

VetMAX™ BTV1 IAH Typing Kit

Protocoles de purification d'acides nucléiques pour une utilisation avec le kit (Réf. BTV1GIAH50)

Pub. n° MAN0008688 Rév. C.0

IMPORTANT ! En France, suivre l'Annexe A, "Consignes relatives à la conservation du sang pour la France".



AVERTISSEMENT ! Lire les fiches de données de sécurité (FDS) et suivre les consignes de manipulation. Porter des lunettes de protection, des gants et des vêtements appropriés. Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles à l'adresse thermofisher.com/support.



AVERTISSEMENT ! RISQUES BIOLOGIQUES POTENTIELS. Lire les informations de sécurité concernant les risques biologiques sur la page du produit à l'adresse thermofisher.com. Porter des gants, des vêtements et des lunettes de protection appropriés.

Espèces	Isolation des acides nucléiques à partir des matrices	Type de test
Bovins Petits ruminants (ovins, caprins)	Sang total en tubes EDTA Rate ou fœtus avorté (rate, foie, cœur)	Individuel

- Objectif de ce guide 2
- Choix des échantillons 2
- Conservation des échantillons 2
- Matériels requis non fournis 2
- Kits d'extraction de l'ARN recommandés 3
- Préparation des échantillons avant extraction 3
- Extraction avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit 4
- Extraction avec MagVet™ Universal Isolation Kit 9
- Extraction avec MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit 11
- Extraction avec QIAamp™ Viral RNA Mini Kit 12
- Extraction avec le kit NucleoSpin™ RNA Virus 13
- Extraction avec le kit NucleoSpin™ 8 / 96 Virus 14

Annexe A Consignes relatives à la conservation du sang pour la France

- Consignes relatives à la conservation du sang pour la France 15

Documentation et support

- Assistance à la clientèle et support technique 15
- Garantie limitée du produit 15

Objectif de ce guide

Ce guide a pour objectif de décrire des protocoles de purification des ARN viraux du virus de la Bluetongue (BTV) compatibles avec le **Applied Biosystems™ VetMAX™ BTV1 IAH Typing Kit**.

Choix des échantillons

Matrice	Type d'analyse	Quantité requise et matériel de prélèvement
Sang total	Individuelle	50 à 200 µL de sang total prélevé dans des tubes EDTA ^[1]
Échantillon d'organe	Individuelle	1 g de rate, foie ou cœur

^[1] Selon le protocole d'extraction utilisé.

Conservation des échantillons

Il est nécessaire de s'assurer de la qualité des échantillons avant leur entrée dans le processus analytique.

Sang total

Le sang doit avoir été impérativement prélevé dans des tubes EDTA. Suite au prélèvement, maintenir **entre 2 °C et 8 °C** jusqu'à utilisation, dans un délai maximum de **4 jours après le prélèvement** (ne pas congeler). Après utilisation ou passé le délai de 4 jours, congeler **en dessous de -16 °C pour une conservation jusqu'à 1 an** ou **en dessous de -70 °C pour une conservation au-delà de 1 an**.

Remarque : En France, conserver les échantillons de sang conformément à l'Annexe A, "Consignes relatives à la conservation du sang pour la France".

Organes

Suite au prélèvement, selon le cas de figure :

- Si l'analyse est effectuée **dans les 24 heures suivant le prélèvement** : maintenir **entre 2 °C et 8 °C** jusqu'à utilisation.
- Si l'analyse est effectuée **au-delà des 24 heures suivant le prélèvement** : **congeler en dessous de -16 °C** jusqu'à utilisation.

Dans les deux cas, après utilisation ou passé le délai de 24 heures, congeler en dessous de -16 °C pour une conservation jusqu'à 1 an ou en dessous de -70 °C pour une conservation au-delà de 1 an.

Matériels requis non fournis

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur **thermofisher.com**.

Matériel et réactifs nécessaires à la préparation des échantillons pour analyse

- Poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II
- Micropipettes de précision (gamme de 1 µL à 1 000 µL) avec pointes DNase/RNase-free à filtre
- Vortex ou équivalent
- Centrifugeuse pour microtubes de 1,5 mL et 2 mL
- Balance de précision
- Microtubes DNase/RNase-free de 1,5 mL et 2 mL
- Broyeur de laboratoire pour le broyage mécanique des échantillons d'organes
- Tampon PBS 1X ou milieu MEM
- Eau DNase/RNase-free

Kits, réactifs et matériel pour l'extraction et la purification de l'ARN des échantillons

L'ensemble du matériel et des réactifs nécessaires à la préparation des échantillons pour analyse sont susceptibles d'être utilisés lors de cette étape. S'assurer en plus de disposer des éléments suivants :

- Éthanol à 96 – 100 % ou éthanol à 80 % selon l'extraction réalisée
- Extraction automatisée en billes magnétiques :
 - MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Réf. A32700 ou A32702)
 - MagVet™ Universal Isolation Kit (Réf. MV384)

