

Août 2017

Instructions d'utilisation (Manuel) du kit RNeasy[®] DSP FFPE



50

Version 1
Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

IVD Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro



REF 73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne

R1 **MAT** 1106945FR

Contenu

Utilisation prévue	3
Résumé et explications	3
Principes de la procédure	4
Matériel fourni.....	6
Contenu du kit.....	6
Matériel nécessaire mais non fourni	7
Avertissements et précautions	8
Stockage et manipulation des réactifs.....	10
Composants du kit.....	10
Remarques importantes	11
Préparation des tampons	12
Procédure	14
Protocole : purification d'ARN total à partir de coupes de tissu FFPE	15
Contrôle de la qualité.....	19
Limitations.....	19
Symboles.....	20
Guide de résolution des principaux problèmes rencontrés	22
Annexe : remarques générales sur la manipulation des ARN	24
Pour commander	26

Utilisation prévue

Le kit RNeasy DSP FFPE est un système destiné à être utilisé dans le cadre de la purification d'ARN total issu de tissus fixés dans le formol et incorporés dans la paraffine (formalin-fixed, paraffin embedded, FFPE).

Ce produit est destiné aux professionnels, tels que les techniciens et les médecins, formés aux techniques de la biologie moléculaire.

Il utilise un protocole fondé sur une version optimisée de colonne de centrifugation en silice et inclut l'élimination par voie enzymatique de l'ADN résiduel.

Le kit RNeasy DSP FFPE est destiné à être utilisé dans le cadre de diagnostics in vitro.

Résumé et explications

Le kit RNeasy DSP FFPE est expressément conçu pour la purification d'ARN total issu de coupes de tissus fixés dans le formol et incorporés dans la paraffine (FFPE). En isolant des molécules d'ARN dont la structure est supérieure à 70 nucléotides, le kit permet de récupérer des fragments d'ARN utilisables dans des applications en aval telles que la RT-PCR.

Les conditions de fixation et d'incrustation entraînent généralement la fragmentation des acides nucléiques dans les échantillons FFPE et leur modification chimique par le formaldéhyde. Le poids moléculaire des acides nucléiques isolés à partir d'échantillons FFPE est donc souvent inférieur au poids moléculaire d'échantillons frais ou congelés. Le degré de fragmentation dépend du type et de l'âge de l'échantillon ainsi que des conditions lors de la fixation, de l'incrustation et du stockage de l'échantillon. Concernant la normalisation des processus de contrôle préalable des tissus FFPE, nous recommandons de procéder conformément à la norme XP CEN/TS 16827-1_2015.

Bien qu'une modification liée au formaldéhyde ne puisse pas être détectée au cours des dosages standard de contrôle de la qualité, par exemple l'électrophorèse sur gel ou l'analyse du laboratoire sur puce, elle interfère fortement avec les analyses enzymatiques.

Même si le kit RNeasy DSP FFPE est optimisé pour annuler autant que possible toute modification liée au formaldéhyde sans accentuer la dégradation de l'ARN, les acides nucléiques purifiés issus d'échantillons FFPE ne devraient pas être utilisés dans des applications en aval nécessitant la pleine longueur d'ARN. Certaines applications ont besoin d'être modifiées pour pouvoir permettre l'utilisation d'ARN fragmenté (par ex. réaliser de petits amplicons pour la RT-PCR). Pour la synthèse d'ADNc, il faut remplacer les amorces oligo-dT par des amorces soit aléatoires soit spécifiques au gène étudié.

Une coloration des coupes FFPE peut également nuire à la qualité de l'ARN et à sa performance dans des applications en aval. Cela est particulièrement vrai dans le cas d'un grand nombre de protocoles de coloration immunohistochimique.

Principes de la procédure

La procédure RNeasy DSP FFPE utilise la technologie RNeasy largement utilisée pour la purification de l'ARN. Des conditions de lyse spécialement optimisées permettent à l'ARN total issu de tissus FFPE d'être purifié de manière efficace. L'étape de digestion par la DNase I permet de se débarrasser de manière efficace des traces de contamination à l'ADN, notamment des molécules extrêmement fragmentées.

