

VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit

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

Pub. n° MAN0008873 Rév. C.0

Espèces	Matrices d'échantillons	Type de test
Ruminants	<ul style="list-style-type: none"> Écouvillons placentaires, vaginaux et cervicaux Organes (fœtus, placenta) 	Individuel

 **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 ! RISQUE BIOLOGIQUE.** Lire les informations de sécurité relatives aux risques biologiques du produit disponibles sur thermofisher.com. Suivre toutes les réglementations du travail avec des échantillons biologiques locales, nationales et/ou communautaires en vigueur.

■ Objectif de ce guide	1
■ Choix de l'échantillon	2
■ Conservation des échantillons	2
■ Matériels requis non fournis	2
■ Méthode	4
■ Instructions	4
■ Préparation des échantillons pour la purification	5
■ Purification de l'acide nucléique avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (méthode automatique)	5
■ Purification de l'acide nucléique avec MagVet™ Universal Isolation Kit (méthode automatique)	10
■ Purification de l'ADN avec QIAamp™ DNA Mini Kit (méthode manuelle)	11
■ Purification de l'ADN avec le kit NucleoSpin™ Tissue (méthode manuelle)	12
■ Bonnes pratiques de laboratoire pour la PCR et la RT-PCR	14

Annexe A Purification avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL

■ Matériels requis non fournis	15
■ Procédure de purification	15

Annexe B Documentation et support

■ Assistance à la clientèle et support technique	16
■ Garantie limitée du produit	16

Objectif de ce guide

Ce guide décrit les protocoles de purification d'ADN pour les huit pathogènes principaux responsables des avortements chez les ruminants (*Coxiella burnetii*, *Chlamydophila* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter fetus*, *Leptospira* pathogens, *Anaplasma phagocytophila* et *Bovine herpesvirus 4*). Les méthodes ont été validées et optimisées pour une utilisation en aval avec Applied Biosystems™ VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit (Réf. SARP).

- La purification automatisée des acides nucléiques est réalisée à l'aide de l'un des instruments suivants : KingFisher™ Flex, MagMAX™ Express-96, KingFisher™ mL ou KingFisher™ Duo Prime.

- La purification manuelle des acides nucléiques utilise des colonnes de centrifugation à base de silice.

Choix de l'échantillon

Type d'échantillon	Type d'analyse	Quantité requise et équipement de prélèvement
Écouvillons placentaires, vaginaux et cervicaux	Individuel	Écouvillon sec stérile
Organe (foetus, placenta)	Individuel	20 à 30 mg de tissu

Conservation des échantillons

Type d'échantillon	Conservation
Écouvillons placentaires, vaginaux et cervicaux	Après le prélèvement, conserver les échantillons entre 2°C et 8°C jusqu'à utilisation (sous 48 heures maximum). Après l'éluion de l'écouvillon, utiliser directement l'éluat pour réaliser la PCR. Après utilisation ou à expiration du délai de 48 heures, conserver les échantillons en dessous de -16°C pour une utilisation dans l'année ou en dessous de -70°C pour une conservation à long terme.
Organe (foetus, placenta)	Après le prélèvement, conserver selon le cas de figure : <ul style="list-style-type: none"> • conserver les échantillons entre 2°C et 8°C si l'analyse est effectuée dans les 24 heures suivant le prélèvement ; • conserver les échantillons en dessous de -16°C si l'analyse est effectuée au-delà des 24 heures suivant le prélèvement. Après utilisation ou à expiration du délai de 24 heures, conserver les échantillons en dessous de -16°C pour une utilisation dans l'année ou en dessous de -70°C pour une conservation à long terme.

Matériels requis non fournis

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur **thermofisher.com**. « PFL » indique que le matériel est disponible sur **fisherscientific.com** ou auprès d'un autre grand fournisseur de laboratoire.

