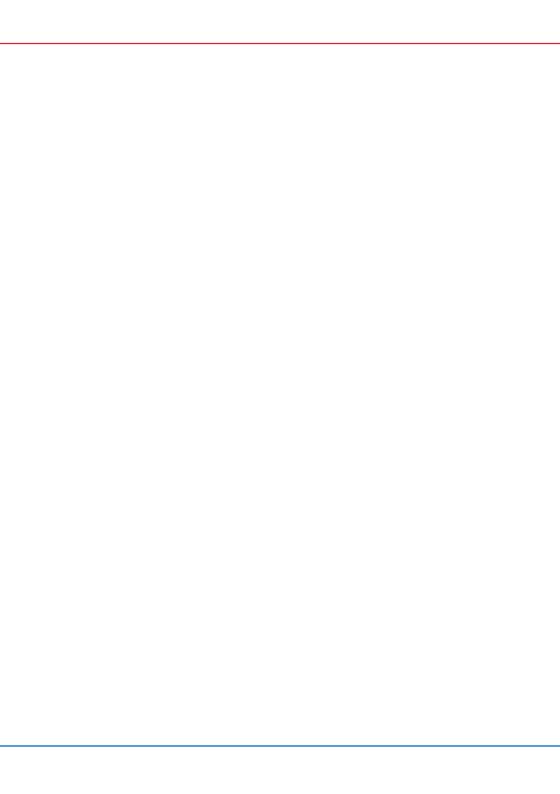


QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1 40724 Hilden ALEMAGNE



1069185FR





Contenu

Utilisation prevue	3
Résumé et explication	3
Principes de la procédure	4
Matériel fourni	7
Contenu du kit	7
Matériel nécessaire, mais non fourni	7
Avertissements et précautions	8
Conservation et manipulation des réactifs	13
Composants du kit	13
Prélèvement et préparation des échantillons	14
Procédure	14
Purification automatisée sur QIAsymphony SP	14
Protocole : purification de l'ADN	23
Contrôle qualité	26
Limitations	26
Symboles	27
Guide de résolution des problèmes	29
Annexe : quantification et détermination de la pureté de l'ADN	32
Quantification de l'ADN	32
Pureté de l'ADN	33
Pour commander	34

Utilisation prévue

Les kits QIAsymphony DSP DNA Mini et QIAsymphony DSP DNA Midi reposent sur une technologie d'isolement et de purification automatisés de l'ADN à partir d'échantillons biologiques à l'aide de particules magnétiques.

Les produits sont destinés à des utilisateurs professionnels, tels que des techniciens et des médecins, formés aux techniques de la biologie moléculaire.

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

Résumé et explication

Les kits QIAsymphony DSP DNA sont prévus exclusivement pour une utilisation combinée au QIAsymphony SP. Les kits QIAsymphony DSP DNA se composent de réactifs pour la purification automatisée et simultanée d'ADN total provenant de sang total, de couche leucoplaquettaire, de tissu et d'échantillons de tissu FFPE humains, ainsi que d'ADN viral provenant de sang total humain. Toutefois, les caractéristiques de performance n'ont pas été établies pour tous les types de virus, de tissus et de tissus FFPE, et doivent être validées par l'utilisateur. La technologie à base de particules magnétiques permet la purification d'acides nucléiques de haute qualité, qui ne contiennent pas de protéines, de nucléases ni d'autres impuretés. Les acides nucléiques purifiés sont prêts à l'emploi dans les applications en aval, telles que l'amplification ou d'autres réactions enzymatiques. Le poste de travail QIAsymphony SP exécute toutes les étapes de la procédure de purification. Il est possible de traiter jusqu'à 96 échantillons, par lot de 24, en un seul cycle. Les protocoles pour tissus et tissus FFPE nécessitent un traitement manuel préalable.

Principes de la procédure

La technologie QIAsymphony associe la vitesse et l'efficacité de la purification d'acides nucléiques sur silice à la manipulation pratique des particules magnétiques (Figure 1, cidessous). La procédure de purification est conçue pour garantir la manipulation sans risques et reproductible d'échantillons potentiellement infectieux. Elle comprend 4 étapes : la lyse, la liaison, le lavage et l'élution (voir l'organigramme, page 6). L'utilisateur peut choisir entre plusieurs volumes d'élution.

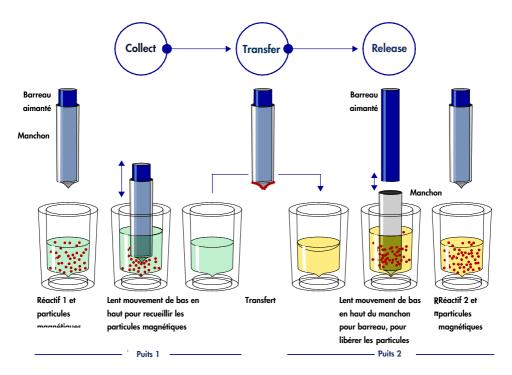
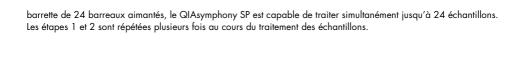
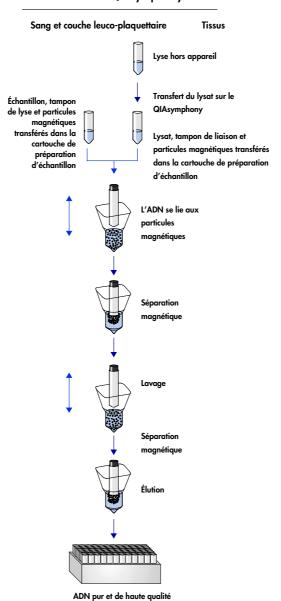


