

Manuel de l'IndiMag® Pathogen Kit

Pour la purification automatisée d'ADN et d'ARN viraux et d'ADN bactérien à partir d'échantillons animaux en utilisant IndiMag 48, KingFisher™ Flex, BioSprint® 96 ou un poste de travail équivalent



IndiMag Pathogen Kit w/o plastics (réf. SP947257), anciennement *MagAttract® 96 cador® Pathogen Kit w/o Plastics (384)*



IndiMag Pathogen Kit (réf. SP947457), anciennement *MagAttract 96 cador Pathogen Kit (384)*



Fabriqué par QIAGEN® GmbH pour INDICAL BIOSCIENCE
INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Allemagne

Sommaire

Contenu du kit.....	4
Postes de travail et protocoles compatibles	5
Postes de travail	5
Protocoles	5
Stockage	7
Utilisation prévue	7
Symboles	8
Informations de sécurité.....	8
Contrôle qualité.....	9
Introduction	10
Principe et procédure	11
Description des protocoles.....	13
Protocole de purification des acides nucléiques	13
Prétraitements.....	15
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur	17
Remarques importantes.....	18
Matériau de départ.....	18
Rendements d'acides nucléiques	21
Utilisation de Carrier RNA et de contrôles internes	21
Conservation des acides nucléiques	22
Manipulation de l'ARN	23
Préparation des réactifs.....	23
Protocole : Purification des acides nucléiques pathogènes dans les échantillons de fluides.....	26

Points importants avant de commencer	26
À effectuer avant de commencer.....	27
Procédure d'utilisation avec l'IndiMag 48	28
Procédure d'utilisation avec des processeurs de particules magnétiques (p. ex. KingFisher Flex, BioSprint 96 ou équivalent)...	30
Guide de dépannage.....	32
Références catalogue	36
Historique des modifications	40

Contenu du kit

IndiMag Pathogen Kit	w/o plastics	
Réf.	SP947257	SP947457
Nombre de préparations	384	384
Buffer VXL (tampon VXL) ¹	2 x 30 ml	2 x 30 ml
Buffer ACB (tampon ACB) ^{1,2}	2 x 60 ml	2 x 60 ml
Proteinase K (Protéinase K)	2 x 6 ml	2 x 6 ml
Carrier RNA (ARN entraîneur) (poly A)	2 x 310 µg	2 x 310 µg
MagAttract Suspension G ³	1 x 13 ml	1 x 13 ml
Buffer AW1 (Tampon AW1) (concentré) ^{1,4}	2 x 75,5 ml	2 x 75,5 ml
Buffer AW2 (Tampon AW2) (concentré) ⁴	2 x 54 ml	2 x 54 ml
Buffer AVE (tampon AVE) ³	1 x 125 ml	1 x 125 ml
Large 96-Rod Cover (Grand manchon pour 96 barreaux)	-	4
S-Block (Bloc S)	-	20
96-Well Microplate MP (microplaque 96 puits)	-	4
Quick-Start Protocol (protocole de démarrage rapide) (PCard)	2	2

1 ATTENTION : contient un sel chaotropique. Prendre les mesures de sécurité de laboratoire appropriées et porter des gants lors de la manipulation. Incompatible avec les désinfectants contenant un javellisant. Voir page 9 pour les informations de sécurité.

2 Avant la première utilisation, ajouter de l'isopropanol comme indiqué sur le flacon pour obtenir une solution de travail.

3 ATTENTION : contient de l'azoture de sodium.

4 Avant la première utilisation, ajouter de l'éthanol (96-100 %) comme indiqué sur le flacon pour obtenir une solution de travail.

Postes de travail et protocoles compatibles

Postes de travail

Les postes de travail suivants sont compatibles avec l'utilisation de l'IndiMag Pathogen Kit (SP947457), sans que cela constitue une liste exhaustive :

- KingFisher Flex
- KingFisher 96
- BioSprint 96
- MagMax™ Express 96

Les postes de travail suivants sont compatibles avec l'utilisation de l'IndiMag Pathogen Kit w/o plastics (SP947257), sans que cela constitue une liste exhaustive :

- IndiMag 48
- KingFisher
- KingFisher mL
- KingFisher Duo
- BioSprint 15
- MagMax Express

Protocoles

Utiliser le MagAttract 96 cador Pathogen Kit Instrument Protocol (v2). Le Tableau 1 à la page 6 donne une vue d'ensemble des noms de scripts selon les appareils et les logiciels utilisés.

Le protocole « Pathogen » est préinstallé sur le système IndiMag 48.

Tableau 1 : Noms de scripts selon les appareils et logiciels utilisés.

Appareil	Logiciel	Nom de script
BioSprint 96	BioSprint	BS96 cador v2.kf2
BioSprint 15	BioSprint	BS15 cador.kf2
KingFisher Duo	BindIt	KF_Duo_96_cador.bdz
KingFisher Flex	BindIt	KF_Flex_cador_v2.bdz
KingFisher 96	BindIt	KF_96_cador_v2.bdz
KingFisher 96	KingFisher	KF96 cador v2.kf2
KingFisher mL	KingFisher	KFmL cador.kf2

Pour de plus amples informations ou des questions techniques, veuillez contacter l'équipe d'assistance INDICAL à **support@indical.com**.

Stockage

Tous les tampons et réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit à température ambiante (15-25 °C) sans affectation des performances.

Le Carrier RNA lyophilisé peut être conservé à température ambiante jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit. Pour pouvoir être utilisé, le Carrier RNA lyophilisé doit être dissous dans le Buffer AVE, puis ajouté au mélange Buffer VXL, comme décrit dans la section « Préparation des réactifs » à la page 23. La solution Carrier RNA/Buffer AVE/mélange Buffer VXL doit être fraîchement préparée. Le Carrier RNA inutilisé dissous dans le Buffer AVE doit être immédiatement congelé en aliquotes à une température comprise entre -30 et -15 °C. Ne pas soumettre les aliquotes de Carrier RNA à plus de 3 cycles congélation/décongélation.

