

Janvier 2021

Mode d'emploi de la trousse QIAamp[®] DSP DNA Mini Kit (Manuel)



Version 2

IVD

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

REF

61304



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R4 **MAT**

1122787FRCA



Table des matières

Utilisation prévue.....	5
Description et principe	6
Lyse avec la protéinase K	6
Purification des colonnes de centrifugation QIAamp Mini	8
Adsorption sur la membrane QIAamp.....	8
Élimination des contaminants résiduels	9
Élution des acides nucléiques purifiés	9
Purification automatisée de l'ADN sur les instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx.....	9
Résumé et explication.....	11
Matériel fourni.....	12
Contenu de la trousse.....	12
Matériel nécessaire, mais non fourni	13
Avertissements et précautions	15
Information sur la sécurité	15
Précautions.....	16
Conservation et manipulation des réactifs.....	17
Conservation et manipulation des échantillons	17
Procédure	18
Remarques importantes avant de commencer	18
Préparation des réactifs et tampons.....	19
Quantité de matériel de départ	20
Préparation de la couche leucocytaire.....	20

Manipulation des colonnes QIAamp Mini	21
Centrifugation.....	21
Traitement des colonnes QIAamp Mini sur le QIAvac 24 Plus (protocoles de dépression).....	23
Configuration du collecteur à vide QIAvac 24 Plus	25
Protocole : Purification de l'ADN du sang ou des fluides corporels à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx	28
Protocole : Purification de l'ADN du sang ou des fluides corporels (protocole de dépression)	32
Protocole : Purification de l'ADN des tissus à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx	35
Protocole : Purification de l'ADN d'écouvillons buccaux (protocole de centrifugation)	41
Protocole : Purification de l'ADN d'écouvillons buccaux (protocole de dépression)	44
Protocole : Purification de l'ADN total de cellules en culture	47
Protocole : Isolation de l'ADN bactérien à partir de fluides biologiques	49
Protocole : Isolation de l'ADN bactérien à partir d'écouvillons oculaires, nasaux, pharyngés ou autres.....	51
Protocole : Isolation de l'ADN génomique des bactéries à Gram positif.....	52
Contrôle qualité.....	54
Limitations.....	54
Symboles.....	55
Coordonnées	57
Pour commander	58
Historique des révisions du document.....	60

Utilisation prévue

La trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit est un système utilisant une technologie de membrane à base de silice (technologie QIAamp) pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques.

Seuls des professionnels tels que des techniciens et des médecins dûment formés aux techniques de biologie moléculaire sont habilités à utiliser ce produit.

L'utilisation de la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit est réservée au diagnostic in vitro.

Description et principe

La trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit fournit des méthodes rapides et faciles de purification de l'ADN total pour une PCR et un buvardage de Southern fiables. L'ADN total (p. ex. génomique, viral, mitochondrial) peut être purifié à partir de sang total, de plasma, de sérum, de couche leucocytaire, de moelle osseuse, d'autres fluides corporels, de lymphocytes, de cellules en culture, de tissus et d'échantillons médico-légaux. Les procédures de dépression et de centrifugation QIAamp simples, qui permettent le traitement simultané de plusieurs échantillons de sang, produisent de l'ADN purifié prêt pour l'amplification directe. Certaines des procédures de centrifugation QIAamp peuvent être automatisées sur l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx pour une standardisation accrue et une plus grande facilité d'utilisation. La procédure QIAamp est adaptée à l'utilisation de sang total frais ou congelé et de sang traité au citrate ou à l'EDTA, mais pas à l'héparine. La séparation préalable des leucocytes n'est pas nécessaire.

La purification ne nécessite pas d'extraction au phénol/chloroforme ni de précipité d'alcool, et implique très peu de manipulation. L'ADN est élué dans le tampon d'éluion (AE), prêt à être ajouté directement à la PCR ou à d'autres réactions enzymatiques. Il peut également être stocké en toute sécurité à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

Lyse avec la protéinase K

La trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit contient de la protéinase K, qui est l'enzyme de choix pour les tampons de lyse contenant du SDS utilisés dans le protocole Tissus, mais qui fonctionne tout aussi bien dans le protocole Sang et Fluides corporels. L'activité de la solution de protéinase K est de 600 mAU/ml de solution (ou 40 mAU/mg de protéine).

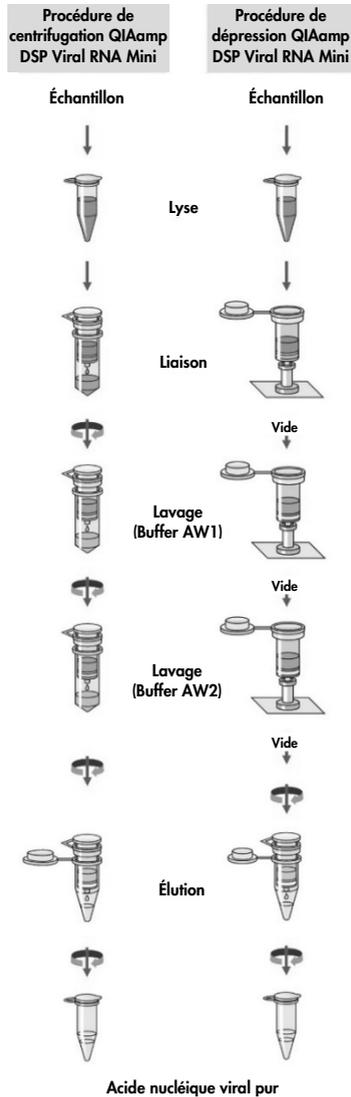


Figure 1. Procédures de centrifugation et de dépression QIAamp DSP DNA Mini

La procédure de centrifugation QIAamp DSP peut être automatisée sur l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx.

Purification des colonnes de centrifugation QIAamp Mini

La procédure de purification de l'ADN QIAamp est réalisée à l'aide des colonnes de centrifugation QIAamp Mini dans une microcentrifugeuse standard, sur un collecteur à vide, ou de manière entièrement automatisée sur le QIAcube ou le QIAcube Connect MDx (voir page 7). Les procédures sont conçues pour minimiser le potentiel de contamination croisée des échantillons et permettent la manipulation sans danger d'échantillons potentiellement infectieux.

Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini s'adaptent à la plupart des tubes de microcentrifugation standard. Dans le protocole de centrifugation, en raison du volume de filtrat, des tubes de prélèvement de 2 ml (fournis) sont nécessaires pour soutenir la colonne de centrifugation QIAamp Mini pendant les étapes de chargement et de lavage. Pour le protocole de dépression, un collecteur à vide (p. ex. QIAvac 24 Plus; voir la section « Matériel nécessaire, mais non fourni », page 13) et une pompe à vide capable de produire un vide de -800 à -900 mbar sont requis. L'ADN élué peut être recueilli dans des tubes de microcentrifugation standard de 1,5 ml (fournis).

Adsorption sur la membrane QIAamp

Les conditions de tamponnage du lysat sont ajustées pour permettre une liaison optimale de l'ADN à la membrane QIAamp avant que l'échantillon ne soit chargé sur la colonne de centrifugation QIAamp Mini. L'ADN est adsorbé sur la membrane de silice QIAamp au cours d'une brève centrifugation ou d'une étape de dépression. Le sel et les conditions d'acidité (pH) dans le lysat garantissent que les protéines et d'autres contaminants susceptibles d'inhiber la PCR et d'autres réactions enzymatiques en aval, ne sont pas retenues sur la membrane QIAamp.

Élimination des contaminants résiduels

L'ADN lié à la membrane QIAamp est lavé en 2 étapes de centrifugation ou de dépression. L'utilisation de 2 tampons de lavage différents, le Buffer AW1 et le Buffer AW2, améliore considérablement la pureté de l'ADN élué. Les conditions de lavage assurent l'élimination efficace de tout contaminant résiduel sans affecter la liaison de l'ADN.

Élution des acides nucléiques purifiés

L'ADN purifié est élué de la colonne de centrifugation QIAamp Mini sous forme concentrée dans le tampon d'éluion (AE). Amenez le tampon d'éluion à température ambiante (15–25 °C) avant de le déposer sur la colonne.

Purification automatisée de l'ADN sur les instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx

Certains protocoles de la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit peuvent être entièrement automatisés sur les instruments QIAcube et QIAcube Connect MDx. Les instruments QIAcube et QIAcube Connect MDx effectuent l'isolation et la purification automatisées des acides nucléiques. Ils peuvent traiter jusqu'à 12 échantillons par analyse.

La préparation des échantillons avec les instruments QIAcube et QIAcube Connect MDx suit les mêmes étapes que la procédure manuelle (à savoir, lyse, liaison, lavage et éluion), ce qui vous permet de continuer à utiliser la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit pour la purification d'ADN de haute qualité.

Si vous automatisez la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit sur l'instrument QIAcube, celui-ci peut traiter moins de 50 échantillons en raison des volumes morts, de l'évaporation et de la consommation supplémentaire de réactifs par le pipetage automatisé. QIAGEN garantit uniquement 50 préparations d'échantillons avec l'utilisation manuelle de la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit.



Figure 2. Le QIAcube.



Figure 3. Purification automatisée de l'ADN La purification de l'ADN à l'aide de la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit peut être automatisée sur l'instrument QIAcube Connect MDx.

Résumé et explication

Les trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit fournissent des méthodes rapides et faciles de purification de l'ADN total. L'ADN total (p. ex. génomique, viral, mitochondrial) peut être purifié à partir de sang total, de plasma, de sérum, de couche leucocytaire, de moelle osseuse, d'autres fluides corporels, de lymphocytes, de cellules en culture et de tissus.

Les procédures simples de centrifugation et de dépression QIAamp (illustrées à la Figure 1) sont adaptées au traitement simultané de plusieurs échantillons. Certaines des procédures de centrifugation QIAamp peuvent être entièrement automatisées sur l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx pour une standardisation accrue et une plus grande facilité d'utilisation (voir page 9).