Figure 1. Schéma du principe de fonctionnement du QIAsymphony SP. L'automate traite un échantillon contenant des particules magnétiques de la manière suivante : Un barreau aimanté protégé par un manchon pénètre dans un puits contenant l'échantillon et attire les particules magnétiques. Le manchon de barreau aimanté est ensuite placé au-dessus d'un autre puits dans lequel les particules magnétiques sont libérées. Muni d'une tête magnétique contenant une



Procédure de QIAsymphony DSP



Matériel fourni

Contenu du kit

Référence	ony DSP DNA Kit		Mini 937236	Midi 937255
Nombre de préparations		192	96*	
RC	Reagent Cartridge (Cartouche de réactifs)†	REAG CART	2	2
ER	Enzyme Rack (Portoir de tubes d'enzyme)		2	2
PL	Piercing Lid (Couvercle perforateur)		2	2
ATE	Buffer ATE (Tampon ATE) (20 ml) ‡	ELU BUF	20 ml	20 ml
RSS	Reuse Seal Set (Jeu de bandelettes d'étanchéité)§		2	2
	Handbook (Manuel)		1	1

^{*} Pour 96 préparations de 1000 μ l ou 144 préparations de 400 μ l.

Matériel nécessaire, mais non fourni

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.

[†] Contient des sels de guanidine. Incompatible avec des désinfectants contenant un produit à base d'eau de Javel. Voir page 9 pour les informations de sécurité.

[‡] Contient de l'azoture de sodium comme conservateur.

¹ Voir page 27 pour la liste des symboles avec les définitions.

- QIAsymphony SP
- Sample Prep Cartridges, 8-well cartridges (Cartouches de préparation des échantillons à 8 puits) (référence 997002)
- 8-Rod Covers (Manchons pour 8 barreaux) (référence 997004)
- Filter-Tips (Cônes munis de filtre), 200 µl et 1500 µl (références 990332 et 997024)
- Tubes d'échantillons (par exemple, tubes d'échantillons de 2 ml avec bouchons à vis, Sarstedt référence 72.693, ou sans bouchon, Sarstedt référence 72.608 ou Sarstedt référence 72.694).Les formats de tubes primaires et secondaires compatibles sont répertoriés sur le site www.qiagen.com/goto/dspdnakits.
- Tubes ou plaques d'élution. Les formats de tubes et de plaques d'élution compatibles sont répertoriés sur www.giagen.com/goto/dspdnakits.
- Solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS, peut être requise pour diluer des échantillons)
- Mixeur Vortex

Facultatif: RNase A sans DNase (pour réduire la teneur en ARN)

 En cas de besoin de matériel supplémentaire pour des applications sur des tissus et du sang contaminé par un virus, se reporter aux fiches de protocole sur www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

Avertissements et précautions

Pour une utilisation dans le diagnostic in vitro

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

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, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne

au format PDF (pratique et compact) à l'adresse <u>www.giagen.com/Support/MSDS.aspx</u> où vous pouvez trouver, consulter et imprimer les FDS pour chaque kit et élément de kit QIAGEN.



ATTENTION: NE PAS verser de solutions à base d'eau de Javel ou de solutions acides directement sur les déchets de la préparation d'échantillon.

Certains tampons de la cartouche de réactifs (RC) contiennent des sels de guanidine qui peuvent former des composés hautement réactifs lorsqu'ils sont associés à de l'eau de Javel. Si le liquide contenant ces tampons est renversé, nettoyer avec un détergent de laboratoire approprié et de l'eau. Si le liquide renversé contient des agents à risque infectieux, nettoyer l'endroit contaminé d'abord avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v).

Les mentions de danger et conseils de prudence suivants s'appliquent aux composants du kit QIAsymphony DSP DNA.

QSB₁



Contient: Brij 58; guanidine thiocyanate; Isopropanol. Danger! Peut être nocif en cas d'ingestion ou par contact cutané. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut provoquer somnolence ou vertiges. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Liquide et vapeurs très inflammables. Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. 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 DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/ se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. - Ne pas fumer. Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

MBS

Attention! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin

Proteinase K



Contient: Proteinase 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. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. En cas de symptômes respiratoires: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. EN CAS D'INHALATION: s'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer. Porter un équipement de protection respiratoire.

QSL₁



Contient: maleic acid; guanidine hydrochloride. Attention! Peut être nocif en cas d'ingestion ou par inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer une allergie cutanée. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

QSW1



Contient: ethanol; guanidine hydrochloride; lithium chloride. Attention! Peut être nocif par ingestion. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Liquide et vapeurs inflammables. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. - Ne pas fumer. Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage..

QSW2



Contient: ethanol. Danger! Provoque une sévère irritation des yeux. Liquide et vapeurs très inflammables. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. - Ne pas fumer. Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

Conservation et manipulation des réactifs

Les kits QIAsymphony DSP DNA doivent être stockés debout à température ambiante (15 à 25 °C). Les particules magnétiques contenues dans les cartouches de réactifs (RC) restent actives lorsqu'elles sont stockées à cette température. Dans de bonnes conditions de stockage, le kit est stable jusqu'à la date limite d'utilisation figurant sur la boîte du kit.

Remarque: La date limite d'utilisation du kit figure sur l'étiquette de la boîte du kit QIAsymphony DSP DNA. Le fichier de résultats indique uniquement les dates limites d'utilisation de la cartouche de réactifs (RC).

Composants du kit

Les kits QlAsymphony DSP DNA contiennent une solution de protéinase K prête à l'emploi qui peut être conservée à température ambiante

Ne pas conserver les cartouches de réactifs (RC) à une température inférieure à 15 °C.