La protéinase K peut être conservée à température ambiante (15-25 °C). Pour une conservation prolongée ou si la température ambiante dépasse souvent 25 °C, il est recommandé de la conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Utilisation prévue

L'IndiMag Pathogen Kit est destiné à l'extraction automatisée des acides nucléiques pathogènes (ARN et ADN viraux, et ADN bactérien) du sang total, du sérum, du plasma, des autres liquides corporels, des écouvillons, des lavages et des homogénats tissulaires provenant d'animaux à l'aide des systèmes IndiMag 48, KingFisher Flex, Biosprint 96 ou tout autre poste de travail équivalent.

Pour les applications de biologie moléculaire.

Symboles



Fabricant légal



Numéro de lot



À utiliser avant le



Limites de température pour le stockage



Manuel



Numéro de référence



Référence produit

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles auprès des représentants d'INDICAL ou sur demande par e-mail à l'adresse compliance@indical.com.



ATTENTION : NE PAS verser de javellisants ou de solutions acides directement sur les déchets de la préparation d'échantillon.

Le Buffer VXL et le Buffer AW1 contiennent du chlorhydrate de guanidine, et le Buffer ACB contient du thiocyanate de guanidine, qui peuvent former des composés hautement réactifs lorsqu'ils sont associés à un javellisant.

En cas de déversement de liquide contenant ces tampons, nettoyer avec un détergent de laboratoire adapté et de l'eau. Si le liquide renversé contient des agents potentiellement infectieux, nettoyer l'endroit contaminé d'abord avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v).

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO d'INDICAL, chaque lot de l'IndiMag Pathogen Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Introduction

La technologie des particules magnétiques permet une purification d'acides nucléiques de haute qualité, exempts de protéines, de nucléases et d'autres impuretés. Les acides nucléiques purifiés sont prêts à l'emploi dans les applications en aval, telles que l'amplification ou d'autres réactions enzymatiques.

L'IndiMag Pathogen Kit permet la purification rapide de l'ARN et de l'ADN viraux, ainsi que de l'ADN bactérien, à partir de nombreux types d'échantillons animaux (voir le Tableau 2 à la page 15) en utilisant les systèmes IndiMag 48, KingFisher Flex, BioSprint 96 ou tout autre poste de travail équivalent (voir la section « Matériau de départ » à la page 18). Toutefois, des combinaisons spécifiques de types d'échantillons et d'agents pathogènes doivent être validées par l'utilisateur.

Principe et procédure

L'IndiMag Pathogen Kit utilise la technologie des particules magnétiques MagAttract pour la purification des acides nucléiques. Cette technologie combine la vitesse et l'efficacité de la purification d'acides nucléiques sur silice à la manipulation pratique des particules magnétiques (Figure 1, page 11).

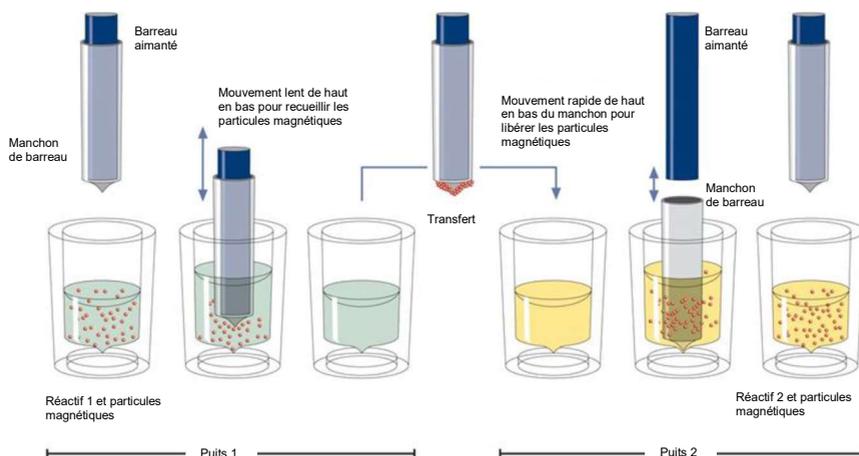


Figure 1. Schéma du principe des billes magnétiques. Le poste de travail traite un échantillon contenant des particules magnétiques de la manière suivante : Étape 1) Un barreau aimanté protégé par un manchon pénètre dans un puits (voir le puits 1 sur la figure) contenant l'échantillon et attire les particules magnétiques. Étape 2) Le manchon du barreau aimanté est ensuite placé au-dessus d'un autre puits (voir le puits 2 sur la figure) dans lequel les particules magnétiques sont libérées. Les étapes 1 et 2 sont répétées plusieurs fois au cours du traitement des échantillons.

La procédure de purification est conçue pour garantir le traitement simple et reproductible d'échantillons potentiellement infectieux (Figure 2, page 12).

Selon le matériau de départ, les échantillons peuvent être lysés en une seule étape en présence de sels chaotropiques et de protéinase K, libérant des acides nucléiques qui se lient à la surface de silice des particules magnétiques MagAttract. L'ADN et l'ARN liés aux particules magnétiques sont ensuite efficacement lavés, puis séchés à l'air libre. Les acides nucléiques de haute qualité sont élués dans le Buffer AVE. Les rendements en acides nucléiques dépendent du type d'échantillon et de sa conservation.