Matériel nécessaire pour la collecte d'échantillon, la préparation, et la purification des acides nucléiques

Tableau 1 Matériel requis pour toutes les méthodes de préparation des échantillons

Article	Source
Équipement	
Poste de Sécurité Microbiologique de type II (PSMII)	PFL
Centrifugeuse de paillasse	PFL
Agitateur de laboratoire, vortex ou équivalent	PFL
Micropipettes de précision ajustables (de 1 µl à 1 000 µl)	PFL
Consommables	
Embouts de pipette résistant aux aérosols, sans nucléase	PFL
Microtubes DNase/RNase-free de 1,5 ml et 2,0 ml	PFL
Réactifs	
Eau sans nucléase	AM12450
PBS (1X), pH 7.4	PFL

Tableau 2 Matériels supplémentaires nécessaires pour la purification des échantillons d'organes

Article	Source
Équipement	
(<i>Facultatif</i>) Broyeur de tissus pour l'agitation avec billes, parmi les modèles suivants ou équivalent : <ul style="list-style-type: none"> Fisher Scientific™ Bead Mill 24 Homogenizer Precellys™ 24 Homogenizer (Bertin) Instrument FastPrep-24™ (MP Biomedical 116004500) Mixer Mill 400 (Verder 207450001) 	<ul style="list-style-type: none"> Fisher Scientific 15-340-163 Bertin EQ03119.200.RD000.0 Fisher Scientific MP116004500 Fisher Scientific 08 418 241
Balance de précision	PFL
PYREX™ Solid Glass Beads for Distillation Columns (3 mm), ou billes en verre de 3 mm équivalentes	Fisher Scientific™ 11-312-10A
Scalpels et pinces métalliques (stériles)	PFL
Consommables	
Boîte de Petri (stérile)	PFL

Matériels supplémentaires nécessaires pour la purification automatisée des acides nucléiques

Tableau 3 Matériel nécessaire pour la procédure MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit

Article	Source
Instrument, l'un des suivants :	
KingFisher™ Flex Purification System	Contacter le représentant commercial local.
MagMAX™ Express-96 Magnetic Particle Processor	
KingFisher™ Duo Prime Purification System	
KingFisher™ mL Purification System	
Équipement	
Bloc chauffant à 55°C	PFL
Réservoir de réactifs	PFL
Consommables	
Adhesive PCR Plate Foils, ou équivalent	AB0626
Consommables pour les instruments KingFisher™ Flex et MagMAX™ Express-96 : <ul style="list-style-type: none"> KingFisher™ Deepwell 96 plaque KingFisher™ 96 KF microplates KingFisher™ 96 tip comb for DW magnets 	<ul style="list-style-type: none"> 95040450 97002540 97002534
Consommables pour les instruments KingFisher™ Duo Prime et KingFisher™ mL	Voir Tableau 8 en page 15.
Kits et réactifs	
MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit	A32700 ou A32702
PBS, pH 7.4 (10 fois), exempt de RNase	AM9624

Tableau 4 Matériel nécessaire pour la procédure MagVet™ Universal Isolation Kit

Article	Source
Instrument, l'un des suivants :	
KingFisher™ Flex Purification System	Contacter le représentant commercial local.
MagMAX™ Express-96 Magnetic Particle Processor	
KingFisher™ mL Purification System	

Article	Source
Équipement	
Bloc chauffant à 70°C	PFL
Réservoir de réactifs	PFL
Kits et réactifs	
MagVet™ Universal Isolation Kit	MV384
MBL2 Buffer	12143
Protéinase K (PK)	<ul style="list-style-type: none"> • Qiagen 19131 • Macherey Nagel 740396
Éthanol à 80 %	PFL

Matériels supplémentaires nécessaires pour la purification manuelle des acides nucléiques

Article	Source
Équipement	
Bloc chauffant à 70°C	PFL
Kits et réactifs	
L'un des kits suivants : <ul style="list-style-type: none"> • QIAamp™ DNA Mini Kit • Kit NucleoSpin™ Tissue 	<ul style="list-style-type: none"> • Qiagen 51304 • Macherey Nagel 740952
Éthanol à 96-100 %	PFL

Méthode

Méthode de purification d'acides nucléiques automatisée et manuelle

Préparation des échantillons pour la purification

Préparer les échantillons conformément à votre méthode de purification, puis effectuer le protocole de purification convenant à votre laboratoire.

