

Décembre 2020

Fiche de protocole du QIASymphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V2 et
circDNA_4000_DSP_V2

Le présent document constitue la fiche de protocole de la trousse QIASymphony DSP Circulating DNA Kit Version 2, R1

Informations générales

Pour une utilisation diagnostique in vitro.

Ce protocole s'applique à la purification de l'ADN libre circulant humain à partir de plasma et de l'urine humains frais ou congelés avec le QIASymphony SP et la trousse QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Trousse	QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (n° de réf. 937556)	
Échantillon	Plasma humain : avec traitement anticoagulant à l'EDTA ou au citrate, ou stabilisation de l'ADN libre Urine humaine : non stabilisée ou stabilisée	
Nom du protocole	circDNA_2000_DSP_V2	circDNA_4000_DSP_V2
Jeu de contrôles de dosage par défaut	ACS_circDNA_2000_DSP_V2	ACS_circDNA_4000_DSP_V2
Volume d'éluotion	60 µl	60 µl
Version logicielle requise	Version 4.0 ou plus récente	Version 5.0 ou plus récente

Tiroir « Sample » (Échantillon)

Type d'échantillon	Plasma humain (voir « Préparation du matériel d'échantillon ») et Urine humaine (stabilisée ou non stabilisée)
Volume d'échantillon	Dépend du type de tube utilisé pour l'échantillon Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur www.qiagen.com .
Tubes d'échantillon primaires	s.o.
Tubes d'échantillon secondaires	Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur www.qiagen.com .
Éléments d'insertion	s.o.
Autres	La protéinase K doit être ajoutée dans la fente A (positions 1 et/ou 2)

s.o. = sans objet.

Préparation de la protéinase K dans le tiroir « Sample » (Échantillon)

La trousse QIASymphony DSP Circulating DNA Kit contient une solution de protéinase K prête à l'emploi qui peut être conservée à température ambiante (15 à 25 °C).

Remarque : Les tubes contenant la protéinase K sont placés dans un porte-tubes. Les tubes contenant la protéinase K doivent être placés en positions 1 et/ou 2 dans la fente A du tiroir « Sample » (échantillon). Pour connaître le type de tube requis, voir la liste du matériel de laboratoire sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur www.qiagen.com.

Nombre d'échantillons*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11 660 µl
72	9020 µl	18 040 µl†
96	11 660 µl	23 320 µl†

* Pour chaque échantillon, les volumes requis sont de 110 µl pour le protocole circDNA_2000_DSP et de 220 µl pour le protocole circDNA_4000_DSP, plus un volume mort supplémentaire de 1100 µl [(n × 110 ou 220 µl) + 1100 µl].

† Pour le protocole circDNA_4000_DSP : si plus de 48 échantillons sont traités, utilisez un second tube. Le volume de chargement maximal par tube est de 11,660 µl. Dans le second tube, un volume mort supplémentaire de 1 100 µl est requis.

Tiroir « Reagents and Consumables » (Réactifs et consommables)

Position A1 et/ou A2	Cartouche de réactif
Position B1	s.o.
Portoir pour pointes à embouts 1–18	Embouts à filtre jetables, 200 µl ou 1 500 µl
Support de boîtes d'unités 1–4	Boîtes d'unités contenant des cartouches de préparation de l'échantillon ou des 8-Rod Covers

s.o. = sans objet.

Tiroir « Waste » (Déchets)

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

Tiroir « Eluate » (éluat)

Portoir d'éluat (il est recommandé d'utiliser la fente 1, position de refroidissement)	Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur www.qiagen.com .
---	---

Matériel en plastique requis

Protocole circDNA_2000_DSP

Matériel en plastique	Un lot, 24 échantillons*	Deux lots, 48 échantillons*	Trois lots, 72 échantillons*	Quatre lots, 96 échantillons*
Embouts à filtre jetables, 200 µl†‡	28	56	84	112
Embouts à filtre jetables, 1500 µl†‡	56	112	168	224
Cartouches de préparation de l'échantillon§	15	30	45	60
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* L'utilisation de moins de 24 échantillons par lot réduit le nombre requis d'embouts à filtre jetables par analyse.

† Il y a 32 embouts à filtre par portoir.