Matériel fourni

Contenu de la trousse

QIAamp DSP DNA Mini Kit			
N° de réf.			61304
Nombre de préparations			50*
QIAamp Mini Spin	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (Colonnes de centrifugation QIAamp Mini avec tubes de lavage)	COL	50
WT	Wash Tubes (Tubes de lavage) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
LT	Lysis Tubes (Tubes de lyse) (2 ml)	LYS TUBE	50
ET	Elution Tubes (Tubes d'éluion) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
AL	Lysis Buffer (Tampon de lyse) [†]	LYS BUF	12 ml
ATL	Tissue Lysis Buffer (Tampon de lyse tissulaire)	TIS LYS BUF	10 ml
AW1	Wash Buffer 1 [†] (Tampon de lavage 1) (concentré)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 [†] (Tampon de lavage 2) (concentré)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AE	Elution Buffer (Tampon d'éluion)	ELU BUF	22 ml
	Protéinase K	PROTK	2 ml
	Mode d'emploi (Manuel)		

* Si vous automatisez la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit sur l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx, celui-ci peut traiter moins de 50 échantillons en raison des volumes morts, de l'évaporation et de la consommation supplémentaire de réactifs par le pipetage automatisé. QIAGEN garantit uniquement 50 préparations d'échantillons avec l'utilisation manuelle de la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit.

[†] Contient un sel chaotropique. Non compatible avec les désinfectants contenant un javellisant. Voir page 15 pour connaître les Warnings and Precautions.

[‡] Contient de l'azotate de sodium comme conservateur.

Matériel nécessaire, mais non fourni

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

- Éthanol (96–100 %) *
- Pipettes et embouts de pipette exempts de nucléase et munis de dispositifs anti-aérosol
- Microcentrifugeuse (avec rotor pour tubes de 2 ml)
- Mélangeur vortex
- Bain-marie ou bloc chauffant à 56 °C
- Tampon phosphate salin (Phosphate-buffered saline, PBS, il peut être nécessaire pour certains échantillons)

Pour les protocoles de dépression

- Collecteur à vide QIAvac 24 Plus (n° de réf. 19413) ou équivalent
- VacConnectors (n° de réf. 19407)
- Vacuum Regulator (n° de réf. 19530) pour une surveillance aisée des dépressions et pour évacuer rapidement le vide
- Vacuum Pump (n° de réf. 84010) ou pompe équivalente capable de produire un vide de -800 à -900 mbar
- Pour les écouvillons buccaux ou les volumes importants : Extension Tubes (n° de réf. 19587)
- **Facultatif** : VacValves (n° de réf. 19408)
- **Facultatif** : QIAvac Connecting System (n° de réf. 19419)
- **Facultatif** : RNase A (100 mg/ml; n° de réf. 19101)

* N'utilisez pas de l'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

Pour la procédure automatisée uniquement

- Rotor Adapters, n° de réf. 990394
- Rotor Adapter Holder, n° de réf. 990392
- Sample Tubes CB, n° de réf. 990382 (tube initial d'échantillon)
- Sample Tubes RB, n° de réf. 990381 (tube initial d'échantillon pour l'ADN bactérien, tissus)
- Shaker Rack Plugs, n° de réf. 9017854 (uniquement si des tubes à bouchon à vis sont utilisés pour les échantillons)
- Reagent Bottles, 30 ml, n° de réf. 990393
- Filter Tips, 1000 µl, n° de réf. 990352
- Filter Tips, 200 µl, n° de réf. 990332
- SafeSeal Tube, 1,5 ml, Sarstedt® (n° de réf. 72.706)

Pour les tissus

- Bain-marie ou bloc chauffant supplémentaire à 70 °C
- Facultatif : Équipement pour la perturbation mécanique, tel que le TissueRuptor II® (n° de réf. 9002755) ou un mortier, un pilon et de l'azote liquide

Pour les écouvillons buccaux

- Tubes de microcentrifugation de 2 ml
- Pour les écouvillons en coton ou en DACRON® : Des ciseaux ou un dispositif de coupe approprié

Avertissements et précautions

Sachez que vous pouvez être tenu de signaler les incidents graves survenus en connexion avec le dispositif au fabricant et à l'autorité réglementaire de la région de l'utilisateur et/ou du patient.

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 appropriés. Pour obtenir plus de renseignements, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne en format PDF pratique et compact sur www.qiagen.com/safety, où vous pouvez les trouver, les afficher et les imprimer pour chaque trousse et composant de trousse QIAGEN.



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

Le tampon de lyse (AL) et le tampon de lavage 1 (AW1) contiennent du chlorhydrate de guanidine, qui est susceptible de former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec du javellisant. Si du liquide contenant ces tampons est renversé, 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 concernée avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (V/V).

Si les flacons de tampon sont endommagés ou fuient, portez des gants et des lunettes de protection avant de jeter les flacons afin d'éviter de vous blesser ou de blesser d'autres personnes.

QIAGEN n'a pas testé les déchets liquides produits par les procédures QIAamp DSP DNA Mini pour déterminer s'ils contenaient des matériaux infectieux résiduels. Une contamination des déchets liquides par des matériaux infectieux résiduels est improbable mais ne peut être exclue complètement. Par conséquent, les déchets liquides doivent être traités comme des déchets infectieux et doivent être manipulés et éliminés conformément à la réglementation de sécurité locale en vigueur.

Précautions

Les indications suivantes de danger et de précaution s'appliquent aux composants de la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit.

Buffer AL



Contient : chlorhydrate de guanidine, acide maléique. Avertissement! Peut être nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Peut provoquer une réaction allergique cutanée. Si l'irritation des yeux persiste : Demander un avis médical/consulter un médecin. Retirer les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection.

Buffer ATL

Avertissement! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation de la peau : Demander un avis médical/consulter un médecin.

Buffer AW1



Contient : Chlorhydrate de guanidine. Avertissement! Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. Éliminer le contenu/récipient dans un centre de traitement des déchets agréé. Retirer les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection.

Protéinase K



Contient de la 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 un centre de traitement des déchets agréé. 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.

Conservation et manipulation des réactifs

Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini doivent être conservées à une température entre 2 et 8 °C dès réception. Lorsqu'elles sont conservées correctement, les colonnes de centrifugation QIAamp Mini sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte. Tous les tampons et la protéinase K peuvent être conservés à température ambiante (entre 15 et 25 °C) et sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte.

Le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué et le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué sont stables pendant une durée de 1 an au maximum lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (entre 15 et 25 °C), mais pas au-delà de la date d'expiration indiquée sur la boîte.

Conservation et manipulation des échantillons

La procédure QIAamp est adaptée à l'utilisation de sang total frais ou congelé et de sang traité au citrate ou à l'EDTA. La séparation préalable des leucocytes n'est pas nécessaire. La purification ne nécessite pas d'extraction au phénol/chloroforme ni de précipité d'alcool, et implique très peu de manipulation.

Procédure

Remarques importantes avant de commencer

- Après avoir reçu la trousse, vérifiez que ses composants ne sont pas endommagés. Si les emballages ou les flacons de tampon sont endommagés, contactez les services techniques QIAGEN ou votre distributeur local. En cas de renversement de liquide, voir la section « Avertissements et précautions », page 15. N'utilisez pas de composants endommagés, car leur utilisation peut mener à des problèmes de fonctionnement.
- Utilisez toujours des équipements sans ARNase.
- Changer systématiquement les embouts de pipette entre les transferts de liquides. Afin de minimiser tout risque de contamination croisée, nous recommandons fortement l'utilisation d'embouts de pipette équipés de dispositifs anti-aérosols.
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (15 °C–25 °C).
- Utilisez systématiquement des gants jetables et vérifiez régulièrement qu'ils ne sont pas contaminés par du matériel de l'échantillon. Jetez les gants lorsqu'ils sont contaminés.
- Afin de minimiser le risque de contamination croisée, ouvrez seulement un tube à la fois.
- N'utilisez pas les composants d'autres trousse avec les trousse que vous êtes en train d'utiliser, sauf si les numéros de lot sont identiques.
- Évitez la contamination microbienne des réactifs de la trousse.
- Pour être protégés contre des matériaux potentiellement infectieux, nous recommandons de travailler sous écoulement d'air laminaire jusqu'à la fin de la lyse des échantillons.
- Cette trousse doit uniquement être utilisée par du personnel formé aux pratiques de laboratoire de diagnostic in vitro.

Préparation des réactifs et tampons

Buffer AW1* (conserver à température ambiante, 15–25 °C)

Le Buffer AW1 est fourni sous forme de concentré. Avant la première utilisation, ajoutez la quantité appropriée d'éthanol (96–100 %) comme indiqué sur le flacon. Le Buffer AW1 reconstitué est stable pendant 1 an lorsqu'il est conservé fermé à température ambiante (15–25 °C), mais seulement jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

Remarque : Mélangez toujours le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué en retournant le flacon plusieurs fois avant de commencer la procédure.

Buffer AW2† (conserver à température ambiante 15–25 °C)

Le Buffer AW2 est fourni sous forme de concentré. Avant la première utilisation, ajoutez la quantité appropriée d'éthanol (96–100 %) au concentré de Buffer AW2 comme indiqué sur le flacon. Le Buffer AW2 reconstitué est stable pendant 1 an lorsqu'il est conservé fermé à température ambiante (15–25 °C), mais seulement jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

Remarque : Mélangez toujours le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué en retournant le flacon plusieurs fois avant de commencer la procédure.

* Contient un sel chaotrope. Prenez les mesures de sécurité de laboratoire appropriées et portez des gants lors de la manipulation.

Non compatible avec les agents de désinfection contenant du javellisant. Voir page 14 pour connaître les Warnings and Precautions.

† Contient de l'azotate de sodium comme conservateur.

Quantité de matériel de départ

Utilisez la quantité de matériel de départ indiquée dans le Tableau 1.