- MagMAX™ -96 Viral RNA Isolation Kit (Réf. AM1836) + isopropanol à 100 %
- Instrument de purification magnétique : renseignements disponibles sur demande au support technique.
- Extraction manuelle sur colonnes de silice en format individuel :
 - QIAamp™ Viral RNA Mini Kit (QIAGEN™) ou NucleoSpin™ RNA Virus kit (MACHEREY-NAGEL)
 - Centrifugeuse pour microtubes
- Extraction manuelle sur colonnes de silice en format plaque :
 - NucleoSpin™ 8 / 96 Virus kit (MACHEREY-NAGEL)
 - Centrifugeuse pour plaques

Kits d'extraction de l'ARN recommandés

	Kits d'extraction recommandés
Sang total	MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit
	MagVet™ Universal Isolation Kit
	MagMAX™ -96 Viral RNA Isolation Kit
	QIAamp™ Viral RNA Mini Kit
	NucleoSpin™ RNA Virus
	NucleoSpin™ 8 / 96 Virus
Échantillons d'organes	QIAamp™ Viral RNA Mini Kit
	NucleoSpin™ RNA Virus
	NucleoSpin™ 8 / 96 Virus

Préparation des échantillons avant extraction

Sang total prélevé dans des tubes EDTA

Prélever le sang total dans des tubes EDTA, puis retourner doucement les tubes à plusieurs reprises pour en mélanger le contenu avant le test. Après mélange, **utiliser l'échantillon directement** sans préparation préalable à l'extraction. L'extraction nécessite **50 à 200 µL de sang**, selon la méthode d'extraction.

Préparer l'échantillon d'organe

1. Disséquer finement le morceau d'organe dans une boîte de Petri stérile à l'aide de pinces et d'un scalpel stériles.
2. Dans un pot à prélèvement, peser 1 g de l'organe disséqué à l'aide d'une balance de précision.
3. Ajouter 10 mL d'eau physiologique ou de solution tamponnée (ex : PBS 1X).
4. Transférer le tout dans un mixeur et broyer pendant environ 10 à 15 secondes.
5. Transférer l'échantillon broyé dans un nouveau pot à prélèvement.
6. Prélever 1 mL d'échantillon broyé et le mettre dans un microtube de 2 mL.
7. Centrifuger 2 minutes à 1000 × g à +4 °C.
8. Utiliser **100 µL de surnageant** pour réaliser l'extraction.

Extraction avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit

Ce protocole est uniquement destiné à l'extraction à partir de sang total prélevé dans des tubes EDTA.

Méthodes recommandées

Deux méthodes sont disponibles pour l'extraction d'échantillons de sang total avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit :

- **Méthode Multi-échantillons Simple**—Recommandée pour traiter une combinaison de types d'échantillons.
- **Méthode Simple**—Recommandée pour traiter uniquement les échantillons de sang total.

Remarque : Ces 2 méthodes diffèrent uniquement dans l'ordre dans lequel les réactifs sont ajoutés aux échantillons.

Méthode : Multi-échantillons Simple

Démarrer avec des échantillons de sang total



Suivre la procédure appropriée en fonction de votre instrument :

KingFisher™ Flex ou MagMAX™ Express-96

Préparation des plaques (page 6)



Préparation des échantillons pour le traitement avec la méthode Multi-échantillons Simple (page 6)

Préparation du mélange de Lysis/Binding/Bead (page 6)

Préparation de l'échantillon (page 6)

Mélange de l'échantillon avec la PK, puis ajout du mélange de Lysis/Binding/Bead (page 6)



Placement des échantillons dans l'instrument (page 8)

KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL

Préparation des échantillons pour le traitement avec la méthode Multi-échantillons Simple (page 6)

Préparation du mélange de Lysis/Binding/Bead (page 6)

Préparation de l'échantillon (page 6)

Mélange de l'échantillon avec la PK, puis ajout du mélange de Lysis/Binding/Bead (page 6)



Préparation des plaques (page 8)



Placement des échantillons dans l'instrument (page 8)

Méthode : Simple

Démarrer avec des échantillons de sang total



Suivre la procédure appropriée en fonction de votre instrument :

KingFisher™ Flex ou MagMAX™ Express-96

Préparation des plaques (page 6)



Préparation des échantillons pour le traitement avec la méthode Simple (page 7)

Préparation du mélange Bead/PK (page 7)

Préparation de la solution de Lysis/Binding (page 7)

Préparation de l'échantillon (page 7)

Mélange de l'échantillon avec le mélange Bead/PK, puis ajout du solution de Lysis/Binding (page 7)



Placement des échantillons dans l'instrument (page 8)

KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL

Préparation des échantillons pour le traitement avec la méthode Simple (page 7)

Préparation du mélange Bead/PK (page 7)

Préparation de la solution de Lysis/Binding (page 7)

Préparation de l'échantillon (page 7)

Mélange de l'échantillon avec le mélange Bead/PK, puis ajout du solution de Lysis/Binding (page 7)



Préparation des plaques (page 8)



Placement des échantillons dans l'instrument (page 8)

Instructions

- Avant utilisation, retourner les bouteilles de solutions et de tampons pour bien les mélanger.
- Mélanger les échantillons avec les réactifs en utilisant un agitateur de plaques ou par aspiration-refoulement.
Remarque : Ne pas utiliser d'agitateur de plaques avec les barrettes requises par l'instrument KingFisher™ mL.
- Pour éviter toute contamination croisée :
 - Couvrir la plaque ou la barrette pendant les étapes d'incubation et d'agitation, pour éviter tout débordement.
 - Pipeter avec précaution les réactifs et les échantillons pour éviter les éclaboussures.
- Pour éviter toute contamination par les nucléases :
 - Porter des gants de laboratoire pendant les procédures. Les gants vous protègent des réactifs, et ils protègent l'acide nucléique des nucléases présents sur la peau.
 - Utiliser des embouts de pipettes exempts d'acide nucléique pour manipuler les réactifs, et éviter de mettre des embouts utilisés dans les récipients de réactifs.
 - Décontaminer les pailles de laboratoire et les pipettes avant de commencer.