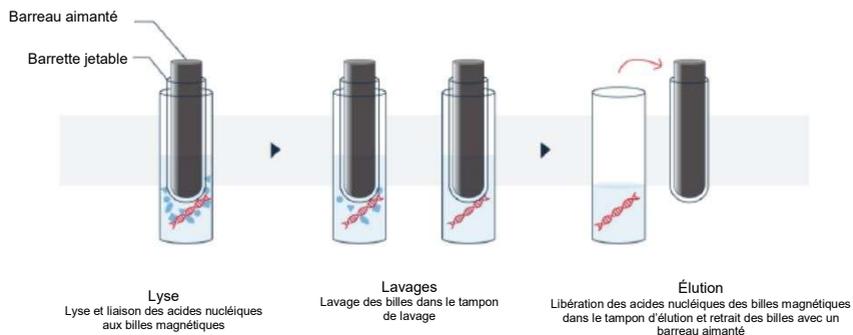


Figure 2. Description schématique des étapes des protocoles

Description des protocoles

Ce manuel contient deux protocoles. Dans le premier protocole, les échantillons subissent une purification des acides nucléiques sur le poste de travail IndiMag 48, tandis que dans le second protocole, les échantillons sont purifiés sur les postes de travail KingFisher Flex, BioSprint 96 ou équivalents.

Pour les échantillons qui nécessitent un prétraitement avant la purification des acides nucléiques, le Tableau 2 à la page 155 donne un aperçu des protocoles de prétraitement adaptés aux différentes combinaisons de matériau de départ et d'agents pathogènes.

La purification de l'échantillon dure environ 34 minutes, sans compter les étapes initiales de manipulation pour préremplir les blocs S ou les microplaques à 96 puits. Les solutions de lyse et de fixation utilisées dans la procédure sont le Buffer VXL et le Buffer ACB. Les informations fournies dans la section « Informations de sécurité », page 8 doivent être prises en compte.

Protocole de purification des acides nucléiques

Le protocole « Purification des acides nucléiques pathogènes dans les échantillons de fluides » (page 26) est optimisé pour la purification de l'ARN et de l'ADN viraux, et de l'ADN de bactéries faciles à lyser à partir de 200 µl de matériau fluide maximum. Les matériaux de départ adaptés au **traitement direct** en utilisant cette méthode sont les suivants :

- sang complet
- sérum
- plasma
- salive

- fluides des cavités corporelles
(p. ex. péritonéal, synovial, cérébrospinal)
- liquides extraits d'écouvillons
(p. ex. écouvillons nasaux, pharyngés et cloacaux*)
- liquides de lavage (p. ex. des lavages broncho-alvéolaires)
- autres fluides, tels que les échantillons d'urine ou les suspensions de selles*

* Le traitement d'échantillons à forte teneur en inhibiteurs, tels que l'urine et les selles, peut nécessiter une réduction du volume d'entrée de l'échantillon ou des mesures supplémentaires. Pour d'autres recommandations de prétraitement, contacter l'assistance INDICAL (support@indical.com).

Prétraitements

Les prétraitements mentionnés dans ce manuel sont optimisés pour des combinaisons spécifiques de matériau de départ et d'agents pathogènes cibles. Le choix du prétraitement dépend du processus cible et doit être suivi d'une purification des acides nucléiques.

Le Tableau 2 à la page 15 résume les prétraitements et leurs applications.

Certains des prétraitements peuvent nécessiter des composants supplémentaires, qui sont indiqués dans chaque protocole de prétraitement.

Tableau 2 : Protocoles de prétraitement pour les échantillons de fluide et de tissu

Échantillon	Cible	Prétraitement	Manuel
Fluides (p. ex. sang total, sérum, plasma, écouvillon ou liquide de lavage, tissu prétraité)	ARN et ADN viraux, ADN de bactéries faciles à lyser ¹	-	-
Sang total ou tissu prétraité	ADN de bactéries difficiles à lyser ¹	Prétraitement B1 pour les bactéries difficiles à lyser dans du sang total ou du tissu prétraité	HB-2533
Sérum, plasma, écouvillons, produits de lavage, fluides provenant de cavités corporelles, urine	ADN de bactéries difficiles à lyser ¹	Prétraitement B2 pour les bactéries difficiles à lyser dans les liquides corporels ²	HB-2534
Tissu (p. ex. foie, rate, rein, ganglion lymphatique)	Acides nucléiques pathogènes	Prétraitement T1 Dissociation mécanique des tissus	HB-2535
	ADN viral ³ , ADN bactérien ⁴	Prétraitement T2 Digestion enzymatique des tissus	HB-2536

Dissociation partielle rapide des tissus	ARN et ADN viraux, ADN de bactéries faciles à lyser¹	Prétraitement T3	HB-2537
Tissu contenant une grande quantité de lipides et/ou de nucléases (par ex. cerveau, pancréas)	ARN et ADN viraux, ADN de bactéries faciles à lyser ¹	Prétraitement T4	HB-2538
Selles	ARN et ADN viraux	Prétraitement F1 Méthode de suspension non lysante	HB-2513
	ADN bactérien ¹ et ADN viral	Prétraitement F2 Méthode de suspension lysante	HB-2514
	ADN de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	Prétraitement F-MAP	HB-2503
Cartes de sérobuvar		Prétraitement C1	HB-2520
Écouvillons (trachéaux, oropharyngés, sanguins)		Prétraitement S1	HB-2516

1 Les bactéries à Gram positif sont difficiles à lyser en raison de leur paroi cellulaire rigide. De nombreuses bactéries à Gram négatif sont faciles à lyser, mais certaines ne le sont pas et bénéficieront également du prétraitement B1 ou B2.

2 Incompatible avec le sang total.

3 Incompatible avec l'ARN viral, car les conditions de lyse ne préservent pas suffisamment l'intégrité de l'ARN.

4 Pour les bactéries difficiles à lyser, utiliser le prétraitement B1.

Pour plus d'informations sur les prétraitements, consulter le site Web www.indical.com/handbooks ou contacter l'assistance INDICAL à support@indical.com.

Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

- Poste de travail IndiMag 48, KingFisher Flex, BioSprint 96 ou équivalent
 - S'il y a lieu : Tête magnétique à utiliser avec les grands manchons pour 96 barreaux
 - Pipettes et embouts de pipettes jetables avec barrières contre les aérosols (20–1000 µl)
 - Pipette multicanaux et embouts de pipette 1000 µl jetables avec barrières contre les aérosols
 - Multi-distributeur
 - Éthanol (96-100 %)*
 - Isopropanol
 - Un tampon phosphate salin (PBS) peut être nécessaire pour diluer les échantillons.
 - Agitateur-mélangeur vortex
 - Chiffon ou tissu doux et 70 % d'éthanol ou autre désinfectant pour nettoyer le poste de travail utilisé
- Remarque** : lire le manuel d'utilisation correspondant pour le nettoyage et l'entretien du dispositif d'extraction

* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances comme du méthanol ou de la méthyléthylcétone.

Remarques importantes

Matériau de départ

Les protocoles de ce manuel sont optimisés pour la purification des acides nucléiques viraux et bactériens, à partir d'échantillons de faible à moyenne complexité, faciles à lyser. Le protocole IndiMag Pathogen comprend une étape spéciale qui combine une lyse et une fixation efficace en une seule étape, permettant un traitement rapide et simple des échantillons. Pour les types d'échantillons plus complexes, comme les tissus, les selles et certains pathogènes difficiles à lyser, comme les bactéries à Gram positif, il peut être nécessaire de procéder à des prétraitements spécialisés de dissociation et/ou de lyse. L'utilisateur doit déterminer à l'avance les prétraitements appropriés pour ces matériaux. Des informations générales sur les types d'échantillons recommandés sont fournies dans les sections suivantes. Pour plus d'informations, contacter l'assistance INDICAL à support@indical.com.

Les fluides à viscosité élevée peuvent nécessiter un traitement pour réduire leur viscosité et permettre une extraction efficace des acides nucléiques pathogènes. Contacter l'assistance INDICAL à support@indical.com pour obtenir des recommandations.

Éviter la décongélation et la congélation répétées des échantillons, sous peine de réduire le rendement et la qualité des acides nucléiques.

Sans total animal

Des échantillons de sang traités à l'EDTA, au citrate ou à l'héparine comme anticoagulant peuvent être utilisés pour la purification des acides nucléiques. Les échantillons peuvent être frais ou congelés, à condition qu'ils n'aient pas été décongelés plus d'une fois.

L'application de plusieurs cycles de congélation/décongélation peut entraîner la dénaturation et la précipitation des protéines, entraînant une réduction potentielle des titres viraux et, par conséquent, une diminution du rendement en acides nucléiques viraux.

Après le prélèvement et la centrifugation, les échantillons de sang total peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 6 heures maximum. Pour une conservation plus longue, nous recommandons de congeler les aliquotes à une température comprise entre -30 et -15 °C ou à -70 °C.

Nous recommandons d'utiliser 50-200 µl de sang contenant des érythrocytes non nucléés. Cependant, des numérations cellulaires très élevées dues à des maladies inflammatoires ou néoplasiques peuvent fortement augmenter la teneur en acides nucléiques de l'hôte d'un échantillon. Dans ce cas, la réduction de l'entrée de l'échantillon à 50 µl peut améliorer les résultats des essais en aval, en particulier en RT-PCR. Si une quantité de sang inférieure à 200 µl est utilisée, ajuster le volume de l'échantillon à 200 µl avec une solution PBS ou NaCl à 0,9 %.

Pour les échantillons de sang contenant des érythrocytes nucléés (p. ex. échantillons d'oiseaux et de poissons), utiliser moins de 50 µl de sang et ajuster le volume de l'échantillon à 200 µl avec une solution PBS ou NaCl à 0,9 %.

Sérum, plasma, autres fluides corporels, écouvillons et échantillons de lavage animaux

Le plasma ou le sérum congelé ne doit pas être décongelé plus d'une fois avant le traitement.

Jusqu'à 200 µl de sérum, de plasma, d'autres fluides corporels, de surnageant ou de liquide de lavage peuvent être traités.

Le traitement d'échantillons à très forte teneur en inhibiteurs, comme les suspensions urinaires ou fécales, peut nécessiter une réduction du volume d'entrée de l'échantillon et/ou un prétraitement supplémentaire pour éliminer les inhibiteurs. Pour réduire le volume d'entrée, utiliser 25-50 µl de l'échantillon et ajuster le volume à 200 µl avec une solution PBS ou NaCl à 0,9 %.

Pour l'extraction de l'ADN bactérien, le volume d'entrée peut être augmenté à plus de 200 µl, p. ex. 1,5 ml pour une sensibilité accrue de la détection bactérienne. Les bactéries à Gram négatif dans les fluides sans cellules peuvent être concentrées par centrifugation de volumes plus importants. Remettre les culots en suspension dans une solution PBS et utiliser 200 µl comme volume de départ. Voir le Prétraitement B2 pour l'extraction de l'ADN de bactéries difficiles à lyser.

Tissus animaux

Lors de la manipulation d'échantillons de tissus, la dissociation mécanique ou enzymatique de la structure tissulaire est la condition préalable à la libération des cellules, à la libération ultérieure des acides nucléiques et à la perméabilité de la membrane du matériau.

La texture et la rigidité, les types de cellules et la teneur en acides nucléiques et en substances inhibitrices de l'hôte peuvent varier considérablement d'un type de tissu à l'autre. De plus, la localisation des acides nucléiques pathogènes dans les tissus peut varier selon le type de tissu, le pathogène et le stade d'infection. Des prétraitements supplémentaires pour les échantillons de tissus sont disponibles auprès de l'assistance INDICAL, notamment un protocole rapide et des recommandations pour les tissus difficiles.

Jusqu'à 25 mg de tissu frais ou congelé peuvent être utilisés comme quantité de départ. Pour les tissus ayant un nombre très élevé de cellules pour une masse donnée de tissu, comme la rate, une quantité réduite de matériau de départ (5-10 mg) doit être utilisée.

Remarque : les particules solides restant dans l'homogénat peuvent s'agréger avec les particules magnétiques MagAttract, ce qui pourrait diminuer le rendement en acides nucléiques.