Tableau 1. Quantité de matériel de départ pour les procédures QIAamp Mini

Échantillon	Quantité
Sang, plasma, sérum	200 µl
Couche leucocytaire	200 µl
Tissus	25 mg*
Cellules (diploïdes)	5 x 10 ⁶ cellules

* Pour isoler l'ADN de la rate, des échantillons de 10 mg doivent être utilisés.

Préparation de la couche leucocytaire

La couche leucocytaire est une fraction de sang total enrichie en leucocytes. La préparation d'une fraction de couche leucocytaire à partir de sang total est simple et produit environ 5–10 fois plus d'ADN qu'un volume équivalent de sang total.

La préparation de la couche leucocytaire se fait par centrifugation du sang total à environ 2500 x g pendant 10 minutes ± 1 minute à température ambiante. Après la centrifugation, on peut distinguer 3 fractions différentes : la couche supérieure transparente est le plasma, la couche intermédiaire est la couche leucocytaire, contenant des leucocytes concentrés, et la couche inférieure contient des érythrocytes concentrés.

Manipulation des colonnes QIAamp Mini

En raison de la sensibilité des technologies d'amplification des acides nucléiques, il est nécessaire de prendre les précautions suivantes lors de la manipulation des colonnes QIAamp Mini afin d'éviter toute contamination croisée entre les préparations d'échantillons :

- Transférer avec précaution l'échantillon ou la solution vers la colonne QIAamp Mini. Déposer l'échantillon dans la colonne QIAamp Mini à l'aide d'une pipette sans mouiller le bord de la colonne.
- Changer systématiquement les embouts de pipette entre les transferts de liquides. Nous recommandons l'utilisation d'embouts de pipette équipées d'un dispositif anti-aérosols.
- Éviter de toucher la membrane de la colonne QIAamp Mini avec l'embout de pipette.
- Après toutes les étapes d'agitation, centrifuger les tubes de microcentrifugation par petites impulsions afin de retirer les gouttes présentes sur l'intérieur des couvercles.
- Ouvrir une seule colonne QIAamp Mini à la fois et prendre garde à ne pas générer d'aérosols.
- Porter des gants durant toute la procédure. En cas de contact entre l'échantillon et les gants, changer de gants immédiatement.

Centrifugation

Toutes les étapes de centrifugation doivent être effectuées à température ambiante (15–25 °C).

La centrifugation des colonnes QIAamp Mini est effectuée à environ 6000 x g afin de réduire le bruit de la centrifugeuse. La centrifugation à pleine vitesse n'affectera pas le rendement de l'ADN. La centrifugation à des vitesses inférieures est également acceptable, à condition que la quasi-totalité de chaque solution soit transférée à travers la membrane QIAamp.

Lors de la préparation d'ADN à partir de la couche leucocytaire ou de lymphocytes, la centrifugation à pleine vitesse est recommandée pour éviter l'encrassement.

Traitement des colonnes QIAamp Mini à l'aide d'une microcentrifugeuse (protocoles de centrifugation)

Fermez la colonne QIAamp Mini avant de la placer dans la microcentrifugeuse. Centrifugez tel que décrit ci-dessus.

- Retirez la colonne QIAamp Mini et le tube de prélèvement de la microcentrifugeuse. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de prélèvement neuf. Jetez le filtrat et le tube de prélèvement. Veuillez noter que le filtrat peut contenir des déchets dangereux et qu'il doit être éliminé de manière appropriée.
- Ouvrez une seule colonne QIAamp Mini à la fois et prenez garde à ne pas générer d'aérosols.
- Pour un traitement efficace de plusieurs échantillons en parallèle, remplissez un portoir avec les tubes de prélèvement auxquels les colonnes QIAamp Mini peuvent être transférées après centrifugation. Les tubes de prélèvement utilisés contenant le filtrat peuvent être éliminés, et les nouveaux tubes de prélèvement contenant les colonnes QIAamp Mini peuvent être placés directement dans la microcentrifugeuse.

QIAvac 24 Plus

Le QIAvac 24 Plus est conçu pour le traitement sous vide rapide et efficace de jusqu'à 24 colonnes de centrifugation QIAGEN en parallèle. Les échantillons et les solutions de lavage sont aspirés à travers les membranes des colonnes par dépression au lieu d'être centrifugés, ce qui permet une plus grande rapidité et une réduction du temps de manipulation dans les procédures de purification.

En combinaison avec le système de connexion QIAvac (en option), le QIAvac 24 Plus peut être utilisé comme un système traversant. L'échantillon ayant traversé la colonne est recueilli dans une bouteille de déchets distincte.

Pour l'entretien du QIAvac 24 Plus, reportez-vous aux directives de manipulation du *Manuel du QIAvac 24 Plus*.

Traitement des colonnes QIAamp Mini sur le QIAvac 24 Plus (protocoles de dépression)

Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini sont traitées sur le QIAvac 24 Plus en utilisant les VacConnectors jetables et les VacValves réutilisables. Les VacValves (en option) sont insérées directement dans les fentes luer du collecteur QIAvac 24 Plus et assurent un débit régulier, facilitant le traitement parallèle d'échantillons de différentes natures (p. ex. sang et fluides corporels), volumes ou viscosités. Elles doivent être utilisées si les débits des échantillons diffèrent de façon importante afin d'assurer un vide constant. Les VacConnectors sont des connecteurs jetables qui s'adaptent entre les colonnes QIAamp Mini et les VacValves ou entre les colonnes QIAamp Mini et les fentes luer du QIAvac 24 Plus. Ils empêchent le contact direct entre la colonne de centrifugation et la VacValve pendant la purification et réduisent le risque de contamination croisée entre les échantillons. Les VacConnectors sont jetés après une seule utilisation.

Directives de manipulation du QIAvac 24 Plus

- Placez toujours le QIAvac 24 Plus sur une paillasse ou une surface de travail sécurisée. En cas de chute, le collecteur du QIAvac 24 Plus peut se fissurer.
- Rangez toujours le QIAvac 24 Plus dans un endroit propre et sec. Pour les procédures de nettoyage, consultez le *Manuel du QIAvac 24 Plus*.
- Les composants du QIAvac 24 Plus ne sont pas résistants à certains solvants (Tableau 2). Si ces solvants sont renversés sur l'unité, rincez-la abondamment à l'eau.
- Pour garantir une performance constante, n'appliquez pas de silicone ou de graisse pour vide sur aucune partie du collecteur QIAvac 24 Plus.
- Faites toujours preuve de prudence et portez des lunettes de sécurité lorsque vous travaillez à proximité d'un collecteur à vide sous pression.
- Contactez les services techniques QIAGEN ou votre distributeur local pour obtenir des informations sur les pièces de rechange.

- La dépression est la différence de pression entre l'intérieur du collecteur à vide et l'atmosphère (pression atmosphérique standard 1 013 millibar ou 760 mm Hg) et peut être mesurée en utilisant le système de connexion QIAvac ou un régulateur de vide (voir la Figure 1). Le protocole de dépression exige une pompe à vide capable de produire un vide de -800 à -900 mbar (p. ex. QIAGEN, Vacuum Pump). Les dépressions plus élevées doivent être évitées. L'utilisation de dépressions inférieures à celles recommandées peut réduire le rendement et la pureté de l'ADN et augmenter la fréquence des membranes obstruées.

Tableau 2. Propriétés de résistance chimique du QIAvac 24 Plus

Résistant à :		Non résistant à :
Acide acétique	Sels chaotropiques	Benzène
Acide chromique	Alcools concentrés	Phénol
SDS	Chlorure de sodium	Chloroforme
Tween® 20	Urée	Toluène
Javellisant	Acide chlorhydrique	Éthers
Hydroxyde de sodium		

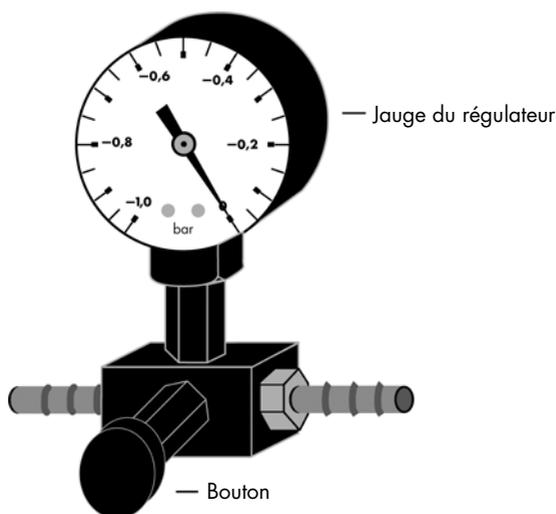


Figure 4. Schéma du régulateur de vide.

Configuration du collecteur à vide QIAvac 24 Plus

1. Connectez le QIAvac 24 Plus à une source de vide. Si vous utilisez le système de connexion QIAvac, connectez le système au collecteur et à la source de vide comme décrit dans l'« Annexe A » du *manuel du QIAvac 24 Plus*.
2. **Recommandé** : Insérez une VacValve dans chaque fente luer du QIAvac 24 Plus qui doit être utilisé (voir la Figure 4).

Les VacValves doivent être utilisées si les débits des échantillons diffèrent de façon importante afin d'assurer un vide constant.

3. Insérez un VacConnector dans chaque VacValve (voir la Figure 4).
Effectuez cette étape juste avant de commencer la purification pour éviter d'exposer les VacConnectors à des contaminants potentiels dans l'air.
4. Placez les colonnes QIAamp Mini dans les VacConnectors sur le collecteur (voir la Figure 4).
5. Si nécessaire, insérez un tube d'extension dans chaque colonne QIAamp Mini (voir la Figure 5).

Les tubes d'extension sont nécessaires pour le traitement des écouillons buccaux ou de grands volumes.

6. Pour la purification des acides nucléiques, suivez les instructions des protocoles de dépression. Jetez les VacConnectors de manière appropriée après utilisation.
Laissez le couvercle de la colonne QIAamp Mini ouvert pendant l'application de la dépression. Arrêtez la pompe à vide entre chaque étape pour assurer l'application d'un vide homogène pendant le traitement. Pour évacuer plus rapidement le vide, il convient d'utiliser un régulateur de vide (voir la Figure 3).