Avant la première utilisation du kit

(Facultatif) Déterminer le réglage maximal de l'agitateur de plaques

Si un agitateur de plaques est utilisé, déterminer le réglage maximal :

1. Vérifier que la plaque est bien fixée à l'agitateur.
2. Ajouter 1 mL d'eau dans chacun des puits, puis couvrir la plaque avec du film adhésif.
3. Déterminer le réglage maximal possible sur l'agitateur sans aucune projection de l'eau sur le film adhésif.

Téléchargement du script

Les scripts pour MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit ne sont pas pré-installés sur les instruments.

1. Sur la page internet du produit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (à l'adresse thermofisher.com, effectuer une recherche à partir de la référence), faire défiler jusqu'à la section **Documentation du produit**.
2. Faire un clic droit sur le fichier approprié pour télécharger la version la plus récente du script MagMAX_CORE pour votre instrument.

Tableau 1 Scripts recommandés

Instrument	Nom du script
KingFisher™ Flex	MagMAX_CORE_Flex.bdz
KingFisher™ 96 MagMAX™ Express-96	MagMAX_CORE_KF-96.bdz
KingFisher™ Duo Prime	MagMAX_CORE_DUO.bdz
KingFisher™ mL	MagMAX_CORE_mL_no_heat.bdz

Si requis par votre laboratoire, utiliser l'un des scripts suivants, qui ne chauffe pas les échantillons lors de l'étape d'éluion.

Tableau 2 Scripts alternatifs sans étape d'éluion chauffée

Instrument	Nom du script
KingFisher™ Flex	MagMAX_CORE_Flex_no_heat.bdz
KingFisher™ 96 MagMAX™ Express-96	MagMAX_CORE_KF-96_no_heat.bdz
KingFisher™ Duo Prime	MagMAX_CORE_DUO_no_heat.bdz
KingFisher™ mL	MagMAX_CORE_mL_no_heat.bdz

Consulter le guide de l'utilisateur de votre instrument ou contacter le Support Technique pour obtenir les instructions d'installation du script.

Préparation des plaques (instruments KingFisher™ Flex et MagMAX™ Express-96)

IMPORTANT ! Si vous utilisez l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL, ne pas configurer les plaques ou les barrettes avant de préparer les échantillons.

1. Préparation des plaques pour le traitement.

Tableau 3 Configuration de la plaque : KingFisher™ Flex ou MagMAX™ Express-96

ID de la plaque	Position de la plaque ^[1]	Type de plaque	Réactif	Volume par puits
Plaque de lavage 1	2	Deep Well	MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Plaque de lavage 2	3	Deep Well	MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Élution	4	Standard	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peigne	5	Standard	Placer un peigne dans la plaque.	

^[1] Position sur l'instrument.

2. (Facultatif) Pour éviter l'évaporation et la contamination, couvrir les plaques préparées avec un film étanche jusqu'à ce qu'elles soient chargées dans l'instrument.

3. Passer à la méthode adaptée à votre laboratoire.

- **Méthode Multi-échantillons Simple**—Voir "Préparation des échantillons pour le traitement avec la méthode Multi-échantillons Simple" en page 6.
- **Méthode Simple**—Voir "Préparation des échantillons pour le traitement avec la méthode Simple" en page 7.

Préparation des échantillons pour le traitement avec la méthode Multi-échantillons Simple

Préparation du mélange de Lysis/Binding/Bead

1. Mélanger les composants suivants, dans l'ordre indiqué, pour le nombre requis d'échantillons plus 10 % d'excédent.

Composant	Volume par échantillon
MagMAX™ CORE Lysis Solution	350 µL
MagMAX™ CORE Binding Solution	350 µL
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	20 µL
Mélange de Lysis/Binding/Beads total	720 µL

2. Homogénéiser en retournant le tube ou la bouteille au moins 10 fois.

Préparation de l'échantillon

Préparer les échantillons et les contrôles comme décrit.

Type d'échantillon	Action
Sang total	Procéder avec un échantillon de 200 µL.
NCS	—

Mélange de l'échantillon avec la PK, puis ajout du mélange de Lysis/Binding/Bead

1. Ajouter 10 µL de MagMAX™ CORE Proteinase K dans les cupules nécessaires de la plaque ou de la barrette.
2. Transférer chaque échantillon ou témoin préparé dans une cupule contenant MagMAX™ CORE Proteinase K.