Toute la paraffine est d'abord retirée des coupes fraîchement préparées de tissu FFPE en les traitant avec une solution de déparaffinisation. Les échantillons sont ensuite incubés dans un tampon de lyse optimisé qui contient de la protéinase K permettant de libérer l'ARN des coupes. Une courte incubation à une température supérieure supprime partiellement les effets de réticulation du formol sur les acides nucléiques libres, améliorant le rendement et la qualité de l'ARN ainsi que la performance de l'ARN dans des dosages enzymatiques en aval. Cette étape est suivie d'un traitement par la DNase I qui est optimisée pour supprimer l'ADN génomique, notamment les fragments d'ADN de taille très petite qui sont souvent

présents dans les échantillons FFPE après une fixation au formol prolongé et/ou une longue durée de stockage. Le lysat est enfin mélangé au tampon RBC. De l'éthanol est ajouté pour fournir les conditions de fixation adaptées à l'ARN, puis l'échantillon est alors placé dans une colonne de centrifugation RNeasy MinElute dans laquelle l'ARN total se fixe à la membrane permettant l'élimination efficace des contaminants. L'ARN est ensuite élué dans un volume minimum de 14 µl d'eau exempte de RNases.

Procédure RNeasy DSP FFPE

Coupes de tissu FFPE

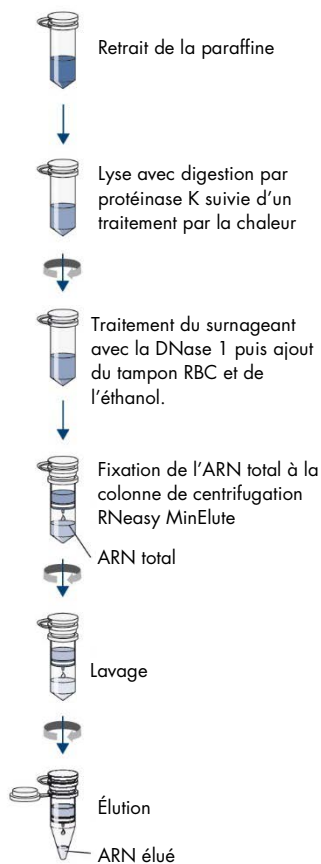


Figure 1. Procédure de purification de l'ARN issu de tissus FFPE à l'aide du kit RNeasy DSP FFPE

Matériel fourni

Contenu du kit

Kit RNeasy DSP FFPE			(50)
N° de référence			73604
Nombre de préparations			50
	Identité	Symboles	Quantité
Centrifugation RNeasy MinElute	RNeasy MinElute® Spin Columns (Colonnes de centrifugation RNeasy MinElute®) (rose) [chacune dans un tube de prélèvement de 2 ml]	COL	50
ET	Elution Tubes (tubes d'éluion) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (tubes de lyse) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (tubes de lavage) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution (solution de déparaffinisation)	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC (Tampon RBC)*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD (Tampon PKD)	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K (Protéinase K)	PROTK	1,25 ml
DN	Nase-Free DNase I (DNase I exempte de RNases) (lyophilisée)	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (Eau exempte de RNases)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer (tampon amplificateur pour DNases)	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE (Tampon RPE) ¹ (concentré)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v1	Manuel du kit RNeasy DSP FFPE		1

*Contient un sel de guanidine. Incompatible avec tout désinfectant contenant de l'eau de Javel. Voir page 8 pour les informations de sécurité.

¹Avant la première utilisation, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100 %, non dénaturé), comme indiqué sur le flacon et décrit page 12, pour obtenir une solution de travail.

Matériel nécessaire mais non fourni

En cas de manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire adéquate, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour plus d'informations, merci de consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Veiller à ce que tous les instruments soient vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

- Embouts de pipettes et pipettes exempts de RNases, stériles
- Microcentrifugeuse (avec rotor pour tubes de 2 ml)
- Agitateur vortex
- 100 % éthanol (ne pas utiliser de l'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que du méthanol ou de la méthyléthylcétone)
- Gants jetables
- Bloc chauffant avec fonction agitateur capable de procéder à une incubation à 56 °C et 80 °C.

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*.

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

En cas de manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire adéquate, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne au format PDF sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

AVERTISSEMENT Risque de blessure personnelle



NE PAS ajouter d'eau de Javel ou des solutions acides directement aux déchets de préparation des échantillons.

Les tampons présents dans le kit RNeasy DSP FFPE contiennent de l'azide de sodium. Si les tampons du kit sont renversés, nettoyer avec un détergent de laboratoire approprié et de l'eau. Si le liquide déversé contient des agents potentiellement infectieux, nettoyer dans un premier temps la zone concernée à l'eau accompagnée d'un détergent de laboratoire, puis à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v).

Les mentions de danger et les conseils de prudence applicables aux composants du kit RNeasy DSP FFPE sont indiqués ci-dessous.

PKD, RPE, RNF, DBB

Contient : azide de sodium. Avertissement ! Peut être nocif en cas d'ingestion. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

DSP



Contient : hexadécane. Danger ! Peut être mortel en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires. L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau. Éliminer le contenu/récipient dans une installation de traitement des déchets agréée. NE PAS faire vomir. EN CAS D'INGESTION : appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Garder sous clef.