Remarque : Chaque VacValve peut être fermée séparément quand l'échantillon est complètement passé à travers la colonne de centrifugation, ce qui permet de traiter en parallèle des échantillons de différents volumes ou viscosités.

7. Après le traitement des échantillons, nettoyez le QIAvac 24 Plus (voir la section « Nettoyage et décontamination du QIAvac 24 Plus » dans le *manuel du QIAvac 24 Plus*).

Remarque : Les tampons AL et AW1 utilisés dans les procédures QIAamp DSP DNA Mini ne sont pas compatibles avec les agents désinfectants contenant de la Javel. Voir page 15 pour connaître les Avertissements et précautions.

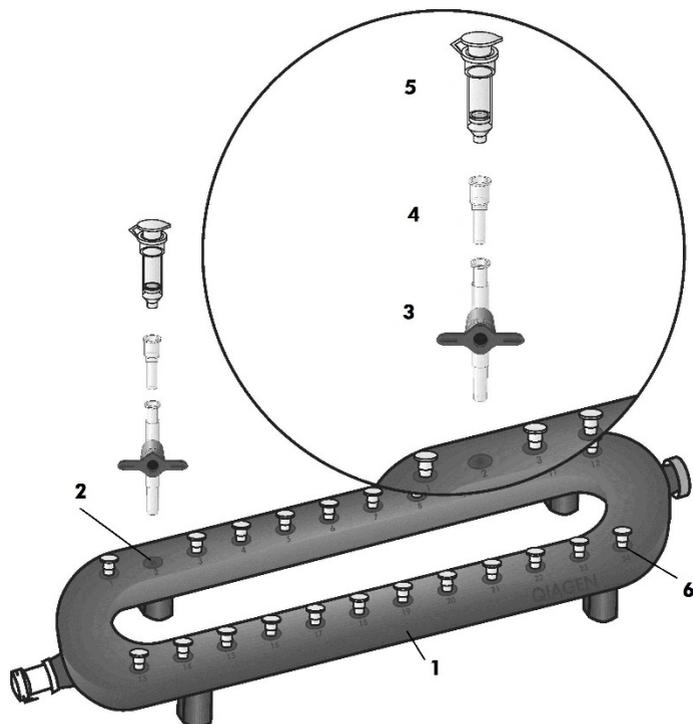


Figure 5. Configuration du QIAvac 24 Plus avec les colonnes QIAamp Mini en utilisant des VacValves et des VacConnectors.

1. Collecteur à vide QIAvac 24 Plus
2. Fente luer du QIAvac 24 Plus

4. VacConnector*
5. Colonne QIAamp

6. Fente luer fermée par un bouchon luer

* À acheter séparément.

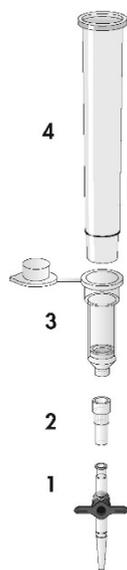


Figure 6. Assemblage des colonnes QIAamp Mini avec les tubes d'extension (pour écouvillons buccaux ou les volumes importants)

1. VacValve*

2. VacConnector*

* À acheter séparément.

3. Colonne QIAamp Mini

4. Tube d'extension*

Traitement des colonnes QIAamp Mini sur le QIAcube

La préparation des échantillons à l'aide du QIAcube suit les mêmes étapes que la procédure manuelle (c.-à-d. lyse, liaison, lavage et élution). Pour plus d'informations sur la procédure automatisée, reportez-vous à la fiche de protocole correspondante disponible à l'adresse www.qiagen.com/qiacubeprotocols.

Copurification de l'ARN

Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini copurifient l'ADN et l'ARN lorsque les deux sont présents dans l'échantillon. Si de l'ADN génomique sans ARN est requis, ajoutez 4 µl d'une solution mère de RNase A (100 mg/ml) à l'échantillon avant d'ajouter le tampon AL. La RNase A n'est pas fournie avec les trousse et doit être achetée séparément (voir la section Matériel nécessaire, mais non fourni, page 13). La RNase A utilisée doit être exempte d'activité DNase.

Protocole : Purification de l'ADN du sang ou des fluides corporels à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx

Ce protocole s'applique à la purification de l'ADN total (génomique, mitochondrial et viral) du sang total, du plasma, du sérum, de la couche leucocytaire, des lymphocytes et des fluides corporels à l'aide d'une microcentrifugeuse ou par automatisation sur les instruments QIAcube ou QIAcube Connect MDx. Pour la purification de l'ADN total à l'aide d'un collecteur à vide, voir la section Protocole : Purification de l'ADN du sang ou des fluides corporels (protocole de dépression), page 32.

Remarques importantes avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.
- Le traitement automatisé de 2–10 ou 12 échantillons peut être effectué sur les instruments QIAcube.
- Pour l'automatisation, suivez les instructions figurant dans les fiches de protocole (QIAcube) ou sur l'écran du logiciel (QIAcube Connect MDx) et le *manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx*.

Étapes à suivre avant de commencer

- Équilibrez les échantillons à température ambiante.
- Préchauffez un bain-marie ou un bloc chauffant à 56 °C. Il sera utilisé à l'étape 4.
- Équilibrez le tampon d'élution (AE) à température ambiante. Il sera utilisé à l'étape 11.
- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer AL par incubation à 56 °C ± 3 °C.

Procédure

- Pour la procédure manuelle avec une microcentrifugeuse, suivez les étapes 1 – 11.
- Cette procédure peut être automatisée en deux versions différentes :
 - Standard : automatisation complète à partir de l'étape 1
 - Lyse manuelle : partiellement automatisée avec lyse manuelle externe (à partir de l'étape 5)

1. Pipetez 20 µl de protéinase K au fond du tube de lyse.
2. Ajoutez 200 µl d'échantillon au tube de lyse. Utilisez jusqu'à 200 µl de sang total, plasma, sérum, couche leucocytaire ou fluides corporels, ou jusqu'à 5×10^6 lymphocytes dans 200 µl de PBS.

Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini copurifient l'ADN et l'ARN lorsque les deux sont présents dans l'échantillon. Si de l'ADN génomique sans ARN est requis, ajoutez 4 µl d'une solution mère de RNase A (100 mg/ml) à l'échantillon avant d'ajouter le Buffer AL.

Remarque : Il est possible d'ajouter de la protéinase K aux échantillons qui ont déjà été distribués dans des tubes de microcentrifugation. Dans ce cas, il est important de bien mélanger après l'ajout de l'enzyme.

3. Ajoutez 200 µl de Buffer AL à l'échantillon. Mélangez au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 s.

Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le Buffer AL soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène.

Remarque : N'ajoutez pas de protéinase K directement au Buffer AL.

4. Incubez à $56 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ pendant $10 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$.
5. Centrifugez brièvement le tube de microcentrifugation de 1,5 ml pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.

Remarque : Si la lyse manuelle (étapes 1 – 5) a été effectuée de façon externe, les étapes suivantes (étapes 6 – 11) peuvent être automatisées sur l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx en suivant les instructions figurant sur l'écran de l'instrument pour le protocole : Lyse manuelle Sang ou Fluides corporels.

6. Ajoutez 200 µl d'éthanol (96–100 %) à l'échantillon, et mélangez au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 s. Après avoir mélangé, centrifugez brièvement le tube de microcentrifugation de 1,5 ml pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
7. Appliquez avec précaution la solution récupérée à l'étape 6 sur la colonne QIAamp Mini (dans un tube de prélèvement de 2 ml) sans mouiller le bord. Fermez le couvercle et centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml (fourni) et mettez le tube contenant le filtrat au rebut. Fermez chaque colonne de centrifugation afin d'éviter la formation d'aérosols pendant la centrifugation.

La centrifugation est effectuée à environ 6000 x g afin de réduire le bruit de la centrifugeuse. La centrifugation à pleine vitesse n'affectera pas le rendement ou la pureté de l'ADN. Si le lysat n'a pas complètement traversé la colonne après centrifugation, centrifugez une nouvelle fois à une vitesse plus élevée jusqu'à ce que la colonne QIAamp Mini soit vide.

Remarque : Lors de la préparation d'ADN à partir de la couche leucocytaire ou de lymphocytes, la centrifugation à pleine vitesse est recommandée pour éviter l'encrassement.

8. Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 500 µl de Buffer AW1 sans mouiller le bord. Fermez le couvercle et centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml (fourni) et mettez le tube contenant le filtrat au rebut.*
9. Ouvrez avec précaution la colonne QIAamp Mini et ajoutez 500 µl de Buffer AW2 sans mouiller le bord. Fermez le bouchon et centrifugez à pleine vitesse (environ 20 000 x g) pendant 3 min \pm 30 s.
10. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml et jetez l'ancien tube de prélèvement contenant le filtrat. Centrifugez à pleine vitesse pendant ≥ 1 min.

* La solution ayant traversé la colonne contient le Buffer AL ou le Buffer AW1 et n'est donc pas compatible avec du javellisant. Voir page 14 pour connaître les Warnings and Precautions.

Cette étape permet de réduire le risque d'un éventuel transfert de Buffer AW2.

11. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube d'éluion (fourni) et jetez le tube de prélèvement contenant le filtrat. Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 200 µl de tampon d'éluion (AE). Incubez à température ambiante pendant 1 min, puis centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min.

Remarque importante : En cas d'automatisation des procédures, retirez les éluats de l'instrument directement après la fin de l'analyse et stockez-les correctement.

Protocole : Purification de l'ADN du sang ou des fluides corporels (protocole de dépression)

Ce protocole s'applique à la purification de l'ADN total (génomique, mitochondrial et viral) du sang total, du plasma, du sérum, des lymphocytes et des fluides corporels à l'aide du QIAvac 24 Plus ou d'un collecteur à vide équivalent. Pour la purification de l'ADN total à l'aide d'une microcentrifugeuse, voir la section Protocole : Purification de l'ADN du sang ou des fluides corporels à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx, page 28.