3. Mélanger l'échantillon avec la protéinase K pendant 2 minutes à température ambiante selon la méthode de votre choix.
 - **Utilisation d'un agitateur de plaques** : agiter vigoureusement pendant 2 minutes (voir "(Facultatif) Déterminer le réglage maximal de l'agitateur de plaques" en page 5).
 - **En pipetant** : par aspiration-refoulement 3 fois, puis incubé 2 minutes à température ambiante. (Pour le traitement en aval sur l'instrument KingFisher™ mL, vous devez mélanger en pipetant.)
4. Retourner le tube contenant le mélange de Lysis/Binding/Bead plusieurs fois pour résuspendre les billes en suspension, puis ajouter 720 µL de mélange de Lysis/Binding/Bead à chaque échantillon.
5. Passer immédiatement à "Placement des échantillons dans l'instrument" en page 8.

Remarque : Si vous utilisez l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL, passez à "Préparation des plaques ou barrettes (instruments KingFisher™ Duo Prime et KingFisher™ mL)" en page 8.

Préparation des échantillons pour le traitement avec la méthode Simple

Préparation du mélange Bead/PK

Nous vous recommandons de préparer un nouveau mélange Bead/PK à chaque nouvel essai. Si nécessaire, vous pouvez stocker le mélange Bead/PK à 4 °C pendant un maximum de 1 semaine.

1. Bien vortexer MagMAX™ CORE Magnetic Beads afin que toutes les billes soient resuspendues.
2. Mélanger les composants suivants pour le nombre requis d'échantillons plus 10 % d'excédent.

Composant	Volume par échantillon
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	20 µL
MagMAX™ CORE Proteinase K	10 µL
Mélange Bead/PK total	30 µL

Préparation de la solution de Lysis/Binding

1. Mélanger les composants suivants pour le nombre requis d'échantillons plus 10 % d'excédent.

Composant	Volume par échantillon
MagMAX™ CORE Lysis Solution	350 µL
MagMAX™ CORE Binding Solution	350 µL
Solution de Lysis/Binding totale	700 µL

2. Homogénéiser en retournant le tube ou la bouteille au moins 10 fois.

(Facultatif) Conserver la solution de Lysis/Binding à température ambiante jusqu'à 24 heures.

Préparation de l'échantillon

Préparer les échantillons et les témoins comme décrit.

Type d'échantillon	Action
Sang total	Procéder avec 200 µL d'échantillon.
NCS	—

Mélange de l'échantillon avec le mélange Bead/PK, puis ajout de la solution de Lysis/Binding

1. Retourner plusieurs fois le tube de mélange Bead/PK pour résuspendre les billes en suspension, puis ajouter 30 µL de mélange Bead/PK dans les puits requis de la plaque ou de la barrette.
2. Transférer chaque échantillon préparé dans un puits contenant le mélange Bead/PK.

3. Mélanger l'échantillon avec le mélange Bead/PK pendant 2 minutes à température ambiante selon la méthode de votre choix.
 - **Utilisation d'un agitateur de plaques** : agiter vigoureusement pendant 2 minutes (voir "(Facultatif) Déterminer le réglage maximal de l'agitateur de plaques" en page 5).
 - **En pipetant** : par aspiration-refoulement 3 fois, puis incubé 2 minutes à température ambiante. (Pour le traitement en aval sur l'instrument KingFisher™ mL, vous devez mélanger en pipetant.)
4. Ajouter 700 µL de solution de Lysis/Binding dans chaque puits ou barrette contenant un échantillon.
5. Passer immédiatement à "Placement des échantillons dans l'instrument" en page 8.

Remarque : Si vous utilisez l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL, passez à "Préparation des plaques ou barrettes (instruments KingFisher™ Duo Prime et KingFisher™ mL)" en page 8.

Préparation des plaques ou barrettes (instruments KingFisher™ Duo Prime et KingFisher™ mL)

Remarque : Quand le protocole est réalisé à l'aide d'un instrument KingFisher™ mL, mélanger les échantillons par aspiration-refoulement. Ne pas utiliser d'agitateur de plaques pour les barrettes requises par l'instrument.

1. Ajouter les MagMAX™ CORE Wash Solutions et le MagMAX™ CORE Elution Buffer aux emplacements indiqués, selon votre instrument.

Charger le peigne et toutes les plaques ou les barrettes au même moment. L'instrument ne requiert pas que les consommables soient chargés individuellement.

Tableau 4 Configuration des plaques : Instrument KingFisher™ Duo Prime

ID de la ligne	Ligne sur la plaque	Type de plaque	Réactif	Volume par puits
Échantillon	A	Deep Well	Mélange billes/lysate d'échantillon	Varie selon l'échantillon
Lavage 1	B		MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Lavage 2	C		MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Élution ^[1]	Séparer la barrette ^[2]	Barrette d'élution	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peigne	H	Deep Well	Placer un peigne dans la plaque.	

^[1] S'assurer que la barrette d'élution est placée dans le bon sens dans le bloc d'élution.

^[2] Placée sur l'élément de chauffage.