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

DNase I



Contient : désoxyribonucléase. Danger ! Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Éliminer le contenu/récipient dans une installation de traitement des déchets agréée. En cas de symptômes respiratoires : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. EN CAS D'INHALATION : s'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Porter un équipement de protection respiratoire.

RBC



Contient : chlorhydrate de guanidine. Avertissement ! Nocif en cas d'ingestion ou par inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. Éliminer le contenu/récipient dans une installation de traitement des déchets agréée. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

DBB



Contient : chlorure de calcium, chlorure d'hydrogène. Avertissement ! Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin. 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. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon. En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Stockage et manipulation des réactifs

La DNase I exempte de RNases et les colonnes de centrifugation RNeasy MinElute doivent être stockées entre 2 et 8 °C, immédiatement après leur réception dans le laboratoire. Les tampons peuvent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C). Dans ces conditions, le kit peut être stocké jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte, sans que ses performances s'en trouvent réduites.

Ne pas utiliser le kit RNeasy DSP FFPE après la date limite d'utilisation.

Composants du kit

Les dates de péremption de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions correctes de conservation, le produit conservera ses performances pendant la période de stabilité, pourvu que les mêmes lots de composants soient utilisés.

Pour un stockage longue durée de la DNase I suite à sa reconstitution, retirer la solution mère du flacon, la diviser en aliquotes à usage unique et stocker entre -15 et -30 °C pendant 9 mois maximum. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C pour une durée maximale de 6 semaines. Ne pas recongeler les aliquotes après la décongélation.

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

Remarques importantes

Échantillons de départ

Les procédures standard de fixation au formol et d'enrobage par la paraffine entraînent toujours une fragmentation et une réticulation significatives des acides nucléiques. Pour limiter l'étendue de la fragmentation et de la réticulation des acides nucléiques, veiller à :

- Utiliser des échantillons de tissu dont l'épaisseur est inférieure à 5 mm afin d'assurer une pénétration totale du formol.
- Fixer les échantillons tissulaires dans du formol neutre tamponné à 4–10 % aussi rapidement que possible après l'ablation chirurgicale
- Utiliser un temps de fixation maximal de 24 heures (des temps de fixation plus longs provoquent une fixation excessive et une fragmentation plus élevée des acides nucléiques, ce qui se traduit par de mauvaises performances lors des dosages en aval)
- Déshydrater entièrement les échantillons avant de procéder à l'enrobage.
- Pour l'enrobage, utiliser une paraffine ayant un point de fusion bas

Les échantillons de départ utilisés pour la purification de l'ARN doivent être des coupes fraîchement préparées de tissu FFPE, chacune ayant une épaisseur maximale de 20 µm. Des coupes plus épaisses risquent d'entraîner une diminution des rendements des acides nucléiques, même après incubation prolongée avec de la protéinase K. Jusqu'à 4 coupes, chacune présentant une épaisseur maximale de 10 µm, peuvent être combinées dans une même préparation. Plus de 4 coupes peuvent être combinées si l'épaisseur totale des sections est inférieure ou égale à 40 µm (par ex. huit coupes de 5 µm d'épaisseur).

Pour les tissus particulièrement riches en ADN, nous recommandons d'utiliser moins de coupes par préparation afin d'éviter une contamination par ADN de l'ARN purifié.

En l'absence d'informations sur la nature de votre échantillon de départ, il est recommandé de commencer avec un nombre maximal de 2 coupes par préparation. En fonction du rendement et de la pureté de l'ARN, il peut être possible d'utiliser jusqu'à 4 coupes dans les préparations suivantes. Surcharger la colonne de centrifugation risque cependant de réduire de manière significative le rendement et la qualité d'ARN.

Préparation des tampons

Préparation de la solution mère de DNase I

Préparer la solution mère de DNase I en dissolvant la DNase I lyophilisée dans 550 µl d'eau exempte de RNases. Pour éviter de perdre de la DNase I, ne pas ouvrir le flacon. Injecter l'eau exempte de RNases dans le flacon à l'aide d'une aiguille et d'une seringue exemptes de RNases. Mélanger doucement en retournant le flacon. Ne pas agiter par vortex.

Dans certains cas, le flacon de DNase I peut sembler vide. Ceci est dû au fait que l'enzyme lyophilisé se colle au septum. Pour éviter de perdre de la DNase I, ne pas ouvrir le flacon. Au contraire, dissoudre la DNase I en utilisant une aiguille et une seringue, comme décrit ci-dessous.