Purification de l'acide nucléique avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (méthode automatique)

ou

Purification de l'acide nucléique avec MagVet™ Universal Isolation Kit (méthode automatique)

ou

Purification de l'ADN avec QIAamp™ DNA Mini Kit (méthode manuelle)

ou

Purification de l'ADN avec le kit NucleoSpin™ Tissue (méthode manuelle)

Instructions

Préparer au moins un échantillon témoin purifié à utiliser en tant que contrôle négatif d'extraction. Utiliser PBS (1X), pH 7.4 ou de l'eau sans nucléase au lieu de l'échantillon testé, sauf indication contraire. Traiter l'échantillon témoin purifié en même temps que les échantillons testés, en utilisant le même protocole de purification d'acides nucléiques.

Préparation des échantillons pour la purification

1. Préparer les échantillons comme décrit.

Type d'échantillon	Méthode de purification	Action
Écouvillon placentaire, vaginal et cervical	Automatisée ou manuelle	<ol style="list-style-type: none"> Casser la pointe de l'écouvillon et l'ajouter à un tube de 2 ml. Ajouter 1 ml de PBS (1X), pH 7.4 à chaque échantillon. Vortexer pendant 3 minutes. Presser l'écouvillon contre la paroi du tube pour en faire sortir le liquide, puis jeter l'écouvillon. Procéder avec 200 µl d'éluat.
Organe (foetus, placenta) ^[1]	Automatisée (avec broyage)	<p>Méthode de broyage : Préparer les échantillons d'organes à l'aide d'un broyeur de tissus.</p> <ol style="list-style-type: none"> Ajouter les composants suivants dans un tube de 2 ml : <ul style="list-style-type: none"> Tissu : 20 à 30 mg PBS (1X), pH 7.4 : 1 ml PYREX™ Solid Glass Beads for Distillation Columns (3 mm) : 2 billes Broyer (agiter avec les billes) les échantillons. <ul style="list-style-type: none"> Fisher Scientific™ Bead Mill 24 Homogenizer : 6 m/s pendant 45 secondes Mixer Mill 400 : 30 Hz pendant 2 minutes Centrifuger à 1 000 × g pendant 2 minutes. Procéder avec 200 µl de surnageant. <p>Méthodes d'échantillon non broyé avec des billes : Préparer les échantillons d'organes à l'aide d'un agitateur vortex.</p> <ol style="list-style-type: none"> Hacher finement le morceau d'organe dans une boîte de Petri stérile à l'aide de pinces et d'un scalpel stériles. Ajouter les composants suivants dans un tube de 2 ml : <ul style="list-style-type: none"> Tissu (haché finement) : 20 à 30 mg PBS (1X), pH 7.4 : 1 ml PYREX™ Solid Glass Beads for Distillation Columns (3 mm) : 2 billes Vortexer vigoureusement. Centrifuger à 1 000 × g pendant 2 minutes. Procéder avec 200 µl de surnageant.
	Manuelle (sans broyage)	<ol style="list-style-type: none"> Hacher finement le morceau d'organe dans une boîte de Petri stérile à l'aide de pinces et d'un scalpel stériles. Procéder avec 20 à 30 mg de tissu haché.

[1] Sélectionner la méthode de préparation convenant à votre laboratoire.

2. Effectuer la purification d'ADN avec le volume approprié de l'échantillon préparé.

- “Purification de l'acide nucléique avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (méthode automatique)” en page 5
- “Purification de l'acide nucléique avec MagVet™ Universal Isolation Kit (méthode automatique)” en page 10
- “Purification de l'ADN avec QIAamp™ DNA Mini Kit (méthode manuelle)” en page 11
- “Purification de l'ADN avec le kit NucleoSpin™ Tissue (méthode manuelle)” en page 12

Purification de l'acide nucléique avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (méthode automatique)

Suivre cette procédure si les instruments suivants sont utilisés :

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

Suivre l'Annexe A, “Purification avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL” si les instruments suivants sont utilisés :