Tableau 5 Configuration de la barrette de tubes : Instrument KingFisher™ mL

ID de la position	Position de la barrette de tubes	Tube	Réactif	Volume par puits
Échantillon	1	Étalon	Mélange billes/lysate d'échantillon	Varie selon l'échantillon
Lavage 1	2		MagMAX™ CORE Wash Solution 1	500 µL
Lavage 2	3		MagMAX™ CORE Wash Solution 2	500 µL
Élution	4		MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µL
Peigne	N/A	N/A	Glisser le peigne dans le support pour peigne.	

2. Passer immédiatement à "Placement des échantillons dans l'instrument" en page 8.

Placement des échantillons dans l'instrument

1. Sélectionner le script approprié sur l'instrument (voir "Téléchargement du script" en page 5).
2. Sélectionner le programme, puis charger les plaques préparées ou les barrettes dans leurs positions lorsque l'instrument vous invite à le faire.

Conserver l'acide nucléique purifié sur de la glace pour une utilisation immédiate, à -20 °C pour une utilisation dans le mois qui suit ou à -80 °C pour une conservation à long terme.

Extraction avec MagVet™ Universal Isolation Kit

Remarques

Ce protocole d'extraction peut être utilisé avec les instruments KingFisher™ mL, KingFisher™ 96 et KingFisher™ Flex. En effet, seul le nombre d'échantillons traités diffère.

Ce protocole convient uniquement à l'extraction à partir de sang total prélevé dans des tubes EDTA.

Avant la première utilisation du kit

Préparer la solution de Lysis **NM1** : ajouter 100 mL de solution **N1** dans la bouteille contenant la solution M1 (25 mL), puis bien vortexer.

Conserver la solution de Lysis NM1 (125 mL) à température ambiante jusqu'à un an.

Avant chaque utilisation du kit

- Préparer la solution **NM2+Beads** : pour chaque réaction, mélanger 20 µL de **NM_LSI_Beads** et 600 µL de tampon de binding **NM2**, puis vortexer vigoureusement la solution afin que toutes les billes soient resuspendues. Après utilisation, jeter la solution **NM2+Beads**.
- Préparer et étiqueter les microtubes, les barrettes et les plaques pour le nombre requis d'échantillons comprenant les témoins négatifs et positifs.

Protocole

En cas d'utilisation de l'instrument KingFisher™ mL, sortir le plateau de barrettes de tubes de l'instrument, puis charger les barrettes d'extraction dessus avant de distribuer les tampons.

En cas d'utilisation de l'instrument KingFisher™ 96 ou KingFisher™ Flex, les tampons sont distribués directement dans les plaques sur la paillasse.

1. Installer la plaque ou barrette sur une paillasse de laboratoire, conformément au tableau suivant :

Position de la barrette ou plaque	Composants	Échantillon pour analyse	NCS
A / 1	Solution de lyse	250 µL de NM1	250 µL de NM1
	Prise d'essai	100 µL de sang	—
B / 2	Solution de lavage 1	600 µL de NM3	600 µL de NM3
C / 3	Solution de lavage 2	600 µL de NM4	600 µL de NM4
D / 4	Solution de lavage 3	600 µL d'éthanol 80 %	600 µL d'éthanol 80 %
E / 5	Tampon d'éluion	80 µL de NM6	80 µL de NM6

2. Vortexer vigoureusement la solution **NM2+Beads** afin que toutes les billes soient resuspendues, puis transférer **620 µL** de la solution **NM2+Beads** (ou 600 µL de NM2 et 20 µL de Beads) **dans chaque échantillon** en **position A** de la barrette ou de la **plaque 1**, selon l'instrument utilisé.
3. Placer les peignes des barreaux aimantés.
4. Charger les barrettes ou les plaques dans l'instrument.
5. Sélectionner le script approprié sur l'instrument :
 - Script **NM_LSI_15prep** pour l'instrument KingFisher™ mL
 - Script **NM_LSI_RRC96** pour les instruments KingFisher™ 96 et KingFisher™ Flex
6. Lancer l'expérience.
7. Après l'expérience, préparer les acides nucléiques purifiés à la conservation.
 - a. Pour l'instrument KingFisher™ mL, transférer les **acides nucléiques purifiés** contenus en **position E de la barrette d'extraction** dans les microtubes appropriés.
 - b. Pour les instruments KingFisher™ 96 et KingFisher™ Flex, recouvrir la plaque d'éluion (**plaque 5**) de film adhésif.
8. Jeter tous les plastiques utilisés pour l'extraction.

Conserver les acides nucléiques purifiés entre 2 °C et 8 °C pour une utilisation immédiate ou en dessous de -16 °C pour une conservation à long terme.

Extraction avec MagMAX™ -96 Viral RNA Isolation Kit

Remarques

Ce protocole d'extraction peut être utilisé avec MagMAX™ Express-24 Magnetic Particle Processor.

Ce protocole convient uniquement à l'extraction à partir de sang total prélevé dans des tubes EDTA.

Avant la première utilisation du kit

- Préparer le tampon de lyse **TL** conformément au tableau suivant :

	Pour 1 échantillon	Pour N échantillons [1]
Concentré de Lysis/Binding Solution	70 µL	N × 70 µL
Carrier RNA [2]	1 µL	N × 1 µL
<i>Vortexer brièvement</i>		
Ajouter l'isopropanol 100 %	70 µL	N × 70 µL
<i>Vortexer</i>		

[1] Nous recommandons de préparer une réaction supplémentaire par rapport au total d'extractions à réaliser (échantillons plus contrôles).