Remarque : la DNase I est particulièrement sensible à toute dénaturation physique. Le mélange doit uniquement être fait en retournant doucement le flacon.

Remarque : veiller à ce que la totalité du volume d'eau exempte de RNases soit injectée dans le flacon.

Il est possible que des éléments insolubles restent présents après dissolution de la DNase I. En raison de son processus de production, des éléments insolubles sont susceptibles d'être présents dans la DNase I. Cela n'affecte en rien les performances de la DNase I.

Pour un stockage longue durée de la DNase I, retirer la solution mère du flacon, la diviser en aliquotes à usage unique et stocker entre -15 et -30 °C pendant 9 mois maximum. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C pour une durée maximale de 6 semaines. Ne pas recongeler les aliquotes après la décongélation.

Préparation du tampon RPE

Ajouter 4 volumes (44 ml) d'éthanol (96 à 100 %) au flacon contenant 11 ml de tampon RPE concentré. Cocher la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que de l'éthanol a été ajouté.

Remarque : avant de commencer la procédure, mélanger le tampon RPE reconstitué en l'agitant.

Procédure

Remarques importantes avant de commencer

- En cas de première utilisation du kit RNeasy DSP FFPE, lire les « Remarques importantes » (page 11).
- En cas de toute première manipulation d'ARN, lire « Annexe : remarques générales sur la manipulation des ARN » (page 24).
- Le tampon RBC contient un sel de guanidine et n'est donc pas compatible avec les réactifs de désinfection contenant de l'eau de Javel. Voir page 8 pour les informations de sécurité.
- Sauf indications contraires, effectuer toutes les étapes de la procédure à température ambiante (15 à 25 °C). Pendant la procédure, travailler vite, sans arrêts entre les étapes.
- Effectuer toutes les étapes de centrifugation à l'aide d'une microcentrifugeuse réglée sur 15–25 °C. Si la microcentrifugeuse est réfrigérée, régler la température sur 20–25 °C, afin d'éviter un refroidissement significatif (température inférieure à 15 °C).
- Dans la procédure ci-dessous, ▲ indique les volumes à utiliser si pour chaque échantillon, 1 à 2 coupes sont traitées, tandis que ● indique les volumes à utiliser lorsque pour chaque échantillon un nombre supérieur à 3 à 4 coupes sont traitées.
- Lors de la première utilisation du tampon RPE et de la DNase I exempte de RNases, les reconstituer selon la méthode décrite dans « Préparation des tampons » (page 12).
- Équilibrer tous les tampons à température ambiante (entre 15 et 25 °C). Mélanger le tampon RPE reconstitué en l'agitant.
- Régler un agitateur thermal sur 56 °C pour les étapes 5 et 9. Afin de réduire les temps d'attente, régler un second agitateur thermal sur 80 °C pour l'étape 9.
- **Remarque** : ne pas interrompre la procédure de purification, car des durées d'incubation plus longues risquent d'entraîner la perte ou la dégradation de l'ARN. Le temps de traitement moyen lorsque jusqu'à 12 échantillons sont traités en parallèle est de 130 minutes, environ.

Protocole : purification d'ARN total à partir de coupes de tissu FFPE

1. À l'aide d'un scalpel, découper la paraffine en excès du bloc d'échantillon.
2. Faire des coupes de 5 à 20 µm d'épaisseur.
Si la surface de l'échantillon a été exposée à l'air, mettre au rebut les 2-3 premières coupes.
3. Placer immédiatement les coupes dans un tube de microcentrifugeuse de ▲ 1,5 ml ou de ● 2 ml et fermer le couvercle.
4. Ajouter ▲ 160 µl ou ● 320 µl de solution de déparaffinisation, agiter vigoureusement par vortex pendant 10 secondes et centrifuger brièvement afin d'amener l'échantillon vers le fond du tube.
5. Incuber à 56 °C pendant 3 minutes puis laisser refroidir pendant 5 minutes à température ambiante.

Lorsqu'une quantité insuffisante de solution de déparaffinisation est utilisée ou si l'échantillon reçoit un excès de paraffine, la solution de déparaffinisation risque de prendre un aspect cireux ou de se solidifier après l'étape de refroidissement. Dans ce cas, rajouter de la solution de déparaffinisation graduellement, par échelons de 160 µl et répéter l'étape 5.

6. Ajouter ▲ 150 µl ou ● 240 µl de tampon PKD et mélanger par vortex pendant 3 secondes.
7. Centrifuger pendant 1 minute à 11 000 x g.
8. Ajouter 10 µl de protéinase K à la phase inférieure, claire. Mélanger en pipetant doucement de haut en bas 10 fois (ne pas mélanger les phases séparées).
9. Incuber à 56 °C pendant 15 minutes à 1 100 rpm, puis à 80 °C pendant 15 minutes à 1 100 rpm.