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

Méthode avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit

Préparation des plaques pour le traitement

Préparation de la Lysis/PK Solution

Traitement des échantillons avec la Lysis/PK Solution

Mélanger les échantillons avec le mélange de Binding/Bead

Placement des échantillons dans l'instrument

Instructions

- Avant utilisation, retourner les bouteilles de solutions et de tampons pour bien les mélanger.
- Pour éviter toute contamination croisée :
 - Couvrir la plaque ou la barrette de tubes pendant les étapes d'incubation et d'agitation, pour éviter tout débordement.
 - Pipetter 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 présentes 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

(Optionnel) Déterminer les paramètres optimaux du broyeur à billes

Nous recommandons l'utilisation de Fisher Scientific™ Bead Mill 24 Homogenizer pour un rendement maximal en acides nucléiques. Si un autre instrument est utilisé, suivre les directives du fournisseur pour déterminer les paramètres de vitesse et de temps pour obtenir une lyse de cellules suffisante.

Téléchargement et installation du script

Le script adéquat pour MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit doit être installé sur l'instrument avant sa première utilisation.

1. Sur la page internet du produit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (à l'adresse [thermofisher.com](https://www.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 5 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 le liquide lors de l'étape d'élution.

Tableau 6 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

3. Se référer au guide de l'utilisateur de l'instrument ou contacter l'assistance technique pour connaître les instructions d'installation du script.

Réalisation de la procédure de purification

1 Préparation des plaques pour le traitement

a. Préparation des plaques pour le traitement.

Tableau 7 Configuration de la plaque : Instrument 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
Éluion	4	Standard	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µl
Peigne	5	Standard	Placer un peigne protecteur dans la plaque.	

^[1] Position sur l'instrument.

Remarque : Pour configurer les plaques ou les barrettes de tubes pour l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL, voir Annexe A, "Purification avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL".

- b. (Facultatif) Pour éviter l'évaporation et la contamination, couvrir les plaques préparées avec une feuille adhésive jusqu'à ce qu'elles soient chargées dans l'instrument.

2 Préparation de la Lysis/PK Solution

Préparer la Lysis/PK Solution au moment de l'utilisation. Ne pas mélanger à l'avance.

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

1. Mélanger MagMAX™ CORE Lysis Solution avec le PBS (1X), pH 7.4.

Composant	Volume par échantillon
MagMAX™ CORE Lysis Solution	200 µl
PBS (1X), pH 7.4	200 µl
Total de Lysis Solution diluée	400 µl

2. Retourner plusieurs fois le tube pour homogénéiser, puis centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube.

2 Préparation de la Lysis/PK Solution (suite)

3. Ajouter MagMAX™ CORE Proteinase K à la Lysis Solution diluée.

Remarque : Le PK Buffer n'est pas requis pour ce protocole.

Composant	Volume par échantillon
Lysis Solution diluée	400 µl
MagMAX™ CORE Proteinase K	10 µl
Volume total de la Lysis/PK Solution	410 µl

- b. Retourner plusieurs fois le tube pour homogénéiser, puis centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube.

3 Traitement des échantillons avec la Lysis/PK Solution

Suivre cette procédure dans des tubes individuels pour éviter la contamination. Ne pas utiliser de plaques.

- a. Mélanger les composants suivants dans l'ordre indiqué.

Composant	Volume par échantillon	Volume par échantillon témoin purifié
Échantillon préparé	200 µl	—
PBS (1X), pH 7.4	—	200 µl
Lysis/PK Solution	410 µl	410 µl

- b. Vortexer brièvement pour mélanger l'échantillon avec la Lysis/PK Solution.

- c. Incuber l'échantillon selon le type d'échantillon.

Pour...	Faire...
Éluat d'écouvillon placentaire, vaginal et cervical	Incuber 30 minutes à 55°C.
Sumageant d'organe	Incuber entre 30 minutes et 2 heures à 55°C.

- d. Centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube.