Rendements d'acides nucléiques

Pour les échantillons contenant une faible quantité de cellules (p. ex. sérum et plasma), le rendement d'acides nucléiques viraux obtenus peut être inférieur à 1 µg et est donc difficile à quantifier à l'aide d'un spectrophotomètre. En outre, les éluats préparés avec du Carrier RNA peuvent contenir beaucoup plus de Carrier RNA que les acides nucléiques cibles. L'IndiMag Pathogen Kit extrait les acides nucléiques totaux. Par conséquent, l'ADN et l'ARN cellulaires seront co-purifiés à partir de n'importe quelle cellule de l'échantillon avec l'ARN et l'ADN viraux et l'ADN bactérien, et ne peuvent être distingués par des mesures spectrophotométriques.

Nous recommandons d'utiliser des méthodes d'amplification quantitative telles que la PCR quantitative en temps réel ou la RT-PCR en temps réel pour déterminer les rendements en acides nucléiques pathogènes.

Utilisation de Carrier RNA et de contrôles internes

Carrier RNA

Nous recommandons d'ajouter du Carrier RNA aux fluides contenant de faibles quantités de cellules, tels que le sérum, le plasma, les écouvillons et le liquide de lavage. Cela améliore l'adsorption de l'ARN et de l'ADN viraux sur les particules magnétiques, ce qui est particulièrement important lorsque les molécules cibles ne sont pas abondantes. De plus, un excès de Carrier RNA réduit les risques de dégradation de l'ARN viral dans les rares cas où les RNases ne sont pas dénaturées par les sels chaotropiques et les détergents contenus dans le tampon de lyse. Le fait de ne pas utiliser de Carrier RNA peut diminuer la récupération des acides nucléiques viraux.

Contrôle interne

L'utilisation d'un contrôle interne, tel que l'intype IC-DNA ou l'intype IC-RNA est facultative, selon le système d'amplification choisi. Si l'IndiMag Pathogen Kit est utilisé en combinaison avec des systèmes d'amplification qui utilisent un contrôle interne, l'introduction de ces contrôles internes peut être nécessaire au cours de la procédure de purification, afin de contrôler l'efficacité de la préparation des échantillons et du test en aval.

Ajouter des acides nucléiques de contrôle interne non protégés (p. ex. ADN plasmidique ou ARN transcrit in vitro) au mélange VXL seulement. Ne pas ajouter ces acides nucléiques de contrôle interne directement à l'échantillon.

La quantité de contrôle interne ajoutée dépend du système de test et du volume d'élution. L'évaluation de la quantité adaptée d'acides nucléiques de contrôle interne doit être effectuée par l'utilisateur. Se reporter aux instructions du fabricant pour déterminer la concentration optimale du contrôle interne ou contacter l'assistance INDICAL (support@indical.com) pour plus d'informations.

Conservation des acides nucléiques

Pour une conservation à court terme jusqu'à 24 heures, nous recommandons de stocker l'ARN et l'ADN viraux purifiés entre 2 et 8 °C. Pour une conservation à long terme au-delà de 24 heures, nous recommandons un stockage des acides nucléiques purifiés à une température comprise entre -30 et -15 °C, voire même à -70 °C pour l'ARN.

Manipulation de l'ARN

Les ribonucléases (RNases) sont des enzymes très stables et très actives qui ne nécessitent généralement pas de cofacteurs pour être activées. Puisque les RNases sont difficiles à inactiver et que de très petites quantités d'enzyme suffisent à détruire les ARN, ne pas utiliser de matériel en plastique ou en verre sans l'avoir préalablement traité contre une contamination possible par les RNases. Prendre garde à ne pas introduire par inadvertance des RNases dans l'échantillon d'ARN pendant ou après la purification.

Préparation des réactifs

Solution mère de Carrier RNA

Pour pouvoir être utilisé, le Carrier RNA lyophilisé doit d'abord être dissous dans le Buffer AVE. Ajouter 310 µl de Buffer AVE au tube contenant 310 µg de Carrier RNA lyophilisé pour obtenir une solution mère de 1 µg/µl. Ajouter cette solution au mélange Buffer VXL comme indiqué dans le Tableau 3 à la page 28. Le Carrier RNA inutilisé dissous dans le Buffer AVE doit être congelé en aliquotes à une température comprise entre -30 et -15 °C. Les aliquotes de Carrier RNA ne doivent pas être soumises à plus de 3 cycles de congélation/décongélation.

Protéinase K

L'IndiMag Pathogen Kit contient de la protéinase K prête à l'emploi fournie dans un tampon de stockage spécialement formulé. L'activité de la solution de protéinase K est de 600 mAU/ml.

La protéinase K est stable pendant au moins 1 an après réception lorsqu'elle est conservée à température ambiante (15-25 °C). Pour une conservation supérieure à un an ou si la température ambiante

dépasse 25 °C, il est recommandé de la conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Buffer ACB

Le Buffer ACB est fourni sous forme de concentré. Avant la première utilisation, ajouter de l'isopropanol (100 %) comme indiqué sur le flacon. Cocher la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que l'isopropanol a été ajouté. Bien mélanger après l'ajout de l'isopropanol.

MagAttract Suspension G

Secouer le flacon contenant la solution MagAttract Suspension G et la passer au vortex pendant 3 minutes (avant la première utilisation) ou 1 minute (avant les utilisations suivantes) pour s'assurer que les particules de silice magnétique sont complètement remises en suspension.

Buffer AW1

Le Buffer AW1 est fourni sous forme de concentré. Avant la première utilisation, ajouter de l'éthanol (96-100 %) comme indiqué sur le flacon. Cocher la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. Le Buffer AW1 reconstitué peut être conservé à température ambiante (15-25 °C) pendant 1 an maximum. Bien mélanger après l'ajout de l'éthanol.