En cas d'utilisation d'un seul bloc chauffant, laisser l'échantillon à température ambiante après l'incubation à 56 °C jusqu'à ce que le bloc chauffant ait atteint 80 °C.

Remarque : une digestion totale des tissus par la protéinase K n'est pas requise pour un rendement maximal d'ARN. L'étape d'incubation à 80 °C est en revanche primordiale.

IMPORTANT : Veiller à ce que le bloc chauffant ait atteint 80 °C avant de démarrer l'incubation qui dure 15 minutes. L'incubation de 15 minutes à 80 °C est indispensable pour annuler les effets de réticulation du formaldéhyde et pour obtenir des performances d'ARN optimales dans les applications en aval telles que la RT-PCR en temps réel.

10. Centrifuger brièvement et transférer ▲ 145 µl ou ● 230 µl de la phase incolore inférieure dans un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml.
11. Incuber sur glace pendant 3 minutes. Puis, centrifuger pendant 15 minutes à 20 000 x g.
12. Transférer le surnageant dans un nouveau tube de microcentrifugeuse de 2 ml en prenant soin à ne pas remuer le culot.

Le culot contient des débris de tissus insolubles, notamment de l'ADN réticulé.

13. Ajouter une quantité de tampon amplificateur pour DNases équivalente à un dixième du volume d'échantillon total (▲ 14,5 µl ou ● 23 µl) et 10 µl de solution mère de DNase I. Mélanger en retournant le tube. Centrifuger brièvement pour pouvoir prélever le liquide résiduel présent sur les parois du tube.

Remarque : la DNase I est fournie lyophilisée et doit être reconstituée en suivant la procédure décrite dans « Préparation de la solution mère de DNase I », page 12.

Remarque : la DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation. Mélanger la solution DNase I en retournant et/ou en secouant doucement le tube plusieurs fois. Ne pas agiter par vortex.

14. Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
15. Ajouter ▲ 320 µl ou ● 500 µl de tampon RBC pour ajuster les conditions de fixation et mélanger entièrement le lysat par vortex pendant 3 secondes suivi d'une brève centrifugation.
16. Ajouter ▲ 720 µl ou ● 1200 µl d'éthanol (100 %) à l'échantillon. Ne pas centrifuger. Passer immédiatement à l'étape 17.

Il est possible d'observer des précipités suite à l'ajout d'éthanol. Cela n'affecte en rien la procédure.

17. Bien mélanger en pipetant de haut en bas 5 fois puis en transférant 700 µl d'échantillon, y compris tout précipité qui aurait pu se former, dans une colonne de centrifugation RNeasy MinElute placée dans un tube de prélèvement de 2 ml. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 15 secondes à $\geq 8\ 000 \times g$. Jeter le tube de prélèvement avec le surplus* et placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (fourni).
18. Répéter l'étape 17 (en omettant le mélange supplémentaire) jusqu'à ce que tout l'échantillon soit passé par la colonne de centrifugation RNeasy MinElute.
19. Ajouter 500 µl de tampon RPE à la colonne de centrifugation RNeasy MinElute. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 15 secondes à $\geq 8\ 000 \times g$. Jeter le tube de prélèvement avec le surplus* et placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (fourni).

Remarque : le tampon RPE est fourni concentré. Veiller à ce que l'éthanol soit ajouté avant son utilisation telle qu'écrite dans « Préparation du tampon RPE ».

20. Ajouter 500 µl de tampon RPE à la colonne de centrifugation RNeasy MinElute. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 2 minutes à $\geq 8\ 000 \times g$ pour nettoyer la membrane de la colonne de centrifugation. Jeter le tube de prélèvement avec le surplus* et placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement (fourni).

Remarque : après la centrifugation, retirer délicatement la colonne RNeasy MinElute du tube de prélèvement afin de lui éviter tout contact avec le surplus. Dans le cas contraire, une contamination de l'éthanol aura lieu.

* Le surplus contient du tampon RBC et n'est donc pas compatible avec l'eau de Javel. Voir page 8 pour les informations de sécurité.

21. Ouvrir le couvercle de la colonne de centrifugation, puis centrifuger à pleine vitesse pendant 5 minutes. Jeter le tube de prélèvement contenant le surplus.

Pour éviter d'endommager leurs couvercles, les placer dans la centrifugeuse en laissant au moins une position vide entre les colonnes. Orienter les couvercles du côté opposé à la rotation du rotor (par ex. si le rotor tourne dans le sens des aiguilles d'une montre, orienter les couvercles dans le sens inverse).