4 Mélanger les échantillons avec le mélange de Binding/Bead

- a. Transférer tout le volume de chaque lysat d'échantillon (jusqu'à 610 µL) dans les puits appropriés de la plaque d'échantillons ou la barrette de tubes.
- b. Vortexer vigoureusement MagMAX™ CORE Magnetic Beads pour s'assurer que les billes sont complètement resuspendues.
- c. Préparation du mélange de Binding/Bead - Mélanger les composants suivants pour le nombre requis d'échantillons plus 10 % d'excédent.

Composant	Volume par échantillon
MagMAX™ CORE Binding Solution	400 µl
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	20 µl
Mélange de Binding/Bead total	420 µl

- d. Remuer le mélange de Binding/Bead par inversion jusqu'à ce que la solution soit homogène, puis ajouter 420 µL du mélange de Binding/Bead dans chaque échantillon.
- e. Procéder immédiatement au placement des échantillons dans l'instrument (section suivante).

5 Placement des échantillons dans l'instrument

- a. Sélectionner le script approprié sur l'instrument (voir "Téléchargement et installation du script" en page 6).
- b. Démarrer le test, puis charger les plaques préparées dans la position appropriée lorsque l'instrument vous invite à le faire.

Conserver l'acide nucléique purifié sur glace pour une utilisation immédiate, à -20°C pendant 1 mois maximum, ou à -80°C pour une conservation à long terme.

Purification de l'acide nucléique avec MagVet™ Universal Isolation Kit (méthode automatique)

Le protocole suivant peut être utilisé avec les instruments KingFisher™ Flex, KingFisher™ mL et MagMAX™ Express-96.

Avant la première utilisation du kit

Remarque : Les produits PK et MBL2 Buffer doivent être commandés séparément du kit.

- Préparation du tampon de lyse NM1 Buffer : ajouter 100 ml de tampon N1 Buffer dans la bouteille contenant le tampon M1 Buffer (25 ml), puis vortexer pour bien mélanger.
Conserver le tampon de lyse NM1 Buffer à température ambiante jusqu'à 1 an.
- Reconstitution de la PK : suivre les recommandations du fournisseur.

Avant chaque utilisation du kit

Préparer le mélange MBL2+Beads : mélanger les composants suivants pour le nombre d'échantillons requis, plus 5 à 10 % d'excédent, puis vortexer afin de bien mélanger.

Composant	Volume par échantillon
MBL2 Buffer	500 µl
NM_LSI_Beads	20 µl

Éliminer le mélange MBL2+Beads après utilisation.

Réalisation de la procédure de purification

1 Traitement du lysat avec la PK

a. Mélanger les composants suivants dans l'ordre indiqué, puis homogénéiser l'échantillon.

Composant	Volume par échantillon testé	Volume par échantillon témoin purifié
Échantillon préparé	200 µl	—
PBS (1X), pH 7.4	—	200 µl
Protéinase K	<ul style="list-style-type: none">• Qiagen : 20 µl• Macherey Nagel : 25 µl	<ul style="list-style-type: none">• Qiagen : 20 µl• Macherey Nagel : 25 µl
Tampon de lyse NM1	280 µl	280 µl

b. Incuber à 70°C pendant 30 minutes.

2 Préparation des plaques ou barrettes de tubes pour le traitement

Préparer les plaques ou barrettes de tubes pour le traitement à l'extérieur de l'instrument comme décrit dans le tableau suivant.

Position ^[1]	Type de plaque ^[2]	Réactif	Volume par puits
2	Deep Well	NM3 Wash Buffer	600 µl
3	Deep Well	NM4 Wash Buffer	600 µl
4	Deep Well	Éthanol à 80 %	600 µl
5	Standard	Tampon d'éluion NM6	200 µl
6	Deep Well	Placer un peigne protecteur dans la plaque ou la barrette de tubes.	

^[1] Position sur l'instrument.

^[2] Non applicable en cas d'utilisation de barrettes de tubes.