Les cartouches de réactifs (RC) entamées peuvent être conservées pendant une durée maximale de 4 semaines, ce qui permet une réutilisation rentable des réactifs et un traitement plus souple des échantillons. Sur les cartouches de réactifs (RC) entamées, remettre le couvercle du compartiment contenant les particules magnétiques et sceller la cartouche de réactif (RC) avec les bandelettes d'étanchéité fournies dès la fin du protocole pour éviter une évaporation.

Pour éviter l'évaporation des réactifs, la cartouche ne doit pas être ouverte pendant plus de 15 h (durée des cycles comprise) à une température ambiante maximale de 30 °C.

L'analyse de lots contenant un faible nombre d'échantillons (< 24) augmente le temps d'ouverture de la cartouche de réactifs (RC) et les volumes de tampon nécessaires, ce qui

13

risque de diminuer le nombre total de préparations d'échantillons qu'il est possible de réaliser avec une cartouche.

Éviter l'exposition des cartouches de réactifs (RC) aux rayons UV (par exemple, lors de leur utilisation pour la décontamination) en raison du risque associé de vieillissement prématuré des cartouches de réactifs et des tampons.

Prélèvement et préparation des échantillons

Éviter la formation de mousse dans ou sur les échantillons. Selon la nature de l'échantillon de départ, un prétraitement des échantillons peut être nécessaire.

Amener tous les échantillons à température ambiante (15 à 25 °C) avant de lancer le cycle.

Pour en savoir plus sur la procédure automatisée, y compris sur les tubes d'échantillons compatibles avec des protocoles spécifiques et les prétraitements spécifiques des échantillons, voir la fiche du protocole correspondante disponible à l'adresse www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

Procédure

Purification automatisée sur QIAsymphony SP

Avec le QIAsymphony SP, la préparation automatisée des échantillons est facile et pratique. Les échantillons, les réactifs, les consommables et les éluats sont séparés dans différents tiroirs. Il suffit de charger les échantillons, les réactifs fournis dans des cartouches spéciales et les portoirs de consommables dans les tiroirs correspondants avant un cycle. Lancer le protocole et récupérer l'ADN purifié dans le tiroir « Eluate » (Éluats) après traitement. Pour

connaître les consignes de fonctionnement, se reporter aux manuels d'utilisation fournis avec l'appareil.

Remarque: Les opérations facultatives de maintenance ne sont pas indispensables au fonctionnement de l'appareil, mais sont fortement recommandées pour réduire le risque de contamination.

La gamme des protocoles disponibles est continuellement enrichie et il est possible de télécharger d'autres protocoles QIAGEN l'adresse aratuitement www.giagen.com/goto/dspdnakits.

Chargement des cartouches de réactifs (RC) dans le tiroir « Reagents and Consumables » (Réactifs et consommables)

Les réactifs pour la purification de l'ADN sont contenus dans une cartouche de réactifs (RC) innovante (Figure 2). Chaque compartiment de la cartouche contient un réactif particulier, tel que des particules magnétiques, un tampon de lyse, un tampon de lavage ou un tampon d'élution. Il est possible de refermer les cartouches entamées à l'aide de bandelettes d'étanchéité pour une réutilisation ultérieure, ce qui évite de générer des déchets dus à des restes de réactifs à la fin de la purification.

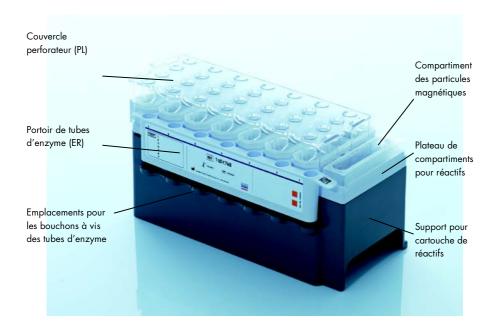


Figure 2. Cartouche de réactifs QIAsymphony (RC). La cartouche contient tous les réactifs nécessaires au cycle du protocole.

Avant de commencer la procédure, s'assurer de la remise en suspension complète des particules magnétiques. Avant la première utilisation, retirer le compartiment des particules magnétiques du plateau de la cartouche de réactifs, mélanger énergiquement au vortex pendant au moins 3 min, puis remettre le compartiment en place. Placer la cartouche de réactifs (RC) sur son support. Placer le portoir de tubes d'enzyme (ER) sur le support de la cartouche de réactifs. Avant la première utilisation d'une cartouche de réactifs (RC), placer sur celle-ci le couvercle perforateur (PL) (Figure 3, ci-dessus).

Remarque : Le couvercle perforateur (PL) est coupant. Faire preuve de précaution lors de sa mise en place sur la cartouche. Veiller à bien orienter le couvercle perforateur (PL) sur la cartouche.

Après retrait du couvercle du compartiment des particules magnétiques et ouverture des tubes d'enzyme, dont les bouchons à vis peuvent être rangés dans des emplacements prévus à cet effet (voir Figure 2 ci-dessus), la cartouche de réactifs (RC) est chargée dans le tiroir « Reagents and Consumables » .

Les cartouches de réactifs (RC) entamées peuvent être stockées jusqu'à leur prochaine utilisation, voir la section « Conservation et manipulation des réactifs », page 13.**Fehler! Textmarke nicht definiert**.

Chargement du matériel en plastique dans le tiroir « Reagents and Consumables » Les cartouches de préparation des échantillons, les manchons pour 8 barreaux (tous deux prérangés dans des boîtes) et les cônes munis de filtre jetables (cônes de 200 µl sur supports bleus, cônes de 1500 µl sur supports gris) sont chargés dans le tiroir « Reagents and

Remarque : Veiller à retirer les couvercles des boîtes avant leur chargement dans le tiroir « Reagents and Consumables ».