Il est important de faire sécher la membrane de la colonne de centrifugation, car l'éthanol résiduel peut créer des interférences avec les réactions en aval. La centrifugation avec couvercles ouverts permet de vérifier l'absence de contamination à l'éthanol pendant l'élution de l'ARN.

22. Placer la colonne de centrifugation RNeasy MinElute dans un nouveau tube de prélèvement de 1,5 ml (fourni). Ajouter 14 à 32 μ l d'eau exempte de RNases directement au centre de la membrane de la colonne de centrifugation. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 1 minute à pleine vitesse pour éluer l'ARN.

Une élution avec une quantité inférieure d'eau exempte de RNases conduit à des concentrations d'ARN total plus élevées, mais à des rendements ARN inférieurs.

Remarque : en cas de rendements d'ARN modestes, un tube à faible fixation est recommandé pour l'élution (non fourni). Le volume mort moyen de la colonne de centrifugation RNeasy MinElute est 2 μ l : une élution avec 14 μ l d'eau exempte de RNases donne lieu à un éluat d'environ 12 μ l.

23. Stocker les éluats d'ARN entre -60 à -90 °C ou entre -15 et -30 °C pour une durée maximale de 8 semaines.

Contrôle de la qualité

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

Limitations

Les performances du système ont été établies au cours d'études d'évaluation des performances de la purification d'ARN humain issu d'échantillons fixés dans le formol et incorporés dans la paraffine.

Il est de la responsabilité des utilisateurs de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans leur laboratoire et non couvertes par les études d'évaluation de la performance QIAGEN.

Afin de limiter les risques d'impact négatif sur les résultats diagnostiques, des contrôles appropriés doivent être utilisés pour les applications en aval.

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

Symboles

Les symboles figurant dans le tableau suivant incluent des symboles utilisés dans ces instructions d'utilisation.



<N>

Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Dès réception



DN



Centrifugation RNeasy MinElute



Référence du catalogue



Numéro de lot



Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)

COMP

Composants (c.-à-d. liste des éléments inclus)

CONT

Contient (contenu)

NUM

Quantité (flacons, tubes)

GTIN

Code d'article commercial international

Rn

Le R désigne une révision des instructions d'utilisation (manuel) et le n représente le numéro de révision



Limites de température



Fabricant



Consulter le mode d'emploi



Attention

PROTK

Protéinase K

Sodium azide

Azide de sodium

Guide de résolution des principaux problèmes rencontrés

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la page de foire aux questions de notre Centre d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosage (pour les coordonnées, visiter le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Colonne de centrifugation RNeasy MinElute bouchée

- | | |
|--|--|
| a) Trop d'échantillons de départ | Réduire le nombre d'échantillons de départ. Il est primordial d'utiliser la juste quantité d'échantillons de départ (voir page 11). |
| b) Température de centrifugation trop faible | La température de centrifugation doit être comprise entre 15 et 25 °C. Il arrive que certaines centrifugeuses refroidissent à une température inférieure à 15 °C même lorsqu'elles ont été réglées sur 20 °C. Cela peut entraîner la formation de précipités qui risquent de boucher la colonne de centrifugation RNeasy MinElute. Dans ce cas, régler la température de centrifugation sur 25 °C. |

Faible rendement en ARN

- | | |
|---|--|
| a) Échantillon de départ de qualité médiocre | Les échantillons qui ont été fixés pendant plus de 24 heures ou ont été stockés longtemps sont susceptibles de contenir une quantité infime d'ARN utilisable. Les coupes montées sur des lames de microscope ne produiront qu'une très petite quantité d'ARN exploitable en raison de leur exposition prolongée à l'air. |
| b) Trop d'échantillons de départ | Saturer la colonne de centrifugation RNeasy MinElute réduit de manière significative les rendements d'acides nucléiques. Réduire le nombre d'échantillons de départ (voir page 11). |
| c) ARN toujours attaché à la membrane de la colonne de centrifugation RNeasy MinElute | Refaire l'élution d'ARN mais incuber la colonne de centrifugation RNeasy MinElute sur la table pendant 10 minutes avec du RNFw avant de procéder à la centrifugation. |
| d) Stockage incorrect des tampons/réactifs | Les colonnes de centrifugation RNeasy MinElute ainsi que la DNase I doivent être stockées entre 2 et 8 °C dès réception du kit. Vérifier que la température de stockage est correcte, car une exposition des températures plus élevées sur une durée prolongée risque d'entraîner une dégradation fonctionnelle. |

Commentaires et suggestions

Valeur A_{260}/A_{280} faible

- a) Eau utilisée pour diluer l'acide nucléique lors de la mesure de A_{260}/A_{280} Utiliser une solution de 10 mM Tris Cl, pH 7,5, et non de l'eau, pour diluer l'échantillon avant de mesurer la pureté.

