




Caractéristiques de performance

Kit RNeasy® DSP FFPE, version 1

REF 73604

Gestion des versions

Ce document présente les caractéristiques de performance du kit RNeasy DSP FFPE, version 1, R1.

  	Vérifier la disponibilité de nouvelles mises à jour des notices électroniques à l'adresse www.qiagen.com/HB-2416 avant de procéder à la réalisation des tests. L'état de la mise à jour actuelle est indiqué par la date de parution (format : mois/année).
---	---

Introduction générale

Le kit RNeasy DSP FFPE est 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 est axé sur un protocole utilisant 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 isole des molécules d'ARN dont la structure est supérieure à 70 nucléotides et permet de récupérer des fragments d'ARN utilisables dans des applications en aval telles que la RT-PCR.

Rendement de l'ARN purifié

La performance élémentaire du kit RNeasy DSP FFPE a été évaluée à l'aide d'échantillons FFPE provenant de 5 différents tissus humains (sein, côlon, poumon, mélanome cancéreux et peau normale ; 20 échantillons de chaque).

Les échantillons FFPE peuvent présenter une grande hétérogénéité tissulaire. De plus, la surface tissulaire est extrêmement variable d'un échantillon FFPE à l'autre, induisant une certaine variabilité dans la quantité d'ARN extrait. L'utilisateur doit donc optimiser le nombre, l'épaisseur et la surface

des coupes de l'échantillon étudié ainsi que toutes les procédures utilisées dans son laboratoire.

Si l'utilisation du kit est associée à une application QIAGEN® en aval, consulter les instructions du manuel correspondant.

Une déshydratation insuffisante du tissu pendant la préparation du tissu FFPE, un ajout excessif de paraffine à l'échantillon dans le tube d'extraction, l'utilisation d'un éthanol de pureté moindre (qualité autre que biologie moléculaire) à celle recommandée ou la présence résiduelle d'éthanol dans l'échantillon peut aboutir à une extraction non optimale et à une quantité d'ARN diminuée ou à des performances en aval amoindries.

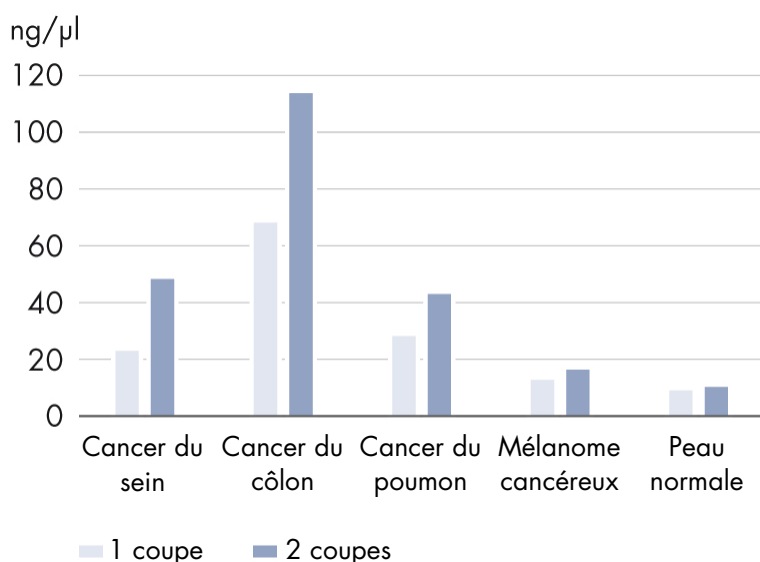


Figure 1. Rendement ARN de différents tissus humains (volume d'éluat 32 µl)

Analyses en aval

L'ARN élué est prêt à être utilisé dans des dosages en aval. Pour l'évaluation de la performance, 10 ng d'ARN ont été isolés avec le kit RNeasy DSP FFPE à partir de 5 différents tissus humains (sein, côlon, poumon, mélanome cancéreux et peau normale ; 20 échantillons se composant d'une ou de deux coupes) et validés par RT-PCR en ciblant le gène de la β -actine humaine. La réussite de l'amplification illustre que l'ARN isolé à l'aide du kit RNeasy DSP FFPE peut être utilisé pour des analyses en aval.

L'utilisateur doit optimiser le nombre, l'épaisseur et la surface des coupes de l'échantillon étudié ainsi que toutes les procédures ultérieures utilisées dans son laboratoire ou consulter les performances spécifiques du dosage correspondant en aval.

	Cancer du sein	Cancer du côlon	Cancer du poumon	Mélanome cancéreux	Peau normale
RT-PCR 1 coupe	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 coupes	✓	✓	✓	✓	✓

Figure 2. Amplification réussie par RT-PCR de coupes de 10 µm de tissus FFPE provenant de cinq différents tissus humains testés.

Stabilité de l'éluat

La stabilité de l'éluat dépendra de sa teneur et du type d'impuretés co-purifiées (selon le type tissulaire), du volume d'éluat et des conditions de conservation. Nous recommandons aux utilisateurs de déterminer la stabilité de l'éluat requise en fonction de leurs besoins particuliers.