Buffer AW2

Le Buffer AW2 est fourni sous forme de concentré. Avant la première utilisation, ajouter de l'éthanol (96-100 %) comme indiqué sur le flacon.

Cocher la case sur l'étiquette du flacon pour indiquer que l'éthanol a été ajouté. Bien mélanger après l'ajout de l'éthanol.

Manipulation du Buffer AVE

Le Buffer AVE est livré exempt de RNases. Il contient de l'azotate de sodium, un agent antimicrobien qui empêche la prolifération des organismes producteurs de RNase. Toutefois, ce tampon ne contenant aucun produit chimique capable de dégrader la RNase, il n'inhibera pas de manière active les RNases introduites en cas de manipulation inappropriée. Veiller impérativement à éviter toute contamination par des RNases lors de la manipulation du Buffer AVE. Suivre les précautions générales de manipulation de l'ARN, telles que le changement fréquent de gants et le maintien des tubes fermés dans la mesure du possible.

Protocole : Purification des acides nucléiques pathogènes dans les échantillons de fluides

Ce protocole est destiné à la purification de l'ARN et de l'ADN viraux, ainsi que de l'ADN de bactéries faciles à lyser provenant d'échantillons de fluides ou de tissus prétraités en utilisant le poste de travail IndiMag 48, KingFisher Flex, BioSprint 96 ou équivalent et l'IndiMag Pathogen Kit.

Points importants avant de commencer

- Se familiariser avec le fonctionnement du poste de travail. Consulter le manuel d'utilisation correspondant pour connaître les instructions de fonctionnement.
- Avant de commencer la procédure, lire la section « Remarques importantes » (page 18).
- Vérifier que le Buffer ACB, le Buffer AW1, le Buffer AW2 et le Carrier RNA ont été préparés conformément aux instructions de la section « Préparation des réactifs » (page 23).
- Vérifier que le Buffer VXL ou le Buffer ACB ne contient pas de précipité blanc. Si nécessaire, incuber le Buffer VXL ou le Buffer ACB pendant 30 minutes à 37 °C en secouant occasionnellement pour dissoudre le précipité.
- En cas d'utilisation de l'IndiMag Pathogen Kit (SP947457) : Les manchons pour 96 barreaux sont conditionnés en paquets de 2. Lors de l'utilisation d'un nouveau paquet de 2, entreposer le deuxième manchon pour 96 barreaux sur un autre bloc S ou sur une autre plaque. Veiller à ne pas plier les manchons pour 96 barreaux.

À effectuer avant de commencer

- Décongeler et équilibrer les échantillons à température ambiante (15-25 °C).
- Si le volume d'échantillon est inférieur à 200 µl, ajouter une solution PBS ou NaCl à 0,9 % pour obtenir un volume final de 200 µl.
- Préparer le mélange Buffer VXL conformément au Tableau 3 à la page 27, pour l'utiliser à l'étape 3 de la procédure. Avant d'ajouter la solution MagAttract Suspension G, s'assurer qu'elle est complètement remise en suspension. Passer au vortex pendant 3 minutes avant la première utilisation ou pendant 1 minute avant les utilisations suivantes.

Important : ne pas ajouter directement la protéinase K au mélange Buffer VXL ! Cela peut entraîner la formation d'obstructions ou de précipités. Suivre la procédure décrite ci-dessous (pipeter la protéinase K dans les puits, puis l'échantillon et enfin le mélange Buffer VXL).

Tableau 3 : Préparation du mélange Buffer VXL

Réactif	Nombre d'échantillons *		
	1	48	96
Buffer VXL	100 µl	4,8 ml	9,6 ml
Buffer ACB	400 µl	19,2 ml	38,4 ml
MagAttract Suspension G	25 µl	1,2 ml	2,4 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	48 µl	96 µl

* Le volume préparé est de 105 % du volume requis pour compenser toute erreur de pipetage et une éventuelle évaporation. L'excédent de tampon doit être jeté.

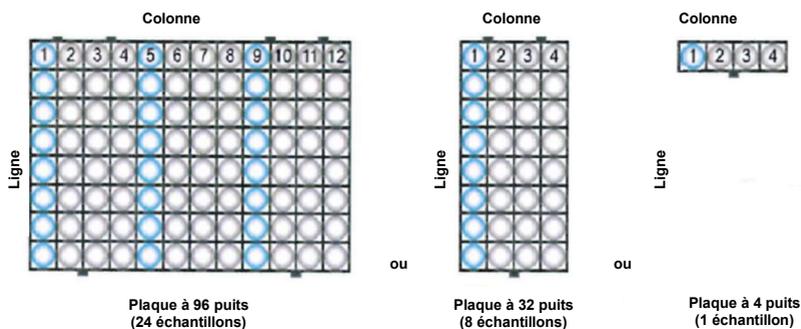
Procédure d'utilisation avec l'IndiMag 48

- Étiqueter et préparer des plaques à 4/32/96 puits (colonnes 2-4) conformément au Tableau .

Tableau 4 : Configuration de l'instrument et volumes de réactifs

Colonne		Élément à ajouter	Volume par puits
1	Lysat	Lysat*	720 µl
2	Lavage 1	Buffer AW1	700 µl
3	Lavage 2	Buffer AW2	700 µl
4	Élution	Buffer AVE	100 µl

* Comprend 20 µl de protéinase K, 200 µl d'échantillon et 500 µl de mélange Buffer VXL



- S'assurer d'avoir préparé suffisamment de mélange Buffer VXL conformément au Tableau , page 27.
- Pipeter 20 µl de protéinase K dans le fond de la première colonne et ajouter 200 µl d'échantillon.

Remarque : si le volume d'échantillon est inférieur à 200 µl, le porter à 200 µl en ajoutant une solution PBS.

4. Bien mélanger le mélange Buffer VXL pendant 30 s et ajouter 500 µl de mélange Buffer VXL à chaque échantillon de la plaque à puits profonds.
5. Charger immédiatement les plaques préparées sur l'IndiMag 48, charger les barrettes de manchons de barreaux aimantés aux endroits correspondants et démarrer le protocole approprié.