Remarque : Les cônes sont munis de filtres pour éviter une contamination croisée.

Les emplacements pour supports de cônes de la table de travail QIAsymphony SP peuvent accueillir les deux types de supports. Le QIAsymphony SP identifie le type de cônes chargés au moment de l'inventaire.

Remarque: Ne pas remplir les supports de cônes ni les boîtes des cartouches de préparation des échantillons ou des manchons pour 8 barreaux avant de lancer un autre cycle de protocole. L'automate est capable d'utiliser des supports de cônes et des boîtes qui ne sont pas pleins.

Consumables ».

Pour connaître les consommables nécessaires, voir la fiche du protocole correspondant disponible à l'adresse <u>www.qiagen.com/goto/dspdnakits</u>. Pour plus d'informations sur la commande de matériel en plastique, voir page 34.

Chargement du tiroir « Waste » (Poubelle)

Les cartouches de préparation des échantillons et les manchons pour 8 barreaux utilisés au cours d'un cycle sont rangés dans des boîtes vides situées dans le tiroir « Waste ». Veiller à ce que le tiroir « Waste » contienne suffisamment de boîtes vides pour contenir tout le matériel en plastique usagé issu d'un cycle de protocole.

Remarque: Veiller à retirer les couvercles des boîtes avant leur chargement dans le tiroir « Waste ». En cas d'utilisation de boîtes pour manchons pour 8 barreaux dans le but de récupérer les cartouches de préparation des échantillons ainsi que les manchons pour 8 barreaux, veiller à retirer le séparateur de boîtes.

Un sachet de récupération des cônes usagés doit être fixé sur la face avant du tiroir « Waste ».

Remarque: L'automate ne vérifie pas la présence d'un sachet pour cônes usagés. Vérifier la bonne fixation du sachet pour cônes usagés avant le démarrage d'un cycle de protocole. Pour plus d'informations, consulter les manuels d'utilisation de l'appareil. Vider le sachet pour cônes usagés après le traitement d'un maximum de 96 échantillons, afin d'éviter l'enrayage dû aux cônes.

Un flacon à déchets recueille les liquides usagés issus de la purification. Le tiroir « Waste » ne peut être fermé qu'à condition que le flacon à déchets soit en place. Éliminer les déchets liquides conformément aux règles locales de sécurité et de respect de l'environnement en vigueur. Ne pas traiter à l'autoclave le flacon à déchets rempli. Vider le flacon après le traitement d'un maximum de 96 échantillons.

Chargement du tiroir « Eluate »

Charger le portoir d'élution requis dans le tiroir « Eluate ». Dans la mesure où le stockage à long terme des éluats dans le tiroir « Eluate » peut entraîner leur évaporation, il est fortement recommandé d'utiliser la position de refroidissement : utiliser uniquement l'emplacement « Elution slot 1 » (Emplacement d'élution 1) avec le support réfrigérant correspondant.

Inventaire

Avant le démarrage d'un cycle, l'appareil vérifie que les consommables chargés dans les différents tiroirs sont en quantités suffisantes pour le(s) lot(s) de la file d'attente.

Préparation des échantillons

Les kits QIAsymphony DSP DNA sont conçus pour la purification automatisée de l'ADN total provenant de sang total, de couche leuco-plaquettaire, de tissus et d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) humains, ainsi que d'ADN viral provenant de sang total humain (Tableau 1, page 21).

Éviter la formation de mousse dans ou sur les échantillons. Selon la nature de l'échantillon de départ, un prétraitement des échantillons peut être nécessaire. Amener tous les échantillons à température ambiante (15 à 25 °C) avant de lancer le cycle. Les protocoles pour tissus et tissus FFPE nécessitent un traitement manuel préalable.

Pour en savoir plus sur la procédure automatisée, y compris sur les tubes d'échantillons compatibles avec des protocoles spécifiques et les prétraitements spécifiques des échantillons, voir la fiche du protocole correspondant disponible à l'adresse www.giagen.com/goto/dspdnakits.

Rendement d'ADN purifié

Les rendements d'ADN dépendent du type d'échantillon, du nombre de cellules nucléées dans l'échantillon, de la qualité de l'échantillon de départ et du protocole employé pour isoler l'ADN. Une élution en volumes plus petits accroît la concentration finale d'ADN dans l'éluat, mais réduit légèrement le rendement d'ADN global. Il est recommandé d'utiliser un volume d'élution convenant à l'application prévue en aval. Les kits QIAsymphony DSP DNA purifient conjointement l'ARN et l'ADN s'ils sont présents simultanément 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. Pour plus d'informations. fiches de protocole à l'adresse reporter aux www.giagen.com/goto/dspdnakits.

Stockage de l'ADN

L'ADN purifié peut être conservé à une température de 2 à 8 °C pendant une durée maximale de 5 jours. Pour le stockage à long terme, le conserver à une température de – 20 °C ou de –80 °C.