‡ Le nombre requis d'embouts à filtre correspond à 1 vérification d'inventaire par cartouche de réactif.

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

¶ Il y a douze 8-Rod Covers par boîte d'unités.

Protocole circDNA_4000_DSP

Matériel en plastique	Un lot, 24 échantillons*	Deux lots, 48 échantillons*	Trois lots, 72 échantillons*	Quatre lots, 96 échantillons*
Embouts à filtre jetables, 200 µl†	28	56	84	112
Embouts à filtre jetables, 1500 µl†	96	192	288	384
Cartouches de préparation de l'échantillon‡	18	36	54	72
8-Rod Covers§	3	6	9	12

* L'utilisation de moins de 24 échantillons par lot réduit le nombre requis d'embouts à filtre jetables par analyse.

† Il y a 32 embouts à filtre par portoir.

‡ Le nombre requis d'embouts à filtre correspond à 1 vérification d'inventaire par cartouche de réactif.

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

¶ Il y a douze 8-Rod Covers par boîte d'unités.

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

Volume d'élution

Volume d'élution choisi	Volume d'élution initial
60 µl	75 µl

Le volume d'élution est sélectionné sur l'écran tactile. Le volume d'élution disponible moyen est ≥ 60 µl. Dans certains cas particuliers, le volume d'éluat final pour des échantillons uniques peut être inférieur au volume choisi de 5 µl au maximum (p. ex. 55 µl). Il est recommandé de vérifier le volume d'éluat réel lors de l'utilisation d'un système de préparation automatisée des dosages, qui ne vérifie pas le volume d'éluat avant le transfert.

Conservation des éluats

Il est recommandé de sortir la plaque d'éluat du tiroir « Eluate » (Éluat) dès la fin de l'analyse. Les plaques d'élution peuvent rester dans le QIASymphony SP après la fin de l'analyse si celle-ci se termine au cours de la nuit (16 heures maximum, durée de l'analyse comprise; conditions environnementales recommandées : 18–26 °C et 20–75 % d'humidité relative). Selon la température et le degré d'humidité, l'éluat peut subir une condensation ou une évaporation.

Après la préparation de l'échantillon, vous pouvez conserver les éluats entre 2 et 8 °C pendant 1 mois maximum. Pour une conservation de longue durée, conservez-les entre -30 °C et -15 °C ou entre -90 °C et -65 °C. Les éluats congelés ne doivent pas être dégelés plus de 3 fois.

Préparation du matériel d'échantillon

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection appropriés. Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Remarques importantes avant de commencer

- Évitez la formation de mousse dans ou à la surface des échantillons.
- Les échantillons doivent revenir à température ambiante (15 à 25 °C) avant le début de l'analyse.

Plasma humain

Les échantillons de sang traités avec de l'EDTA ou du citrate comme anticoagulant peuvent être utilisés pour la préparation de plasma. Du plasma préparé à partir de tubes de prélèvement de sang stabilisé pour l'ADN libre peut également être utilisé. Le plasma est obtenu conformément aux spécifications du fabricant.

Il est recommandé de procéder à la séparation du plasma immédiatement après le don de sang lorsque de l'EDTA ou du citrate est utilisé comme anticoagulant.

Pour certaines applications en aval, il peut être nécessaire d'exclure ou de limiter la présence d'acides nucléiques dans les vésicules. Dans ce cas, il est recommandé de réaliser une étape de centrifugation haute vitesse à 16 000 × g pendant 10 minutes à température ambiante (15 à 25 °C) après la génération initiale du plasma.

Après prélèvement et centrifugation, le plasma peut être conservé à température ambiante pendant 7 jours maximum et entre 2 et 8 °C pendant 14 jours maximum. Pour une conservation plus longue, il est recommandé de congeler les aliquotes à -20 °C ou -80 °C. Le plasma congelé ne doit pas être dégelé plus de 3 fois. Un processus de congélation/décongélation répété entraîne la dénaturation et la précipitation des protéines, ce qui peut réduire le rendement en acides nucléiques libres circulants. Si des cryoprécipités sont visibles dans les échantillons, centrifugez à 6 800 × g pendant 3 minutes à température ambiante (15–25 °C), puis transférez les surnageants dans un tube d'échantillon secondaire sans remuer les culots (voir la liste du matériel de laboratoire sous l'onglet Resource (Ressources) de la page du produit sur www.qiagen.com). Commencez immédiatement la procédure de purification.