Remarques importantes avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.
- Pour la configuration du QIAvac 24 Plus, voir la page 25.
- Arrêtez la pompe à vide entre chaque étape pour assurer l'application d'un vide homogène pendant toutes les étapes du protocole.

Étapes à suivre avant de commencer

- Équilibrez les échantillons à température ambiante.
- Préchauffez un bain-marie ou un bloc chauffant à 56 °C. Il sera utilisé à l'étape 4.
- Équilibrez le tampon d'éluion (AE) à température ambiante. Il sera utilisé à l'étape 11.
- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer AL par incubation à 56 °C ± 3 °C.

Procédure

1. Pipetez 20 µl de protéinase K au fond du tube de lyse.
2. Ajoutez 200 µl d'échantillon au tube de lyse. Utilisez jusqu'à 200 µl de sang total, plasma, sérum ou fluides corporels, ou jusqu'à 5 x 10⁶ lymphocytes dans 200 µl de PBS.

Si le volume de l'échantillon est inférieur à 200 µl, ajoutez le volume approprié de PBS. Les colonnes QIAamp Mini copurifient l'ADN et l'ARN lorsque les deux sont présents dans l'échantillon. L'ARN peut inhiber certaines réactions enzymatiques en aval, mais pas la PCR. Si de l'ADN génomique sans ARN est requis, ajoutez 4 µl d'une solution mère de RNase A (100 mg/ml) à l'échantillon avant d'ajouter le Buffer AL.

Remarque : Il est possible d'ajouter de la protéinase K aux échantillons qui ont déjà été distribués dans des tubes de microcentrifugation. Dans ce cas, il est important de bien mélanger après l'ajout de l'enzyme.

3. Ajoutez 200 µl de Buffer AL à l'échantillon. Mélangez au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 s.

Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le Buffer AL soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène.

Remarque : N'ajoutez pas de protéinase K directement au Buffer AL.

4. Incubez à $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant $10\text{ min} \pm 1\text{ min}$.
5. Centrifugez brièvement le tube de microcentrifugation de 1,5 ml pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
6. Ajoutez 200 µl d'éthanol (96–100 %) à l'échantillon, et mélangez de nouveau au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 s. Après avoir mélangé, centrifugez brièvement le tube de microcentrifugation de 1,5 ml pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
7. Insérez la colonne QIAamp Mini dans le VacConnector sur le collecteur à vide QIAvac. Déposez avec précaution le mélange récupéré à l'étape 6 dans la colonne QIAamp Mini sans mouiller le bord. Mettez en marche la pompe à vide. Veillez à laisser couvercle de la colonne QIAamp Mini ouvert pendant l'application de la dépression. Une fois que tous les lysats sont passés à travers la colonne de centrifugation, arrêtez la pompe à vide.

Le tube de prélèvement du blister peut être conservé pour la centrifugation à l'étape 10.

Si, à ce stade, toute la solution n'est pas complètement passée à travers la membrane, placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de prélèvement propre de 2 ml (fourni), fermez le bouchon et centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 3 min ou jusqu'à ce que tout le liquide soit entièrement passé à travers la membrane. Placez la colonne QIAamp Mini dans un autre tube de prélèvement propre de 2 ml et jetez le tube contenant le filtrat. * Passez l'étape 8 du protocole pour la microcentrifugeuse, page 30.

8. Déposez avec précaution 750 μ l de Buffer AW1 dans la colonne QIAamp Mini sans mouiller le bord. Laissez le couvercle de la colonne QIAamp Mini ouvert et mettez en marche la pompe à vide.

Une fois que tout le Buffer AW1 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, arrêtez la pompe à vide.

9. Ajoutez 750 μ l de Buffer AW2 sans mouiller le bord de la colonne QIAamp Mini. Laissez le couvercle de la colonne QIAamp Mini ouvert et mettez en marche la pompe à vide. Une fois que tout le tampon AW2 est passé à travers la colonne QIAamp Mini, arrêtez la pompe à vide.
10. Fermez le couvercle de la colonne QIAamp Mini, retirez-la du collecteur à vide et jetez le VacConnector. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml et centrifugez à environ 20 000 x g pendant ≥ 1 min pour sécher la membrane complètement.
11. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube d'élution (fourni). Jetez le tube de prélèvement contenant le filtrat. Ouvrez avec précaution la colonne QIAamp Mini. Ajoutez 200 μ l de tampon d'élution (AE) amené à température ambiante. Incubez à température ambiante pendant 1 min, puis centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min.

* La solution ayant traversé la colonne contient le Buffer AL ou le Buffer AW1 et n'est donc pas compatible avec du javellisant.

Protocole : Purification de l'ADN des tissus à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx

Pour la purification de l'ADN total (génomique, mitochondrial et viral) des tissus en utilisant une microcentrifugeuse ou par automatisation sur le QIAcube/QIAcube Connect MDx

Remarques importantes avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.
- Évitez de soumettre les échantillons stockés à des cycles de congélation et décongélation répétés car cela entraîne une réduction de la taille de l'ADN.
- Les tissus transcriptionnellement actifs, tels que le foie et les reins, contiennent des niveaux élevés d'ARN, qui sera copurifié avec l'ADN génomique. L'ARN peut inhiber certaines réactions enzymatiques en aval, mais n'inhibera pas la PCR. Si de l'ADN génomique sans ARN est requis, incluez la digestion de la RNase A, comme décrit dans l'étape 5a du protocole.
- Le traitement automatisé de 2–10 ou 12 échantillons peut être effectué sur les instruments QIAcube ou QIAcube Connect MDx.
- Pour l'automatisation, suivez les instructions figurant dans les fiches de protocole (QIAcube) ou sur l'écran du logiciel (QIAcube Connect MDx) et le *manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx*.

Étapes à suivre avant de commencer

- Équilibrez l'échantillon à température ambiante.
- Préchauffez 2 bains-marie ou blocs chauffants : un à 56 °C à utiliser à l'étape 3 et l'autre à 70 °C à utiliser à l'étape 5.
- Équilibrez le tampon d'élution (AE) à température ambiante. Il sera utilisé à l'étape 11.

- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer ATL ou le Buffer AL par incubation à $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Procédure

- Pour la procédure manuelle avec une microcentrifugeuse, suivez les étapes 1 – 12.
 - Cette procédure peut être partiellement automatisée à partir de l'étape 5b.
1. Excisez l'échantillon de tissu ou retirez-le du stockage. Déterminez la quantité de tissu. N'utilisez pas plus de 25 mg (10 mg de rate).

La pesée des tissus est le moyen le plus précis de déterminer la quantité.

Si l'ADN est préparé à partir de tissus de la rate, il convient de ne pas en utiliser plus de 10 mg.

Le rendement de l'ADN dépendra à la fois de la quantité et du type de tissu traité.
 2. Découpez (étape 2a), broyez (étape 2b) ou perturbez mécaniquement (étape 2c) l'échantillon de tissu.

La procédure QIAamp ne nécessite pas de perturbation mécanique de l'échantillon de tissu, mais la durée de la lyse sera réduite si l'échantillon est préalablement broyé à l'azote liquide (étape 2b) ou homogénéisé mécaniquement (étape 2c).

 - 2a. Découpez jusqu'à 25 mg de tissu (jusqu'à 10 mg de rate) en petits morceaux. Placez-les dans le tube de lyse, et ajoutez 180 µl de Buffer ATL. Passez à l'étape 3. Il est important de découper le tissu en petits morceaux pour diminuer la durée de la lyse.
 - 2b. Placez jusqu'à 25 mg de tissu (10 mg de rate) dans de l'azote liquide, et broyez-le soigneusement avec un mortier et un pilon. Laissez décanter la poudre de tissu et l'azote liquide dans le tube de lyse. Laissez l'azote liquide s'évaporer (ne laissez pas le tissu décongeler) et ajoutez 180 µl de Buffer ATL. Passez à l'étape 3.

- 2c. Ajoutez jusqu'à 25 mg de tissu (10 mg de rate) dans le tube de lyse contenant au maximum 80 µl de PBS. Homogénéisez l'échantillon à l'aide du TissueRuptor ou d'un homogénéisateur rotor-stator équivalent. Ajoutez 100 µl de Buffer ATL, puis passez à l'étape 3.

Certains tissus nécessitent un Buffer ATL non dilué pour une lyse complète. Dans ce cas, il est recommandé d'effectuer un broyage à l'azote liquide. Les échantillons ne peuvent pas être homogénéisés directement dans le tampon ATL, qui contient du détergent.

3. Ajoutez 20 µl de protéinase K, mélangez au vortex et incubez à $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ jusqu'à ce que le tissu soit complètement lysé. Mélangez au vortex de temps à autre pendant l'incubation pour disperser l'échantillon, ou placez-le dans un bain-marie vibrant ou sur une plate-forme à bascule.

La durée de la lyse varie en fonction du type de tissu traité. La lyse est généralement terminée en 1–3 h. Une lyse effectuée de nuit est possible et n'influence pas la préparation. Afin d'assurer une lyse efficace, il convient d'utiliser un bain-marie vibrant ou une plate-forme à bascule. Si ce n'est pas possible, il est recommandé de mélanger au vortex 2–3 fois par heure pendant l'incubation.

4. Centrifugez brièvement le tube de lyse pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
5. Si de l'ADN génomique sans ARN est requis, suivez l'étape 5a. Sinon, suivez l'étape 5b.

Les tissus transcriptionnellement actifs, tels que le foie et les reins, contiennent des niveaux élevés d'ARN, qui sera copurifié avec l'ADN génomique. L'ARN peut inhiber certaines réactions enzymatiques en aval, mais n'inhibera pas la PCR.

