

Décembre 2020

PAXgene®

Mode d'emploi du Blood RNA Kit (Manuel)

Version 2



50 (n° de réf. 762164)

R4 **MAT** 1122167FRCA

REF 762164

IVD



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Produit par QIAGEN GmbH pour PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**

A QIAGEN / BD Company

Marques de commerce : PAXgene®, PreAnalytiX® [PreAnalytiX GmbH]; QIAGEN®, QIAcube® (Groupe QIAGEN); BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Les PAXgene Blood RNA Kits ne sont disponibles dans tous les pays, veuillez vous renseigner.

Contrat de licence limité

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur de la trousse PAXgene Blood RNA Kit accepte les conditions suivantes :

1. La trousse PAXgene Blood RNA Kit peut uniquement être utilisée en respectant les consignes du *Manuel du PAXgene Blood RNA Kit* et doit uniquement être utilisée avec les composants contenus dans la trousse. PreAnalytiX n'accorde aucune licence en vertu de sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans cette trousse avec tout autre composant non fourni dans cette trousse, à l'exception de ce qui est stipulé dans le *Manuel du PAXgene Blood RNA Kit* et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.preanalytix.com.
2. En dehors des licences expressément énoncées, PreAnalytiX n'offre aucune garantie indiquant que cette trousse et/ou son utilisation ne violent pas les droits de tiers.
3. Cette trousse et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. PreAnalytiX rejette spécifiquement toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles expressément énoncées.
5. L'acheteur et l'utilisateur de la trousse 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.
6. PreAnalytiX peut faire appliquer les interdictions du présent accord de licence limité par tout tribunal et pourra recourir 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 des modalités de la licence, voir www.preanalytix.com.

Brevet www.preanalytix.com/patents

Vente sous condition

Le présent produit est fourni avec une licence en vertu de certaines revendications des brevets US-7,270,953 et US-7,682,790, ainsi que EP-1820793 B1 et les équivalents étrangers de ces revendications de brevet en vue de l'utilisation du produit pour traiter le complexe d'acides nucléiques formé au cours de la collecte d'un échantillon dans un PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0181-005 1122167 BD-11630 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, tous droits réservés.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Suisse

www.preanalytix.com

Distributeurs de PreAnalytiX

Les produits PreAnalytiX sont produits et distribués par QIAGEN ou BD pour PreAnalytiX. Les produits ne peuvent pas être commandés auprès de PreAnalytiX GmbH.

Se reporter à la dernière page pour connaître les coordonnées de votre distributeur PreAnalytiX le plus proche.

Table des matières

Contenu de la trousse.....	5
Symboles.....	6
Conditions de conservation.....	7
Usage prévu.....	7
Indications d'utilisation.....	7
Limitations de l'utilisation du produit.....	8
Contrôle qualité.....	8
Assistance technique.....	9
Information sur la sécurité.....	9
Introduction.....	12
Principe et procédure.....	12
Prélèvement et stabilisation des échantillons.....	13
Concentration et purification de l'ARN.....	16
Purification manuelle de l'ARN.....	16
Purification automatisée de l'ARN.....	26
Équipement et réactifs à fournir par l'utilisateur.....	35
Remarques importantes.....	38
Utilisation des instruments QIAcube.....	38
Démarrage de l'instrument QIAcube.....	38
Installation des protocoles sur les instruments QIAcube.....	41
Chargement des instruments QIAcube.....	42

Protocole : Purification manuelle de l'ARN total à partir de sang total humain recueilli dans des PAXgene Blood RNA Tubes	54
Protocole : Purification automatisée de l'ARN total à partir de sang total humain recueilli dans des PAXgene Blood RNA Tubes	62
Guide de dépannage	70
Annexe A : Remarques générales sur la manipulation d'ARN.....	73
Annexe B : Quantification et détermination de la qualité de l'ARN total	74
Annexe C : Manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes	76
Pour commander	78
Historique des révisions du manuel	80

Contenu de la trousse

PAXgene Blood RNA Kit	(50)
N° de réf.	762164
Nombre de préparations	50
Buffer BR1 (tampon de remise en suspension)	20 ml
Buffer BR2 (tampon de liaison) *	18 ml
Buffer BR3 (tampon de lavage) *	45 ml
Buffer BR4 (tampon de lavage) †	11 ml
Buffer BR5 (tampon d'éluion)	6 ml
RNase-Free Water (Eau sans RNases) (flacon)	2 × 125 ml
Proteinase K (Protéinase K) (couvercle vert)	2 × 1,4 ml
PAXgene RNA Spin Columns (Colonnes de centrifugation PAXgene RNA) (rouge)	5 × 10
Processing Tubes (Tubes de traitement) (2 ml)	6 × 50
Secondary BD Hemogard™ Closures (Bouchons sécurité BD Hemogard™ secondaires)	50
Microcentrifuge Tubes (Tubes de microcentrifugation) (1,5 ml)	3 × 50, 1 × 10
DNase I, RNase-free (DNase I, sans RNases) (lyophilisé)	1 500 unités Kunitz ‡
Buffer RDD (couvercle blanc)	2 × 2 ml
RNase-Free Water (Eau sans RNases) (tube, couvercle lilas)	2 ml
PAXgene Shredder Spin Columns (Colonnes de centrifugation PAXgene Shredder) (lilas)	5 × 10
Manuel de la trousse PAXgene Blood RNA Kit (Version 2)	1

* Non compatible avec les réactifs de désinfection contenant de l'eau de Javel. Contient un sel de guanidine. Voir la page 9 pour plus d'information sur la sécurité.

† Le Buffer BR4 est fourni sous forme de concentré. Avant d'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, catégorie de pureté p.a.) comme indiqué sur le flacon pour obtenir une solution propre à l'utilisation.

‡ Les unités Kunitz sont les unités couramment utilisées pour mesurer la DNase I, et sont définies comme la quantité de DNase I capable de causer une augmentation de A_{260} de 0,001 par minute et par millilitre à 25 °C, pH 5,0, avec de l'ADN hautement polymérisé comme substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 et 363).

Symboles



Contient des réactifs suffisants pour <N> tests



Consulter le mode d'emploi



Date limite d'utilisation



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Numéro de référence



Numéro de lot



Numéro de matériel



Code article international



Limites de température



Limite supérieure de la température



Fabricant

Conditions de conservation

Les colonnes de centrifugation PAXgene RNA, les colonnes de centrifugation PAXgene Shredder, la protéinase K et les tampons BR1 à BR5 peuvent être conservés secs à la température indiquée sur l'étiquette de la trousse.

L'ensemble de DNase sans RNases, qui contient la DNase I, le tampon RDD et l'eau sans RNases (tube), est expédié à température ambiante. Conserver tous les composants de l'ensemble de DNase sans RNases immédiatement à réception à la température indiquée sur l'étiquette. Lorsqu'elle est conservée correctement, la trousse est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le carton.

Usage prévu

Le PAXgene Blood RNA System contient un tube de prélèvement sanguin (PAXgene Blood RNA Tube) et une trousse de purification des acides nucléiques (PAXgene Blood RNA Kit). Il est destiné au prélèvement, à la conservation et au transport du sang, à la stabilisation de l'ARN intracellulaire dans un tube fermé puis à l'isolation et la purification de l'ARN hôte du sang total pour la RT-PCR utilisée dans les tests de diagnostic moléculaire.

Les caractéristiques de performances du PAXgene Blood RNA System ont été établies avec les transcriptions de gène FOS et IL1B. Il appartient à l'utilisateur d'établir les caractéristiques de performances du PAXgene Blood RNA System pour les transcriptions d'autres cibles.

Indications d'utilisation

La trousse PAXgene Blood RNA Kit est utilisée pour la purification de l'ARN intracellulaire provenant de sang total recueilli dans un PAXgene Blood RNA Tube. Lorsque la trousse est utilisée en conjonction avec le PAXgene Blood RNA Tube, le système fournit l'ARN intracellulaire purifié à partir du sang total en vue d'une RT-PCR aux fins d'analyses diagnostiques moléculaires.

Limitations de l'utilisation du produit

La trousse PAXgene Blood RNA Kit est destinée à la purification d'ARN intracellulaire à partir de sang total humain ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucocytes/ml) pour les applications de diagnostic in vitro. Il n'est pas destiné à la purification d'ADN génomique ou d'acides nucléiques viraux à partir de sang total humain. En raison du nombre limité de transcriptions validées pour les spécifications de stabilisation (transcriptions des gènes FOS et IL1B), les caractéristiques de performances n'ont pas été établies pour toutes les transcriptions. Les utilisateurs se doivent de prendre connaissance des données du fabricant et de ses propres données afin de déterminer si une validation est nécessaire pour d'autres transcriptions.

Seuls des professionnels tels que des techniciens et des médecins dûment formés aux procédures de diagnostic in vitro sont habilités à utiliser ce produit. Uniquement sur prescription.

Voir le *Manuel du PAXgene Blood RNA Tube* pour plus d'informations sur l'utilisation des PAXgene Blood RNA Tubes.

Contrôle qualité

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

Assistance technique

Chez QIAGEN, nous sommes fiers de la qualité et de la disponibilité de notre support technique. Nos départements du service technique sont composés de scientifiques expérimentés bénéficiant d'un vaste savoir-faire pratique et théorique en ce qui concerne la biologie moléculaire et l'utilisation des produits PreAnalytiX. Si vous avez des questions concernant la trousse PAXgene Blood RNA Kit, n'hésitez pas à communiquer avec nous.

Pour toute demande d'assistance technique et d'information complémentaire, veuillez appeler les services techniques QIAGEN.

Information 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 éviter tout risque d'infection (par exemple, par les virus du VIH ou de l'hépatite B) ou de blessure lorsque vous travaillez avec du matériel biologique et chimique, portez toujours un sarrau de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour plus d'informations, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne en format PDF pratique et compact sur www.preanalytix.com, où vous pouvez trouver, consulter et imprimer les FDS de cette trousse.

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



Les tampons Buffer BR2 et Buffer BR3 contiennent du thiocyanate de guanidine, qui peut former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec un javellisant. Si les tampons Buffer BR2 ou Buffer BR3 sont renversés, 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 avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (V/V) (eau de Javel).

Le mélange formé par la solution de stabilisation de l'ARN et le sang du PAXgene Blood RNA Tube peut être désinfecté avec 1 volume de solution de javellisant commerciale (hypochlorite de sodium à 5 %) pour 9 volumes du mélange solution de stabilisation de l'ARN/sang.

Les déchets de préparation des échantillons, comme les surnageants issus des étapes de centrifugation lors de la procédure de purification de l'ARN, doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Avant leur élimination, les déchets doivent être passés à l'autoclave ou incinérés pour détruire tout matériel infectieux. L'élimination doit être effectuée conformément aux réglementations officielles.

Les indications suivantes de danger et de précaution s'appliquent aux composants de la trousse PAXgene Blood RNA Kit. Voir le *Manuel du PAXgene Blood RNA Tube* pour connaître les informations de sécurité des PAXgene Blood RNA Tubes.

Buffer BR2



Contient : thiocyanate de guanidine. Danger! Nocif en cas d'ingestion. Peut être nocif par contact avec la peau ou par inhalation. Provoque de graves lésions oculaires. Toxique pour la vie aquatique avec effets à long terme. Le contact avec des acides libère un gaz très toxique. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. 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. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Buffer BR3



Contient : éthanol, thiocyanate de guanidine. Danger! Liquide et vapeurs inflammables. Provoque de graves lésions oculaires. Le contact avec des acides libère un gaz très toxique. Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. 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. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

DNase I



Contient : DNase. Danger! Peut provoquer une réaction allergique 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. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. Porter un équipement de protection respiratoire. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

Protéinase K



Contient : protéinase 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. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. Porter un équipement de protection respiratoire. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.

Introduction

Le prélèvement de sang total est la première étape de nombreux dosages moléculaires utilisés pour étudier l'ARN cellulaire. Cependant, l'un des écueils de ce type d'expérience repose sur l'instabilité du profil de l'ARN cellulaire in vitro. Des études menées par PreAnalytiX ont révélé que le nombre de copies d'une espèce d'ARNm individuelle dans le sang total peut changer plus de 1000 fois au cours de la conservation et du transport à température ambiante*. Cette fluctuation peut être causée par la dégradation rapide de l'ARN et par l'expression de certains gènes induite après le prélèvement sanguin. De tels changements dans le profil d'expression de l'ARN rendent impossible toute étude fiable de l'expression des gènes. Il est par conséquent indispensable de disposer d'une méthode qui préserve l'expression de l'ARN pendant et après la phlébotomie pour pouvoir analyser de façon exacte l'expression des gènes dans le sang total humain.

Principe et procédure

PreAnalytiX a développé un système qui permet le prélèvement, la stabilisation, la conservation et le transport d'échantillons de sang total, ainsi qu'un protocole rapide et efficace pour la purification de l'ARN intracellulaire. Le système nécessite l'utilisation de PAXgene Blood RNA Tubes pour le prélèvement sanguin et la stabilisation de l'ARN, suivie d'une technique manuelle ou automatisée de purification de l'ARN avec la trousse PAXgene Blood RNA Kit. Les protocoles manuel et automatisé assurent l'un comme l'autre des performances sensiblement équivalentes en ce qui concerne la qualité et le rendement de l'ARN. Les données de performance du protocole manuel (pages 19–26) et le protocole automatisé (pages 30–34) sont indiquées dans ce manuel.

Remarque : Le QIAGEN QIAcube Connect MDx n'est pas disponible dans tous les pays. Pour plus de détails, contactez les services techniques QIAGEN.

* Rainen, L. et coll. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Prélèvement et stabilisation des échantillons

Les PAXgene Blood RNA Tubes contiennent une combinaison de réactifs exclusive qui protège les molécules d'ARN de la dégradation par les RNases et minimise les changements d'expression des gènes ex vivo. Les PAXgene Blood RNA Tubes sont conçus pour recueillir le sang total humain et stabiliser l'ARN cellulaire pendant un maximum de 3 jours entre 18 et 25 °C (Figure 1, page 14) ou un maximum de 5 jours entre 2 et 8 °C (Figure 2, page 15). Les données actuellement disponibles montrent une stabilisation de l'ARN cellulaire pendant au moins 11 ans à -20 °C ou -70 °C*. Pour plus d'informations provenant d'études en cours évaluant la stabilité sur des délais plus longs, veuillez communiquer avec les services techniques QIAGEN.

La durée réelle de la stabilisation de l'ARN peut varier selon les espèces d'ARN cellulaire et l'application utilisée en aval. En raison du nombre limité de transcriptions validées pour les spécifications de stabilisation (transcriptions des gènes FOS et IL1B), les caractéristiques de performances n'ont pas été établies pour toutes les transcriptions. Les utilisateurs se doivent de prendre connaissance des données du fabricant et de ses propres données afin de déterminer si une validation est nécessaire pour d'autres transcriptions.

* Une étude à long terme sur la conservation du sang dans les PAXgene Blood RNA Tubes est en cours de réalisation.

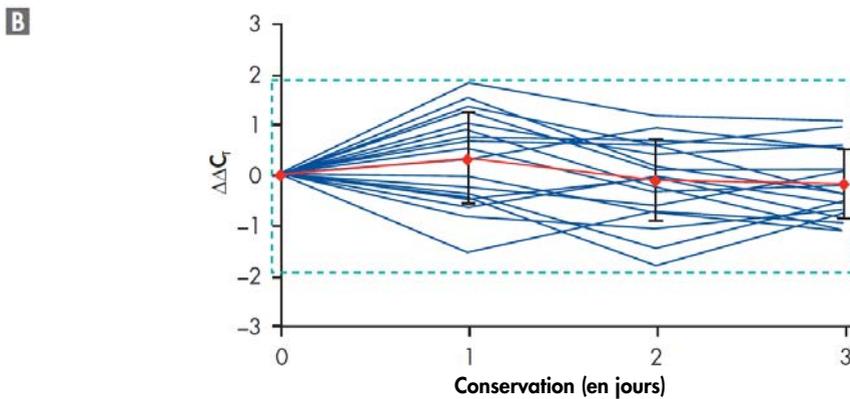
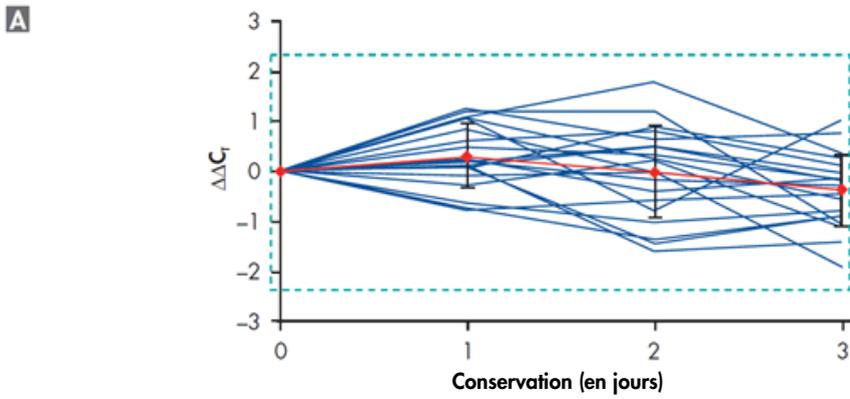


Figure 1. Stabilité de l'ARN dans les échantillons de sang entre 18 et 25 °C. Du sang a été prélevé sur 10 donneurs, avec des échantillons en deux exemplaires, et stocké entre 18 et 25 °C pendant le nombre de jours indiqué, suivi d'une purification de l'ARN total. Le sang a été recueilli et conservé dans des PAXgene Blood RNA Tubes, et l'ARN total a été purifié avec la trousse PAXgene Blood RNA Kit. Les niveaux de transcription relatifs de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, avec de l'ARNr 18S comme référence interne. Les valeurs obtenues pour tous les échantillons sont reportées sur un graphique (20 jeux de données pour chaque gène, lignes bleues), avec les moyennes (lignes rouges) et les écarts-types (barres noires) représentés. Les lignes pointillées indiquent la précision totale du dosage ($\pm 3x$ (FOS : 2,34 C_t ; IL1B : 1,93 C_t)).