Contamination par ADN dans les expériences en aval

- a) Trop d'échantillons de départ Pour certains types de tissus, l'efficacité du processus d'élimination de l'ADN peut être diminuée en raison d'une quantité trop élevée d'éléments à traiter. Si l'ARN élué présente une importante contamination à l'ADN, essayer de traiter moins de coupes de tissus par préparation.
- b) Tissu riche en ADN En cas de traitement d'un grand nombre de tissus riches en ADN (par ex. le thymus), il est possible que tout l'ADN ne soit pas complètement digéré. Refaire la procédure de purification en utilisant moins de coupes de tissus. Vérifier si la DNase I a bien été stockée, comme décrit dans « Stockage et manipulation des réactifs » et « Préparation de la solution mère de DNase I ».
- c) Transcription inverse avec quantité insuffisante d'ARN La plupart des transcriptases sont conçues pour être utilisées avec environ 1 µg d'ARN. En cas de transcription inverse avec une trop faible quantité d'ARN, nous recommandons d'utiliser une transcriptase inverse spécialement conçue pour une transcription inverse ultra sensible.

L'ARN ne réagit pas bien dans des applications en aval

- a) ARN fragmenté ou bloqué en raison d'une modification liée au formaldéhyde L'incubation à 80 °C dans la procédure RNeasy DSP FFPE est primordiale pour obtenir des performances optimales de l'ARN au cours de la transcription inverse et d'autres applications enzymatiques en aval. Veiller à ce que la température d'incubation soit maintenue à 80 °C tout au long de la durée d'incubation, à savoir 15 minutes. Bien que l'incubation à 80 °C supprime certaines modifications liées au formaldéhyde, l'ARN purifié issu de coupes FFPE ne représente pas un modèle idéal pour des réactions enzymatiques. Nous recommandons de n'utiliser pour la synthèse d'ADNc que des amorces aléatoires ou des amorces spécifiques du gène à l'étude. Nous recommandons également d'utiliser des amplicons aussi courts que possible pour la PCR (< 500 nucléotides).
- b) Contamination à l'éthanol Lors du second lavage avec le tampon RPE, veiller à centrifuger à $\geq 8\ 000 \times g$ pendant 2 minutes à 15–25 °C afin de sécher la membrane de la colonne de centrifugation RNeasy MinElute. Après la centrifugation, retirer soigneusement la colonne du tube de prélèvement pour lui éviter tout contact avec le surplus. Puis, placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement et centrifuger à pleine vitesse pendant 5 minutes.
- c) Résidu de sel pendant l'élué d'ARN Veiller à ce que le tampon RPE soit reconstitué en ajoutant le volume correct d'éthanol et qu'il soit à température ambiante (15–25 °C).
- d) Transcription inverse avec quantité insuffisante d'ARN La plupart des transcriptases sont conçues pour être utilisées avec environ 1 µg d'ARN. En cas de transcription inverse avec une trop faible quantité d'ARN, nous recommandons d'utiliser une transcriptase inverse spécialement conçue pour une transcription inverse ultra sensible.

Annexe : remarques générales sur la manipulation des ARN

Manipulation de l'ARN

Les ribonucléases (RNases) sont des enzymes très stables et très actives qui ne nécessitent généralement pas de cofacteurs pour être activées. Puisque les RNases sont difficiles à inactiver et que de très petites quantités d'enzyme suffisent à détruire les ARN, ne pas utiliser de matériel en plastique ou en verre sans l'avoir préalablement traité contre une contamination possible par les RNases. Prendre garde à ne pas introduire par inadvertance des RNases dans l'échantillon d'ARN pendant ou après la purification. Lors de la manipulation de l'ARN, afin de créer et de maintenir un environnement exempt de RNase, il est important de prendre les précautions suivantes au cours du pré-traitement et de l'utilisation de récipients jetables ou non jetables et des solutions.

Manipulation générale

Lors de la préparation des ARN, toujours respecter les principes de techniques aseptiques de microbiologie. Les mains et les particules de poussière peuvent être porteuses de bactéries et de champignons et sont la source la plus fréquente de contaminations par les RNases. Toujours porter des gants en latex ou en vinyle pour travailler avec des réactifs et des échantillons d'ARN afin d'éviter une contamination par les RNases par la peau ou par l'équipement de laboratoire poussiéreux. Changer souvent de gants et fermer les tubes immédiatement après usage. Garder les ARN purifiés dans la glace si des aliquotes sont préparées pour des applications ultérieures.