- 5a. Ajoutez 4 µl de RNase A (100 mg/ml), mélangez au vortex par petites impulsions pendant $\geq 15\text{ s}$, et incubez pendant $2\text{ min} \pm 30\text{ s}$ à température ambiante. Centrifugez brièvement le tube de lyse pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle avant d'ajouter 200 µl de Buffer AL à l'échantillon. Mélangez à nouveau au vortex par petites impulsions pendant $\geq 15\text{ s}$, et incubez à $70\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ pendant $10\text{ min} \pm 1\text{ min}$. Centrifugez brièvement le tube de lyse pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.

Il est primordial que l'échantillon et le Buffer AL soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène.

Un précipité blanc peut se former lors de l'ajout du Buffer AL. Dans la plupart des cas, il se dissoudra pendant l'incubation à $70\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Le précipité n'interfère pas avec la procédure QIAamp ni avec aucune application ultérieure.

Remarque : Les étapes suivantes (étapes 5b–12) peuvent être automatisées sur l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx. Pour l'instrument QIAcube Connect MDx, suivez les instructions sur l'écran de l'instrument pour le protocole : Tissus_Standard

- 5b. Ajoutez 200 µl de Buffer AL à l'échantillon, mélangez au vortex par petites impulsions pendant $\geq 15\text{ s}$, et incubez à $70\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ pendant $10\text{ min} \pm 1\text{ min}$. Centrifugez brièvement le tube de lyse pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.

Il est primordial que l'échantillon et le Buffer AL soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène.

Un précipité blanc peut se former lors de l'ajout du Buffer AL. Dans la plupart des cas, il se dissoudra pendant l'incubation à $70\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Le précipité n'interfère pas avec la procédure QIAamp ni avec aucune application ultérieure.

Remarque : Les étapes suivantes (étapes 6–12) peuvent être automatisées sur l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx.

6. Ajoutez 200 µl d'éthanol (96–100 %) à l'échantillon, et mélangez au vortex par petites impulsions pendant $\geq 15\text{ s}$. Après avoir mélangé, centrifugez brièvement le tube de lyse pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.

Il est primordial que l'échantillon, le Buffer AL et l'éthanol soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène.

Un précipité blanc peut se former lors de l'ajout de l'éthanol. Il est primordial d'appliquer l'ensemble du précipité sur la colonne de centrifugation QIAamp Mini. Ce précipité n'interfère pas avec la procédure QIAamp ni avec aucune application ultérieure.

N'utilisez pas d'alcools autres que l'éthanol, car cela pourrait diminuer le rendement.

- Appliquez avec précaution la solution récupérée à l'étape 6 (y compris le précipité) sur la colonne de centrifugation QIAamp Mini (dans un tube de lavage de 2 ml) sans mouiller le bord. Fermez le couvercle et centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml (fourni) et mettez le tube contenant le filtrat au rebut.*

Fermez chaque colonne de centrifugation afin d'éviter la formation d'aérosols pendant la centrifugation.

Il est primordial d'appliquer l'ensemble du précipité sur la colonne de centrifugation QIAamp Mini.

La centrifugation est effectuée à environ 6000 x g afin de réduire le bruit. La centrifugation à pleine vitesse n'affectera pas le rendement ou la pureté de l'ADN. Si la solution n'est pas entièrement passée à travers la membrane, centrifugez à nouveau à une vitesse plus élevée jusqu'à ce que toute la solution soit passée à travers celle-ci.

- Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 500 μ l de Buffer AW1 sans mouiller le bord. Fermez le couvercle et centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml (fourni) et mettez l'ancien tube contenant le filtrat au rebut.
- Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 500 μ l de tampon de Buffer AW2 sans mouiller le bord. Fermez le bouchon et centrifugez à pleine vitesse (environ 20 000 x g) pendant 3 min \pm 30 s.
- Recommandé** : Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de prélèvement propre de 2 ml (fourni) et jetez l'ancien tube de prélèvement contenant le filtrat. Centrifugez à pleine vitesse pendant ≥ 1 min.

Cette étape permet de réduire le risque d'un éventuel transfert de Buffer AW2.

* La solution ayant traversé la colonne contient le Buffer AL ou le Buffer AW1 et n'est donc pas compatible avec du javellisant. Voir page 14 pour connaître les Warnings and Precautions.

11. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube d'éluion de 1,5 ml propre et jetez le tube de prélèvement contenant le filtrat. Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 200 µl de tampon d'éluion (AE). Incubez à température ambiante pendant ≥ 1 min, puis centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min.

12. Répétez l'étape 11.

Remarque importante : En cas d'automatisation des procédures, retirez les éluats de l'instrument directement après la fin de l'analyse et stockez-les correctement.

Protocole : Purification de l'ADN d'écouvillons buccaux (protocole de centrifugation)

Ce protocole s'applique à la purification de l'ADN total (génomique, mitochondrial et viral) d'écouvillons buccaux à l'aide d'une microcentrifugeuse. Pour la purification de l'ADN total à l'aide d'un collecteur à vide, voir la section Protocole : Purification de l'ADN d'écouvillons buccaux (protocole de dépression), page 44.

Remarques importantes avant de commencer

- En raison du volume accru de Buffer AL nécessaire pour le protocole pour écouvillons buccaux, il est possible d'effectuer moins de préparations.
- Ce protocole est recommandé pour les types d'écouvillons suivants : C.E.P. (Omni Swabs de Whatman® Bioscience), coton et DACRON (applicateurs Daigger, Puritan® avec bâtonnet en plastique et embout en coton ou DACRON de Hardwood Products Company ou de Hain Diagnostika).
- Pour prélever un échantillon, frottez fermement l'écouvillon contre l'intérieur de chaque joue 6 fois. Faites sécher l'écouvillon à l'air libre pendant au moins 2 h après le prélèvement. Assurez-vous que la personne qui fournit l'échantillon n'a pas consommé de nourriture ou de boisson dans les 30 minutes précédant le prélèvement de l'échantillon.
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.

Étapes à suivre avant de commencer

- Préparez un bain-marie à $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ pour l'étape 3.
- Équilibrez le tampon d'élution (AE) à température ambiante. Il sera utilisé à l'étape 9.
- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer AL par incubation à $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Procédure

1. Placez un écouvillon buccal dans le tube de lyse de 2 ml. Ajoutez 400 µl (écouvillon en DACRON et coton) ou 600 µl (Omni Swab) de PBS à l'échantillon.

L'Omni Swab est éjecté dans le tube en pressant l'extrémité de la tige en direction de l'écouvillon. Les écouvillons en DACRON ou coton sont séparés du bâtonnet à la main ou avec des ciseaux. Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini copurifient l'ADN et l'ARN lorsque les deux sont présents dans l'échantillon. L'ARN peut inhiber certaines réactions enzymatiques en aval, mais pas la PCR. Si de l'ADN génomique sans ARN est requis, ajoutez 4 µl d'une solution mère de RNase A (100 mg/ml) à l'échantillon avant d'ajouter le Buffer AL.

2. Ajoutez 20 µl de protéinase K et 400 µl (écouvillon en DACRON ou coton) ou 600 µl (Omni Swab) de Buffer AL à l'échantillon. Mélangez immédiatement au vortex pendant ≥ 15 s.

Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le Buffer AL soient mélangés soigneusement et immédiatement.

Remarque : N'ajoutez pas de protéinase K directement au Buffer AL.

3. Incubez à $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ pendant $10\text{ min} \pm 1\text{ min}$. Centrifugez brièvement pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
4. Ajoutez 400 µl (écouvillon en DACRON ou coton) ou 600 µl (Omni Swab) d'éthanol (96–100 %) à l'échantillon, et mélangez de nouveau au vortex. Centrifugez brièvement pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
5. Appliquez avec précaution 700 µl de la solution récupérée à l'étape 4 sur la colonne de centrifugation QIAamp Mini (dans un tube de lavage de 2 ml) sans mouiller le bord. Fermez le couvercle et centrifugez à environ $6000 \times g$ pendant ≥ 1 min. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml (fourni) et mettez le tube contenant le filtrat au rebut.*

Fermez chaque colonne de centrifugation afin d'éviter la formation d'aérosols pendant la centrifugation.

* La solution ayant traversé la colonne contient le Buffer AL ou le Buffer AW1 et n'est donc pas compatible avec du javellisant. Voir page 14 pour connaître les Warnings and Precautions.

6. Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 500 µl de Buffer AW1 sans mouiller le bord. Fermez le couvercle et centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml (fourni) et mettez le tube contenant le filtrat au rebut.*
7. Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 500 µl de Buffer AW2 sans mouiller le bord. Fermez le bouchon et centrifugez à pleine vitesse (environ 20 000 x g) pendant 3 min \pm 30 s.
8. **Recommandé** : Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml et jetez l'ancien tube de prélèvement contenant le filtrat. Centrifugez à pleine vitesse pendant ≥ 1 min.
Cette étape permet de réduire le risque d'un éventuel transfert de Buffer AW2.
9. Placez la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube d'élution (ET) (fourni). Jetez le tube de lavage contenant le filtrat. Ouvrez avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini et ajoutez 150 µl de tampon d'élution (AE). Incubez à température ambiante pendant ≥ 1 min, puis centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min.

* La solution ayant traversé la colonne contient le Buffer AL ou le Buffer AW1 et n'est donc pas compatible avec du javellisant. Voir page 14 pour connaître les Warnings and Precautions.

Protocole : Purification de l'ADN d'écouillons buccaux (protocole de dépression)

Ce protocole s'applique à la purification de l'ADN total (génomique, mitochondrial et viral) d'écouillons buccaux à l'aide d'une microcentrifugeuse. Pour la purification de l'ADN total à l'aide d'un collecteur à vide, voir la section Protocole : Purification de l'ADN d'écouillons buccaux (protocole de centrifugation), page 41.