[2] Le carrier RNA peut devenir visqueux une fois décongelé. Si le pipetage est difficile, **incuber le tube à 37 °C pendant 10 à 15 minutes**, vortexer vigoureusement, puis centrifuger.

Conserver le tampon de lyse TL préparé à température ambiante jusqu'à un mois.

Remarque : Ne pas conserver le tampon de lyse TL entre 2 °C et 8 °C car le RNA carrier risque de précipiter. En cas de précipitation, incuber le tampon de lyse TL à 37 °C pendant 10 à 15 minutes, puis le mélanger soigneusement avant utilisation.

- Préparer la solution de lavage 1 : ajouter le volume requis d'isopropanol 100 % au concentré de solution de lavage 1 selon les recommandations du fournisseur.
- Préparer la solution de lavage 2 : ajouter le volume requis d'éthanol 96 – 100 % au concentré de solution de lavage 2 selon les recommandations du fournisseur.

Avant chaque utilisation du kit

- Préparer la solution **Mix Beads** : pour chaque réaction, mélanger 10 µL de **RNA Binding Beads** et 10 µL de **Lysis/Binding Enhancer**, puis mélanger vigoureusement la solution afin que toutes les billes soient resuspendues. Conserver la solution **Mix Beads** à 2–8 °C pour une utilisation immédiate. Après utilisation, jeter la solution **Mix Beads**.
- Préparer et étiqueter les microtubes et les plaques pour le nombre requis d'échantillons comprenant les témoins négatifs et positifs.

Protocole

1. Installer la plaque sur une paillasse de laboratoire, conformément au tableau suivant :

Ligne de la plaque	Composants	Échantillon pour analyse	NCS
A	Billes magnétiques	20 µL de Mix Beads	20 µL de Mix Beads
	Prise d'essai	50 µL de sang	—
B	Solution de lavage 1	170 µL de tampon de lavage 1	170 µL de tampon de lavage 1
C	Solution de lavage 1	170 µL de tampon de lavage 1	170 µL de tampon de lavage 1
D	Solution de lavage 2	170 µL de tampon de lavage 2	170 µL de tampon de lavage 2
E	Solution de lavage 2	170 µL de tampon de lavage 2	170 µL de tampon de lavage 2
F	Tampon d'élution	50 µL de tampon d'élution	50 µL de tampon d'élution

2. Transférer **140 µL** de tampon de lyse **TL** à chaque échantillon dans la ligne **A** de la plaque.
3. Placer les peignes des barreaux aimantés.
4. Charger les plaques dans l'instrument.
5. Sélectionner le script **AM_LSI_Express** sur le MagMAX™ Express-24 Magnetic Particle Processor.
6. Lancer l'expérience.

- Après l'expérience, transférer les **acides nucléiques purifiés** de la **ligne F de la plaque d'extraction** dans la plaque de conservation des éluats fournie dans le kit ou dans les microtubes appropriés.
- Jeter tous les plastiques utilisés pour l'extraction.

Conserver les acides nucléiques purifiés entre 2 °C et 8 °C pour une utilisation immédiate ou en dessous de -16 °C pour une conservation à long terme.

Extraction avec QIAamp™ Viral RNA Mini Kit

Avant de commencer

- Préparer le tampon **AVL+Carrier** selon les recommandations du fournisseur.
- Préparer les tampons **AW1** et **AW2** : ajouter la quantité requise d'éthanol 96 – 100 % selon les recommandations du fournisseur avant utilisation.
- Préparer et étiqueter les microtubes et les colonnes pour le nombre requis d'échantillons comprenant les témoins négatifs et positifs.

Protocole

- Mélanger les composants suivants dans des microtubes de 1,5 mL conformément au tableau suivant :

	Échantillon pour analyse	NCS
Solution de Lysis	560 µL de AVL+Carrier	560 µL de AVL+Carrier
Prise d'essai	100 µL d'échantillon	100 µL d'eau DNase/RNase-free

- Vortexer immédiatement pendant **15 secondes**.
- Incuber **10 minutes** à température ambiante.
- Ajouter **560 µL d'éthanol 96 – 100 %** dans chaque tube, vortexer immédiatement pendant 15 secondes, puis centrifuger rapidement le tube avant ouverture.
On obtient le **lysate de l'échantillon**.
- Prendre et étiqueter une mini-colonne du QIAamp™ Viral RNA Mini Kit.
- Transférer **630 µL du lysate de l'échantillon** sur la colonne, boucher, centrifuger 1 minute à 10 000 × g, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
- Transférer **le reste du lysate de l'échantillon** sur la même colonne, boucher, centrifuger 1 minute à 10 000 × g, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
- Distribuer **500 µL** de tampon **AW1** (voir "Avant de commencer" en page 12) dans chaque colonne, boucher, centrifuger 1 minute à 6 000 × g, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
- Distribuer **500 µL** de tampon **AW2** (voir "Avant de commencer" en page 12) dans chaque colonne, boucher, centrifuger 1 minute à 10 000 × g, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
- Placer la colonne dans un tube collecteur de 2 mL propre, centrifuger 3 minutes à 10 000 × g pour sécher la membrane, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
- Placer la colonne dans un **microtube de 1,5 mL** propre, distribuer **40 µL** de tampon **AVE**, puis boucher.
- Incuber 1 minute à température ambiante.
- Centrifuger l'ensemble colonne/microtube 2 minutes à 6 000 × g, puis jeter la colonne.
Les acides nucléiques purifiés sont dans le microtube.

