

Décembre 2020

Fiche de protocole du QIASymphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V2 et circDNA_4000_DSP_V2

Ce document constitue la fiche de protocole du QIASymphony DSP Circulating DNA Kit,
version 2, R1

Informations générales

Pour utilisation diagnostique in vitro.

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

Kit	QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (référence 937556)	
Type d'échantillon	Plasma humain : avec traitement anticoagulant à l'EDTA ou au citrate, ou avec stabilisation de ccfDNA Urine humaine : non stabilisée ou stabilisée	
Nom du protocole	circDNA_2000_DSP_V2	circDNA_4000_DSP_V2
Jeu de contrôles des tests par défaut	ACS_circDNA_2000_DSP_V2	ACS_circDNA_4000_DSP_V2
Volume d'éluion	60 µl	60 µl
Version logicielle requise	Version 4.0 ou ultérieure	Version 5.0 ou ultérieure

Tiroir « Sample » (Échantillon)

Type d'échantillon	Plasma humain (voir « Préparation des échantillons ») et urine humaine (stabilisée ou non)
Volume d'échantillon	Dépend du type de tube utilisé pour l'échantillon Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire disponible dans l'onglet Resource (Ressource) sur la page du produit à l'adresse www.qiagen.com .
 Tubes d'échantillon primaires	S.o.
 Tubes d'échantillon secondaires	Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire disponible dans l'onglet Resource (Ressource) sur la page du produit à l'adresse www.qiagen.com .
Inserts	S.o.
Autre	La protéinase K doit être ajoutée dans l'emplacement A (position 1 et/ou 2)

S.o. = sans objet.

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

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

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

Nombre d'échantillons*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1 980 µl	2 860 µl
24	3 740 µl	6 380 µl
48	6 380 µl	11 660 µl
72	9 020 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 1 100 µl [(n x 110 ou 220 µl) + 1 100 µl].

† Pour le protocole circDNA_4000_DSP : si plus de 48 échantillons sont traités, utiliser 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.
Supports de portoir à cônes 1-18	Pointes à filtre jetables, 200 µl ou 1500 µl
Support de boîtes d'unité 1-4	Boîtes contenant des cartouches de préparation d'échantillons ou 8-Rod Covers

S.o. = sans objet.

Tiroir « Waste » (Déchets)

Support de boîtes d'unité 1-4	Vider les boîtes
Support pour sac poubelle	Sac poubelle
Support pour flacon à déchets liquides	Flacon à déchets liquides vide

Tiroir « Eluate » (Éluat)

Portoir d'éluat (il est recommandé d'utiliser l'emplacement 1 [position de refroidissement])	Pour plus d'informations, voir la liste du matériel de laboratoire disponible dans l'onglet Resource (Ressource) sur la page du produit à l'adresse 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*
Pointes à filtre jetables, 200 µl†‡	28	56	84	112
Pointes à filtre jetables, 1 500 µl†‡	56	112	168	224
Cartouches de préparation d'échantillons§	15	30	45	60
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* L'utilisation de moins de 24 échantillons par lot réduit le nombre de pointes à filtre jetables requises par cycle.

† Il y a 32 pointes à filtre par portoir de pointes à filtre.

‡ Le nombre de pointes à filtre requises correspond à 1 inventaire par cartouche de réactif.

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

¶ Il y a douze manchons pour 8 Rod Covers/boîte.

Protocole circDNA_4000_DSP

Matériel en plastique	Un lot 24 échantillons*	Deux lots 48 échantillons*	Trois lots 72 échantillons*	Quatre lots 96 échantillons*
Pointes à filtre jetables, 200 µl†	28	56	84	112
Pointes à filtre jetables, 1 500 µl††	96	192	288	384
Cartouches de préparation d'échantillons§	18	36	54	72
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* L'utilisation de moins de 24 échantillons par lot réduit le nombre de pointes à filtre jetables requises par cycle.

† Il y a 32 pointes à filtre par portoir de pointes à filtre.

†† Le nombre de pointes à filtre requises correspond à 1 inventaire par cartouche de réactif.

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

¶ Il y a douze manchons pour 8 Rod Covers/boîte.