Remarques importantes avant de commencer

- En raison du volume accru de Buffer AL nécessaire pour le protocole pour écouillons buccaux, il est possible d'effectuer moins de préparations.
- Ce protocole est recommandé pour les types d'écouillons suivants : C.E.P. (Omni Swabs de Whatman Bioscience), coton et DACRON (applicateurs Daigger, Puritan avec bâtonnet en plastique et embout en coton ou DACRON de Hardwood Products Company ou de Hain Diagnostika).
- Pour prélever un échantillon, frottez fermement l'écouillon contre l'intérieur de chaque joue 6 fois. Faites sécher l'écouillon à l'air libre pendant au moins 2 h après le prélèvement. Assurez-vous que la personne qui fournit l'échantillon n'a pas consommé de nourriture ou de boisson dans les 30 minutes précédant le prélèvement de l'échantillon.
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.
- Pour la configuration du QIAvac 24 Plus, voir la page 25.
- Arrêtez la pompe à vide entre chaque étape pour assurer l'application d'un vide homogène pendant toutes les étapes du protocole.

Étapes à suivre avant de commencer

- Préparez un bain-marie à $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ pour l'étape 3.
- Équilibrez le tampon d'éluion (AE) ou l'eau distillée à température ambiante pour l'éluion réalisée à l'étape 9.

- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer AL par incubation à $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Procédure

1. Placez un écouvillon buccal dans le tube de lyse de 2 ml. Ajoutez 400 μl (écouvillon en DACRON et coton) ou 600 μl (Omni Swab) de PBS à l'échantillon.

L'Omni Swab est éjecté dans le tube en pressant l'extrémité de la tige en direction de l'écouvillon. Les écouvillons en DACRON ou coton sont séparés du bâtonnet à la main ou avec des ciseaux. Les colonnes de centrifugation QIAamp Mini copurifient l'ADN et l'ARN lorsque les deux sont présents dans l'échantillon. L'ARN peut inhiber certaines réactions enzymatiques en aval, mais pas la PCR. Si de l'ADN génomique sans ARN est requis, ajoutez 4 μl d'une solution mère de RNase A (100 mg/ml) à l'échantillon avant d'ajouter le Buffer AL.

2. Ajoutez 20 μl de solution mère de protéinase K et 400 μl (écouvillon en DACRON ou coton) ou 600 μl (Omni Swab) de Buffer AL à l'échantillon. Mélangez immédiatement au vortex pendant $\geq 15\text{ s}$.

Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le Buffer AL soient mélangés soigneusement et immédiatement.

Remarque : N'ajoutez pas de protéinase K directement au Buffer AL.

3. Incubez à $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ pendant $10\text{ min} \pm 1\text{ min}$. Centrifugez brièvement pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
4. Ajoutez 400 μl (écouvillon en DACRON ou coton) ou 600 μl (Omni Swab) d'éthanol (96–100 %) à l'échantillon, et mélangez de nouveau au vortex.
5. Insérez la colonne QIAamp Mini dans un VacConnector sur le collecteur à vide QIAvac. Placez un tube d'extension (voir la section Pour commander, page 58) sur la colonne. Scellez les adaptateurs luer non utilisés avec des bouchons luer.

6. Appliquez le mélange de l'étape 4 à la colonne QIAamp Mini. Allumez la pompe à vide pour aspirer le lysat à travers la colonne QIAamp Mini. Une fois que tout le lysat est passé à travers la colonne QIAamp Mini, arrêtez la pompe à vide.
7. Ajoutez 750 µl de Buffer AW1 dans le tube d'extension. Allumez la pompe à vide pour aspirer le Buffer AW1 à travers la colonne QIAamp Mini. Arrêtez la pompe à vide. Retirez avec précaution le tube d'extension de la colonne QIAamp Mini et jetez-le.
8. Ajoutez 750 µl de Buffer AW2 sans mouiller le bord de la colonne QIAamp Mini. Laissez le couvercle de la colonne QIAamp Mini ouvert et mettez en marche la pompe à vide. Une fois que tout le Buffer AW2 est passé à travers la colonne de centrifugation, arrêtez la pompe à vide.*
9. Fermez le couvercle de la colonne QIAamp Mini, retirez-la du collecteur à vide et jetez le VacConnector. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube de lavage propre de 2 ml et centrifugez à environ 20 000 x g pendant ≥ 1 min pour sécher la membrane complètement.
10. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube d'élution (ET) propre (fourni). Jetez le tube de lavage et le filtrat. Ouvrez avec précaution la colonne QIAamp Mini. Éluer l'ADN avec 150 µl de tampon d'élution (AE). Incubez à température ambiante pendant ≥ 1 min, puis centrifugez à environ 6000 x g pendant ≥ 1 min.

* La solution ayant traversé la colonne contient le Buffer AL ou le Buffer AW1 et n'est donc pas compatible avec du javellisant. Voir page 14 pour connaître les Warnings and Precautions.

Protocole : Purification de l'ADN total de cellules en culture

Ce protocole s'applique à la purification de l'ADN total (génomique, mitochondrial et viral) de cellules en culture à l'aide d'une microcentrifugeuse.

Matériel et réactifs supplémentaires nécessaires

- Tampon phosphate salin (PBS)*
- Matériel pour le prélèvement des cellules. Selon la méthode choisie, le matériel suivant est nécessaire :
 - Microcentrifugeuse
 - Trypsine et milieu de culture*.
 - Grattoir de cellules

Remarques importantes avant de commencer

- N'utilisez pas plus de 5×10^6 cellules (avec un ensemble normal de chromosomes).
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.

Étapes à suivre avant de commencer

- Préchauffez un bain-marie ou un bloc chauffant à 56 °C.
- Équilibrez le tampon d'élution (AE) à température ambiante pour l'élution.
- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer AL par incubation à $56 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

* 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.

Procédure

1. Prélevez les cellules conformément à l'étape 2 (pour les cellules cultivées en suspension) ou l'étape 3 (pour les cellules cultivées en monocouche).
2. Cellules cultivées en suspension (n'utilisez pas plus de 5×10^6 cellules avec un ensemble normal de chromosomes) : Déterminez le nombre de cellules. Centrifugez le nombre approprié de cellules pendant $5 \text{ min} \pm 30 \text{ s}$ à environ $300 \times g$ dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml. Retirez la totalité du surnageant et jetez-le en prenant soin de ne pas perturber le culot de cellules. Passez à l'étape 4.
3. Cellules cultivées en monocouche (n'utilisez pas plus de 5×10^6 cellules avec un ensemble normal de chromosomes) : Les cellules cultivées en monocouche peuvent être détachées du flacon de culture par trypsination ou à l'aide d'un grattoir de cellules.

Pour trypsiner les cellules :

Déterminez le nombre de cellules. Aspirez le milieu et lavez les cellules avec du PBS. Aspirez le PBS et ajoutez 0,10–0,25 % de trypsine. Une fois que les cellules se sont détachées du contenant, recueillez-les dans le milieu et transférez le nombre approprié de cellules (ne pas utiliser plus de 5×10^6 cellules avec un ensemble normal de chromosomes) dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (non fourni). Centrifugez pendant $5 \text{ min} \pm 30 \text{ s}$ à environ $300 \times g$. Retirez la totalité du surnageant et jetez-le en prenant soin de ne pas perturber le culot de cellules. Passez à l'étape 4.

Utilisation d'un grattoir de cellules :

Détachez les cellules du contenant. Transférez le nombre approprié de cellules (ne pas utiliser plus de 5×10^6 cellules avec un ensemble normal de chromosomes) dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (non fourni) et centrifugez pendant $5 \text{ min} \pm 30 \text{ s}$ à environ $300 \times g$. Retirez la totalité du surnageant et jetez-le en prenant soin de ne pas perturber le culot de cellules. Passez à l'étape 4.

4. Remettez en suspension le culot de cellules dans le PBS jusqu'à obtenir un volume final de 200 μl .
5. Ajoutez 20 μl de protéinase K.
6. Passez à l'étape 3 de la section Protocole : Purification de l'ADN du sang ou des fluides corporels à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx, page 28.

Protocole : Isolation de l'ADN bactérien à partir de fluides biologiques

Pour la purification de l'ADN bactérien à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx.

Certaines bactéries, en particulier les bactéries à Gram positif, nécessitent une pré-incubation avec des enzymes spécifiques telles que le lysozyme* ou la lysostaphine (p. ex. les staphylocoques) pour lyser la paroi cellulaire rigide multicouche. Dans de tels cas, utilisez Protocole : Isolation de l'ADN génomique des bactéries à Gram positif, page 52.

Remarques importantes avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.
- Évitez de soumettre les échantillons stockés à des cycles de congélation et décongélation répétés car cela entraîne une réduction de la taille de l'ADN.
- Le traitement automatisé de 2–10 ou 12 échantillons peut être effectué sur les instruments QIAcube ou QIAcube Connect MDx.
- Pour l'automatisation, suivez les instructions figurant dans les fiches de protocole (QIAcube) ou sur l'écran du logiciel (QIAcube Connect MDx) et le *manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx*.

Étapes à suivre avant de commencer

- Équilibrez l'échantillon à température ambiante.
- Préchauffez 2 bains-marie ou blocs chauffants : un à 56 °C et l'autre à 70 °C.
- Équilibrez le tampon d'élution (AE) à température ambiante pour l'élution.
- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer ATL ou le Buffer AL par incubation à 56 °C ± 3 °C.

* 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.

Procédure

- Pour la procédure manuelle avec une microcentrifugeuse, suivez les étapes 1 – 3.
 - Cette procédure peut être partiellement automatisée à partir de l'étape 2 (Protocole : Culot bactérien_ADN bactérien).
1. Sédimentez les bactéries par centrifugation pendant 10 min à 5000 x g (7500 tr/min).
 2. Remettez en suspension le culot de bactéries dans 180 µl de Buffer ATL.
 3. Suivez Protocole : Purification de l'ADN des tissus à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx, page 35, en commençant à partir de l'étape 3.