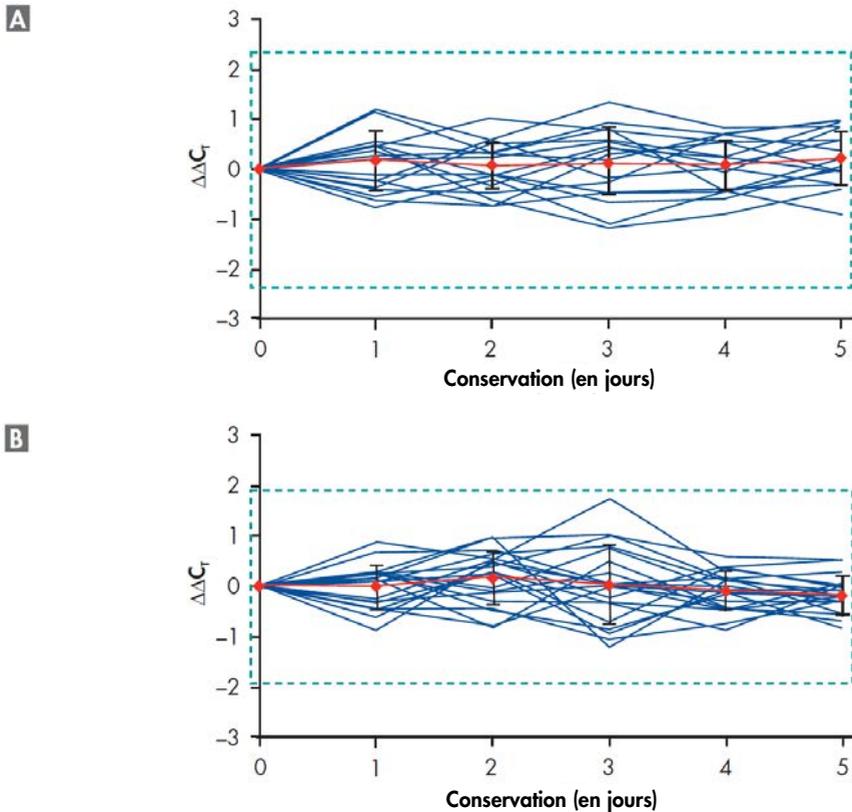


Figure 2. Stabilité de l'ARN dans les échantillons de sang entre 2 et 8 °C. Du sang a été prélevé et l'ARN total a été purifié, après stockage entre 2 et 8 °C, tel que décrit sur la Figure 1. Les niveaux de transcription relatifs de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, avec de l'ARNr 18S comme référence interne. Les valeurs obtenues pour tous les échantillons sont reportées sur un graphique (20 jeux de données pour chaque gène, lignes bleues), avec les moyennes (lignes rouges) et les écarts-types (barres noires) représentés. Les lignes pointillées indiquent la précision totale du dosage $\pm 3x$ (FOS : 2,34 C_t ; IL1B : 1,93 C_t).

Concentration et purification de l'ARN

La trousse PAXgene Blood RNA Kit est utilisée pour la purification de l'ARN total provenant de 2,5 ml de sang total prélevé dans un PAXgene Blood RNA Tube. La procédure est simple et peut être effectuée à l'aide de techniques manuelle ou automatisée (voir les Figures 3 et 9, pages 17 et 28). Dans les deux protocoles, la purification commence par une étape de centrifugation pour réunir les acides nucléiques en culot dans le PAXgene Blood RNA Tube. Le culot est lavé et remis en suspension, avant de subir une purification manuelle ou automatisée de l'ARN. En principe, les deux protocoles suivent les mêmes étapes, avec les mêmes composants de trousse.

Purification manuelle de l'ARN

En détail, le culot remis en suspension est incubé dans des tampons optimisés avec la protéinase K pour déclencher la digestion des protéines. Une centrifugation supplémentaire est effectuée avec la colonne de centrifugation PAXgene Shredder pour homogénéiser le lysat cellulaire et retirer les débris cellulaires résiduels, et le surnageant de la fraction traversante est transférée dans un nouveau tube de microcentrifugation. De l'éthanol est ajouté pour ajuster les conditions de liaison, et le lysat est appliqué sur une colonne de centrifugation PAXgene RNA. Pendant une brève centrifugation, l'ARN est lié de manière sélective à la membrane de silice PAXgene alors que les contaminants passent à travers elle. Les contaminants restants sont éliminés en plusieurs étapes d'un lavage efficace. Entre les première et deuxième étapes de lavage, la membrane est traitée avec de la DNase I pour éliminer les quantités infimes d'ADN lié. Après les étapes de lavage, l'ARN est élué dans un tampon d'éluat (Buffer BR5) et dénaturé thermiquement.

L'ARN total isolé avec le PAXgene Blood RNA System est pur. Avec le protocole manuel, les valeurs A_{260}/A_{280} sont comprises entre 1,8 et 2,2, et $\leq 1\%$ (p/p) d'ADN génomique est présent dans $\geq 95\%$ de tous les échantillons, tel que mesuré par PCR en temps réel quantitative d'une séquence du gène bêta-actine. Au moins 95 % des échantillons ne présentent aucune inhibition lors de la RT-PCR, lorsque l'on utilise jusqu'à 30 % de l'éluat.

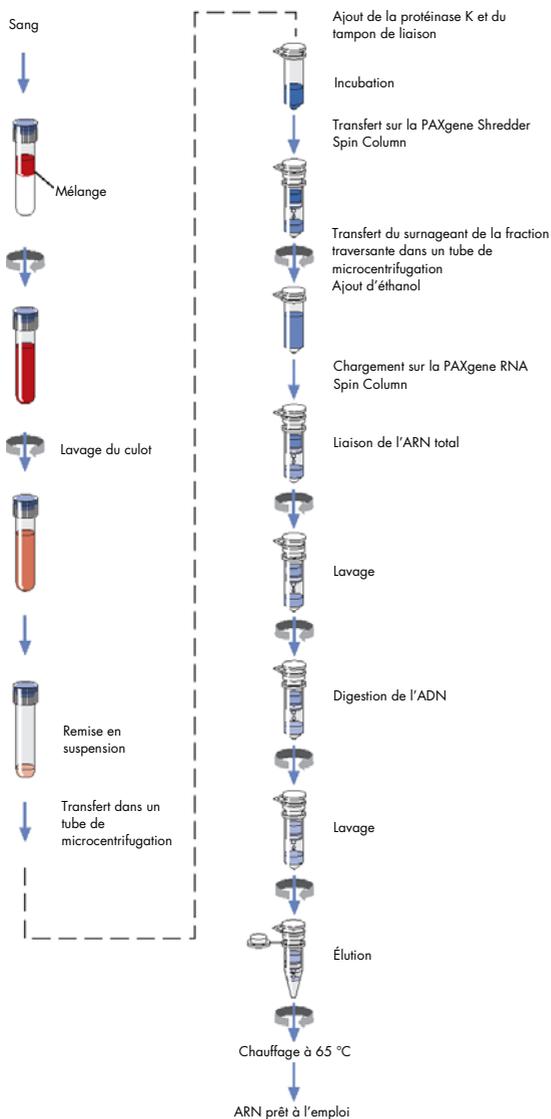


Figure 3. La procédure PAXgene Blood RNA manuelle.

Avec le protocole manuel, la durée de préparation moyenne des échantillons (sur la base des données provenant de 12 séries de préparation d'échantillons) est d'environ 90 minutes*, avec seulement 40 minutes de temps d'intervention de l'opérateur. Les rendements d'ARN provenant de 2,5 ml de sang total humain de donneurs en bonne santé sont de $\geq 3 \mu\text{g}$ pour $\geq 95\%$ des échantillons traités. Étant donné que les rendements sont fortement tributaires des donneurs concernés, les rendements peuvent varier d'un individu à un autre. Pour les donneurs individuels, le PAXgene Blood RNA System produit des rendements hautement reproductibles et répétables (Figures 4 et 5, pages 19 et 20) une RT-PCR reproductible et répétable (Figures 6 et 7, pages 24 et 25), ce qui en fait un outil robuste pour effectuer des tests diagnostiques cliniques.

La Figure 4 (page 19) indique la répétabilité et la reproductibilité globales du PAXgene Blood RNA System. Des études supplémentaires ont été réalisées pour montrer l'influence de différents lots de PAXgene Blood RNA Kit et de différents opérateurs sur la reproductibilité du rendement d'ARN et les performances de real time RT-PCR. Comme des échantillons de sang groupés et non des PAXgene Blood RNA Tubes individuels ont été utilisés lors de ces études, les résultats ne reflètent pas la répétabilité du système, notamment la fluctuation entre les prises de sang individuelles, mais seulement la répétabilité de la préparation des échantillons (voir la Figure 5, page 20).

* Durée totale d'exécution, en comptant la manipulation initiale des PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugations, lavage du culot et remise en suspension du culot).

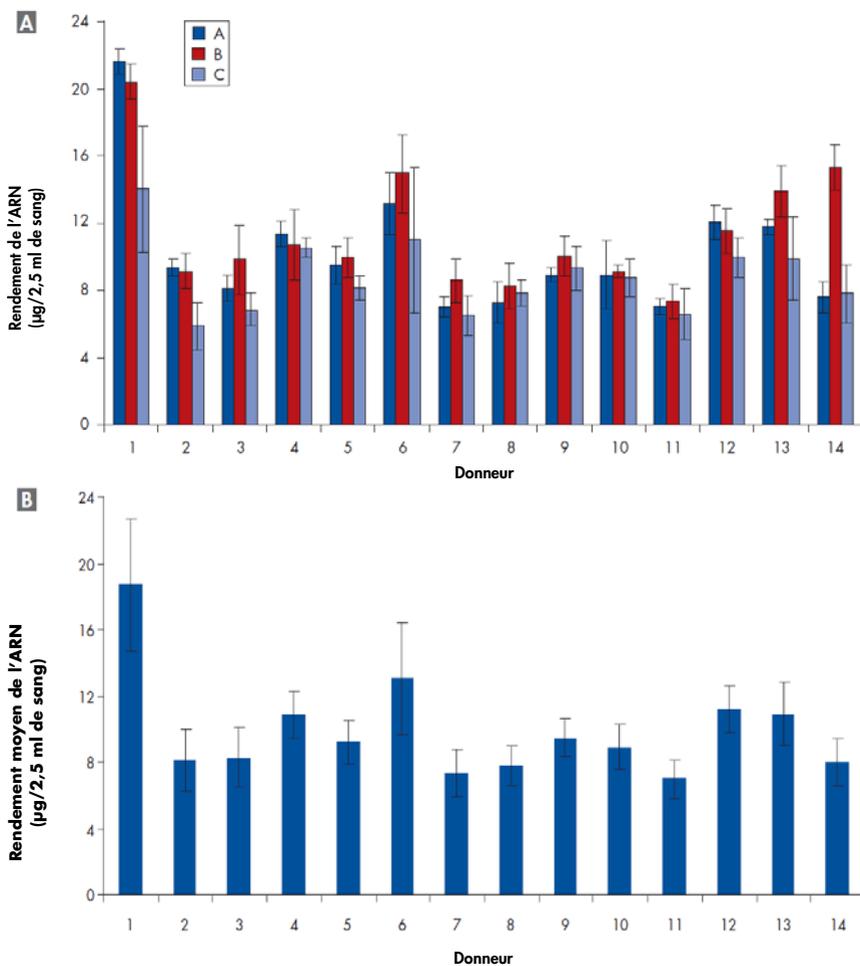


Figure 4. Purification de l'ARN reproductible et répétable. Des échantillons de sang en 4 exemplaires de 14 donneurs ont été traités manuellement par chacun de 3 techniciens (A, B et C). Trois jeux d'équipement ont été utilisés, et tous les échantillons préparés par un seul technicien ont été traités avec le même équipement. **[A]** Les moyennes et les écarts-types du rendement de l'ARN par exemplaires d'échantillons provenant des mêmes donneurs et de techniciens différents sont représentés. **[B]** Douze exemplaires d'échantillons sanguins provenant de 14 donneurs ont été traités par les 3 techniciens différents. Les moyennes et les écarts-types du rendement de l'ARN par échantillons provenant des mêmes donneurs et de tous les techniciens sont représentés. Pour tous les échantillons d'ARN, les rapports A_{260}/A_{280} s'échelonnaient de 1,8 à 2,2.

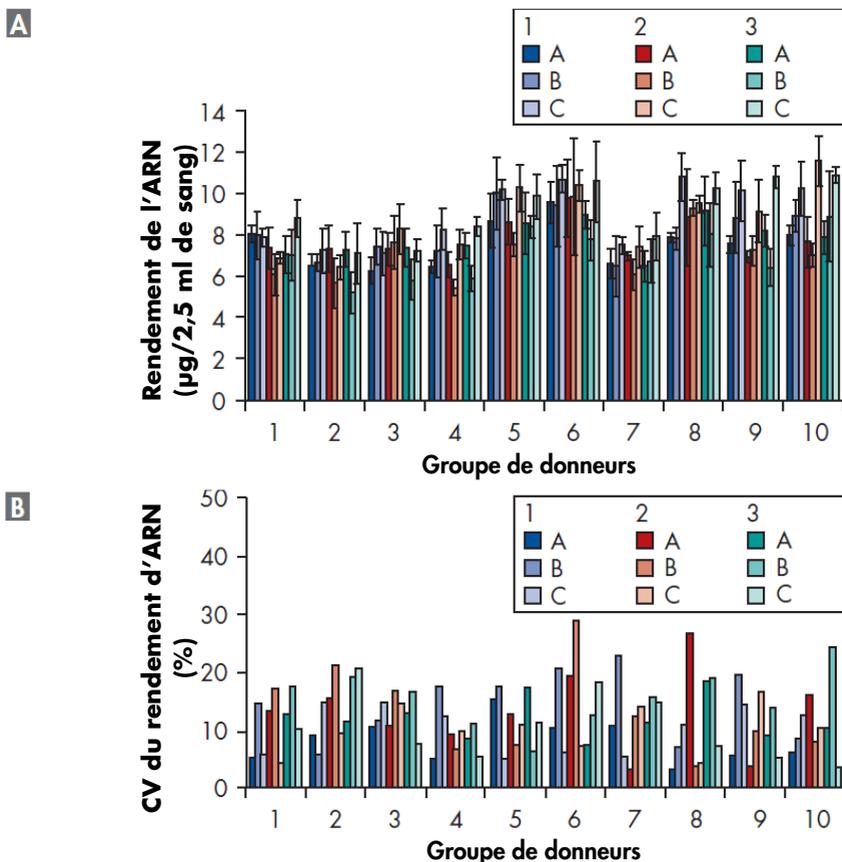


Figure 5. Répétabilité et reproductibilité du rendement d'ARN pour des différents opérateurs et lots de PAXgene Blood RNA Kit avec des échantillons de sang regroupés. Des échantillons de sang de 30 donneurs différents ont été recueillis dans les PAXgene Blood RNA Tubes (12 tubes par donneur, 360 tubes au total). Le contenu des tubes de 3 donneurs a été regroupé avant d'être ré-aliquoté en 36 échantillons. Ces 36 échantillons par groupe de 3 donneurs ont été traités manuellement par 3 opérateurs différents. Chaque opérateur a utilisé 3 lots de PAXgene Blood RNA Kit différents pour l'extraction et traité des échantillons en quatre exemplaires de chacun des 10 groupes de donneurs. **[A]** Rendement de l'ARN et écart-type pour chaque combinaison opérateur-lot. Les échantillons de sang en quatre exemplaires provenant de 10 groupes de donneurs ont été traités par 3 opérateurs différents (A, B, C) avec chacun des 3 lots de trousse (1, 2, 3). Les rendements moyens (colonnes) et les écarts-types (barres d'erreur) par échantillon en quatre exemplaires du même groupe de donneurs pour différents opérateurs et lots de trousse sont présentés. **[B]** Le coefficient de variation (CV) du rendement d'ARN par groupe de donneurs pour toutes les combinaisons opérateur-lot (A, B, C; 1, 2, 3) tel que calculé à partir du rendement moyen et de l'écart-type (ET) du rendement est représenté sur la Figure 5A.