3 Placement des échantillons dans l'instrument

- a. Une fois l'incubation à 70°C terminée, centrifuger les échantillons brièvement pour faire diminuer la condensation.
- b. Transférer tout le volume de chaque lysat d'échantillon jusqu'à dans les puits appropriés de la plaque d'échantillons ou la barrette de tubes.
- c. Vortexer vigoureusement le mélange MBL2+Beads pour s'assurer que les billes sont complètement resuspendues.
- d. Ajouter 520 µl de mélange MBL2+Beads pour chaque échantillon et contrôle.
- e. Sélectionner le script approprié sur l'instrument.
 - KingFisher™ Flex/MagMAX™ Express-96 : **NM_LSI_RRC96**
 - KingFisher™ mL : **NM_LSI_15prep**
- f. Démarrer le test, puis charger les plaques préparées dans la position appropriée lorsque l'instrument vous invite à le faire.
Charger la plaque d'échantillons ou la barrette de tubes à la position 1 sur l'instrument.
Remarque : Si vous utilisez l'instrument KingFisher™ mL, charger le peigne et toutes les barrettes de tubes en même temps. L'instrument ne vous invite pas à charger les éléments individuellement.
- g. À la fin du test, lorsque l'instrument le demande, retirer la plaque ou les tubes contenant l'acide nucléique purifié.

Instrument	Procédure
<ul style="list-style-type: none"> • KingFisher™ Flex • MagMAX™ Express-96 	Enlever la plaque en position 5 puis couvrir d'un film adhésif.
KingFisher™ mL	Enlever la barrette de tubes et transférer l'acide nucléique purifié en position 5 dans de nouveaux tubes de microcentrifugeuse.

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.

Purification de l'ADN avec QIAamp™ DNA Mini Kit (méthode manuelle)

Avant la première utilisation du kit

- Reconstitution des tampons AW1 et AW2 Buffers : ajouter le volume requis d'éthanol à 96–100 % selon les recommandations du fournisseur.

Réalisation de la procédure de purification

1 Lyse et homogénéisation des échantillons

- a. Mélanger les composants suivants dans l'ordre indiqué, puis passer immédiatement à l'étape suivante.

Composant	Volume par échantillon testé	Volume par échantillon témoin purifié
Échantillon préparé	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µl d'éluat d'écouvillon • 20 à 30 mg de tissu haché 	—
PBS (1X), pH 7.4	—	200 µl
ATL Buffer	180 µl	180 µl
Protéinase K	20 µl	20 µl

- b. Vortexer pendant 15 secondes.
- c. Incuber à 70°C pendant 30 minutes ou à 56°C pendant 16–18 heures.

-
- 1** Lyse et homogénéisation des échantillons (*suite*)
- d. Laisser refroidir les tubes, puis centrifuger brièvement les échantillons pour faire diminuer la condensation.
 - e. Ajouter 200 µl de tampon AL Buffer, puis vortexer pendant 15 secondes.
 - f. Incuber à 70°C pendant 10 minutes.
 - g. Laisser refroidir les tubes, puis centrifuger brièvement.
 - h. Ajouter 200 µl d'éthanol 96–100 % dans chaque échantillon, vortexer pendant 15 secondes, puis centrifuger rapidement pour recueillir le contenu.
-

- 2** Liaison de l'ADN à la colonne
- a. Insérer une colonne QIAamp™ DNA Mini Kit dans un tube collecteur, puis transférer la totalité du volume de l'échantillon dans la colonne.
 - b. Boucher la colonne, puis centrifuger l'ensemble à 15 000 × g pendant 1 minute.
 - c. Jeter le tube collecteur puis positionner la colonne sur un nouveau tube collecteur.
-

- 3** Lavage et élution de l'ADN
- a. Ajouter 500 µl de tampon AW1 Buffer à chaque colonne, boucher la colonne, puis centrifuger à 15 000 × g pendant 1 minute.
 - b. Jeter le tube collecteur puis positionner la colonne sur un nouveau tube collecteur.
 - c. Ajouter 500 µl de tampon AW2 Buffer à chaque colonne, boucher la colonne, puis centrifuger à 15 000 × g pendant 1 minute.
 - d. Jeter le tube collecteur puis positionner la colonne sur un nouveau tube collecteur.
 - e. Centrifuger à 15 000 × g pendant 3 minutes pour sécher la membrane.
 - f. Jeter le tube collecteur.
 - g. Positionner la colonne sur un nouveau microtube de 1,5 ml et ajouter 200 µl de tampon AE Buffer.
 - h. Boucher la colonne puis incuber à température ambiante pendant 1 minute.
 - i. Centrifuger à 6 000 × g pendant 1 minute, puis jeter la colonne.
L'ADN purifié se trouve dans le microtube.