La stabilité de l'éluat a été testée pour des échantillons d'ARN humain extrait de tissus FFPE, conservés entre -15 et -30 °C et entre -60 et -90 °C. Aucune dégradation n'a été observée sur une période allant jusqu'à 12 semaines et les éluats stockés à température ambiante (18-25 °C) sont restés stables pendant 12 heures. Toutes les conditions ont été évaluées par RT-PCR en ciblant le gène de la β-actine humaine.

Si l'utilisation du kit est associée à des applications QIAGEN en aval, consulter les instructions du manuel du kit correspondant.

Répétabilité

La répétabilité a été évaluée à l'aide d'échantillons FFPE de cellules sanguines nucléées humaines. Les échantillons ont été testés à l'aide d'un dosage validé en interne effectué sur un fragment de 295 bp du gène de la β-actine humaine sur un cycleur de PCR en temps réel ABI® 7900.

Afin de procéder à une analyse statistique, 108 points de données issus des trois lots d'extraction (même lot de kit, même opérateur, même jour) ont été utilisés. L'analyse statistique inclut le calcul

de l'écart type (É.-T.) et du coefficient de variation (CV) des valeurs de C_T découlant de la RT-PCR de la β -actine. L'É.-T. était 1,1 C_T et le coefficient de variation était 4,1 % (tableau 1).

Tableau 1. Résultats de répétabilité

Répétabilité			
	C_T moyen	É.-T.	CV (%)
Lot 1	26,64	1,01	3,81
Lot 2	27,51	1,16	4,2
Lot 3	27,23	0,95	3,5
Lots 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

Reproductibilité

La reproductibilité a été réalisée en évaluant l'ARN extrait d'échantillons FFPE de cellules sanguines nucléées humaines, opération effectuée par différents opérateurs, sur plusieurs jours et avec une combinaison de différents opérateurs sur plusieurs jours. Les échantillons ont été testés à l'aide d'un dosage validé en interne effectué sur un fragment de 295 bp du gène de la β -actine humaine sur un cycleur de PCR en temps réel ABI 7900. Afin de procéder à une analyse statistique, 108 points de données issus des trois lots d'extraction ont été utilisés pour chaque configuration de test. L'analyse statistique inclut le calcul de l'écart type (ÉT) et du coefficient de variation (CV) des valeurs de C_T découlant de la RT-PCR de la β -actine (tableau 2).

Tableau 2. Résultats de la reproductibilité

Reproductibilité			
	C_T moyen	É.-T.	CV (%)
Différents opérateurs	26,92	1,06	3,95
Différents jours	26,56	1,20	4,53
Différents opérateurs sur plusieurs jours	26,63	1,01	3,78

Linéarité

Le kit RNeasy DSP FFPE peut être utilisé pour isoler l'ARN issu de différents types de tissu FFPE. Le système a été validé pour la manipulation de 1 à 4 coupes de cellules sanguines nucléées humaines FFPE et a révélé une hausse linéaire du rendement de l'ARN. L'utilisateur doit établir une plage de linéarité selon ses besoins et la valider pour cette application. Il est attendu que les plages de linéarité varient d'un type de tissu à un autre, selon le tissu chargé dans le système et ses caractéristiques, sans oublier les dosages en aval.

Substances interférentes

Des substances potentiellement interférentes d'origines variées peuvent être présentes dans l'échantillon, par exemple des métabolites naturels spécifiques au type de tissu ou à l'organe, des métabolites produits lors d'un certain état pathologique, des substances liées au traitement du patient ou des substances ingérées par le patient. En raison de la complexité des substances potentiellement interférentes et des différences de sensibilité des applications en aval, nous recommandons aux utilisateurs d'évaluer l'effet des substances interférentes sur leurs propres systèmes et de valider une méthodologie permettant de contrôler les interférences présentes dans leurs applications diagnostiques spécifiques en aval.

Aucune substance interférente provenant des composants du kit RNeasy DSP FFPE n'a été observée au cours du traitement des échantillons et de l'extraction de l'ARN.

Pour obtenir plus d'informations sur les substances interférentes dans le cadre d'applications QIAGEN spécifiques et en aval, consulter les manuels des kits.

Contamination croisée

Pour évaluer le degré de contamination croisée, 500 ng d'ARN total d'origine sanguine ont été ajoutés à la solution de déparaffinisation et isolés des tubes voisins ne contenant pas d'ARN (tubes d'extraction négatifs). L'objectif de l'étude était de simuler une situation dans laquelle des échantillons contenant une proportion élevée de molécules d'ARN cible pourraient contaminer de manière croisée d'autres échantillons pendant la même procédure d'extraction. La purification de l'ARN a été faite à l'aide d'un lot de réactifs. La contamination croisée a été évaluée par RT-PCR en ciblant le gène de la β -actine humaine. Aucune contamination croisée n'a été observée pour l'ensemble de la procédure.

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.

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