Tableau 1A. Reproductibilité au sein de chaque lot et au sein d'un même utilisateur pour un choix de groupes de donneurs (1, 6, 9, 10)

Combinaison de données	Groupe de donneurs 1 5,1 x 10 ⁶ cellules/ml			Groupe de donneurs 6 6,5 x 10 ⁶ cellules/ml		
	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)
Lot 1, utilisateur A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lot 1, utilisateur B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lot 1, utilisateur C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lot 2, utilisateur A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lot 2, utilisateur B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lot 2, utilisateur C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lot 3, utilisateur A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lot 3, utilisateur B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lot 3, utilisateur C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Combinaison de données	Groupe de donneurs 9 8,4 x 10 ⁶ cellules/ml			Groupe de donneurs 10 10,2 x 10 ⁶ cellules/ml		
	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)
Lot 1, utilisateur A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lot 1, utilisateur B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lot 1, utilisateur C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lot 2, utilisateur A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lot 2, utilisateur B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lot 2, utilisateur C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lot 3, utilisateur A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lot 3, utilisateur B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lot 3, utilisateur C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tableau 1B. Reproductibilité au sein d'un même utilisateur et entre tous les lots pour un choix de groupes de donneurs (1, 6, 9, 10)

Combinaison de données	Groupe de donneurs 1 5,1 x 10 ⁶ cellules/ml			Groupe de donneurs 6 6,5 x 10 ⁶ cellules/ml		
	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)
Utilisateur A, tous les lots	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Utilisateur B, tous les lots	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Utilisateur C, tous les lots	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Combinaison de données	Groupe de donneurs 9 8,4 x 10 ⁶ cellules/ml			Groupe de donneurs 10 10,2 x 10 ⁶ cellules/ml		
	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)
Utilisateur A, tous les lots	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Utilisateur B, tous les lots	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Utilisateur C, tous les lots	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tableau 1C. Reproductibilité au sein de chaque lot et entre tous les utilisateurs pour un choix de groupes de donneurs (1, 6, 9, 10)

Combinaison de données	Groupe de donneurs 1 5,1 x 10 ⁶ cellules/ml			Groupe de donneurs 6 6,5 x 10 ⁶ cellules/ml		
	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)
Lot 1, tous les utilisateurs	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lot 2, tous les utilisateurs	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lot 3, tous les utilisateurs	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Combinaison de données	Groupe de donneurs 9 8,4 x 10 ⁶ cellules/ml			Groupe de donneurs 10 10,2 x 10 ⁶ cellules/ml		
	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)
Lot 1, tous les utilisateurs	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lot 2, tous les utilisateurs	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lot 3, tous les utilisateurs	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tableau 1D. Reproductibilité entre tous les lots et tous les utilisateurs pour un choix de groupes de donneurs (1, 6, 9, 10)

Combinaison de données	Groupe de donneurs 1 5,1 x 10 ⁶ cellules/ml			Groupe de donneurs 6 6,5 x 10 ⁶ cellules/ml		
	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)
Lot 1, tous les utilisateurs	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Combinaison de données	Groupe de donneurs 9 8,4 x 10 ⁶ cellules/ml			Groupe de donneurs 10 10,2 x 10 ⁶ cellules/ml		
	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)	Rendement moyen (µg)	ET (µg)	CV (%)
Lot 1, tous les utilisateurs	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Analyse détaillée de 4 groupes de donneurs représentatifs. Les groupes ont été sélectionnés en fonction de la numération en leucocytes et reflètent les valeurs supérieure, médiane et inférieure de la plage normale des numérations en leucocytes ($4,8 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ leucocytes/ml). La numération en leucocytes représente la valeur moyenne des 3 numérations en leucocytes des trois donneurs d'un même groupe de donneurs.

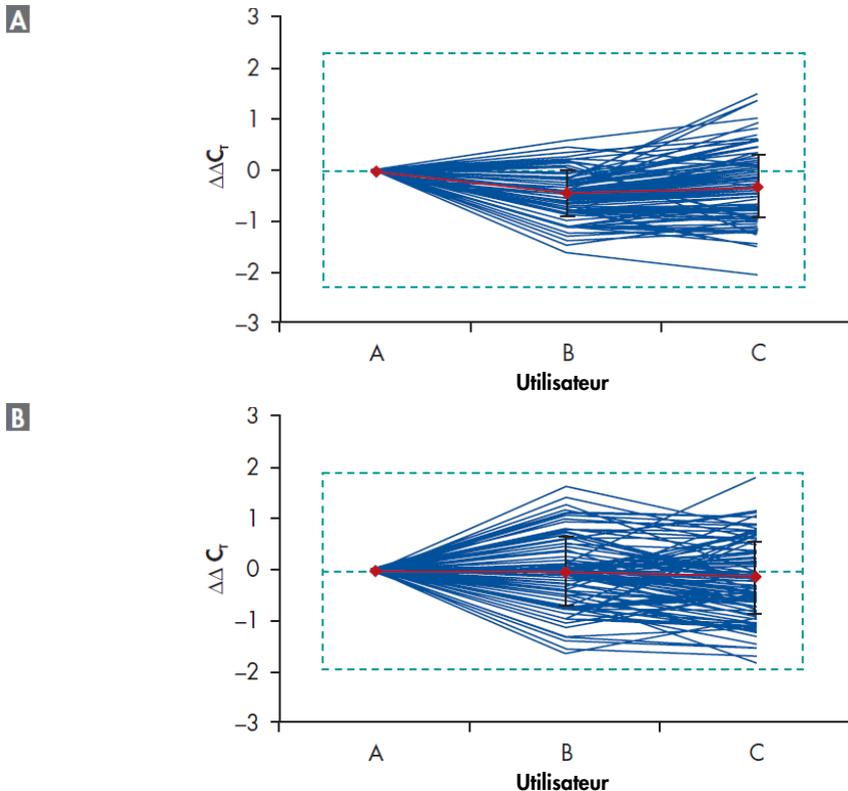


Figure 6. Reproductibilité de la RT-PCR – entre les utilisateurs. L'ARN purifié dans l'expérience décrite sur la Figure 5 a été utilisé dans le cadre d'une RT-PCR en temps réel. Les niveaux de transcription relatifs de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, avec de l'ARNr 18S comme référence interne. Les valeurs de tous les échantillons sont reportées sur un graphique, en fonction des valeurs pour l'utilisateur A (10 groupes de donneurs \times 3 lots de trousse \times 4 réplicats = 120 jeux de données pour chaque gène), avec les moyennes (lignes rouges) et les écarts-types (barres noires) représentés pour tous les échantillons. Les lignes pointillées indiquent la précision totale des dosages $\pm 3x$ (FOS : 2,34 C_t ; IL1B : 1,93 C_t).

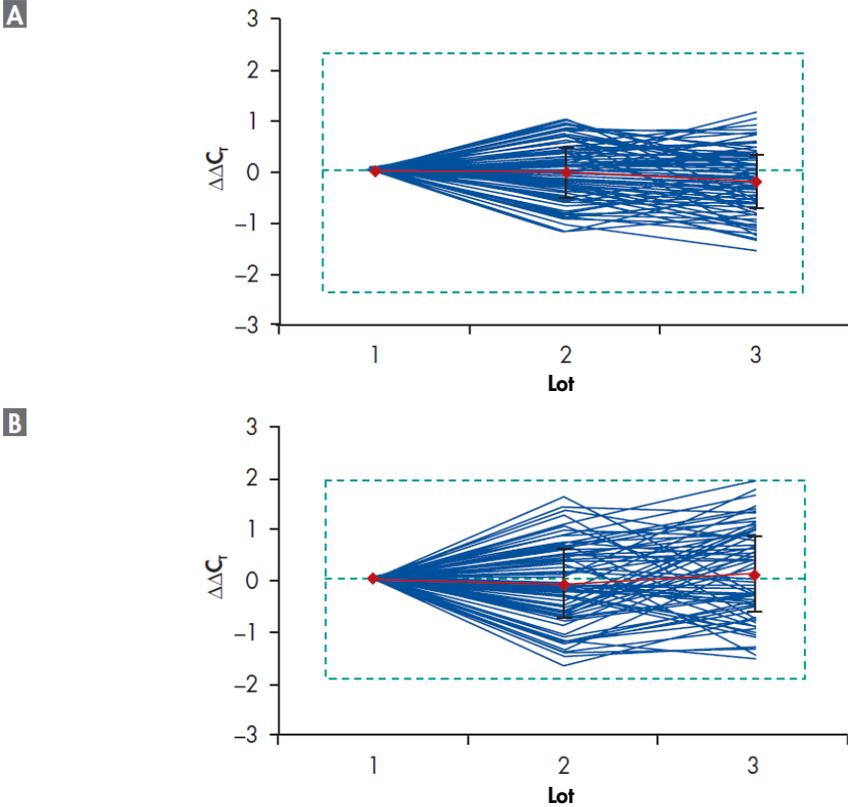


Figure 7. Reproductibilité de la RT-PCR – entre les lots de trousse. L'ARN purifié dans l'expérience décrite sur la Figure 5 a été utilisé dans le cadre d'une RT-PCR en temps réel. Les niveaux de transcription relatifs de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, avec de l'ARNr 18S comme référence interne. Les valeurs de tous les échantillons sont reportées sur un graphique, en fonction des valeurs pour le lot de trousse 1 (10 groupe de donneurs x 3 utilisateurs x 4 réplicats = 120 jeux de données pour chaque gène), avec les moyennes (lignes rouges) et les écarts-types (barres noires) représentés pour tous les échantillons. Les lignes pointillées indiquent la précision totale des dosages $\pm 3x$ (FOS : 2,34 C_t ; IL1B : 1,93 C_t).

Tableau 2. Récapitulatif des données de RT-PCR à partir des Figures 6 et 7

Système de test	Dosage FOS/ARNr 18S		Dosage IL1B/ARNr 18S	
	Moyenne ($\Delta\Delta C_T$)	\pm ET ($\Delta\Delta C_T$)	Moyenne ($\Delta\Delta C_T$)	\pm ET ($\Delta\Delta C_T$)
Reproductibilité au sein d'un même utilisateur et entre tous les lots				
Tous les utilisateurs, lot 1–lot 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Tous les utilisateurs, lot 1–lot 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Tous les utilisateurs, lot 1–lot 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
Reproductibilité au sein d'un même utilisateur et entre tous les lots				
Tous les lots, utilisateur A–utilisateur A	0,00	0,00	0,00	0,00
Tous les lots, utilisateur A–utilisateur B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Tous les lots, utilisateur A–utilisateur C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Utilisateur : Technicien ayant effectué l'étude.

Lot : Numéro de lot de la trousse utilisée dans cette étude.

ET : Écart-type.

Les valeurs $\Delta\Delta C_T$ moyennes (N = 120) et les écarts-types sont indiqués pour les données présentées dans les Figures 6 et 7.

Purification automatisée de l'ARN

La purification de l'ARN du sang est automatisé sur le QIAGEN QIAcube Connect MDx ou le QIAGEN QIAcube classique (appelé ici QIAcube). Les instruments QIAcube innovants utilisent une technologie avancée pour traiter les colonnes de centrifugation QIAGEN, cela vous permet d'intégrer simplement à la procédure de votre laboratoire un processus automatisé de préparation d'échantillons à faible capacité. La préparation des échantillons avec les instruments QIAcube suit les mêmes étapes que la procédure manuelle (à savoir lyse, liaison, lavage et élution), ce qui vous permet d'utiliser le PAXgene Blood RNA Kit pour la purification de l'ARN de haute qualité.



Figure 8. QIAcube Connect MDx.

Le protocole de purification de l'ARN automatisée comporte 2 parties (ou protocoles) : « PAXgene Blood RNA Part A » et « PAXgene Blood RNA Part B », avec une brève intervention manuelle entre les 2 parties (voir la Figure 9, page 28).

Procédure PAXgene Blood RNA automatisée

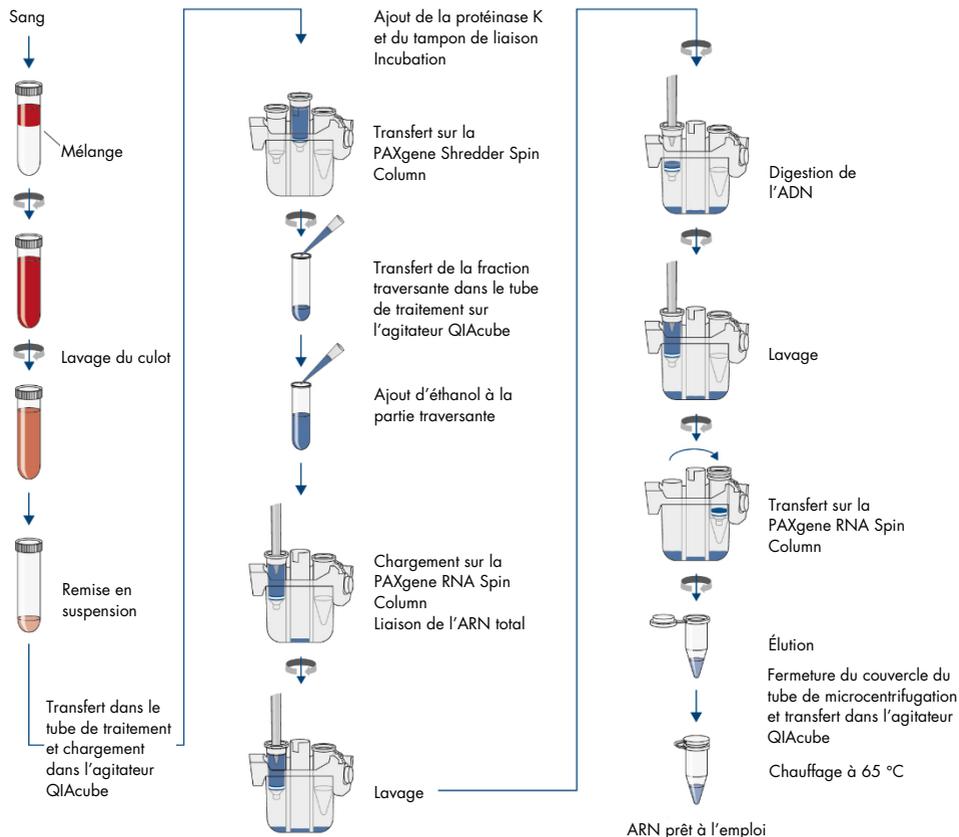


Figure 9. La procédure PAXgene Blood RNA automatisée.

Le culot d'acides nucléiques centrifugé, lavé et remis en suspension (voir « Concentration et purification de l'ARN », page 16) est transféré du PAXgene Blood RNA Tube dans les tubes de traitement, qui sont placés dans l'unité de thermoagitation sur la platine des instruments QIAcube. L'opérateur sélectionne et lance le protocole « PAXgene Blood RNA Part A » à partir du menu. Les instruments QIAcube effectuent les étapes du protocole jusqu'à l'élution de l'ARN dans le tampon d'élution. L'opérateur transfère les tubes de microcentrifugation contenant l'ARN purifié dans l'unité de thermoagitation des instruments QIAcube. L'opérateur sélectionne et lance le protocole « PAXgene Blood RNA Part B » à partir du menu, et une dénaturation thermique est effectuée par les instruments QIAcube.

Le temps de préparation moyen des échantillons (sur la base des données provenant de 12 séries de préparation d'échantillons) est de 151 minutes*, avec nettement moins de temps d'intervention effective par rapport au protocole manuel.

Les rendements d'ARN provenant de 2,5 ml de sang total humain de donateurs en bonne santé sont de $\geq 3 \mu\text{g}$ pour $\geq 95 \%$ des échantillons traités. La Figure 10 (page 30) indique le rendement de l'ARN à partir d'un total de 216 échantillons préparés à l'aide du protocole automatisé avec 3 lots de trousse par 3 opérateurs. Comme des échantillons de sang groupés de PAXgene Blood RNA Tubes ont été utilisés lors de ces études, les résultats ne reflètent pas le rendement d'ARN attendu d'échantillons simples provenant d'une même prise de sang. Étant donné que les rendements sont fortement tributaires des donateurs concernés, les rendements peuvent varier d'un individu à un autre.

Au moins 95 % des échantillons ne présentent aucune inhibition lors de la RT-PCR, lorsque l'on utilise jusqu'à 30 % de l'éluat.

* Durée totale d'exécution du protocole, en comptant la manipulation initiale des PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugations, lavage du culot et remise en suspension du culot).

L'ARN isolé avec le PAXgene Blood RNA System et le protocole automatisé est pur, comme le montre le manque d'inhibition de la RT-PCR et les valeurs A_{260}/A_{280} entre 1,8 et 2,2. L'ADN génomique est présent à $\leq 1\%$ (p/p) dans $\geq 95\%$ de tous les échantillons, comme le montre une PCR en temps réel quantitative sur une séquence du gène bêta-actine. Les figures 11 et 12 (pages 31 et 32) indiquent les valeurs A_{260}/A_{280} et l'ADN génomique relatif d'un total de 216 échantillons préparés à l'aide du protocole automatisé avec 3 lots de trousse par 3 opérateurs.