Conserver l'ADN purifié entre 2°C et 8°C pour une utilisation immédiate ou en dessous de -16°C pour une conservation à long terme.

Purification de l'ADN avec le kit NucleoSpin™ Tissue (méthode manuelle)

Avant la première utilisation du kit

- Reconstitution du tampon B5 Buffer : ajouter le volume requis d'éthanol à 96–100 % selon les recommandations du fournisseur.
- Reconstitution de la PK : ajouter le volume requis de tampon PB Buffer selon les recommandations du fournisseur.

Réalisation de la procédure de purification

- 1** Lyse et homogénéisation des échantillons
- a. Mélanger les composants suivants dans l'ordre indiqué, puis passer immédiatement à l'étape suivante.

Composant	Volume par échantillon testé	Volume par échantillon témoin purifié
Échantillon préparé	<ul style="list-style-type: none">• 200 µl d'éluat d'écouvillon• 20 à 30 mg de tissu haché	—
PBS (1X), pH 7.4	—	200 µl
Tampon T1 Buffer	180 µl	180 µl
Protéinase K	25 µl	25 µl

- b. Vortexer pendant 1 minute.
- c. Incuber à 70°C pendant 30 minutes ou à 56°C pendant 16–18 heures.
- d. Laisser refroidir les tubes, puis centrifuger brièvement les échantillons pour faire diminuer la condensation.
- e. Ajouter 200 µl de tampon B3 Buffer, puis vortexer pendant 15 secondes.
- f. Incuber à 70°C pendant 10 minutes.
- g. Laisser refroidir les tubes, puis centrifuger brièvement.
- h. Ajouter 200 µl d'éthanol 96–100 % dans chaque échantillon, vortexer pendant 15 secondes, puis centrifuger rapidement pour recueillir le contenu.

- 2** Liaison de l'ADN à la colonne
- a. Insérer une colonne de kit NucleoSpin™ Tissue dans un tube collecteur, puis transférer la totalité du volume de l'échantillon dans la colonne.
- b. Boucher la colonne, puis centrifuger l'ensemble à 11 000 × g pendant 1 minute.
- c. Jeter le tube collecteur puis positionner la colonne sur un nouveau tube collecteur.

- 3** Lavage et élution de l'ADN
- a. Ajouter 500 µl de tampon BW Buffer à chaque colonne, boucher la colonne, puis centrifuger à 11 000 × g pendant 1 minute.
- b. Jeter le tube collecteur puis positionner la colonne sur un nouveau tube collecteur.
- c. Ajouter 600 µl de tampon B5 Buffer à chaque colonne, boucher la colonne, puis centrifuger à 11 000 × g pendant 1 minute
- d. Jeter le tube collecteur puis positionner la colonne sur un nouveau tube collecteur.
- e. Centrifuger à 11 000 × g pendant 3 minutes pour sécher la membrane.
- f. Jeter le tube collecteur.
- g. Positionner la colonne sur un nouveau microtube de 1,5 ml et ajouter 200 µl de tampon BE Buffer.
- h. Boucher la colonne puis incuber à température ambiante pendant 1 minute.
- i. Centrifuger à 6 000 × g pendant 1 minute, puis jeter la colonne.
L'ADN purifié se trouve dans le microtube.