Urine humaine

En raison de la dégradation rapide de l'ADN libre circulant après le prélèvement d'urine, il est fortement recommandé de stabiliser les échantillons d'urine immédiatement.

Urine humaine stabilisée

L'urine stabilisée peut être stockée à température ambiante (15–25 °C) ou à 2–8 °C pendant une durée maximale de 7 jours. Pour une conservation plus longue, il est recommandé de congeler les aliquotes entre -30 °C et -15 °C ou entre -90 °C et -65 °C.

Les échantillons d'urine stabilisée ne requièrent aucun traitement des échantillons. Après stabilisation, il est recommandé de centrifuger les échantillons d'urine à faible vitesse (1 900 x g) pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) afin d'éliminer les cellules avant l'extraction de l'ADN libre circulant. Si des précipités sont visibles dans les surnageants après la centrifugation, réchauffez les échantillons jusqu'à 25 °C au bain-marie afin de dissoudre les précipités. Avant de débiter une analyse, transférez les échantillons d'urine stabilisés dans un tube d'échantillon secondaire, puis chargez ce tube sur le porte-échantillon (voir la liste de matériel de laboratoire, sous l'onglet Resource (Ressources) de la page des produits sur le site www.qiagen.com).

Urine humaine « non stabilisée »

Avant de commencer un protocole nécessitant du Buffer ATL, vérifiez si un précipité s'est formé dans le Buffer ATL. Le cas échéant, dissolvez ce précipité en le chauffant à 70 °C et en l'agitant délicatement dans un bain-marie. Aspirez les bulles à la surface du Buffer ATL.

Remarque : Le Buffer ATL (Buffer ATL, 4 x 50 ml, N° de réf. 939016) ne fait pas partie de la trousse QIASymphony DSP Circulating DNA Kit et doit être commandé séparément.

Il est recommandé de centrifuger les échantillons d'urine immédiatement après le prélèvement à faible vitesse (1 900 x g) pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) afin d'éliminer les cellules. Les échantillons d'urine non stabilisés requièrent un prétraitement.

Important : Équilibrez les échantillons à température ambiante (15 à 25 °C) avant le début du prétraitement.

Important : La centrifugation et le prétraitement devraient être réalisés dans les 4 heures suivant le prélèvement de l'échantillon d'urine.

- Mélangez 2 500 µl d'urine (circDNA_2000_DSP) ou 4 500 µl d'urine (circDNA_4000_DSP) avec 250 µl ou 450 µl de Buffer ATL, respectivement.
- Incubez les échantillons à température ambiante (15–25 °C) pendant une heure.

- Centrifugez les échantillons à 1 900 x g pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C).
Si des précipités sont visibles dans le surnageant après centrifugation, réchauffez les échantillons jusqu'à 25 °C au bain-marie pour dissoudre les précipités.
- Transférez les surnageants dans un tube d'échantillon secondaire, puis chargez ce tube sur le porte-échantillon (voir la liste du matériel de laboratoire, sous l'onglet Resource (Ressources) de la page des produits sur le site www.qiagen.com)

Important : La stabilité et l'intégrité de l'ADN libre circulant sont limitées dans l'urine non stabilisée. Il est recommandé de charger au maximum un lot de 24 échantillons par analyse QIASymphony pour minimiser la durée d'insertion des échantillons d'usine.

Substances interférentes

Les échantillons de plasma fortement concentrés en gammaglobuline (> 30 g/l) peuvent nuire à la récupération de l'ADN libre circulant.

Historique des révisions

Date	Modifications
Version 2, R1 Décembre 2020	Version initiale.

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

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Groupe QIAGEN). Les marques déposées, marques de commerce et autres marques citées dans ce document doivent être considérées comme protégées par la loi, même si elles ne sont pas spécifiquement signalées comme telles.

12/2020 HB-2309-S02-001 © 2020 QIAGEN, tous droits réservés.

Commandes sur www.qiagen.com/shop | Support technique support.qiagen.com | Site Web www.qiagen.com