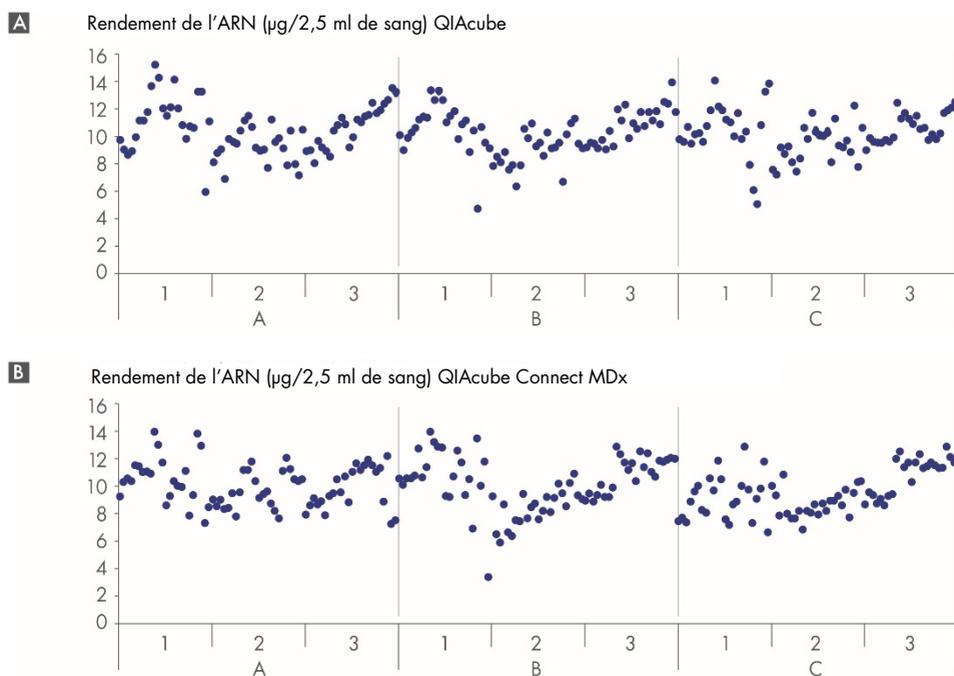


Figure 10. Rendement de l'ARN — traitement automatisé, A : QIAcube, B : QIAcube Connect MDx. Des échantillons de sang de plusieurs donneurs ont été prélevés dans des PAXgene Blood RNA Tubes. Le contenu des tubes a été regroupé dans 6 groupes de donneurs puis réaliquotés. Au total, 216 tubes (donc 36 par groupe) ont été traités par 3 opérateurs différents (A, B, C). Chaque opérateur a utilisé 3 lots distincts (1, 2, 3) de PAXgene Blood RNA Kit pour l'extraction automatisée avec plusieurs instruments QIAcube et QIAcube Connect MDx et traité des échantillons en quatre exemplaires de chacun des 6 groupes de donneurs. Les rendements de l'ARN de tous les échantillons individuels sont indiqués pour chaque combinaison opérateur-lot.

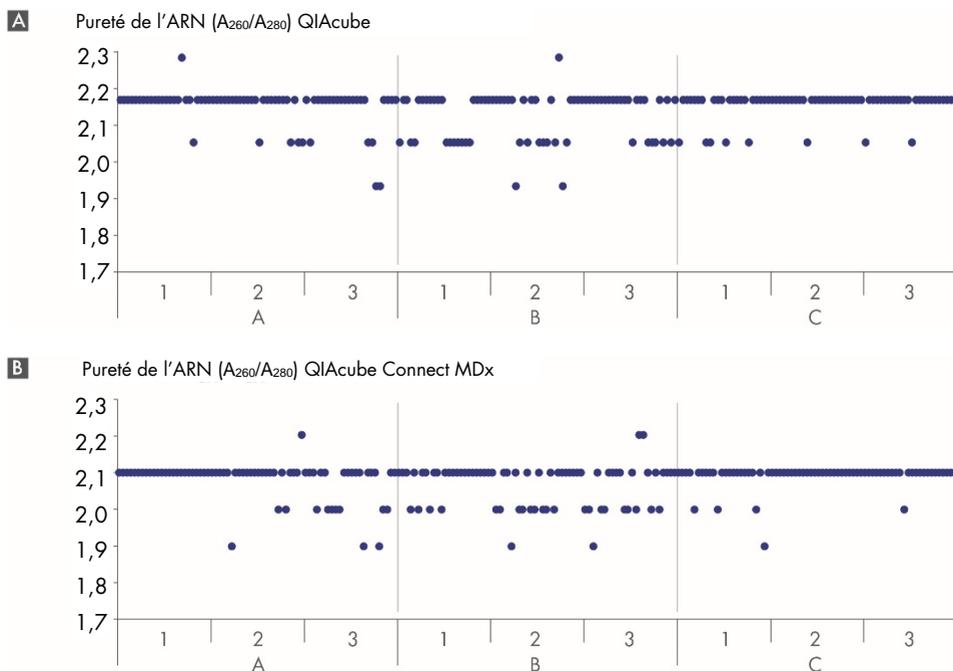


Figure 11. Pureté de l'ARN (valeurs A_{260}/A_{280}) – traitement automatisé, A : QIAcube, B : QIAcube Connect MDx. L'ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) au moyen de 3 lots différents (1, 2, 3) de PAXgene Blood RNA Kit avec plusieurs instruments QIAcube et QIAcube Connect MDx dans l'expérience décrite sur la Figure 10. Les valeurs A_{260}/A_{280} de tous les échantillons individuels sont indiqués pour chaque combinaison opérateur-lot.

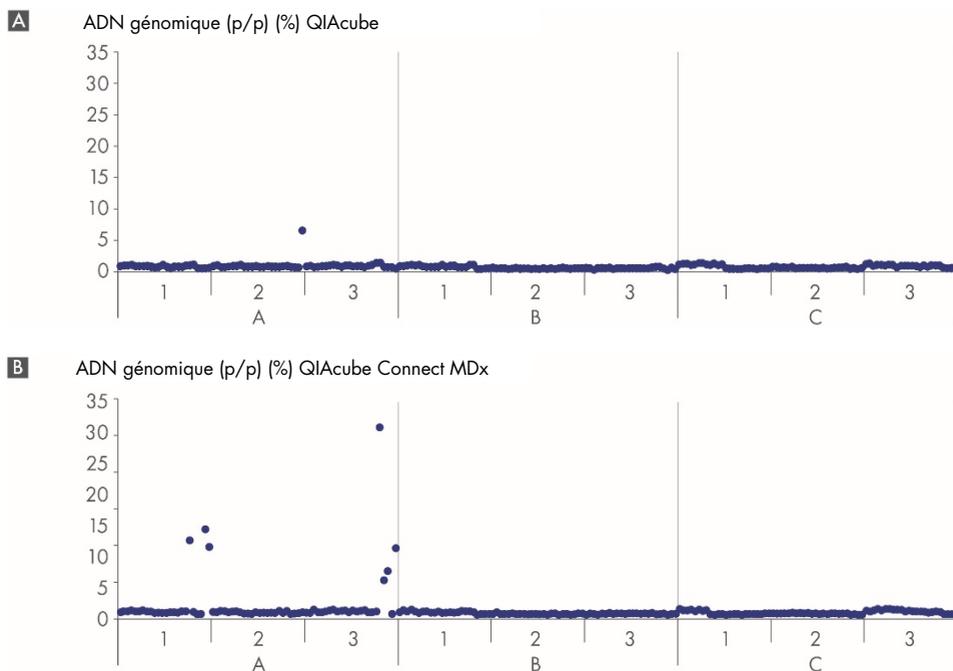


Figure 12. Pureté de l'ARN (% de contamination par l'ADN génomique) – traitement automatisé, A : QIAcube, B : QIAcube Connect MDx. L'ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) au moyen de 3 lots différents (1, 2, 3) de PAXgene Blood RNA Kit avec plusieurs instruments QIAcube et QIAcube Connect MDx dans l'expérience décrite sur la Figure 10. Les quantités d'ADN génomique (p/p) de tous les échantillons individuels sont indiqués pour chaque combinaison opérateur-lot.

Le protocole automatisé de purification de l'ARN avec le PAXgene Blood RNA System produit des résultats de RT-PCR hautement reproductibles et répétables, comme le montrent la Figure 13 et la Figure 14 (page 33 et 34), ce qui en fait un outil robuste pour effectuer des tests de diagnostic clinique.

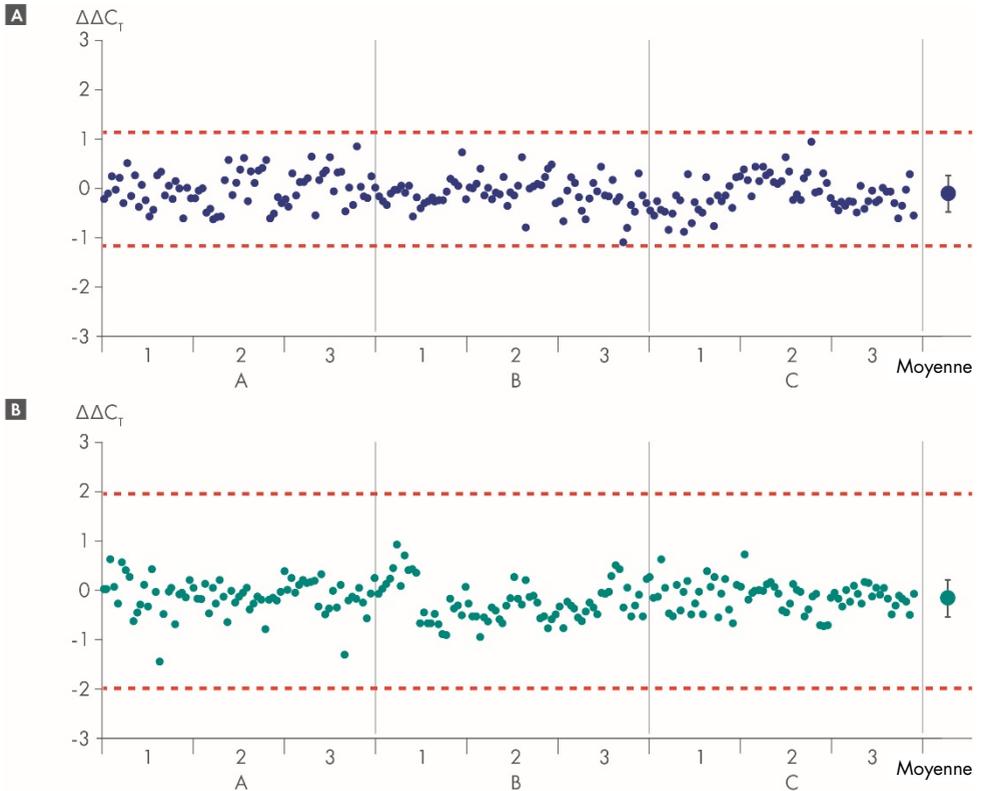


Figure 13. Reproductibilité de la RT-PCR – entre les protocoles automatisé (QIAcube) et manuel. L'ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) au moyen de 3 lots différents (1, 2, 3) de PAXgene Blood RNA Kit avec plusieurs instruments QIAcube et QIAcube Connect MDx à l'aide du protocole automatisé dans l'expérience décrite sur la Figure 10. En parallèle, l'ARN a été purifié à partir des tubes de réplicats correspondants avec le protocole manuel. Les niveaux de transcription relatifs de **[A]** FOS et **[B]** IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, avec de l'ARNr 18S comme référence interne. Les possibles différences de niveaux de transcription entre l'ARN préparé à partir d'échantillons de sang total appariés avec les deux protocoles d'extraction (protocole manuel et automatisé) ont été calculées par la méthode $\Delta\Delta C_T$. Les valeurs $\Delta\Delta C_T$ individuelles pour toutes les paires d'échantillons (4 réplicats x 6 groupes de donneurs x 3 lots de trousse x 3 opérateurs = 216 paires pour chaque gène) sont reportées sur un graphique sous la forme de points individuels avec les moyennes (gros points) et écarts-types (barres noires) représentés pour tous les échantillons. Les lignes pointillées indiquent la précision totale des dosages $\pm 3x$ (FOS : 1,16 C_T ; IL1B : 1,98 C_T ; différentes précisions de dosage tel que comparé aux Figures 1, 2, 6 et 7 en raison des différentes versions des dosages).

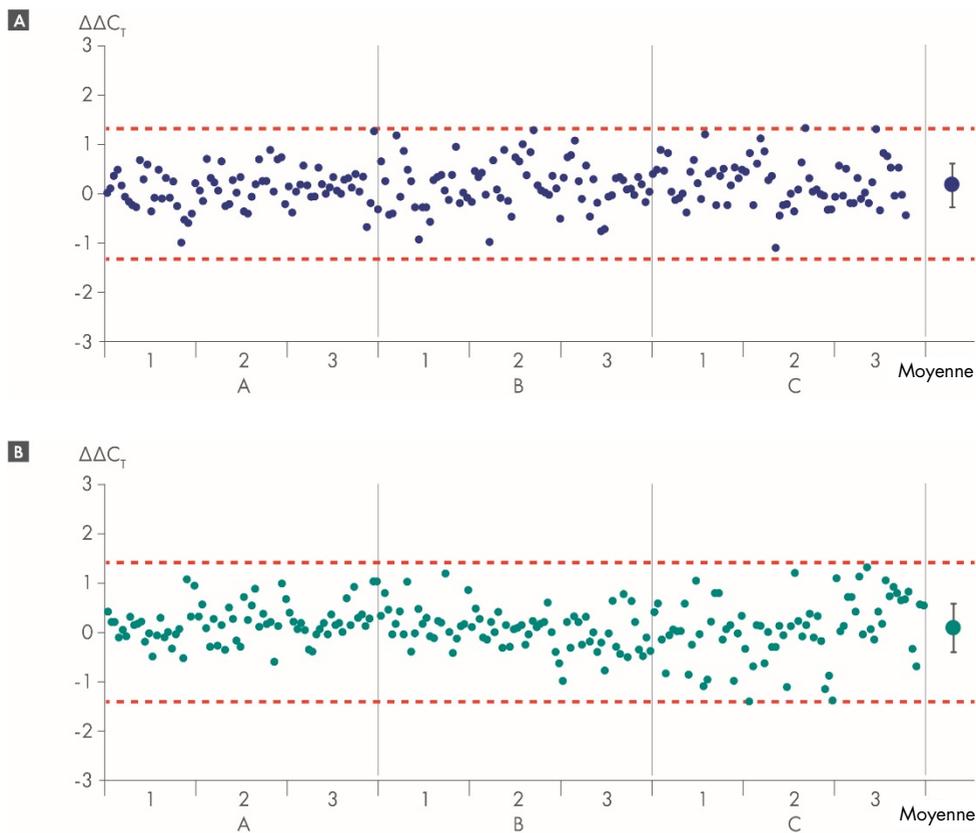


Figure 14. Reproductibilité de la RT-PCR – entre le QIAcube et le QIAcube Connect MDx à l’aide du protocole automatisé.

L’ARN a été purifié par 3 opérateurs différents (A, B, C) au moyen de 3 lots différents (1, 2, 3) de PAXgene Blood RNA Kit à l’aide du protocole automatisé sur plusieurs instruments QIAcube et QIAcube Connect MDx dans l’expérience décrite sur la Figure 10. Les niveaux de transcription relatifs de [A] FOS et [B] IL1B ont été déterminés par RT-PCR duplex en temps réel, avec de l’ARNr 18S comme référence interne. Les possibles différences de niveaux de transcription entre l’ARN préparé à partir d’échantillons de sang total appariés avec les deux instruments ont été calculées par la méthode $\Delta\Delta C_T$. Les valeurs $\Delta\Delta C_T$ individuelles pour toutes les paires d’échantillons (4 réplicats x 6 groupes de donneurs x 3 lots de trousse x 3 opérateurs = 216 paires pour chaque gène) sont reportées sur un graphique sous la forme de points individuels avec les moyennes (gros points) et écarts-types (barres noires) représentés pour tous les échantillons. Les lignes pointillées indiquent la précision totale des dosages $\pm 3x$ (FOS : 1,30 C_T ; IL1B : 1,42 C_T ; différentes précisions de dosage tel que comparé aux Figures 1, 2, 6, 7 et 13 en raison des différentes versions des dosages).

Équipement et réactifs à fournir par l'utilisateur

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

Pour tous les protocoles

- PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytiX, n° de réf. 762165)
- Éthanol (96–100 %, catégorie de pureté p.a.)
- Pipettes* (10 µl–4 ml)
- Embouts de pipettes stériles sans RNases avec dispositif anti-aérosols†
- Éprouvette graduée‡
- Centrifugeuse* capable d'atteindre 3 000–5 000 x g, et équipée d'un rotor horizontal et de godets permettant de maintenir les PAXgene Blood RNA Tubes
- Agitateur vortex*
- Glace pilée
- Marqueur indélébile pour annoter les étiquettes

* Assurez-vous que les dispositifs et instruments ont bien été vérifiés, entretenus et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

† Assurez-vous d'être bien familiarisé avec les consignes relatives à la manipulation d'ARN (Annexe A, page 68).

‡ Pour l'ajout d'éthanol au Buffer BR4 concentré.