Pour se débarrasser d'une contamination par les RNases sur les surfaces de travail, sur le matériel en plastique non jetable et sur les équipements du laboratoire (par ex. pipettes et réservoirs d'électrophorèse), il est recommandé d'utiliser le RNaseZap® (réf. catalogue AM9780) d'Ambion®. Il est également possible de se débarrasser de cette contamination par les RNases en utilisant des réactifs généraux de laboratoire. Pour décontaminer le matériel

en plastique, rincer avec 0,1 M de NaOH, 1 mM d'EDTA puis avec de l'eau exempte de RNases (voir « Solutions », page 25). Si le matériel en plastique est résistant au chloroforme, le rincer avec du chloroforme. Pour décontaminer les réservoirs d'électrophorèse, nettoyer avec du détergent (par ex. du SDS à 0,5 %), rincer avec de l'eau exempte de RNases puis avec de l'éthanol (lorsque les réservoirs sont résistants à l'éthanol) puis laisser sécher.

Matériel en plastique jetable

Il est recommandé d'utiliser des tubes jetables, stériles en polypropylène tout au long de la procédure. Ces tubes sont généralement exempts de RNases et ne requiert aucun prétraitement qui aurait pour fonction d'inactiver les RNases.

Verrerie

La verrerie doit être traitée avant utilisation afin de s'assurer qu'elle est exempte de RNases. Avant emploi, la verrerie utilisée avec l'ARN doit être nettoyée avec un détergent, rincée soigneusement et passée à l'étuve à 240 °C pendant au moins 4 heures (toute la nuit si cela est plus pratique). L'autoclavage seul ne permet pas d'inactiver totalement les RNases. Il est également possible de traiter la verrerie au DEPC (diéthylpyrocarbonate) comme décrit dans la section « Solutions » ci-dessous.

Solutions

Les solutions (eau et autres) doivent être traitées avec du DEPC à 0,1 %. Le DEPC est un inhibiteur puissant mais incomplet des RNases. Il est couramment employé à la concentration de 0,1 % pour inactiver les RNases présentes sur la verrerie ou le matériel en plastique ou pour éliminer toutes traces de RNases éventuellement présentes dans les solutions et l'eau. Le DEPC inactive les RNases en modifiant leur liaison covalente. Ajouter 0,1 ml de DEPC à 100 ml de la solution à traiter et secouer vigoureusement pour bien mettre en solution le DEPC. Laisser la solution incuber pendant 12 heures à 37 °C. Passer à l'autoclave pendant 15 minutes afin d'enlever toute trace du DEPC. Le DEPC réagit avec les amines primaires et ne peut par être utilisé directement pour traiter les tampons Tris. Le DEPC est très instable en présence de tampons Tris et se décompose rapidement en éthanol et CO₂. Lors de la

préparation des tampons Tris, traiter d'abord l'eau avec du DEPC puis dissoudre le Tris pour obtenir le tampon adapté. Des quantités à l'état de trace suffisent à modifier la purine résiduelle de l'ARN par carbéthoxylation. Dans les systèmes acellulaires, l'efficacité de traduction de l'ARN carbéthoxylé est très faible. Toutefois, sa capacité à former des hybrides ADN:ARN ou ARN:ARN n'est pas gravement affectée sauf si une forte proportion des purines résiduelles ont été modifiées. Le DEPC résiduel doit toujours être éliminé des solutions ou des récipients par autoclavage ou chauffage à 100 °C pendant 15 minutes.

Remarque : les tampons RNeasy sont garantis exempts de RNases sans avoir recours au traitement DEPC et sont donc ainsi exempts de toute contamination par DEPC.

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
Kit RNeasy DSP FFPE (50)	50 colonnes de centrifugation RNeasy MinElute Spin, tubes d'élution, tubes de lavage, tubes de lyse, réactifs et tampons exempts de RNases.	73604

Pour obtenir des informations actualisées et connaître les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services Techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Remarques

Remarques

Contrat de licence limité pour le kit RNeasy DSP FFPE

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du produit consent aux conditions suivantes :

1. le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toute licence, expresse ou tacite, autre que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits dans les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions contenues dans ce Contrat de licence limité par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de ce Contrat de licence limité ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

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

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (Groupe QIAGEN) ; Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific ou ses filiales). Les noms déposés, les noms de marque, etc., cités dans le présent document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

08/2017 HB-2416-001 1106945 © 2012-2017 QIAGEN, tous droits réservés.

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