Tableau 1. Aperçu du protocole

Échantillon	Volume d'échantillon (µl)	Volume d'élution (µl)	Kit	Protocole pour QIAsymphony SP
Sang total	200 400	50, 100, 200 100, 200, 400	Mini Midi	Blood 200 DSP Blood 400 DSP
	1000	200, 400, 500	Midi	Blood 1000 DSP
Couche leucocytaire	200 400	200, 300, 400 200, 400	Mini Midi	DNA Buffy Coat 200 DSP DNA Buffy Coat 400 DSP
Sang contaminé par un virus	200	60, 85, 110, 165	Mini	VirusBlood200 DSP
Tissu	200 200	50, 100, 200,400 100, 200, 400	Mini Mini	Tissue LC 200 DSP Tissue HC 200 DSP

Remarques importantes avant de commencer

- S'assurer de bien connaître le fonctionnement du QIAsymphony SP. Pour connaître les consignes de fonctionnement, se reporter aux manuels d'utilisation fournis avec l'appareil.
- Les opérations facultatives de maintenance ne sont pas indispensables au fonctionnement de l'appareil, mais sont fortement recommandées pour réduire le risque de contamination.
- Avant de commencer la procédure, lire la section « Principes de la procédure », à partir de la page 4.
- S'assurer de prendre connaissance de la fiche du protocole correspondant à la procédure à réaliser (www.giagen.com/goto/dspdnakits).
- Avant la première utilisation d'une cartouche de réactifs, vérifier l'absence de précipité dans les tampons QSL1 et QSB1. Si nécessaire, retirer les compartiments contenant les tampons QSL1 et QSB1 de la cartouche de réactifs et les incuber pendant 30 min à 37 °C en agitant de temps en temps pour dissoudre le précipité. Veiller à remettre les compartiments en bonne position. Si la cartouche de réactifs est déjà perforée, vérifier que les compartiments sont scellés par des bandelettes d'étanchéité et incuber la

- cartouche de réactifs entière à $37\,^{\circ}\text{C}$ pendant $30\,\text{min}$ au bain-marie en agitant de temps en temps.*
- Essayer d'éviter une agitation énergique de la cartouche de réactifs (RC), afin de ne pas former de mousse, source potentielle de problèmes de détection du niveau de liquide.

Avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, s'assurer de la remise en suspension complète des particules magnétiques. Avant la première utilisation, mélanger énergiquement le compartiment des particules magnétiques au vortex pendant au moins 3 min.
- Vérifier que le couvercle perforateur se trouve sur la cartouche de réactifs et que le couvercle du compartiment des particules magnétiques a été retiré ou, en cas d'utilisation d'une cartouche de réactifs entamée, que les bandelettes d'étanchéité ont été retirées.
- Veiller à ouvrir les tubes d'enzyme.
- Si des échantillons portent un code-barres, les orienter dans le porte-tubes de sorte que les codes-barres soient face au lecteur, à gauche du QIAsymphony SP.
- Pour connaître la compatibilité des tubes d'échantillon avec un protocole spécifique, voir la liste de matériel de laboratoire correspondante (disponible à l'adresse www.qiagen.com/goto/dspdnakits).
- Pour connaître les volumes minimaux d'échantillon des tubes primaires et secondaires pour un protocole spécifique, voir la liste de matériel de laboratoire correspondante (disponible à l'adresse <u>www.qiagen.com/goto/dspdnakits</u>). Cette liste indique également les tubes qui peuvent être utilisés pour des protocoles différents.

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

Protocole: purification de l'ADN

Il s'agit d'un protocole général adapté aux kits QIAsymphony DSP DNA. Des informations détaillées pour chaque protocole, notamment les volumes et les tubes à utiliser, sont données dans les fiches de protocole qui peuvent être télécharaées à l'adresse www.giagen.com/goto/dspdnakits.

- 1. Fermer tous les tiroirs et le capot.
- 2. Mettre le QIAsymphony SP sous tension et attendre que l'écran Sample Preparation (Préparation des échantillons) apparaisse, puis la fin de la procédure d'initialisation. L'interrupteur d'alimentation est situé dans le coin inférieur gauche de l'appareil.
- 3. Se connecter à l'appareil.
- 4. Veiller à préparer correctement le tiroir « Waste », puis lancer un inventaire de ce tiroir, y compris de la goulotte d'évacuation des cônes et du flacon à déchets liquides. Si nécessaire, remplacer le sachet pour cônes usagés.
- 5. Charger le portoir d'élution requis dans le tiroir « Eluate ».
 - Ne pas charger une plaque à 96 puits sur l'emplacement « Elution slot 4 » (Emplacement d'élution 4).
 - Le slot d'élution 1 doit être utilisé, avec l'adaptateur de refroidissement correspondant. En cas d'utilisation d'une plaque à 96 puits, veiller à bien orienter la plaque pour éviter le mélange des échantillons lors des analyses en aval.
 - Lors de l'utilisation du portoir de microtubes d'élution CL, retirer le fond en faisant pivoter le portoir jusqu'à ce que le fond se libère.
- 6. Charger le(s) cartouche(s) de réactifs et les consommables nécessaires dans le tiroir « Reagents and Consumables ».
- 7. Lancer un inventaire du tiroir « Reagents and Consumables ».
- 8. Placer les échantillons sur le porte-échantillons adapté et les charger dans le tiroir « Sample » (Échantillons).

IMPORTANT: Pour les application VirusBlood200, le ou les tubes contenant le mélange contrôle interne-tampon ATE doivent être placés dans le slot A du tiroir « Sample ». Pour plus d'informations sur la préparation du mélange et l'utilisation d'un témoin interne, se reporter à la fiche de protocole correspondante (disponible à l'adresse www.aiagen.com/qoto/dspdnakits).

9. À l'aide de l'écran tactile, saisir les informations demandées pour chaque lot d'échantillons à traiter.

Saisir les informations suivantes :

Informations relatives aux échantillons (selon les portoirs à échantillons utilisés)
Protocole à effectuer (Assay Control Set (Jeu de témoins d'analyse))
Volume d'élution et position de sortie.

Pour les applications VirusBlood200 : tube(s) contenant un ou plusieurs contrôles internes Une fois les informations sur le lot saisies, l'état passe de « LOADED » (CHARGÉ) à « QUEUED » (DANS LA FILE D'ATTENTE). Dès qu'un lot est placé dans la file d'attente, le bouton « Run » (Exécuter) s'affiche.