Protocole : Isolation de l'ADN bactérien à partir d'écouvillons oculaires, nasaux, pharyngés ou autres

Certaines bactéries, en particulier les bactéries à Gram positif, nécessitent une pré-incubation avec des enzymes spécifiques telles que le lysozyme* ou la lysostaphine* (p. ex. les staphylocoques) pour lyser la paroi cellulaire rigide multicouche. Dans de tels cas, utilisez Protocole : Isolation de l'ADN génomique des bactéries à Gram positif, page 52.

Remarques importantes avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.
- Évitez de soumettre les échantillons stockés à des cycles de congélation et décongélation répétés car cela entraîne une réduction de la taille de l'ADN.

Étapes à suivre avant de commencer

- Équilibrez l'échantillon à température ambiante.
- Préchauffez 2 bains-marie ou blocs chauffants : un à 56 °C et l'autre à 70 °C.
- Équilibrez le tampon d'élution (AE) à température ambiante pour l'élution.
- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer ATL ou le Buffer AL par incubation à 56 °C ± 3 °C.

Procédure

1. Prélevez les échantillons et placez-les dans le tube de lyse de 2 ml.
2. Ajoutez 1 ml de PBS et incubez pendant 2 h ± 10 min à température ambiante.
3. Sédimentez les bactéries par centrifugation pendant 10 min à 5000 x g (7500 tr/min).

* 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.

4. Remettez en suspension le culot de bactéries dans 180 µl de Buffer ATL.
5. Suivez Protocole : Purification de l'ADN des tissus à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx, page 36, en commençant à partir de l'étape 3.

Protocole : Isolation de l'ADN génomique des bactéries à Gram positif

Pour une utilisation avec une microcentrifugeuse ou en automatisation sur les instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx

Remarques importantes avant de commencer

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante.
- Évitez de soumettre les échantillons stockés à des cycles de congélation et décongélation répétés car cela entraîne une réduction de la taille de l'ADN.
- Le traitement automatisé de 2–10 ou 12 échantillons peut être effectué sur les instruments QIAcube ou QIAcube Connect MDx.
- Pour l'automatisation suivez les instructions figurant dans les fiches de protocole (QIAcube) ou sur l'écran du logiciel (QIAcube Connect MDx) et le *manuel d'utilisation de l'instrument QIAcube ou QIAcube Connect MDx*.

Étapes à suivre avant de commencer

- Équilibrez l'échantillon à température ambiante.
- Préchauffez 2 bains-marie ou blocs chauffants : un à 56 °C et l'autre à 95 °C.
- Équilibrez le tampon d'élution (AE) à température ambiante pour l'élution.
- Veillez à ce que le Buffer AW1 et le Buffer AW2 soient préparés conformément aux instructions figurant à la page 19.
- Dissolvez les précipités présents dans le Buffer ATL ou le Buffer AL par incubation à 56 °C ± 3 °C.
- Préparez une solution enzymatique appropriée (non fournie) : 20 mg/ml de lysozyme ou 200 µg/ml de lysostaphine; 20 mM de Tris·HCl, pH 8,0; 2 mM d'EDTS; 1,2 % de Triton®.

Procédure

- Pour la procédure manuelle avec une microcentrifugeuse, suivez les étapes 1 – 8.
 - Cette procédure peut être partiellement automatisée après l'étape 7 (Protocole : Bactéries (Gram+) ou Levures_Lyse enzymatique)
1. Prélevez les échantillons et placez-les dans le tube de lyse de 2 ml.
 2. Sédimentez les bactéries par centrifugation pendant 10 min à 5000 x g (75 000 tr/min).
 3. Suspendez le culot bactérien dans 180 µl de la solution enzymatique appropriée (20 mg/ml de lysozyme ou 200 µg/ml de lysostaphine; 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM d'EDTA; 1,2 % de Triton).
 4. Incubez pendant au moins 30 minutes à 37 °C.
 5. Ajoutez 20 µl de protéinase K et 200 µl de Buffer AL. Mélangez au vortex.
 6. Incubez à 56 °C pendant 30 minutes, puis incubez à 95 °C pendant 15 minutes supplémentaires.
 7. Centrifugez pendant quelques secondes.
 8. Suivez Protocole : Purification de l'ADN des tissus à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx, page 35, en commençant à partir de l'étape 6.

Contrôle qualité

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

Limitations

La performance du système a été établie à l'aide de sang total, de cultures bactériennes et de tissus pour l'isolation de l'ADN génomique.

Il incombe à l'utilisateur de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire et non couvertes par les études 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. Pour une validation ultérieure, il est conseillé de suivre les directives de la Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques (ICH) exposées dans ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text And Methodology.

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

Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer dans le mode d'emploi ou être apposés sur l'emballage ou les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
 Σ <N>	Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions
	Date limite d'utilisation
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Numéro de référence
LOT	Numéro de lot
MAT	Numéro de matériel (c.-à-d. étiquette de composant)
COMP	Composants
CONT	Contient
NUM	Nombre
GTIN	Code article international
VOL	Volume
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision
	Limites de température

Symbole	Définition du symbole
	Produit
	À réception
	Ouvrir à la livraison; stocker les QIAamp Mini Spin Columns à une température comprise entre 2 et 8 °C.
	Noter la date du jour après l'ajout d'éthanol au flacon
	Éthanol
	Ajout
	Chlorhydrate de guanidine
	Acide maléique
	Fabricant
	Consulter le mode d'emploi
	Tenir à l'abri de la lumière du soleil
	Avertissement/mise en garde

Coordonnées

Pour toute assistance technique ou pour obtenir des renseignements supplémentaires, consultez notre centre d'assistance technique à l'adresse **www.qiagen.com/Support** (les coordonnées sont disponibles sur le site www.qiagen.com).

Pour commander

Produit	Table des matières	N° de réf.
QIAamp DSP DNA Mini Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : Colonnes de centrifugation QIAamp Mini, protéinase K, réactifs, tampons et tubes de prélèvement	61304
Produits connexes		
QIAcube Connect MDx*	Instrument et 1 an de garantie pièces et main-d'œuvre	9003070
Accessoires		
Extension Tubes (3 ml)†	À utiliser avec les colonnes de centrifugation QIAGEN sur les collecteurs à vide : 100 par boîte	19587
QIAvac 24 Plus vacuum manifold‡	Collecteur à vide pour le traitement de 1–24 colonnes de centrifugation Collecteur à vide QIAvac 24 Plus, bouchons Luer, raccords rapides	19413
Vacuum Pump‡	Pompe à vide universelle	84010
VacConnectors‡	500 connecteurs jetables à utiliser avec les colonnes de centrifugation QIAamp sur les connecteurs luer	19407
Rotor Adapters	Pour 240 préparations : 240 adaptateurs de rotor jetables et 240 tubes d'éluion (1,5 ml) ; à utiliser avec le QIAcube	990394
Rotor Adapter Holder	Support pour 12 adaptateurs de rotor jetables; à utiliser avec le QIAcube	990392

Produit	Table des matières	N° de réf.
Sample Tubes CB	1000 tubes coniques à bouchon à vis sans jupe (2 ml) à utiliser avec le QIAcube et le QIAcube Connect MDx	990382
Sample Tubes RB	1000 tubes de microcentrifugation (2 ml) à verrouillage de sécurité à utiliser avec le QIAcube et le QIAcube Connect	990381
Shaker Rack Plugs	Pour le chargement du portoir à agitateur QIAcube	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Flacons de réactifs (30 ml) avec couvercles, lot de 6; à utiliser avec le QIAcube	990393
Filter-Tips, 1000 µl	Filter-Tips jetables, sur portoirs (8 × 128). À utiliser avec le QIAcube	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore	Embouts à filtre jetables, grand calibre, sur portoirs (8 × 128) ; non requis pour tous les protocoles. À utiliser avec le QIAcube	990452
Filter-Tips, 200 µl	Filter-Tips jetables, sur portoirs (8 × 128). À utiliser avec les instruments QIAcube et QIASymphony SP/AS	990332

* Le QIAcube Connect MDx n'est pas disponible dans tous les pays. Pour plus d'informations, contactez les services techniques QIAGEN.

† À utiliser avec des écouvillons buccaux ou des protocoles à volumes importants.

‡ À utiliser avec les protocoles de dépression.

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

Historique des révisions du document

Révision	Description
R4, 01/2021	<p>Mise à jour des sections suivantes : Purification automatisée de l'ADN sur les instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx, Matériel nécessaire, mais non fourni, Avertissements et précautions, Protocole : Purification de l'ADN du sang ou des fluides corporels à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx, Protocole : Purification de l'ADN des tissus à l'aide d'une microcentrifugeuse ou des instruments QIAcube/QIAcube Connect MDx, Protocole : Isolation de l'ADN bactérien à partir de fluides biologiques, Protocole : Isolation de l'ADN génomique des bactéries à Gram positif, Symboles et Pour commander.</p> <p>Suppression du protocole pour les taches de sang séché.</p> <p>Ajout de références au QIAcube Connect MDx et à ses accessoires</p> <p>Modifications rédactionnelles et de mise en page.</p>

Contrat de licence limité pour la trousse QIAamp DSP DNA Mini Kit

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis avec le produit et avec ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce panel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, 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 pour 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 expressément énoncées, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou son utilisation ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles expressément énoncées.
5. L'acheteur et l'utilisateur du panel 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. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions du présent accord de licence limité par tout tribunal et pourra recouvrer 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 de la licence, voir www.qiagen.com.

Marques de commerce : QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, TissueRuptor® (groupe QIAGEN); Tween® (ICI Americas Inc.); DACRON® (Invista North America S.A.R.L. Corporation); Puritan® (Puritan Medical Products Company); Triton® (Rohm and Haas Company); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.); Whatman® (Whatman International Limited Corporation). Les marques déposées, marques de commerce et autres marques citées dans ce document doivent être considérées comme protégées par la loi, même si elles ne sont pas spécifiquement signalées comme telles.

01/2021 HB-0428-008 1122787 © 2021 QIAGEN, tous droits réservés.

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