Remarque : le protocole « Pathogen » est préinstallé sur l'IndiMag 48.

Procédure d'utilisation avec des processeurs de particules magnétiques (p. ex. KingFisher Flex, BioSprint 96 ou équivalent)

1. Étiqueter et préparer 4 plaques à 96 puits profonds (Bloc S) et 1 microplaque à 96 puits (emplacements 2-6) conformément au Tableau 5.

Tableau 5 : Configuration de l'instrument et volumes de réactifs

Emplacement	Message de chargement	Format	Élément à ajouter	Volume par puits
6	Charger manchon de barreau	Plaque à 96 puits profonds	Manchon pour embout pour peigne 96	—
5	Charger élution	Microplaque à 96 puits	Buffer AVE	100 µl
4	Charger lavage 3	Plaque à 96 puits profonds	Éthanol (96-100 %)	750 µl
3	Charger lavage 2	Plaque à 96 puits profonds	Buffer AW2	700 µl
2	Charger lavage 1	Plaque à 96 puits profonds	Buffer AW1	700 µl
1	Charger lysat	Plaque à 96 puits profonds	Lysat*	720 µl

* Comprend 20 µl de protéinase K, 200 µl d'échantillon et 500 µl de mélange Buffer VXL

2. S'assurer d'avoir préparé suffisamment de mélange Buffer VXL conformément au Tableau , page 27.
3. Pipeter 20 µl de protéinase K dans le fond d'un nouveau puits de la plaque à 96 puits profonds ou du bloc S et ajouter 200 µl d'échantillon.

Remarque : si le volume d'échantillon est inférieur à 200 µl, le porter à 200 µl en ajoutant une solution PBS.

4. Bien mélanger le mélange Buffer VXL pendant 30 s et ajouter 500 µl de mélange Buffer VXL à chaque échantillon de la plaque à 96 puits profonds.
5. Charger immédiatement les plaques préparées sur le processeur et démarrer le protocole correspondant.

Remarque : le Tableau 1 à la page 6 donne un aperçu des appareils et de leurs noms de scripts correspondants.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut être utile pour résoudre les problèmes pouvant survenir.

Pour plus d'informations ou pour obtenir de l'aide, contacter l'assistance INDICAL à support@indical.com.

Commentaires et suggestions	
Faible rendement d'ADN et d'ARN	
1 Remise en suspension incomplète de la solution MagAttract Suspension G	S'assurer que la solution MagAttract Suspension G est complètement remise en suspension avant de l'ajouter au mélange Buffer VXL. Passer au vortex pendant au moins 3 minutes avant la première utilisation et pendant 1 minute avant les utilisations suivantes.
2 Préparation incorrecte du mélange Buffer VXL	S'assurer que le mélange Buffer VXL a été préparé avec les volumes corrects de réactifs supplémentaires, comme indiqué sur le flacon du tampon. Répéter la procédure de purification de l'ADN avec de nouveaux échantillons.
3 Préparation incorrecte du Buffer AW1 ou AW2	Vérifier que le concentré de Buffer AW ou AW2 a été dilué avec le volume approprié d'éthanol à 96-100 %, comme indiqué sur le flacon. Ne pas utiliser d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances comme du méthanol ou de la méthyléthylcétone. Répéter le protocole de purification avec de nouveaux échantillons.
4 Chargement des réactifs sur le poste de travail dans le mauvais ordre	S'assurer que tous les réactifs sont chargés sur le poste de travail BioSprint 96 dans le bon ordre. Répéter le protocole de purification avec de nouveaux échantillons.

5	Lyse insuffisante de l'échantillon	<p>La protéinase K a été stockée à des températures élevées pendant trop longtemps. Répéter la procédure de purification en utilisant de nouveaux échantillons et de la protéinase K fraîche (voir les recommandations de conservation à la page 7).</p> <p>La lyse chauffée peut améliorer l'efficacité de la lyse pour certains virus et bactéries à ADN. À cette fin, un protocole de lyse en dehors de l'appareil est disponible. Contacter l'assistance INDICAL à support@indical.com.</p>
6	Carrier RNA non ajouté au Buffer VXL ou dégradé	Consulter les recommandations relatives à la préparation, à la conservation et à l'ajout de Carrier RNA.
7	Mélange Buffer VXL/Protéinase K/Carrier RNA mal mélangés	Bien mélanger en pipetant avec une pipette de grande taille.
8	Contamination par RNases dans le Buffer AVE	Veiller à ne pas introduire de RNases, qui peuvent dégrader l'ARN viral. Cela peut se produire si des tubes contenant du Buffer AVE sont ouverts à plusieurs reprises. En cas de contamination par RNases, utiliser un nouveau flacon de Buffer AVE. Répéter la procédure de purification avec de nouveaux échantillons.
9	Acides nucléiques dans les échantillons déjà dégradés avant la purification	Les échantillons ont été décongelés plus d'une fois ou conservés à température ambiante (15-25 °C) pendant trop longtemps. Toujours utiliser des échantillons frais ou décongelés une seule fois. Répéter le protocole de purification avec de nouveaux échantillons.
Performances médiocres de l'ADN ou de l'ARN dans les applications en aval		
1	Peu ou pas d'ADN ou d'ARN dans l'éluat	Voir la section « Faible rendement d'ADN et d'ARN » (ci-dessus) pour connaître les raisons possibles. Augmenter la quantité d'éluat ajoutée à la réaction, si possible.