- 10. Appuyer sur le bouton « **Run** » pour lancer la procédure de purification.
 - Toutes les étapes de traitement sont entièrement automatisées. À la fin du cycle de protocole, l'état du lot passe de « **RUNNING** » (EN COURS DE TRAITEMENT) à « **COMPLETED** » (TERMINÉ).
- 11. Récupérer le portoir d'élution contenant les acides nucléiques purifiés du tiroir « Eluate »
- 12.L'ADN est prêt à l'emploi ou peut être stocké à une température de 2 à 8 °C, –20 °C ou –80 °C.

Il est recommandé de retirer la plaque d'éluats du tiroir « Eluate » dès la fin du cycle. Selon la température et le degré d'humidité, les plaques d'éluats laissées sur le QIAsymphony SP après un cycle peuvent subir une condensation ou une évaporation.

En général, les particules magnétiques ne sont pas entraînées dans les éluats. En cas de transfert, les particules magnétiques dans les éluats n'affecteront pas la plupart des applications en aval.

Si les particules magnétiques doivent être éliminées avant l'exécution d'applications en aval, les tubes ou les plaques contenant les éluats seront d'abord placés dans un aimant approprié, puis les éluats seront transférés dans un tube propre (voir l'annexe, page 32). Des fichiers de résultats sont créés pour chaque plaque d'élution.

13.Si une cartouche de réactifs est seulement entamée, la sceller avec les bandelettes d'étanchéité fournies et fermer les tubes de protéinase K avec des bouchons à vis immédiatement après la fin du cycle de protocole pour éviter une évaporation.

Remarque: Pour en savoir plus sur le stockage des cartouches de réactifs (RC) entamées, voir la section « Conservation et manipulation des réactifs », page 13.

14. Mettre au rebut les tubes d'échantillons et autres déchets conformément aux règles de sécurité locales.

Voir page Fehler! Textmarke nicht definiert. pour les informations de sécurité.

15. Nettoyer le QIAsymphony SP.

Suivre les consignes de maintenance des manuels d'utilisation fournis avec l'appareil. Veiller à nettoyer régulièrement les protège-cônes afin de minimiser le risque de contamination croisée.

16. Fermer les tiroirs de l'appareil et arrêter le QIAsymphony SP.

Contrôle qualité

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

Limitations

Les performances du système ont été déterminées lors d'essais d'évaluation des performances en purifiant de l'ADN total provenant de sang total, de couche leuco-plaquettaire, de tissus et de tissus FFPE humains, ainsi que d'ADN viral provenant de sang total humain

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider la performance du système pour toute procédure utilisée dans leur laboratoire et non couverte par les études d'évaluation de la performance de QIAGEN.

Pour fausser le moins possible les résultats diagnostiques, il est nécessaire d'utiliser des témoins adéquats 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 conjointement avec d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

Symboles

Les symboles figurant dans le tableau suivant sont utilisés dans ce mode d'emploi.

Symbole	Définition des symboles
	Contient des réactifs pour <n> préparations d'échantillons</n>
\subseteq	À utiliser avant
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Référence
LOT	Numéro de lot
MAT	Numéro de la substance
COMP	Composants
NUM	Nombre
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi (manuel) et n représente le numéro de révision
VOL	Volume
*	Limitations de température
	Fabricant
USE	À utiliser uniquement avec

Symbole Définition des symboles Lire les informations dans le manuel EC **REP** Contient Nombre de puits Isopropanol WELL Protéinase K **REAG** CART Thiocyanate de guanidinium BUF **ELU** Chlorhydrate de guanidine **IPA** Éthanol **PROTK** Acide maléique **GITC BRIJ** 58 **GuHC** Chlorure de lithium Code article international (GTIN) **MALEIC ACID** Attention **BRIJ 58** Bord tranchant Volume Limitations de température **Fabricant**

Guide de résolution des problèmes

Ce guide de résolution des problèmes peut aider à répondre à certaines questions qui peuvent se poser. Pour plus d'informations, voir aussi la page Foire aux Questions de notre Centre d'assistance technique : www.giagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des Services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions que vous auriez sur les informations ou les protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir la auatrième de couverture ou consulter le site www.aiaaen.com).

Commentaires et suggestions

Manipulation générale

Message d'erreur affiché sur l'écran tactile

En cas d'affichage d'un message d'erreur pendant un cycle, se reporter aux manuels d'utilisation fournis avec l'appareil.

Précipité dans un compartiment de réactif de la cartouche entamée

a١ Évaporation du tampon Une évaporation excessive peut augmenter la concentration en sel dans les tampons. Jeter la cartouche de réactifs (RC). Lorsqu'une cartouche de réactifs (RC) entamée n'est pas utilisée, veiller à ce que les compartiments contenant les tampons soient scellés avec des bandelettes d'étanchéité.

Ы Stockage de la cartouche de réactifs (RC)

Le stockage de la cartouche de réactifs (RC) à une température inférieure à 15 °C peut provoquer la formation de précipités. Si nécessaire, retirer les compartiments contenant les tampons QSL1 et QSB1 de la cartouche de réactifs (RC) et les incuber au bain-marie* à 37 °C pendant 30 min en agitant de temps en temps pour dissoudre le précipité. Veiller à remettre le compartiment dans la bonne position. Si la cartouche de réactifs (RC) est déjà perforée, vérifier que le compartiment est refermé par une bandelette d'étanchéité et incuber la cartouche de réactifs (RC) entière au bain-marie* à 37 °C pendant 30 min en remuant ponctuellement.

Faible rendement d'ADN

^{*} S'assurer que tous les instruments sont vérifiés, entretenus et calibrés régulièrement selon les instructions du fabricant.