Conserver les acides nucléiques purifiés entre 2 °C et 8 °C pour une utilisation immédiate ou en dessous de -16 °C pour une conservation à long terme.

Extraction avec le kit NucleoSpin™ RNA Virus

Avant de commencer

- Préparer le tampon **RAV1+Carrier** selon les recommandations du fournisseur.
- Préparer le tampon **RAV3** : ajouter la quantité requise d'éthanol 96 – 100 % selon les recommandations du fournisseur avant utilisation.
- Préparer et étiqueter les microtubes et les colonnes pour le nombre requis d'échantillons comprenant les témoins négatifs et positifs.

Protocole

1. Mélanger les composants suivants dans des microtubes de 1,5 mL conformément au tableau suivant :

	Échantillon pour analyse	NCS
Solution de lyse	560 µL de RAV1+Carrier	560 µL de RAV1+Carrier
Prise d'essai	100 µL d'échantillon	100 µL d'eau DNase/RNase free

2. Vortexer immédiatement pendant **15 secondes**.
3. Incuber **10 minutes** à température ambiante.
Remarque : En cas de sang coagulé, incuber 10 minutes à 70 °C.
4. Ajouter **560 µL d'éthanol à 96–100 %** dans chaque tube, vortexer immédiatement pendant 15 secondes, puis centrifuger rapidement le tube avant ouverture.
On obtient le **lysate de l'échantillon**.
5. Prendre et étiqueter une mini-colonne du kit NucleoSpin™ RNA Virus.
6. Transférer **630 µL du lysate de l'échantillon** sur la colonne, boucher, centrifuger 1 minute à 10 000 × g, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
7. Transférer **le reste du lysate de l'échantillon** sur la même colonne, boucher, centrifuger 1 minute à 10 000 × g, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
8. Distribuer **500 µL** de tampon **RAW** dans chaque colonne, boucher, centrifuger 1 minute à 10 000 × g, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
9. Distribuer **630 µL** de tampon **RAV3** (voir "Avant de commencer" en page 13) dans chaque colonne, boucher, centrifuger 1 minute à 10 000 × g, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
10. Placer la colonne dans un tube collecteur de 2 mL propre, centrifuger 3 minutes à 10 000 × g pour sécher la membrane, jeter le tube collecteur, puis **poursuivre avec la colonne**.
11. Placer la colonne dans un **microtube de 1,5 mL** propre, ajouter **50 µL d'eau DNase/RNase-free**, puis boucher.
12. Incuber 1 minute à température ambiante.
13. Centrifuger l'ensemble colonne/microtube 1 minute à 10 000 × g, puis jeter la colonne.
Les acides nucléiques purifiés sont dans le microtube.

Conserver les acides nucléiques purifiés entre 2 °C et 8 °C pour une utilisation immédiate ou en dessous de -16 °C pour une conservation à long terme.

Extraction avec le kit NucleoSpin™ 8 / 96 Virus

Remarques

Les extractions avec les kits NucleoSpin™ 8 Virus et NucleoSpin™ 96 Virus sont similaires, seul le format des colonnes diffère : en barrettes de 8 colonnes ou en plaque de 96 colonnes.

Avant de commencer

- Préparer le tampon **RAV1+Carrier** selon les recommandations du fournisseur.
- Préparer le tampon **RAV3** : ajouter la quantité requise d'éthanol 96 – 100 % selon les recommandations du fournisseur avant utilisation.
- Préparer la protéinase K : ajouter la quantité requise de tampon PB selon les recommandations du fournisseur avant utilisation.
- Préparer et étiqueter les barrettes ou plaques de Lysis et les colonnes de silice en format barrette ou plaque pour le nombre requis d'échantillons comprenant les témoins négatifs et positifs.

Protocole

1. Mélanger les composants suivants dans les barrettes de Lysis (rack de barrettes) ou plaque de Lysis (MN Round-Well Block) conformément au tableau suivant :

	Échantillon pour analyse	NCS
Solution de Lysis	400 µL de RAV1+Carrier	400 µL de RAV1+Carrier
	20 µL de protéinase K	20 µL de protéinase K
Prise d'essai	100 µL d'échantillon	100 µL d'eau DNase/RNase-free