Pour le protocole manuel

- Une microcentrifugeuse à vitesse variable* capable d'atteindre au minimum entre 1 000 et 8 000 x g, mais des forces gravitationnelles (g) plus basses et plus élevées sont aussi possibles (voir les étapes du protocole pour plus de détails), et équipée d'un rotor pour tubes de microcentrifugation de 2 ml
- Agitateur-incubateur* capable d'incuber entre 55 °C et 65 °C et d'agiter à ≥ 400 tr/min., en ne dépassant pas les 1 400 tr/min. (p. ex. Eppendorf® Thermomixer Compact, ou équivalent)

Pour le protocole automatisé (avec le QIAcube ou le QIAcube Connect MDx)

- Ciseaux

Consommables des instruments QIAcube :

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, n° de réf. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, n° de réf. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, n° de réf. 990394)†

Accessoires des instruments QIAcube :

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, n° de réf. 990392)†

Pour le protocole automatisé avec le QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx* (QIAGEN, n° de réf. 9003070)

* Assurez-vous que les dispositifs et instruments ont bien été vérifiés, entretenus et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

† Également inclus dans le Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, n° de réf. 990395).

Services QIAcube Connect MDx :

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, n° de réf. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, n° de réf. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, n° de réf. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, n° de réf. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, n° de réf. 9003075)

Pour le protocole automatisé avec le QIAcube

- QIAcube* (QIAGEN, n° de réf. 9001882 [110 V])

* Assurez-vous que les dispositifs et instruments ont bien été vérifiés, entretenus et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

Remarques importantes

Utilisation des instruments QIAcube

Assurez-vous d'être familiarisé avec le fonctionnement de l'instrument QIAcube. Veuillez lire le Manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube correspondant et toutes les informations supplémentaires fournies avec le QIAcube, en prêtant une attention particulière à l'information sur la sécurité, avant de lancer les protocoles automatisés PAXgene Blood RNA.

Les consignes de cette section s'appliquent au QIAcube Connect MDx comme au QIAcube tant qu'ils ne sont pas considérés distinctement.

Démarrage de l'instrument QIAcube

Fermez le capot de l'instrument QIAcube et mettez l'instrument QIAcube sous tension à l'aide de l'interrupteur marche/arrêt (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 15, page 39; QIAcube : voir la Figure 16, page 40).

Un signal sonore est émis et l'écran de démarrage s'affiche. L'instrument effectue automatiquement des tests d'initialisation.



Vue avant du QIAcube Connect MDx



Écran tactile escamotable



Vue arrière du QIAcube Connect MDx



Vue arrière du QIAcube Connect MDx

Figure 15. Fonctionnalités externes du QIAcube Connect MDx.

- ① Écran tactile
- ② Capot
- ③ Tiroir à déchets
- ④ Interrupteur marche/arrêt
- ⑤ 2 ports USB sur le côté gauche de l'écran tactile; 2 ports USB derrière l'écran tactile (module Wi-Fi branché à 1 port USB)
- ⑥ Port Ethernet RJ-45
- ⑦ Prise du cordon d'alimentation
- ⑧ Sortie d'air de refroidissement



Figure 16. Vue avant du QIAcube.

- | | | | |
|---|--|---|--|
| ① | Écran tactile | ④ | Port USB derrière le panneau de protection |
| ② | Capot | ⑤ | Interrupteur marche/arrêt |
| ③ | Port série RS232 derrière le panneau de protection (réservé aux techniciens QIAGEN chargés de l'entretien de l'instrument) | ⑥ | Tiroir à déchets |

Écran tactile

Les instruments QIAcube sont contrôlés par le biais d'un écran tactile. Ce dernier permet à l'utilisateur de manipuler l'instrument et le guide dans la configuration de la platine. Pendant le traitement des échantillons, l'écran tactile affiche le statut du protocole ainsi que le temps restant.



Figure 17. Écran tactile escamotable du QIAcube Connect MDx.

Installation des protocoles sur les instruments QIAcube

Une installation initiale des protocoles peut être nécessaire avant le premier cycle de préparation d'ARN sur les instruments QIAcube. Installez les protocoles « PAXgene Blood RNA Part A » et « PAXgene Blood RNA Part B ».

Les protocoles du QIAcube Connect MDx sont disponibles sur www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources (sur www.qiagen.com/MyQIAcube pour le QIAcube) et doivent être téléchargés sur la clé USB fournie avec les instruments QIAcube. Ces protocoles seront transférés vers l'instrument par le port USB.

Le port USB (QIAcube Connect MDx : sur le côté de l'écran tactile, voir la Figure 15, page 39; QIAcube : derrière le panneau de protection, voir la Figure 16, page 40) permet de raccorder les instruments QIAcube à la clé USB fournie avec les instruments QIAcube. Des fichiers de données, comme les fichiers journaux ou les fichiers de rapport, peuvent également être transférés des instruments QIAcube vers la clé USB par le port USB.

Remarque : Le port USB est uniquement destiné à une utilisation avec la clé USB fournie par QIAGEN. Ne pas brancher d'autres périphériques sur ce port.

Remarque : Ne pas retirer la clé USB pendant le téléchargement des protocoles ou le transfert des fichiers de données, ou pendant l'exécution d'un protocole.

Pour plus de détails sur le processus de téléchargement des protocoles vers les instruments QIAcube, consultez le manuel de l'instrument utilisé.

Chargement des instruments QIAcube

Pour gagner du temps, le chargement peut être effectué au cours de l'une ou l'autre des étapes de centrifugation de 10 minutes (étapes 3 et 5) dans « Protocole : Purification automatisée de l'ARN total à partir de sang total humain recueilli dans des PAXgene Blood RNA Tubes », page 62.

Flacons de réactif

Avant chaque cycle sur l'instrument QIAcube, remplissez soigneusement les 4 flacons de réactifs avec les réactifs figurant dans le Tableau 3 (page 43) jusqu'au repère de niveau maximal, ou, si ce n'est pas possible, jusqu'au niveau que permettent les volumes de tampon fournis dans le PAXgene Blood RNA Kit. Étiquetez clairement les flacons et les couvercles en indiquant le nom des tampons et placez les flacons de réactifs pleins dans les positions appropriées sur le portoir à flacons de réactifs. Chargez le portoir sur la platine de l'instrument QIAcube tel que représenté (Figures 18 à 20, pages 44 à 46).

Remarque : Le volume de Buffer BR2 fourni ne va pas permettre de remplir les flacons de réactif jusqu'au repère. Les tampons Buffer BR3 et Buffer BR4 peuvent ne pas remplir le flacon jusqu'au repère après traitement de plusieurs échantillons au cours de cycles précédents.

Remarque : Veiller à bien retirer les couvercles des flacons avant de les placer sur la platine.

Remarque : Les volumes de tampon fournis dans le PAXgene Blood RNA Kit (50) sont suffisants pour un maximum de 7 cycles de préparation d'ARN sur les instruments QIAcube, avec des nombres d'échantillons de 2 à 12 par cycle. En général, les cycles comportant un nombre moindre d'échantillons doivent être évités afin de traiter un total de 50 échantillons par trousse, pour un maximum de 7 cycles de préparation d'ARN. Un nombre supérieur à 7 cycles de préparation d'ARN peut conduire à des volumes de tampon insuffisants pour le traitement des derniers échantillons.

Tableau 3. Positions sur le portoir à flacons de réactifs

Position	Réactif
1	Tampon de liaison (BR2)
2	Éthanol 96–100 %
3	Tampon de lavage 1 (BR3)
4	Tampon de lavage 2 (BR4)*
5	– (laisser vide)
6	– (laisser vide)

* Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni sous forme concentrée. Avant d'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, catégorie de pureté p.a.) comme indiqué sur le flacon pour obtenir une solution propre à l'utilisation.

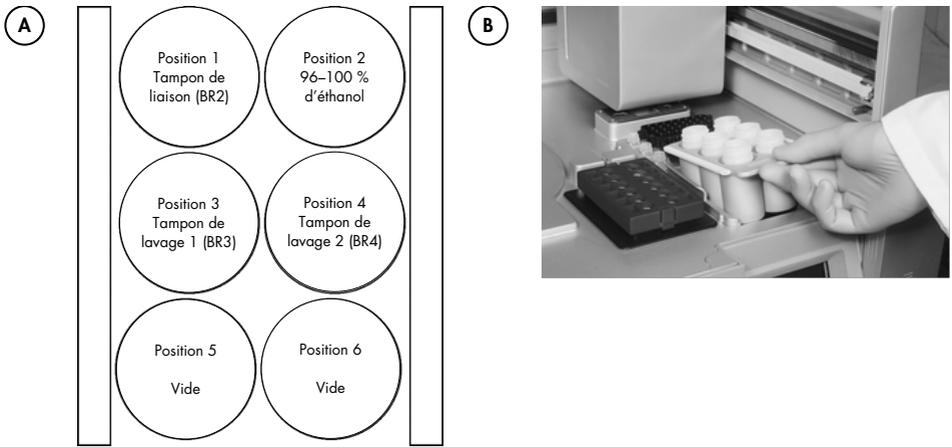


Figure 18. Chargement sur le portoir à flacons de réactifs. [A] Schéma des positions et du contenu des flacons de réactif sur le portoir. [B] Chargement du portoir sur les instruments QIAcube (QIAcube illustré ici).

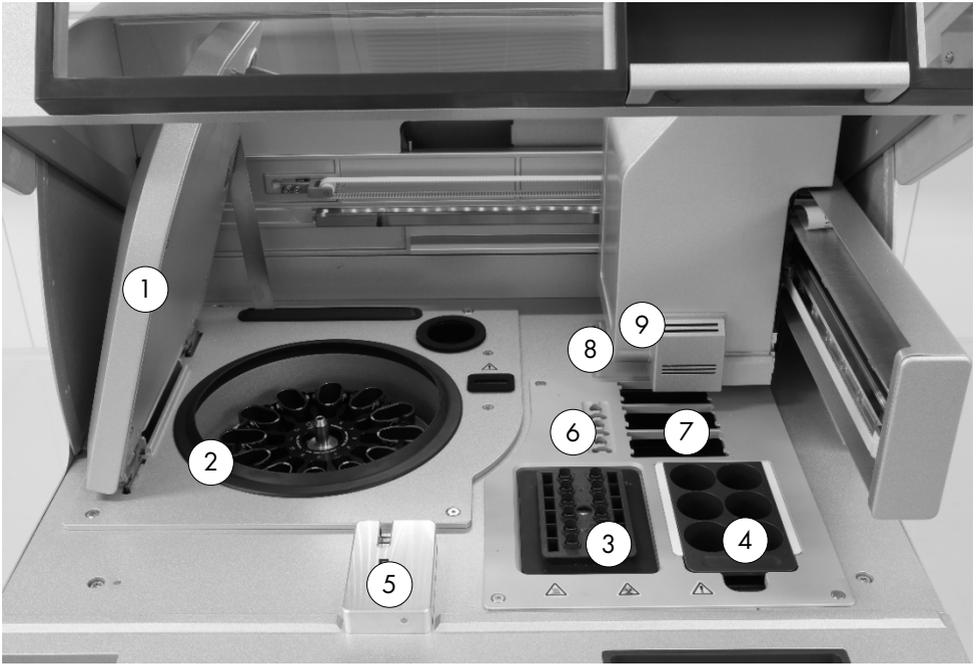


Figure 19. Vue interne du QIAcube Connect MDx.

- | | |
|---|--|
| <p>① Couvercle de la centrifugeuse</p> <p>② Centrifugeuse</p> <p>③ Agitateur</p> <p>④ Portoir à flacons de réactifs</p> <p>⑤ Capteur de pointe et verrou du capot</p> | <p>⑥ Emplacements pour tubes de microcentrifugation</p> <p>⑦ 3 logements pour portoirs à pointes</p> <p>⑧ Orifices d'élimination des embouts et colonnes</p> <p>⑨ Bras robot (avec pipetteur monocanal, pince, capteur ultrasonore et optique et DEL UV)</p> |
|---|--|

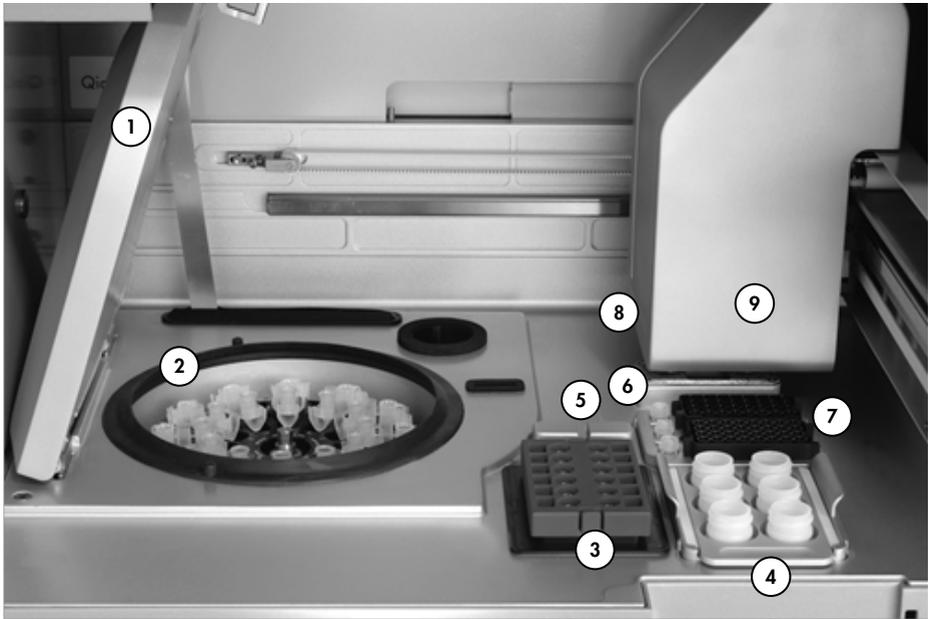


Figure 20. Vue interne du QIAcube.

- | | | | |
|---|-------------------------------|---|--|
| 1 | Couvercle de la centrifugeuse | 6 | Emplacements pour tubes de microcentrifugation |
| 2 | Centrifugeuse | 7 | Portoirs à pointes |
| 3 | Agitateur | 8 | Orifices d'élimination des embouts et colonnes |
| 4 | Portoir à flacons de réactifs | 9 | Bras robot |
| 5 | Capteur d'embout | | |

Colonnes de centrifugation, tubes de microcentrifugation et matériel en plastique des instruments QIAcube

Placez 2 portoirs à pointes contenant des pointes à filtre de 1 000 µl sur l'instrument QIAcube (voir les Figures 19 et 20, pages 45 et 46). Remettez des embouts sur les portoirs lorsque cela est nécessaire.

Remarque : Utilisez uniquement des pointes à filtre de 1 000 µl conçues pour être utilisées avec les instruments QIAcube.

Étiqueter les adaptateurs du rotor et les tubes de microcentrifugation pour chaque échantillon à l'aide d'un marqueur indélébile. Ouvrez les colonnes de centrifugation PAXgene Shredder à utiliser et retirez complètement les couvercles à l'aide de ciseaux (voir la Figure 21, page 48).

Remarque : Pour un fonctionnement correct de la pince robot de l'instrument QIAcube, retirez complètement les couvercles (en les coupant) ainsi que toutes les pièces en plastique reliant le couvercle aux colonnes de centrifugation PAXgene Shredder (voir la Figure 21). Dans le cas contraire, la pince robot n'est pas capable de saisir les colonnes de centrifugation correctement.

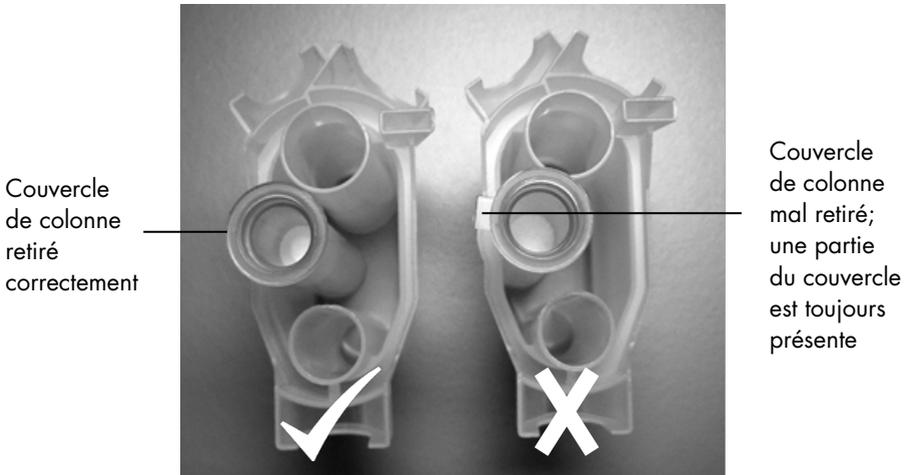


Figure 21. Chargement de la colonne de centrifugation PAXgene Shredder. La colonne de centrifugation PAXgene Shredder est chargée dans la position intermédiaire de l'adaptateur de rotor. Couper le couvercle avant de charger la colonne.

Chargez la colonne de centrifugation PAXgene RNA, la colonne de centrifugation PAXgene Shredder (sans couvercle, voir la Figure 21, page 48) et le tube de microcentrifugation étiqueté dans les positions appropriées sur chacun des adaptateurs de rotor étiquetés, comme indiqué dans le Tableau 4 et sur la Figure 22.

Remarque : Veiller à ce que les couvercles de la colonne de centrifugation et du tube de microcentrifugation soient enfoncés jusqu'au fond des emplacements sur le bord de l'adaptateur de rotor, au risque que les couvercles ne se cassent durant la centrifugation dans le cas contraire.