<p>2 Résidus de particules magnétiques</p>	<p>Les résidus de particules magnétiques dans les éluats n'affectent pas la plupart des applications en aval. Les résidus de particules magnétiques peuvent être minimisés en plaçant la microplaque contenant les éluats dans un aimant approprié (p. ex. un aimant à 96 puits de type A ou un aimant de tube de calibre 12 pendant 1 minute, et en transférant les éluats dans une microplaque propre.</p> <p>En l'absence d'un aimant approprié, centrifuger la microplaque contenant les éluats à pleine vitesse pendant 1 minute pour culotter les particules magnétiques restantes et transférer les surnageants dans une microplaque propre.</p>
<p>3 Trop d'éluat dans la réaction d'amplification</p>	<p>Déterminer le volume maximum d'éluat indiqué pour la réaction d'amplification. Réduire ou augmenter le volume d'éluat ajouté à la réaction d'amplification en conséquence.</p>
<p>4 ARN dégradé</p>	<p>L'ARN peut avoir été dégradé par des RNases dans les échantillons d'origine. S'assurer que les échantillons sont traités immédiatement après leur prélèvement ou leur retrait du lieu de conservation. Répéter le protocole de purification avec de nouveaux échantillons.</p>
<p>5 Acides nucléiques dans les échantillons déjà dégradés avant la purification</p>	<p>Les échantillons ont été décongelés plus d'une fois ou conservés à température ambiante (15–25 °C) pendant trop longtemps. Toujours utiliser des échantillons frais ou décongelés une seule fois. Répéter le protocole de purification avec de nouveaux échantillons.</p>
<p>6 Carrier RNA non ajouté au mélange Buffer VXL</p>	<p>Reconstituer le Carrier RNA dans le Buffer AVE et mélanger avec un volume approprié de Buffer AVE, comme décrit dans la section « Utilisation de Carrier RNA et de contrôles internes » (page 2121). Répéter le protocole de purification avec de nouveaux échantillons.</p>
<p>7 Trop ou trop peu de Carrier RNA dans l'éluat</p>	<p>Déterminer la quantité maximale de Carrier RNA indiquée pour la réaction d'amplification. Ajuster en conséquence la concentration de la solution de Carrier RNA ajoutée au mélange Buffer VXL.</p>

8	Carrier RNA dégradé	Le Carrier RNA reconstitué dans le Buffer AVE n'a pas été conservé à une température comprise entre -30 °C et -15 °C ou a subi plusieurs cycles de congélation/décongélation. Préparer un nouveau tube de Carrier RNA dissous dans du Buffer AVE et le conserver conformément aux instructions. Répéter la procédure de purification avec de nouveaux échantillons.
9	Inhibition de la PCR	Certains types d'échantillons (p. ex. sang total et matières fécales d'animaux) peuvent contenir des quantités élevées de substances inhibitrices de la PCR. L'élimination des inhibiteurs peut ne pas être complète sans traitement spécial. Réduire la quantité d'entrée de l'échantillon et/ou la quantité d'éluat ajoutée à la réaction d'amplification.
Précipité dans les tampons		
1	Précipité dans le Buffer VXL ou le Buffer ACB	Des précipités peuvent se former après une conservation à basse température ou prolongée. Pour dissoudre le précipité, incuber le Buffer VXL ou ACB pendant 30 minutes à 37 °C, en secouant occasionnellement.
2	Précipité dans le mélange échantillon/Buffer VXL	En cas d'utilisation d'un échantillon de fluide contenant du Buffer ATL, par exemple après une digestion enzymatique des tissus, un précipité peut se former après l'ajout du Buffer VXL à l'échantillon. Le précipité n'influence pas les étapes ultérieures du protocole et peut être dissous par incubation brève à 56 °C.

Références catalogue

Nom du produit	Réf.
IndiMag Pathogen Kit (384) <i>anciennement MagAttract 96 cador Pathogen Kit (384)</i>	SP947457
IndiMag Pathogen Kit w/o plastics (384) <i>anciennement MagAttract 96 cador Pathogen Kit w/o Plastics (384)</i>	SP947257
IndiMag 48	IN-942048
IndiMag 48 PW 1-Sample Block (368)	PW940123
IndiMag 48 PW 8-Sample Block (560)	PW940166
IndiMag 48 PW 24-Sample Block (672)	PW940187
IndiMag 48 PW Rod cover (672)	PW940237
intype IC-DNA	IC289980
intype IC-RNA	IC289970

INDICAL propose une large gamme de kits ELISA pour agents pathogènes, de tests qPCR/ RT-qPCR et de réactifs prêts à l'emploi.

Afin d'optimiser votre flux de travail et répondre à vos besoins en matière d'échantillons et de rendement, INDICAL propose également des instruments et des kits pour l'extraction efficace des acides nucléiques de différents types d'échantillons.

Consulter le site **www.indical.com** pour plus d'informations sur les produits bactotype, cador, cattletype, flocktype, IndiMag, IndiSpin, intype, pigtype et virotype.

Pour obtenir des informations actualisées sur la licence et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du produit ou le manuel d'utilisation INDICAL correspondant.

Notes

Notes

Contrat de licence limitée pour IndiMag Pathogen 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 et à ce manuel, et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. INDICAL n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.indical.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs INDICAL pour des utilisateurs INDICAL. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par INDICAL. INDICAL ne saurait être tenue 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 énoncées expressément, INDICAL n'offre aucune garantie que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. INDICAL rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. INDICAL est susceptible de faire appliquer les interdictions de ce contrat de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de ce contrat de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour les conditions de licence mises à jour, consulter www.indical.com.

Marques de commerce : bactotype[®], cador[®], cattletype[®], flocktype[®], IndiMag[®], IndiSpin[®], intype[®], pigtype[®], virotype[®] (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); BioSprint[®], MagAttract[®], QIAGEN[®] (QIAGEN Group, Hilden, Germany), MagMax[™] (Life Technologies Corporation), BeadRetriever[™], KingFisher[™] (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Les noms déposés, les marques de commerce, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

HB-1926-FR-004 © 2018 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, tous droits réservés.

Historique des modifications

Manuel	Version	Modification
HB-1926-EN-004	Octobre 2018	Style INDICAL