Commentaires et suggestions

 a) Remise en suspension incomplète des particules magnétiques Avant de commencer la procédure, s'assurer de la remise en suspension complète des particules magnétiques. Avant emploi, mélanger au vortex pendant au moins 3 min.

 b) Des échantillons de sang ou de couche leucocytaire congelés n'ont pas été mélangés correctement après leur décongélation Décongeler les échantillons de sang ou de couche leucocytaire sous agitation légère pour garantir un mélange homogène.

 c) Lyse d'échantillon incomplète Avant emploi, vérifier l'absence de précipité dans les tampons QSL1 et QSB1. Si nécessaire, retirer les compartiments contenant les tampons QSL1 et QSB1 de la cartouche de réactif (RC) et les incuber dans un bain-marie* pendant 30 minutes à 37 °C en agitant de temps en temps pour dissoudre le précipité. Si la cartouche de réactifs (RC) est déjà perforée, vérifier que les compartiments sont fermés à l'aide de bandelettes d'étanchéité et incuber l'ensemble de la cartouche de réactifs (RC) au bain-marie à 37 °C pendant 30 min en agitant de temps en temps.*

 d) Digestion incomplète des échantillons tissulaires S'assurer de la digestion complète du tissu en augmentant le temps d'incubation avec la protéinase K.

e) Obstruction du cône de pipette par une substance insoluble

La substance insoluble n'a pas été éliminée de l'échantillon avant de débuter la purification sur QIAsymphony. Si nécessaire, suivre les procédures de prétraitement décrites dans les fiches de protocole correspondantes, par exemple pour des échantillons visqueux. Les fiches de protocole sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

 f) Mauvaise préparation de couche leucocytaire lors de l'utilisation d'un protocole pour couche leucocytaire Veiller à ce que la fraction leucocytaire soit recueillie avec efficacité.

 g) Numération leucocytaire faible dans l'échantillon de sang total utilisé comme échantillon de départ pour la préparation de la couche leucocytaire En cas d'utilisation du protocole pour couche leucocytaire, augmenter le volume de sang total utilisé et maintenir constant le volume de leucocytes recueillis.

h) Lyse incomplète des tissus

Si le lysat contient de la matière insoluble, prolonger le temps d'incubation avec la protéinase K.

^{*} S'assurer que tous les instruments sont vérifiés, entretenus et calibrés régulièrement selon les instructions du fabricant.

Commentaires et suggestions

 i) Perte du culot pendant un prétraitement de type FFPE, utilisant un mélange xylène/éthanol Surveiller attentivement les échantillons pendant le prétraitement.

L'ADN ne réagit pas correctement dans les applications en aval

 a) Quantité insuffisante d'ADN utilisé dans l'application en aval Quantifier l'ADN purifié par une mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 260 nm (voir l'annexe, page 32).*

 b) Quantité excessive d'ADN utilisé dans l'application en aval Un excès d'ADN peut inhiber certaines réactions enzymatiques. Quantifier l'ADN purifié par une mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 260 nm (voir l'annexe, page 32).*

Faible rapport A₂₆₀/A₂₈₀ pour l'ADN purifié

Lecture d'absorbance à 320 nm non soustraite des lectures d'absorbance obtenues à 260 nm et 280

Pour corriger la présence de particules magnétiques dans l'éluat, une lecture d'absorbance à 320 nm doit être relevée et soustraite des lectures d'absorbance obtenues à 260 nm et 280 nm (voir l'annexe, page 32).*

^{*} S'assurer que tous les instruments sont vérifiés, entretenus et calibrés régulièrement selon les instructions du fabricant.

Annexe : quantification et détermination de la pureté de l'ADN

Quantification de l'ADN

La concentration d'ADN doit être déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm (A_{260}) dans un spectrophotomètre. Les lectures d'absorbance à 260 nm doivent être comprises entre 0,1 et 1,0 pour être précises. Une absorbance de 1 unité à 260 nm correspond à 50 μ g d'ADN par millilitre ($A_{260} = 1 = 50 \mu$ g/ml).

Utiliser le tampon ATE pour diluer les échantillons et pour étalonner le spectrophotomètre.

Le rapport entre les valeurs d'absorbance à 260 nm et 280 nm donne une estimation de la pureté de l'ADN (voir la section « Pureté de l'ADN », page 33).

Mesurer l'absorbance à 320, 280 et 260 nm. Soustraire la lecture d'absorbance obtenue à 320 nm des lectures obtenues à 260 et 280 nm, afin de corriger la présence éventuelle d'une lecture de fond.

Utiliser la formule suivante pour calculer la concentration d'ADN et son rendement : Concentration de l'échantillon d'ADN = $50 \mu \text{g/ml} \times (A_{260} - A_{320}) \times \text{facteur}$ de dilution. Quantité totale d'ADN purifié = concentration x volume d'échantillon en millilitres.

Si des particules magnétiques sont entraînées dans l'éluat et susceptibles d'affecter l'application en aval (par exemple, si de l'ADN purifié doit être analysé par séquençage par capillarité en mode fluorescent), le tube contenant l'éluat sera d'abord appliqué sur un séparateur magnétique approprié et l'éluat sera transféré dans un tube propre (voir cidessous).

Si des particules magnétiques doivent être éliminées, appliquer le tube contenant l'ADN sur un séparateur magnétique approprié (par exemple, l'aimant QIAGEN 12-Tube Magnet, référence 36912) jusqu'à ce que les particules magnétiques soient séparées. Si l'ADN est dans des microplaques, appliquer la microplaque sur un séparateur magnétique approprié (par exemple, l'aimant QIAGEN 96-Well Magnet Type A, référence 36915) jusqu'à ce que les particules magnétiques soient séparées. En cas de séparateur magnétique approprié non disponible, centrifuger le tube contenant l'ADN pendant 1 minute à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse, afin de sédimenter toute particule magnétique résiduelle.