Tableau 4. Matériel de laboratoire dans l'adaptateur de rotor

Position	Réactif	Position du couvercle
1	Colonne de centrifugation PAXgene RNA (rouge)	L1
2	Colonne de centrifugation PAXgene Shredder (lilas) (retirez le couvercle avant le placement dans l'adaptateur de rotor)	–
3	Tube de microcentrifugation†	L3

† Utilisez les tubes de microcentrifugation (1,5 ml) fournis dans le PAXgene Blood RNA Kit.

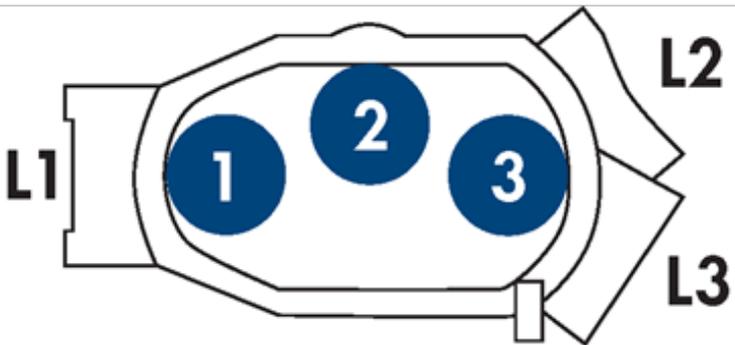


Figure 22. Positions dans l'adaptateur de rotor. L'adaptateur de rotor compte trois positions de tube (1 à 3) et trois positions de couvercle (L1 à L3).

Chargement de la centrifugeuse

Chargez les adaptateurs de rotor assemblés dans les godets de la centrifugeuse comme indiqué sur la Figure 23 ci-dessous.

Remarque : Si moins de 12 échantillons sont traités, veillez à bien charger le rotor de la centrifugeuse en l'équilibrant de façon radiale (voir la Figure 24, page 51). Tous les godets de la centrifugeuse doivent être montés avant de lancer l'exécution du protocole, même s'il y a moins de 12 échantillons à traiter. Il n'est pas possible de traiter un échantillon unique (seul) ou 11 échantillons.



Figure 23. Chargement de la centrifugeuse sur les instruments QIAcube. Chargez les adaptateurs de rotor assemblés dans les godets de la centrifugeuse (QIAcube Connect MDx illustré ici).

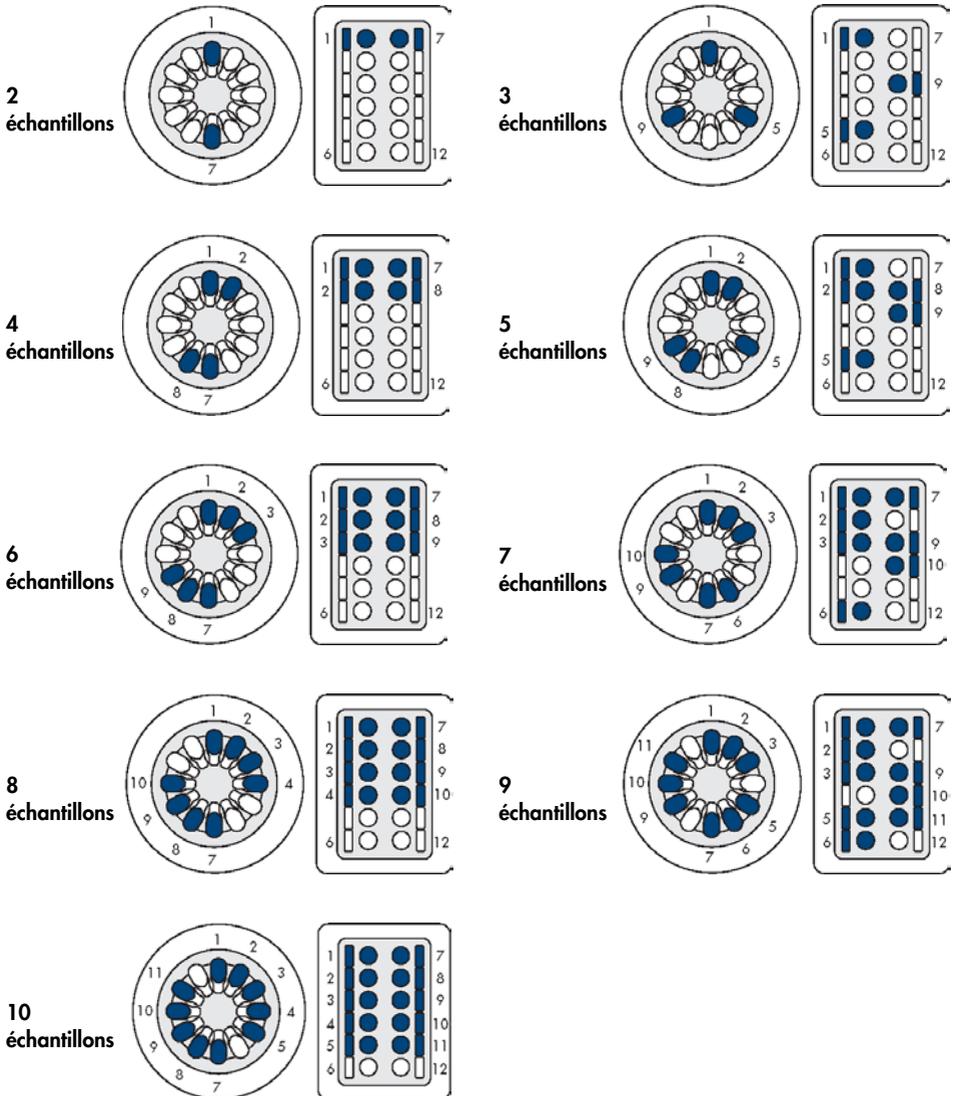


Figure 24. Chargement de la centrifugeuse et de l'agitateur. Les positions de la centrifugeuse et de l'agitateur sont indiquées pour le traitement de deux (2) à dix (10) échantillons. Il n'est pas possible de traiter un (1) seul échantillon ou 11 échantillons. Les numéros de position du portoir à agitateur correspondent à celles de la centrifugeuse. Pour traiter douze (12) échantillons, toutes les positions de la centrifugeuse et de l'agitateur sont chargées (non illustré).

Tubes de traitement

Retirez les tubes de traitement restant dans les emplacements pour tubes de microcentrifugation après les cycles précédents (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 19, page 45; QIAcube : voir la Figure 20, page 46). Remplir 3 tubes de traitement avec la quantité de réactifs indiquée dans le Tableau 5, en fonction du nombre d'échantillons traités dans l'analyse.

Pour le mélange d'incubation DNase I, ajouter le volume indiqué de Buffer RDD avec une pipette dans un tube de traitement et ajouter le volume indiqué de solution mère de DNase I. Mélanger en pipetant délicatement la totalité du mélange puis en le relâchant, 3 fois de suite, au moyen d'un embout de pipette de 1 000 µl.

Utiliser les tubes de traitement de 2 ml fournis dans la trousse PAXgene Blood RNA Kit. Étiqueter les tubes de façon claire en indiquant les noms des réactifs et les placer à la position appropriée dans les emplacements pour tubes de microcentrifugation, tel qu'indiqué dans le Tableau 6 (page 53).

Remarque : La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. Mélanger uniquement par pipetage, en utilisant des embouts de pipettes de large diamètre afin de réduire le cisaillement. Ne pas passer au vortex.

Remarque : Veiller à ne pipeter que le volume nécessaire indiqué dans le Tableau 5.

Tableau 5. Volume de réactifs nécessaire dans les tubes de traitement pour les emplacements des tubes de microcentrifugation

Nombre d'échantillons	Volume de réactif pour le nombre indiqué d'échantillons (µl)		
	Protéinase K (PK)	Mélange d'incubation DNase I	Tampon d'éluion (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1 177

Tableau 6. Emplacements pour tubes de microcentrifugation

	Position		
	A	B	C
Contenu	Protéinase K	Mélange d'incubation DNase I	Buffer BR5
Récipient	Tube de traitement*	Tube de traitement*	Tube de traitement*

* Utiliser les tubes de traitement de 2 ml fournis dans la trousse PAXgene Blood RNA Kit.

Protocole : Purification manuelle de l'ARN total à partir de sang total humain recueilli dans des PAXgene Blood RNA Tubes

Points importants avant le démarrage

- Vérifier que le carton de la trousse est intacte et en bon état, et qu'aucun tampon n'a fui. Ne pas utiliser la trousse si elle est endommagée.
- Lors de l'utilisation d'une pipette, veiller à ce qu'elle soit réglée sur le bon volume et que le liquide soit aspiré et relâché délicatement et entièrement.
- Afin d'éviter de transférer des échantillons dans le mauvais tube ou la mauvaise colonne de centrifugation, veiller à ce que les tubes et colonnes de centrifugation soient correctement étiquetés au marqueur indélébile. Étiqueter le couvercle et le corps de chaque tube. Pour les colonnes de centrifugation, étiqueter le corps du tube de traitement. Fermer chaque tube ou colonne de centrifugation après que du liquide y a été transféré.
- Le fait de renverser des échantillons ou des tampons au cours de la procédure peut réduire le rendement et la pureté de l'ARN.
- Sauf indication contraire, toutes les étapes de ce protocole, étapes de centrifugation comprises, doivent être effectuées à température ambiante (entre 15 et 25 °C).

En raison de la sensibilité des technologies d'amplification des acides nucléiques, les précautions suivantes sont nécessaires lors de la manipulation des échantillons pour éviter la contamination croisée :

- Introduire l'échantillon dans la colonne de centrifugation avec précaution au moyen d'une pipette, sans mouiller le pourtour de la colonne.

- Changer systématiquement les embouts de pipette entre les transferts de liquides. Utiliser des embouts de pipette équipés de dispositifs anti-aérosols.
- Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation avec l'embout de pipette.
- Après le passage au vortex ou le chauffage d'un tube de microcentrifugation, le centrifuger brièvement afin de retirer les gouttes présentes à l'intérieur du couvercle.
- Porter des gants durant toute la procédure. En cas de contact entre l'échantillon et les gants, changer de gants immédiatement.
- Fermer la colonne de centrifugation avant de la placer dans la microcentrifugeuse. Centrifuger tel qu'indiqué dans la procédure.
- Ouvrir une seule colonne de centrifugation à la fois et prendre soin d'éviter de générer des aérosols.
- Pour un traitement efficace de plusieurs échantillons en parallèle, remplir un portoir avec les tubes de traitement auxquels les colonnes de centrifugation peuvent être transférées après centrifugation. Mettre au rebut les tubes de traitement usagés contenant les matières ayant traversé la colonne, et placer les nouveaux tubes de traitement contenant des colonnes de centrifugation directement dans la microcentrifugeuse.

À faire avant de démarrer

- Le sang doit être recueilli dans les PAXgene Blood RNA Tubes conformément aux instructions énoncées dans le *Manuel du PAXgene Blood RNA Tube*. Au besoin, consultez l'Annexe C (page 76) pour connaître les recommandations sur la manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes.
- Veiller à ce que les PAXgene Blood RNA Tubes soient incubés pendant au moins 2 heures à température ambiante après le prélèvement sanguin afin d'assurer la lyse complète des cellules sanguines. L'incubation du PAXgene Blood RNA Tube toute une nuit peut augmenter le rendement. Si le PAXgene Blood RNA Tube a été conservé entre 2 et 8 °C, -20 °C ou -70 °C après le prélèvement sanguin, le laisser d'abord revenir à température ambiante, puis le conserver à température ambiante pendant 2 heures avant de commencer la procédure.

- Lire l'information sur la sécurité à la page 9.
- Lisez les consignes relatives à la manipulation d'ARN (Annexe A, page 73).
- Veiller à ce que les instruments, comme les pipettes et l'agitateur-incubateur, aient bien été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.
- Un agitateur-incubateur est nécessaire aux étapes 5 et 20. Régler la température de l'agitateur-incubateur sur 55 °C.
- Le Buffer BR2 peut former un précipité lors de son stockage. Au besoin, réchauffer à 37 °C pour le dissoudre.
- Le Buffer BR4 est fourni sous forme de concentré. Avant d'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, catégorie de pureté p.a.) comme indiqué sur le flacon pour obtenir une solution propre à l'utilisation.
- En cas d'utilisation de l'ensemble de DNase sans RNases pour la première fois, préparer la solution mère de DNase I. Dissolvez la DNase I solide (1 500 unités Kunitz*) dans 550 µl de l'eau sans RNases fournie avec l'ensemble. Veillez à ce qu'aucune DNase I ne soit perdue lors de l'ouverture du flacon. Ne pas passer au vortex la DNase I reconstituée, car la DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. Le mélange doit uniquement être effectué en retournant délicatement le flacon.
- Les données actuelles montrent que la DNase I peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 6 semaines. Pour la conservation de la DNase I sur la durée, retirer la solution mère du flacon en verre, la diviser en parties aliquotes à usage unique (utiliser les tubes de microcentrifugation de 1,5 ml fournis avec la trousse; il y en a suffisamment pour 5 aliquotes) et la conserver à -20 °C pendant un maximum de 9 mois. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 6 semaines. Ne pas recongeler les aliquotes après décongélation.
- Lors de la reconstitution et de l'aliquotage de la DNase I, veillez à suivre les consignes relatives à la manipulation de l'ARN (Annexe A, page 73).

* Les unités Kunitz sont les unités couramment utilisées pour mesurer la DNase I, et sont définies comme la quantité de DNase I capable de causer une augmentation de A_{260} de 0,001 par minute et par millilitre à 25 °C, pH 5,0, avec de l'ADN hautement polymérisé comme substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 et 363).

Procédure

1. Centrifuger le PAXgene Blood RNA Tube pendant 10 minutes à 3 000–5 000 x g au moyen d'un rotor horizontal.

Remarque : Veiller à ce que l'échantillon de sang soit incubé dans le PAXgene Blood RNA Tube pendant au moins 2 heures à température ambiante (15 à 25 °C) afin de parvenir à une lyse complète des cellules sanguines.

Remarque : Le rotor doit contenir des adaptateurs pour tubes à fond rond. Si d'autres types d'adaptateur de tube sont utilisés, les tubes peuvent se briser pendant la centrifugation.

2. Retirer le surnageant par décantation ou pipetage. Ajoutez 4 ml d'eau sans RNases au culot et fermez le tube au moyen d'un bouchon sécurité BD Hemogard secondaire neuf (fourni avec la trousse).

Si le surnageant est décanté, prendre soin de ne pas agiter le culot, et sécher le pourtour du tube avec une serviette en papier propre.

3. Passer au vortex jusqu'à ce que le culot soit complètement dissous et centrifuger pendant 10 minutes à 3 000–5 000 x g au moyen d'un rotor horizontal. Retirer et jeter l'ensemble du surnageant.

La présence de petits débris restant dans le surnageant après le passage au vortex mais avant la centrifugation ne va pas affecter la procédure.

Remarque : Le retrait incomplet du surnageant va inhiber la lyse et diluer le lysat, et va par conséquent affecter les conditions nécessaires à la liaison de l'ARN à la membrane PAXgene.

4. Ajouter 350 µl de Buffer BR1 et passer au vortex jusqu'à dissolution visuelle du culot.
5. Introduire l'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml avec une pipette. Ajouter 300 µl de Buffer BR2 et 40 µl de protéinase K. Mélanger en passant au vortex pendant 5 secondes et incubé pendant 10 minutes à 55 °C à l'aide d'un agitateur-incubateur à 400–1 400 tr/mn. Après incubation, régler la température de l'agitateur-incubateur sur 65 °C (pour l'étape 20).

Remarque : Ne pas mélanger le Buffer BR2 et la protéinase K ensemble avant de les ajouter à l'échantillon.

6. Introduire le lysat avec une pipette directement dans une colonne de centrifugation PAXgene Shredder (lilas) placée dans un tube de traitement de 2 ml et centrifuger pendant 3 minutes à vitesse maximale (mais sans dépasser 20 000 x g).

Remarque : Introduire le lysat avec précaution au moyen d'une pipette dans la colonne de centrifugation et vérifier visuellement que le lysat est entièrement transféré dans la colonne de centrifugation.

Afin d'empêcher que les colonnes et tubes soient endommagés, ne pas dépasser les 20 000 x g.

Remarque : Certains échantillons peuvent traverser la colonne de centrifugation PAXgene Shredder sans centrifugation. Ceci est dû à la faible viscosité de certains échantillons et ne doit pas être considéré comme une indication que le produit ne fonctionne pas.

7. Transférer la totalité du surnageant de la fraction ayant traversé la colonne dans un nouveau tube de microcentrifugation de 1,5 ml sans remuer le culot présent dans le tube de traitement.
8. Ajouter 350 µl d'éthanol (96–100 %, catégorie de pureté p.a.). Mélanger au vortex et centrifuger brièvement (1 à 2 secondes à 500–1 000 x g) pour enlever les gouttes présentes à l'intérieur du couvercle du tube.

Remarque : La durée de la centrifugation ne doit pas dépasser 1 à 2 secondes, car dans le cas contraire un culot d'acides nucléiques pourrait se former, ce qui réduirait le rendement de l'ARN total.