Bonnes pratiques de laboratoire pour la PCR et la RT-PCR

- Porter des gants et une blouse de laboratoire propres.
 - Ne pas porter les mêmes gants et la même blouse que ceux précédemment portés pour manipuler des produits amplifiés ou préparer des échantillons.
- Changer systématiquement de gants en cas de doute quant à leur contamination possible.
- Maintenir des zones distinctes ainsi que des équipements et des consommables dédiés pour les types suivants :
 - Préparation des échantillons et configuration de la réaction.
 - Amplification et analyse des produits.
- Ne pas introduire les produits amplifiés dans la zone pré-PCR de la réaction.
- Ouvrir et fermer tous les tubes d'échantillon avec soin. Éviter toute projection ou création d'aérosols.
- Maintenir les composants et les réactifs fermés dans la mesure du possible.
- Utiliser une pipette à piston ou des pointes de pipette résistant aux aérosols.
- Nettoyer régulièrement les paillasses et équipements de laboratoire avec une solution d'eau de Javel à 10 % ou une solution de décontamination ADN.

Annexe A Purification avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL

Suivre cette procédure pour la purification avec MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit à l'aide de l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL.

Matériels requis non fournis

Tableau 8 Matériels requis pour le traitement avec les instruments KingFisher™ Duo Prime et KingFisher™ mL

Article	Source ^[1]
Consommables pour l'instrument KingFisher™ Duo Prime	
KingFisher™ Duo Pack Combi pour plaque Microtiter 96 Deepwell (peignes, plaques et barrettes d'éluion pour 96 échantillons)	97003530
KingFisher™ Duo Elution Strip (pack de 40) ^[2]	97003520
KingFisher™ Duo Peigne à 12 pointes pour plaque Microtiter 96 Deepwell (pack de 50) ^[2]	97003500
KingFisher™ Flex Microtiter Deepwell 96 plaques ^[2]	95040460
Consommables pour l'instrument KingFisher™ mL	
KingFisher™ mL Tubes et peignes (pour 240 échantillons)	97002141
KingFisher™ mL Peigne (800 unités)	97002111
KingFisher™ mL Tube (20 x 45 unités)	97002121

^[1] Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur thermofisher.com. « PFL » indique que le matériel est disponible sur fisherscientific.com ou auprès d'un autre grand fournisseur de laboratoire.

^[2] Inclus dans le pack KingFisher™ Duo Combi (Réf. 97003530).

Procédure de purification

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

1. Suivre le protocole, de la préparation du lysat d'échantillon au mélange des échantillons avec les billes et la solution de lyse.

Remarque : Ne pas préparer les plaques ou les tubes pour le traitement avant d'avoir préparé les échantillons.

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

Tableau 9 Configuration de la plaque : 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]	Barrette de tubes séparée ^[2]	Barrette d'élution	MagMAX™ CORE Elution Buffer	90 µl
Peigne	H	Deep Well	Placer un peigne protecteur 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 chauffant.

Tableau 10 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	Standard	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	S/O	S/O	Glisser le peigne dans le support pour peigne.	

3. Sélectionner le script approprié sur l'instrument (voir "Téléchargement et installation du script" en page 6).

4. Démarrer le test, puis charger les plaques préparées ou les barrettes de tubes dans l'instrument en même temps. L'instrument ne vous invite pas à charger les éléments individuellement.

Conserver l'acide nucléique purifié sur glace pour une utilisation immédiate, à -20°C pendant 1 mois maximum, ou à -80°C pour une conservation à long terme.

Annexe B 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 MAN0019291 Rév. A.0.

Historique des révisions: Pub. N° MAN0019291

Révision	Date	Description
A.0	29 juin 2020	Nouveau document traduit à partir d'un document en français (MAN0008873 Rév. B.0) avec les mises à jour suivantes : <ul style="list-style-type: none">• Ajout du protocole MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit.• Modifications mineures de la formulation et de la mise en page pour plus de cohérence avec les documents connexes.

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. FastPrep-24 est une marque de MP Biomedicals, LLC. Mixer/Mill est une marque de SPEX SamplePrep, LLC. Precellys est une marque de Bertin Technologies. Precress 24 est une marque de Bio-Rad Laboratories, SA. QIAamp et QIAGEN sont des marques de QIAGEN GmbH. Nucleospin est une marque de MACHEREY-NAGEL.