Remarque: Pour une quantification précise de l'ADN par mesure de l'absorbance à 260 nm, il est recommandé de diluer l'échantillon dans le tampon d'élution correspondant. Une dilution de l'échantillon dans de l'eau peut produire des valeurs inexactes. Le tampon d'élution présente une absorbance élevée à 220 nm, ce qui peut générer des valeurs d'absorbance de fond trop élevées si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement calibré. L'évaporation des éluats augmente éventuellement le risque d'un impact sur la mesure, en particulier lorsque de faibles quantités d'éluats sont utilisées sous forme non diluée. Un tampon d'élution supplémentaire pour la valeur à blanc du spectrophotomètre est fourni dans un flacon séparé avec les kits QIAsymphony DSP DNA.

Pureté de l'ADN

La pureté est déterminée en calculant le rapport de l'absorbance corrigée à 260 nm à l'absorbance corrigée à 280 nm ; c'est-à-dire $(A_{260} - A_{320})/(A_{280} - A_{320}).$ L'ADN pur a un rapport A_{260}/A_{280} de 1,7 à 1,9.

Pour commander

Produit	Contenu	Référenc e
QlAsymphony DSP DNA Mini Kit (192)	2 cartouches de réactifs, portoirs de tubes d'enzyme et accessoires	937236
QlAsymphony DSP DNA Midi Kit (96)	2 cartouches de réactifs, portoirs de tubes d'enzyme et accessoires	937255
Related products		
Buffer ATL (4 x 50 ml)	4 x 50 ml de tampon ATL à utiliser dans les protocoles QIAsymphony sur les tissus	939016
Deparaffinization Solution (1 x 50 ml)	1 x 50 ml de solution de déparaffinage à utiliser dans les protocoles QIAsymphony sur les tissus FFPE	939018
Accessory Trough (10)	Compartiments auxiliaires à utiliser sur le QIAsymphony SP	997012
Reagent Cartridge Holder (2)	Support pour cartouche de réactifs à utiliser sur le QIAsymphony SP	997008
Tube Insert, 2 ml, v2, sample carrier, Qsym	Adaptateur pour tubes secondaires (tubes de 2 ml à bouchon à vis) à utiliser sur le porte-tubes QIAsymphony	9242083
Tube Insert, 11 mm, Revision, sample carrier, Qsym	Adaptateur pour tubes primaires (11 mm) à utiliser sur le porte-tubes QIAsymphony	9242057
Tube Insert, 13 mm, sample carrier, Qsym	Adaptateur pour tubes primaires (13 mm) à utiliser sur le porte-tubes QIAsymphony	9242058

Cooling Adapter, 2 ml, V2, Qsym	Support réfrigérant pour tubes de 2 ml à bouchon à vis. À utiliser dans le tiroir « Eluate » QIAsymphony	9020674
Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym	Support réfrigérant pour portoirs EMT. À utiliser dans le tiroir « Eluate » QIAsymphony	9020730
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Cartouches de préparation des échantillons à 8 puits à utiliser sur le QIAsymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Manchons pour 8 barreaux à utiliser sur le QIAsymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Cônes munis de filtres jetables, sur portoirs (8 x 128). À utiliser sur le QIAcube® et le QIAsymphony SP	990332
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	Cônes munis de filtres jetables, sur portoirs (8 x 128). À utiliser sur le QIAsymphony SP	997024
Tip Disposal Bags (15)	Sachets de récupération des cônes usagés à utiliser sur le QIAsymphony SP	9013395
12-Tube Magnet	Aimant pour la séparation des particules magnétiques dans 12 tubes de 1,5 ml ou 2 ml	36912
96-Well Magnet Type A	Aimant pour la séparation des particules magnétiques dans les puits de plaques à 96 puits, 2 microplaques FB à 96 puits	36915
S-Blocks (24)	Blocs à 96 puits avec des puits de 2,2 ml, 24 par paquet	19585
Reuse Seal Set (20)	Bandelettes d'étanchéité pour sceller des cartouches de réactifs QIAsymphony entamées	997006

Elution Microtubes CL (24 x 96)	Tubes en polypropylène non stériles (volume maximal de 0,85 ml, volume de stockage inférieur à 0,7 ml, volume d'élution de 0,4 ml) ; 2304 tubes sur portoirs de 96 unités ; avec bouchons	19588
QIAsymphony SP	Module de préparation des échantillons QIAsymphony, garantie 1 an pièces et main d'œuvre	9001297

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN respectif. Les manuels des kits et les 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.

Page laissée volontairement vierge

37

Contrat de licence limité pour les kits QIAsymphony DSP DNA

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du produit consent aux termes suivants :

- 1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel, et avec les composants fournis à l'intérieur du kit. 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, ce manuel et d'autres protocoles disponibles à l'adresse www.qiagen.com. Certains de ces protocoles supplémentaires ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour les utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été testés de manière approfondie ni optimisés par QIAGEN. QIAGEN n'offre aucune garantie sur eux ni aucune garantie qu'ils n'enfreignent pas les droits de liters.
- 2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(ses) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
- 3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
- 4. 4. QIAGEN rejette notamment toutes les licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
- 5. 5. 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 termes précédents. QIAGEN peut faire appliquer des interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants

Pour les termes de licence mis à jour, voir www.qiagen.com.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAsymphony®, QIAcube® (Groupe QIAGEN); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). 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. 0.8/2015 HB0977-004

© 2012-2015 QIAGEN, tous droits réservés.