9. Introduire 700 µl d'échantillon avec une pipette dans la colonne de centrifugation PAXgene RNA (rouge) placée dans un tube de traitement de 2 ml et centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Placer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube de traitement de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement contenant la solution ayant traversé la colonne.

10. Introduire le reste de l'échantillon avec une pipette dans la colonne de centrifugation PAXgene RNA et centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Placer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube de traitement de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement contenant la solution ayant traversé la colonne.

Remarque : Introduire l'échantillon avec précaution au moyen d'une pipette dans la colonne de centrifugation et vérifier visuellement que l'échantillon est entièrement transféré dans la colonne de centrifugation.

11. Introduire 350 µl de Buffer BR3 avec une pipette dans la colonne de centrifugation PAXgene RNA. Centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Placer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube de traitement de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement contenant la solution ayant traversé la colonne.

12. Ajouter 10 µl de solution mère de DNase I à 70 µl de Buffer RDD dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml. Mélanger en donnant de petits coups sur le tube avec précaution et centrifuger brièvement pour recueillir le liquide résiduel présent sur les côtés du tube.

En cas de traitement, par exemple, de 10 échantillons, ajouter 100 µl de solution mère de DNase I à 700 µl de Buffer RDD. Utiliser les tubes de microcentrifugation de 1,5 ml fournis avec la trousse.

Remarque : La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. Le mélange doit uniquement être effectué en donnant délicatement de petits coups sur le tube. Ne pas passer au vortex.

13. Introduire le mélange d'incubation DNase I (80 µl) avec une pipette directement sur la membrane de la colonne de centrifugation PAXgene RNA et placer le tout sur la paillasse (20 à 30 °C) pendant 15 minutes.

Remarque : Veiller à ce que le mélange d'incubation DNase I soit placé directement sur la membrane. La digestion de la DNase ne sera pas complète si une partie du mélange est appliquée sur les parois ou sur le joint torique de la colonne de centrifugation et y reste.

14. Introduire 350 µl de Buffer BR3 avec une pipette dans la colonne de centrifugation PAXgene RNA et centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Placer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube de traitement de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement contenant la solution ayant traversé la colonne.

15. Introduire 500 µl de Buffer BR4 avec une pipette dans la colonne de centrifugation PAXgene RNA et centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g. Placer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube de traitement de 2 ml et jeter l'ancien tube de traitement contenant la solution ayant traversé la colonne.

Remarque : Le Buffer BR4 est fourni sous forme de concentré. Veiller à ce que l'éthanol soit ajouté au Buffer BR4 avant utilisation (voir « À faire avant de démarrer », page 55).

16. Introduire à nouveau 500 µl de Buffer BR4 dans la colonne de centrifugation PAXgene RNA. Centrifuger pendant 3 minutes entre 8 000 et 20 000 x g.

17. Jeter le tube de traitement contenant la solution ayant traversé la colonne et placer la colonne de centrifugation PAXgene RNA dans un nouveau tube de traitement de 2 ml. Centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g.

18. Jeter le tube de traitement contenant la solution ayant traversé la colonne. Placer la colonne de centrifugation PAXgene RNA dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml et pipeter 40 µl de Buffer BR5 directement sur la membrane de la colonne de centrifugation PAXgene RNA. Centrifuger pendant 1 minute entre 8 000 et 20 000 x g afin d'éluer l'ARN.

Il est important de mouiller la totalité de la colonne avec le tampon Buffer BR5 afin de maximiser l'efficacité de l'élution.

19. Répéter l'étape d'élution (étape 18) tel que décrit, en utilisant 40 µl de Buffer BR5 et le même tube de microcentrifugation.

20. Incuber l'éluat pendant 5 minutes à 65 °C dans l'agitateur-incubateur (de l'étape 5) sans agiter. Après incubation, refroidir immédiatement sur de la glace.

Cette incubation à 65 °C dénature l'ARN pour les applications en aval. Ne pas dépasser le temps d'incubation ou la température indiqués.

21. Si les échantillons d'ARN ne sont pas utilisés immédiatement, stocker à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Étant donné que l'ARN reste dénaturé après plusieurs cycles de congélation et décongélation, il n'est pas nécessaire de répéter l'incubation à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. En cas d'utilisation des échantillons d'ARN dans un dosage diagnostique, suivre les instructions fournies par le fabricant.

Pour une quantification exacte de l'ARN par absorbance à 260 nm , nous vous recommandons de diluer les échantillons avec du Tris-HCl à 10 mM , à $\text{pH } 7,5^*$. La dilution de l'échantillon dans de l'eau sans RNases peut produire de faibles valeurs erronées.

Tarer le spectrophotomètre à l'aide d'un blanc constitué de la même proportion de Buffer BR5 et de tampon Tris-HCl que celle utilisée dans les échantillons à mesurer. Le Buffer BR5 a une absorbance élevée à 220 nm , ce qui peut conduire à des niveaux d'absorbance de fond élevés si le spectrophotomètre n'est pas correctement taré.

Remarque : Pour la quantification dans le tampon Tris-HCl, utiliser la relation $A_{260} = 1 \Rightarrow 44\text{ }\mu\text{g/ml}$. Voir l'Annexe B, page 74.

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

Protocole : Purification automatisée de l'ARN total à partir de sang total humain recueilli dans des PAXgene Blood RNA Tubes

Points importants avant le démarrage

- Vérifier que le carton de la trousse est intacte et en bon état, et qu'aucun tampon n'a fui. Ne pas utiliser la trousse si elle est endommagée.
- Lors de l'utilisation d'une pipette, veiller à ce qu'elle soit réglée sur le bon volume et que le liquide soit aspiré et relâché délicatement et entièrement.
- Afin d'éviter de transférer des échantillons dans le mauvais tube ou les mauvais consommables en plastique, veiller à ce que les tubes de microcentrifugation et les adaptateurs de rotor soient correctement étiquetés au marqueur indélébile. Étiqueter le couvercle et le corps de chaque tube de microcentrifugation, le corps de chaque tube de traitement et la paroi extérieure de chaque adaptateur de rotor.
- Le fait de renverser des échantillons ou des tampons au cours de la procédure peut réduire le rendement et la pureté de l'ARN.
- Sauf indication contraire, toutes les étapes de ce protocole, étapes de centrifugation comprises, doivent être effectuées à température ambiante (entre 15 et 25 °C).

En raison de la sensibilité des technologies d'amplification des acides nucléiques, les précautions suivantes sont nécessaires lors de la manipulation des échantillons pour éviter la contamination croisée :

- Introduire l'échantillon dans le tube de traitement avec une pipette, dans le fond du tube sans mouiller le pourtour du tube.

- Changer systématiquement les embouts de pipette entre les transferts de liquides. Utiliser des embouts de pipette équipés de dispositifs anti-aérosols.
- Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation avec l'embout de pipette.
- Après le passage au vortex ou le chauffage d'un tube de microcentrifugation, le centrifuger brièvement afin de retirer les gouttes présentes à l'intérieur du couvercle.
- Porter des gants durant toute la procédure. En cas de contact entre l'échantillon et les gants, changer de gants immédiatement.

À faire avant de démarrer

- Le sang doit être recueilli dans les PAXgene Blood RNA Tubes conformément aux instructions énoncées dans le *Manuel du PAXgene Blood RNA Tube*. Au besoin, consultez l'Annexe C (page 76) pour connaître les recommandations sur la manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes.
- Veiller à ce que les PAXgene Blood RNA Tubes soient incubés pendant au moins 2 heures à température ambiante après le prélèvement sanguin afin d'assurer la lyse complète des cellules sanguines. L'incubation du PAXgene Blood RNA Tube toute une nuit peut augmenter le rendement. Si le PAXgene Blood RNA Tube a été conservé entre 2 et 8 °C, -20 °C ou -70 °C après le prélèvement sanguin, le laisser d'abord revenir à température ambiante, puis le conserver à température ambiante pendant 2 heures avant de commencer la procédure.
- Lire l'information sur la sécurité à la page 9.
- Lire « Remarques importantes », page 38.
- Lisez les consignes relatives à la manipulation d'ARN (Annexe A, page 73).
- Lisez le Manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube et toutes les informations supplémentaires fournies avec le QIAcube, en prêtant une attention particulière à l'information sur la sécurité.
- Veillez à ce que les dispositifs et instruments, comme les pipettes et les instruments QIAcube, aient bien été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

- Le tampon BR2 peut former un précipité lors de son stockage. Au besoin, réchauffer à 37 °C pour le dissoudre.
- Le Buffer BR4 est fourni sous forme de concentré. Avant d'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, catégorie de pureté p.a.) comme indiqué sur le flacon pour obtenir une solution propre à l'utilisation.
- En cas d'utilisation de l'ensemble de DNase sans RNases pour la première fois, préparer la solution mère de DNase I. Dissolvez la DNase I solide (1 500 unités Kunitz*) dans 550 µl de l'eau sans RNases fournie avec l'ensemble. Veillez à ce qu'aucune DNase I ne soit perdue lors de l'ouverture du flacon. Ne pas passer au vortex la DNase I reconstituée, car la DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. Le mélange doit uniquement être effectué en retournant délicatement le flacon.
- Les données actuelles montrent que la DNase I peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 6 semaines. Pour la conservation de la DNase I sur la durée, retirer la solution mère du flacon en verre, la diviser en parties aliquotes à usage unique (utiliser les tubes de microcentrifugation de 1,5 ml fournis avec la trousse; il y en a suffisamment pour 5 aliquotes) et la conserver à -20 °C pendant un maximum de 9 mois. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 6 semaines. Ne pas recongeler les aliquotes après décongélation.
- Lors de la reconstitution et de l'aliquotage de la DNase I, veillez à suivre les consignes relatives à la manipulation de l'ARN (Annexe A, page 73).
- Installez le bon adaptateur d'agitateur (inclus avec les instruments QIAcube; utilisez l'adaptateur pour des tubes à verrouillage de sécurité de 2 ml, marqué d'un « 2 ») puis placez le portoir à agitateur sur l'adaptateur.
- Vérifier le tiroir à déchets et le vider si cela est nécessaire.
- Installer les protocoles si cela n'a pas déjà été fait pour les cycles précédents. Installer les protocoles « PAXgene Blood RNA Part A » et « PAXgene Blood RNA Part B ». Lire « Installation des protocoles sur les instruments QIAcube », page 41.

* Les unités Kunitz sont les unités couramment utilisées pour mesurer la DNase I, et sont définies comme la quantité de DNase I capable de causer une augmentation de A_{260} de 0,001 par minute et par millilitre à 25 °C, pH 5,0, avec de l'ADN hautement polymérisé comme substrat (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 et 363).

Procédure

1. Fermez le capot de l'instrument QIAcube et mettez l'instrument QIAcube sous tension à l'aide de l'interrupteur marche/arrêt (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 15, page 39; QIAcube : voir la Figure 16, page 40).

Un signal sonore est émis et l'écran de démarrage s'affiche. Les instruments effectuent automatiquement des tests d'initialisation.

2. Ouvrez le capot de l'instrument QIAcube et chargez les réactifs nécessaires ainsi que le matériel en plastique dans l'instrument QIAcube. Lire « Chargement des instruments QIAcube », page 42.

Pour gagner du temps, le chargement peut être effectué au cours de l'une ou l'autre des étapes de centrifugation de 10 minutes suivantes (étapes 3 et 5).

3. Centrifuger le PAXgene Blood RNA Tube pendant 10 minutes à 3 000–5 000 x g au moyen d'un rotor horizontal.

Remarque : Veiller à ce que l'échantillon de sang soit incubé dans le PAXgene Blood RNA Tube pendant au moins 2 heures à température ambiante (15 à 25 °C) afin de parvenir à une lyse complète des cellules sanguines.

Remarque : Le rotor doit contenir des adaptateurs pour tubes à fond rond. Si d'autres types d'adaptateur de tube sont utilisés, les tubes peuvent se briser pendant la centrifugation.

4. Retirer le surnageant par décantation ou pipetage. Ajoutez 4 ml d'eau sans RNases au culot et fermez le tube au moyen d'un bouchon sécurité BD Hemogard secondaire neuf (fourni avec la trousse).

Si le surnageant est décanté, prendre soin de ne pas agiter le culot, et sécher le pourtour du tube avec une serviette en papier propre.

5. Passer au vortex jusqu'à ce que le culot soit complètement dissous et centrifuger pendant 10 minutes à 3 000–5 000 x g au moyen d'un rotor horizontal. Retirer et jeter l'ensemble du surnageant.

La présence de petits débris restant dans le surnageant après le passage au vortex mais avant la centrifugation ne va pas affecter la procédure.

Remarque : Le retrait incomplet du surnageant va inhiber la lyse et diluer le lysat, et va par conséquent affecter les conditions nécessaires à la liaison de l'ARN à la membrane PAXgene.

6. Ajouter 350 µl de Buffer BR1 et passer au vortex jusqu'à dissolution visuelle du culot.

7. Introduire l'échantillon dans un tube de traitement de 2 ml avec une pipette.

Remarque : Utiliser les tubes de traitement de 2 ml fournis dans la trousse PAXgene Blood RNA Kit.

8. Chargez les tubes de traitement de 2 ml ouverts contenant l'échantillon dans l'agitateur de l'instrument QIAcube (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 19, page 45; QIAcube : voir la Figure 20, page 46). Les positions d'échantillon sont numérotées pour faciliter le chargement. Insérez les bouchons du portoir à agitateur (fournis avec les instruments QIAcube) dans les fentes situées à l'extrémité du portoir à agitateur à côté de chaque tube de traitement. Ceci permet la détection des échantillons durant la vérification du chargement.

Remarque : veillez à ce que le bon adaptateur d'agitateur (adaptateur d'agitateur pour tubes à verrouillage de sécurité de 2 ml marqué d'un « 2 », fourni avec les instruments QIAcube) soit installé.

Remarque : Si moins de 12 échantillons sont traités, veillez à bien charger le portoir à agitateur comme indiqué sur la Figure 24, page 51. Il n'est pas possible de traiter un (1) seul échantillon ou 11 échantillons. Les numéros de position du portoir à agitateur correspondent à celles de la centrifugeuse.

9. Fermez le capot de l'instrument QIAcube (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 15, page 39; QIAcube : voir la Figure 16, page 40)

10. Sélectionner le protocole « PAXgene Blood RNA Part A » et lancer le protocole.

Suivez les consignes affichées sur l'écran tactile de l'instrument QIAcube.

Remarque : Veillez à ce que les deux parties du programme (Part A et Part B) soient installées sur l'instrument QIAcube (voir « Installation des protocoles sur les instruments QIAcube », page 41).

Remarque : Les instruments QIAcube vont effectuer des vérifications de chargement pour les échantillons, pointes, adaptateurs de rotor et flacons de réactif.

11. Au terme du protocole « PAXgene Blood RNA Part A », ouvrez le capot de l'instrument QIAcube (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 15, page 39; QIAcube : voir la Figure 16, page 40). Retirer et jeter les colonnes de centrifugation PAXgene RNA des adaptateurs de rotor et les tubes de traitement vides de l'agitateur.

Remarque : Au cours du cycle, les colonnes de centrifugation sont transférées de la position d'adaptateur de rotor 1 (position du couvercle L1) à la position d'adaptateur de rotor 3 (position du couvercle L2) par l'instrument (voir la Figure 22, page 49).

12. Fermez les couvercles de tous les tubes de microcentrifugation de 1,5 ml contenant l'ARN purifié dans les adaptateurs de rotor (position 3, position du couvercle L3, voir la Figure 22, page 49). Transférez les tubes de microcentrifugation de 1,5 ml dans l'adaptateur d'agitateur de l'instrument QIAcube (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 19, page 45; QIAcube : voir la Figure 20, page 46).

13. Fermez le capot de l'instrument QIAcube (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 15, page 39; QIAcube : voir la Figure 16, page 40).

14. Sélectionner le protocole « PAXgene Blood RNA Part B » et lancer le protocole.

Suivez les consignes affichées sur l'écran tactile de l'instrument QIAcube.

Remarque : Ce programme incube les échantillons à 65 °C et dénature l'ARN pour les applications en aval. Même si les applications en aval comprennent une étape de dénaturation thermique, ne pas omettre cette étape. Une dénaturation suffisante de l'ARN est essentielle pour garantir une efficacité maximale dans les applications en aval.

15. Au terme du programme « PAXgene Blood RNA Part B », ouvrez le capot de l'instrument QIAcube (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 15, page 39; QIAcube : voir la Figure 16, page 40). Placer immédiatement les tubes de microcentrifugation contenant l'ARN purifié sur de la glace.



AVERTISSEMENT : Surface brûlante. L'agitateur va atteindre des températures pouvant monter jusqu'à 70 °C. Évitez de la toucher lorsqu'elle est chaude.

Remarque : ne laissez pas l'ARN purifié dans l'instrument QIAcube. Comme les échantillons ne sont pas refroidis, l'ARN purifié peut se trouver dégradé. Il n'est par conséquent pas recommandé de laisser les cycles de préparation d'échantillons toute la nuit sans surveillance.