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

Volume d'éluat

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

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

Stockage des éluats

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

Après la préparation des échantillons, les éluats peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant 1 mois au maximum. Pour un stockage de longue durée, placer les éluats entre –30 et –15 °C ou entre –90 et –65 °C. Les éluats congelés ne doivent pas être dégelés plus de 3 fois.

Préparation des échantillons

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.

Remarques importantes avant de commencer

- Éviter la formation de mousse dans ou sur les échantillons.
- Amener tous les échantillons à température ambiante (15–25 °C) avant de lancer le cycle.

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 ccfDNA 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 minimiser la présence d'acides nucléiques provenant des vésicules. Dans ce cas, il est recommandé de réaliser une étape de centrifugation haute vitesse à 16 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) après la génération initiale du plasma.

Après prélèvement et centrifugation, le plasma peut être conservé à température ambiante pendant 7 jours maximum et à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 14 jours maximum. Pour une conservation de plus longue durée, 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, centrifuger à 6 800 x g pendant 3 minutes à température ambiante (15–25 °C), puis transférer les surnageants dans un tube d'échantillon secondaire sans remuer les culots (voir la liste du matériel de laboratoire, disponible dans l'onglet Ressource, sur la page du produit, à l'adresse www.qiagen.com). Commencer la procédure de purification immédiatement.

Urine humaine

En raison de la dégradation rapide de l'ADN libre circulant après le recueil des urines, il est fortement recommandé de stabiliser ces échantillons immédiatement.

Urine humaine stabilisée

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

Les échantillons d'urine stabilisée ne nécessitent aucun traitement préalable. Après stabilisation, il est recommandé de centrifuger les échantillons d'urine à faible vitesse (1 900 × g) pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) pour éliminer les cellules avant l'extraction de l'ADN libre circulant. Si des précipités sont visibles dans les surnageants après centrifugation, chauffer les échantillons au bain-marie à 25 °C afin de dissoudre les précipités. Avant de lancer un cycle, transférer les échantillons d'urine stabilisée dans un tube d'échantillon secondaire, puis charger ce tube sur le porte-échantillons (voir la liste du matériel de laboratoire disponible dans l'onglet Resource (Ressource) sur la page du produit à l'adresse www.qiagen.com).

Urine humaine « non stabilisée »

Avant de commencer un protocole nécessitant le Buffer ATL, vérifier l'absence de précipité dans le Buffer ATL. Si nécessaire, le dissoudre par un chauffage à 70 °C au bain-marie sous agitation modérée. Aspirer les bulles formées à la surface du Buffer ATL.

Remarque : Le Buffer ATL (Buffer ATL, 4 × 50 ml, référence 939016) n'est pas inclus dans le QIASymphony DSP Circulating DNA Kit et doit être commandé séparément.

Il est recommandé de centrifuger les échantillons d'urine immédiatement après leur recueil, à faible vitesse (1 900 × g) pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C) pour éliminer les cellules. Les échantillons d'urine non stabilisée nécessitent un traitement préalable.

Important : Amener les échantillons à température ambiante (15–25 °C) avant de commencer l'étape de prétraitement.

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

- Mélanger 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.
- Incuber les échantillons à température ambiante (15–25 °C) pendant 1 heure.
- Centrifuger les échantillons à 1 900 × g pendant 10 minutes à température ambiante (15–25 °C).

Si des précipités sont visibles dans le surnageant après centrifugation, chauffer les échantillons au bain-marie à 25 °C afin de dissoudre les précipités.

- Transférer les surnageants dans un tube d'échantillon secondaire, puis charger ce tube sur le porte-échantillons (voir la liste du matériel de laboratoire disponible dans l'onglet Resource (Ressource) sur la page du produit à l'adresse 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 un lot de 24 échantillons maximum par cycle QIASymphony pour minimiser la durée de présence des échantillons d'urine sur l'appareil.

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	Première version.

Pour les dernières informations sur les licences et les clauses limitatives de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (groupe QIAGEN). Les noms déposés, les marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

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

Pour commander, www.qiagen.com/shop | Assistance technique, support.qiagen.com | Site Web, www.qiagen.com