2. **Mélanger** par aspiration-refoulement 4 à 5 fois, puis boucher correctement.
3. Incuber **10 minutes à 70°C**, puis centrifuger rapidement avant ouverture.
4. Ajouter **400 µL d'éthanol 96 – 100 %** dans un MN Square-Well Block, transférer le lysat obtenu à l'étape précédente dans l'éthanol 96 – 100 %, puis **mélanger** par pipetage 4 à 5 fois.
On obtient le **lysate de l'échantillon**.
5. Prendre et étiqueter les colonnes du kit NucleoSpin™ 8 / 96 Virus (colonnes bleues), en format barrette (NucleoSpin™ Virus Binding Strips) ou plaque (NucleoSpin™ Virus Binding Plate), puis les placer sur un MN Square-Well Block.
6. À l'aide d'une pipette, transférer **la totalité du lysate de l'échantillon** sur les colonnes, fermer à l'aide d'un film adhésif, centrifuger 2 minutes à 5 600 × g, puis **transférer les colonnes** sur un autre MN Square-Well Block ou sur des puits non utilisés.
7. Distribuer **500 µL** de tampon **RAW** dans chaque colonne, fermer à l'aide d'un film adhésif, centrifuger 2 minutes à 5 600 × g, puis **transférer les colonnes** sur un autre MN Square-Well Block ou sur des puits non utilisés.
8. Distribuer **700 µL** de tampon **RAV3** (voir "Avant de commencer" en page 14) dans chaque colonne, fermer à l'aide d'un film adhésif, centrifuger 2 minutes à 5 600 × g, puis transférer les colonnes sur un autre MN Square-Well Block ou sur des puits non utilisés.
9. Distribuer **700 µL** de tampon **RAV3** (voir "Avant de commencer" en page 14) dans chaque colonne, fermer à l'aide d'un film adhésif, puis centrifuger 15 minutes à 5 600 × g.
10. **Transférer les colonnes** sur des barrettes d'élution ou une plaque d'élution, ajouter **80 µL d'eau DNase/RNase-free préchauffée à 70 °C**, puis fermer à l'aide d'un film adhésif.
11. Incuber 1 à 2 minutes à température ambiante.
12. Centrifuger 2 minutes à 5 600 × g, jeter les colonnes, puis **boucher et conserver les tubes d'élution**.
Les acides nucléiques purifiés sont dans les tubes d'élution.

Conserver les acides nucléiques purifiés entre 2 °C et 8 °C pour une utilisation immédiate ou en dessous de -16 °C pour une conservation à long terme.

Annexe A Consignes relatives à la conservation du sang pour la France

Consignes relatives à la conservation du sang pour la France

Le laboratoire national de référence français impose les instructions suivantes :

Le sang doit avoir été impérativement prélevé sur tube EDTA. Suite au prélèvement, maintenir entre 2 °C et 8 °C jusqu'à utilisation dans un délai maximum de 10 jours après prélèvement. Après utilisation ou passé le délai de 10 jours, congeler en dessous de -16 °C pour conservation jusqu'à 1 an ou en dessous de -70 °C pour une conservation au-delà de 1 an.

Documentation et support

Assistance à la clientèle et support technique

Visiter thermofisher.com/support pour obtenir les informations les plus récentes sur les services et le support.

- Numéros de téléphone de contact internationaux
- Informations sur le support produit
 - FAQ relatives aux produits
 - Logiciels, correctifs et mises à jour
 - Formations sur de nombreux instruments et applications
- Commandes et assistance en ligne
- Documentation produit
 - Guides de l'utilisateur, manuels et protocoles
 - Certificats d'analyse
 - Fiches de données de sécurité (FDS)

Remarque : Pour obtenir les FDS relatives aux réactifs et produits chimiques d'autres fabricants, contacter ces derniers.

Garantie limitée du produit

Life Technologies Corporation et ses filiales garantissent leurs produits selon les termes et conditions générales de ventes disponibles sur le site www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. Si vous avez des questions, vous pouvez prendre contact avec Life Technologies à l'adresse web suivante : www.thermofisher.com/support.

Personne morale : Life Technologies Corporation | Carlsbad, CA 92008 États-Unis | Numéro gratuit aux États-Unis 1 800 955 6288

Les informations contenues dans ce guide sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

CLAUDE DE NON-RESPONSABILITÉ : DANS LA MESURE PERMISE PAR LA LOI, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. ET/OU SA OU SES FILIALE(S) NE SAURAIENT ÊTRE TENUES RESPONSABLES DE DOMMAGES SPÉCIAUX, ACCESSOIRES, INDIRECTS, PUNITIFS, MULTIPLES OU CONSÉCUTIFS LIÉS AU PRÉSENT DOCUMENT OU A SON USAGE OU EN RÉSULTANT.

Traduit de l'anglais, publication numéro MAN0019023 Rév. A.0.

Historique des révisions: Pub. N° MAN0019023

Révision	Date	Description
A.0	23 janvier 2020	Nouveau document traduit à partir d'un document en français (MAN0008688 Rev. B.0) avec l'ajout du protocole MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit.

Informations importantes sur les licences : Ces produits peuvent être couverts par une ou plusieurs licences à usage limité. En utilisant ces produits, vous acceptez les conditions générales de toutes les licences à usage limité.

©2020 Thermo Fisher Scientific Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques sont la propriété de Thermo Fisher Scientific et de ses filiales, sauf indication contraire. NucleoSpin™ est une marque de MACHEREY-NAGEL. QIAamp™ et QIAGEN™ sont des marques de QIAGEN GmbH.