16. Si les échantillons d'ARN ne sont pas utilisés immédiatement, stocker à -20 °C ou à -70 °C.

Étant donné que l'ARN reste dénaturé après plusieurs cycles de congélation et décongélation, il n'est pas nécessaire de répéter le protocole d'incubation thermique (« PAXgene Blood RNA Part B »). En cas d'utilisation d'échantillons d'ARN dans un dosage diagnostique, suivre les instructions fournies par le fabricant.

Pour une quantification exacte de l'ARN par absorbance à 260 nm, nous vous recommandons de diluer les échantillons dans du Tris-HCl à 10 mM, à pH 7,5*. La dilution de l'échantillon dans de l'eau sans RNases peut produire de faibles valeurs erronées.

Tarer le spectrophotomètre à l'aide d'un blanc constitué de la même proportion de Buffer BR5 et de tampon Tris-HCl que celle utilisée dans les échantillons à mesurer. Le Buffer BR5 a une absorbance élevée à 220 nm, ce qui peut conduire à des niveaux d'absorbance de fond élevés si le spectrophotomètre n'est pas correctement taré.

Remarque : Pour la quantification dans le tampon Tris-HCl, utiliser la relation

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$. Voir l'Annexe B, page 74.

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

17. Retirez le portoir à flacons de réactifs de la platine de l'instrument QIAcube (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 19, page 45; QIAcube : voir la Figure 20, page 46) puis fermez tous les flacons avec leurs couvercles correctement étiquetés. Le tampon dans les flacons se conserve à température ambiante (15–25 °C) pendant un maximum de 3 mois. Retirez et jetez les réactifs restants dans les tubes de traitement dans les emplacements pour tubes de microcentrifugation de l'instrument QIAcube. Retirez et jetez les adaptateurs de rotor présents dans la centrifugeuse. Videz le tiroir à déchets de l'instrument QIAcube (QIAcube Connect MDx : voir la Figure 15, page 39; QIAcube : voir la Figure 16, page 40). Fermez le capot de l'instrument QIAcube puis mettez l'instrument hors tension à l'aide de l'interrupteur marche/arrêt.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour plus d'informations, consultez 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 informations et les protocoles mentionnés dans ce manuel ou sur les échantillons et les technologies de dosage (pour connaître les coordonnées, reportez-vous à la dernière page ou au site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

ARN dégradé

Contamination par des RNases

Veillez à ne pas introduire de RNases dans les réactifs pendant la procédure ou les manipulations ultérieures (voir l'Annexe A, page 73).

Faible rendement de l'ARN

a) Moins de 2,5 ml de sang recueilli dans le PAXgene Blood RNA Tube

Veillez à ce que 2,5 ml de sang soit recueilli dans le PAXgene Blood RNA Tube (voir *Manuel du PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Concentration d'ARN mesurée dans l'eau

La concentration de l'ARN doit être mesurée dans du Tris-HCl à 10 mM, à pH 7,5* pour que la quantification soit exacte (voir l'Annexe B, page 74).

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

Commentaires et suggestions

- | | | |
|----|--|---|
| c) | Débris cellulaires transférés dans la colonne de centrifugation PAXgene RNA aux étapes 9 et 10 du protocole manuel | Éviter de transférer de grandes particules lors du pipetage du surnageant à l'étape 7 du protocole manuel (le transfert de petits débris ne va pas affecter la procédure). |
| d) | Surnageant pas retiré complètement à l'étape 3 | Veiller à retirer la totalité du surnageant. Si le surnageant est décanté, retirer les gouttes présentes sur le pourtour du PAXgene Blood RNA Tube en épongeant par petites touches avec une serviette en papier. Prendre les précautions nécessaires pour prévenir la contamination croisée. |
| e) | Après avoir été recueilli dans le PAXgene Blood RNA Tube, le sang a été incubé pendant moins de 2 heures | Incuber le sang dans le PAXgene Blood RNA Tube pendant au moins 2 heures après le prélèvement. |

Faible valeur A_{260}/A_{280}

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Eau utilisée pour diluer l'ARN pour la mesure de A_{260}/A_{280} | Utilisez du Tris-HCl à 10 mM, à pH 7,5 pour diluer l'ARN avant de mesurer la pureté* (voir l'Annexe B, page 74). |
| b) | Spectrophotomètre pas correctement taré | Tarer le spectrophotomètre à l'aide d'un blanc constitué de la même proportion de Buffer BR5 et de tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,5 que celle utilisée dans les échantillons à mesurer. Le Buffer BR5 a une absorbance élevée à 220 nm, ce qui peut conduire à des niveaux d'absorbance de fond élevés si le spectrophotomètre n'est pas correctement taré. |

* Wilfinger, W.W., Mackey, M. et Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

Commentaires et suggestions

Dysfonctionnement de l'instrument

Les instruments QIAcube n'ont pas fonctionné correctement

Lisez le Manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube concerné, en faisant tout particulièrement attention à la section Dépannage. Veillez à assurer un bon entretien de l'instrument QIAcube, conformément à ce qui est indiqué dans le manuel d'utilisation.

Annexe A : Remarques générales sur la manipulation d'ARN

Manipulation d'ARN

Les ribonucléases (RNases) sont des enzymes très stables et très actives qui n'ont généralement pas besoin de cofacteurs pour fonctionner. Étant donné que les RNases sont difficiles à inactiver et que même d'infimes quantités suffisent à dégrader l'ARN, ne pas utiliser de vaisselle en plastique ou en verre sans d'abord éliminer toute contamination éventuelle par des RNases. Il est important de prendre des précautions particulières pour éviter d'introduire par inadvertance des RNases dans l'échantillon d'ARN pendant ou après la purification. Afin de créer et de préserver un environnement exempt de RNases, des précautions doivent être prises pendant le prétraitement et l'utilisation de récipients et de solutions jetables et non jetables lors de toute manipulation d'ARN.

Manipulation générale

Une technique aseptique microbiologique appropriée doit être utilisée systématiquement lors de la manipulation d'ARN. Les mains et les particules de poussière transportent des bactéries et des moisissures, et ce sont les sources de contamination par des RNases les plus courantes. Toujours porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation des réactifs et des échantillons d'ARN afin d'empêcher la contamination par des RNases provenant de la surface de la peau ou de matériel de laboratoire poussiéreux. Changer de gants fréquemment et garder les tubes fermés autant que possible. Garder l'ARN purifié sur de la glace lors du pipetage d'aliquotes pour des applications en aval.

Les protocoles de retrait de la contamination par des RNases sur la vaisselle en verre et les solutions sont indiqués dans les guides de biologie moléculaire généraux, comme Sambrook, J. et Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Annexe B : Quantification et détermination de la qualité de l'ARN total

Quantification de l'ARN

La concentration de l'ARN doit être déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm (A_{260}) dans un spectrophotomètre. Afin de garantir leur pertinence, les mesures doivent être dans la plage linéaire du spectrophotomètre. Une absorbance d'une unité à 260 nm correspond à 44 µg d'ARN par ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Cette relation n'est valable que pour les mesures effectuées dans du Tris-HCl 10 mM, pH 7,5*. Il est par conséquent nécessaire de diluer l'échantillon d'ARN, et cette dilution doit être faite dans du Tris-HCl 10 mM. Comme expliqué ci-dessous (voir « Pureté de l'ARN », page 75), le rapport entre la valeur d'absorbance à 260 et celle à 280 nm donne une estimation de la pureté de l'ARN. Lors de la mesure des échantillons d'ARN, veiller à ce que les cuvettes soient exemptes de RNases. Tarer le spectrophotomètre à l'aide d'un blanc constitué de la même proportion de Buffer BR5 et de tampon Tris-HCl que celle utilisée dans les échantillons à mesurer. Le Buffer BR5 a une absorbance élevée à 220 nm, ce qui peut conduire à des niveaux d'absorbance de fond élevés si le spectrophotomètre n'est pas correctement taré. Un exemple de calcul impliqué dans la quantification de l'ARN est illustré ci-dessous.

Volume de l'échantillon d'ARN	=	80 µl
Dilution (1/15)	=	10 µl d'échantillon d'ARN + 140 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5
Mesurer l'absorbance de l'échantillon dilué dans une cuvette (sans RNases).		
A_{260}	=	0,3
Concentration de l'échantillon	=	$44 \times A_{260} \times \text{facteur de dilution}$
	=	$44 \times 0,3 \times 15$
	=	198 µg/ml

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

$$\begin{aligned} \text{Rendement total} &= \text{concentration} \times \text{volume de l'échantillon en millilitres} \\ &= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml} \\ &= 15,8 \mu\text{g d'ARN} \end{aligned}$$

Pureté de l'ARN

Le rapport entre les mesures à 260 nm et 280 nm (A_{260}/A_{280}) fournit une estimation de la pureté de l'ARN par rapport aux contaminants qui absorbent dans le rayonnement UV, comme les protéines. Cependant, le rapport A_{260}/A_{280} est considérablement influencé par le pH. Des pH faibles conduisent à des rapports A_{260}/A_{280} plus bas et réduisent la sensibilité vis-à-vis de la contamination par les protéines*. Pour des valeurs exactes, nous recommandons de mesurer l'absorbance dans du Tris-HCl 10 mM, à pH 7,5. L'ARN pur présente un rapport A_{260}/A_{280} de 1,8–2,2 dans le Tris-HCl 10 mM, à pH 7,5. Tarer le spectrophotomètre à l'aide d'un blanc constitué de la même proportion de Buffer BR5 et de tampon Tris-HCl que celle utilisée dans les échantillons à mesurer. Le Buffer BR5 a une absorbance élevée à 220 nm, ce qui peut conduire à des niveaux d'absorbance de fond élevés si le spectrophotomètre n'est pas correctement taré.

* Wilfinger, W.W., Mackey, M. et Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

Annexe C : Manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes

Les recommandations suivantes de BD peuvent s'avérer utiles lors de la manipulation des PAXgene Blood RNA Tubes. Voir le *Manuel d'utilisation du PAXgene Blood RNA Tube* pour plus d'information de sécurité sur les PAXgene Blood RNA Tubes.

Instructions sur le retrait du bouchon sécurité BD Hemogard

1. Tenir le PAXgene Blood RNA Tube d'une main, en plaçant le pouce sous le bouchon sécurité BD Hemogard (pour plus de stabilité, placer le bras sur une surface solide). De l'autre main, tourner le bouchon sécurité BD Hemogard tout en appuyant simultanément vers le haut avec le pouce de l'autre main **SEULEMENT LE TEMPS DE DESSERRER LE BOUCHON**.
2. Déplacer le pouce avant de soulever le bouchon sécurité. **NE PAS** utiliser le pouce pour retirer le bouchon sécurité du PAXgene Blood RNA Tube. Mise en garde : Si le PAXgene Blood RNA Tube contient du sang, il existe un risque d'exposition. Afin d'éviter toute blessure durant le retrait du bouchon sécurité, il est important que le pouce utilisé pour pousser le bouchon sécurité vers le haut cesse d'être en contact avec le PAXgene Blood RNA Tube dès que le bouchon sécurité BD Hemogard est desserré.
3. Retirer le bouchon sécurité du PAXgene Blood RNA Tube. Dans l'éventualité où la protection en plastique se sépare de la partie en caoutchouc, **NE PAS RÉASSEMBLER** les deux éléments. Retirer le bouchon en caoutchouc du PAXgene Blood RNA Tube avec précaution.

Instructions sur l'insertion du bouchon sécurité BD Hemogard secondaire

1. Replacer le bouchon sécurité sur le PAXgene Blood RNA Tube.
2. Tourner et enfoncer fermement jusqu'à ce que le bouchon en caoutchouc soit réintroduit complètement. La complète réinsertion du bouchon en caoutchouc est nécessaire pour garantir que le bouchon sécurité reste bien sur le PAXgene Blood RNA Tube lors de la manipulation.

Pour commander

Produit	Table des matières	N° de réf.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, tubes de traitement, DNase I sans RNases, Réactifs et tampons sans RNases. À utiliser en conjonction avec les PAXgene Blood RNA Tubes	762164
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tubes de prélèvement sanguin	762165
Produits associés pouvant être commandés auprès de QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	L'ensemble comprend : portoirs à flacons de réactifs (3); bandes d'étiquetage des portoirs (8); embouts filtrants de 200 µl (1024); embouts filtrants de 1 000 µl (1024); embouts filtrants de 1 000 µl, large diamètre (1024); flacons de réactifs de 30 ml (18); adaptateurs de rotor (240); support d'adaptateur de rotor	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Stérile, Embouts filtrants jetables stériles, empilés	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Flacons de réactif (30 ml) avec bouchons; lot de 6; à utiliser avec le portoir à flacons de réactifs des instruments QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Pour 240 préparations : 240 adaptateurs de rotor à usage unique; à utiliser avec les instruments QIAcube	990394

Produit	Table des matières	N° de réf.
Reagent Bottle Rack	Portoir pouvant accueillir 6 flacons de réactif de 30 ml sur la platine des instruments QIAcube	990390
Rotor Adapter Holder	Support pour 12 adaptateurs de rotor à usage unique; à utiliser avec les instruments QIAcube	990392
Produits associés pouvant être commandés auprès de BD*		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set : 21G, aiguille de 0,75 pouces (0,8 x 19 mm), tuyau de 12 pouces (305 mm) avec adaptateur luer; 50 par boîte, 200 par caisse	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Caisse uniquement pour les diamètres 13 et 16 mm; 1 000/caisse	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	Prélèvement 4,0 ml 13 x 75 mm avec bouchon BD Hemogard rouge et étiquette en papier; 100/boîte, 1 000/caisse	368975

* Ces accessoires de prélèvement sanguin représentent les produits types qui peuvent être utilisés avec les PAXgene Blood RNA Tubes. Pour en savoir plus sur ces accessoires, notamment comment les commander, rendez-vous sur www.preanalytix.com.

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 PreAnalytiX ou QIAGEN correspondant. Les manuels des trousse et les manuels d'utilisation PreAnalytiX et QIAGEN sont disponibles sur www.preanalytix.com et www.qiagen.com ou peuvent être demandés aux services techniques QIAGEN ou au distributeur local.

Historique des révisions du manuel

Document et révision	Modifications	Date
HB-0181-003, R2	Modifications apportées pour se conformer aux réglementations du SGH dans tout le document.	Juin 2015
HB-0181-004, R3	Nouveau modèle; révisions apportées au protocole automatisé et aux données de performance; mise à jour de l'information sur la sécurité; modifications apportées aux détails sur l'instrument.	Octobre 2019
HB-0181-005, R4	Ajout du QIAcube Connect MDx au protocole automatisé; langue actualisée pour inclure les références au QIAcube Connect MDx; numéros des tableaux, pages et figures actualisés.	Décembre 2020

PreAnalytiX Worldwide

Les produits PreAnalytiX sont distribués par les entreprises QIAGEN et BD

QIAGEN – Service client

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

BD – Service client

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: bd_anz@bd.com

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: customercare.at@bd.com

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: orders.be@bd.com

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: consultoria_vacutainer@bd.com

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

E-mail: customer.service.canada@bd.com

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: info_bulgaria@bd.com

Czech Republic orders: info_czech@bd.com

Croatia orders: info_croatia@bd.com

Hungary orders: info_hungary@bd.com

Poland orders: info_poland@bd.com

Romania orders: info_romania@bd.com

Southeast Europe orders: info_balkan@bd.com

Serbia orders: info_serbia@bd.com

Slovakia orders: info_slovakia@bd.com

Slovenia orders: info_slovenia@bd.com

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: ordre.dk@bd.com

Technical support: bddenmark@bd.com

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: tilaukset.fi@bd.com

E-mail: bdsuomi@bd.com

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: serviceclientbdf@bd.com

Orders: commandesfr@bd.com

Technical support: vacutainerfr@bd.com

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: customercare.de@bd.com

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: bd_india@bd.com

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: contactus@aquilantscientific.ie

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: cs@lapidot.com

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa

Orders: 971.45.592.555

Fax: 971.45.592.599

E-mail: EMA_PAS@bd.com

The Netherlands

Orders: 31.20.582.94.20

Fax: 31.20.582.94.21

Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand

Orders: 0800.572.468

Fax: 0800.572.469

E-mail: nz_customerservice@bd.com

Norway

Customer Support: 64.00.99.00

E-mail: bdnorge@bd.com

Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia

E-mail: PAS.SEA@bd.com

Indonesia orders: 622.1577.1920

Malaysia orders: 603.2093.8788

Philippines orders: 63.2478.8881

Singapore orders: 65.6861.0633

Thailand orders: 662.646.1800

Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea

Orders: 02.3404.3706

Fax: 02.3404.3785

Technical: 02.3404.3706

Technical support: Korea_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra

Orders: 34.91.848.8174

Customer support: 34.902.27.17.27

Fax: 34.91.848.8115

E-mail: info.spain@bd.com

Sweden

Orders: 46.8.775.51.00

Fax: 46.8.645.08.08

Orders: order.se@bd.com

Technical support: bdsweden@bd.com

Switzerland

Orders: 41.61.485.22.24

Fax: 41.61.485.22.00

E-mail: infoch@bd.com

UK

Orders: 0800.917.8776

E-mail: bduk_customerservice@bd.com

USA

Customer support: 800.631.0174

E-mail: productcomplaints@bd.com

Remarques :

Remarques :

Remarques :



HB-0181-005 1122167FRCA BD-11630 12/2020
Produit allemand