

VetMAX™ MAP IS900-F57 Kit

Protocoles de purification d'acides nucléiques


En association avec la Référence Catalogue TMPT


Partie N° 100021192 Pub. N° MAN0009881 Rév. C.0

Espèce(s)	Isolation des acides nucléiques à partir des matrices	Test
Bovins Petits ruminants (ovins, caprins)	Fèces Tissus Colonies bactériennes Bouillon de culture (issu du système automatisé de cultures des mycobactéries « Trek »)	Individuel

Sommaire

Purification d'acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques	2
Contenu de ce manuel.....	2
Type et quantité des échantillons à utiliser.....	2
Kits d'extraction recommandés par type d'échantillons.....	2
Conservation des échantillons.....	2
Matériel et réactifs requis pour l'analyse non fournis dans le kit.....	3
Extraction de l'ADN – Méthodes avec broyage, sans protéinase K, et sans incubation pour fèces (2 g) et bouillons de culture et colonies (500 µL)	4
Préparation des échantillons avant extraction.....	4
Extraction de l'ADN avec le MagVet™ M. paratuberculosis DNA Isolation Kit ou MagVet™ Universal Isolation Kit.....	5
Extraction de l'ADN avec le MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit.....	6
Extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin™ Tissue.....	7
Extraction de l'ADN avec le QIAamp™ DNA Mini Kit.....	8
Extraction de l'ADN – Méthodes avec broyage, protéinase K, et incubation pour tissus (40 mg)	9
Préparation des échantillons avant extraction.....	9
Extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin™ Tissue.....	10
Extraction de l'ADN avec le QIAamp™ DNA Mini Kit.....	11
Documentation et support	12
Service clientèle et assistance technique.....	12
Garantie produit limitée.....	12

 **AVERTISSEMENT !** Lire les fiches de données de sécurité (FDS) et suivre les consignes de manipulation. Porter des lunettes de sécurité, 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 relatives aux risques biologiques du produit disponibles sur thermofisher.com. Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés.

Purification d'acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques

Contenu de ce manuel

Ce manuel a pour objectif de présenter des protocoles de purification des ADN bactériens de *Mycobacterium paratuberculosis* compatibles avec Applied Biosystems™ VetMAX™ MAP IS900-F57 Kit.

Type et quantité des échantillons à utiliser

Matrice	Type d'analyse	Quantité requise et matériel de prélèvement
Fèces	Individuelle	2 g de fèces
Tissus	Individuelle	40 mg of valvule iléo-caecale ou ganglion mésentérique finement disséqué
Bouillons de culture	Individuelle	500 µL de bouillon de culture liquide « Trek »
Colonies sur gélose	Individuelle	2 à 3 colonies prélevées avec une anse et resuspendues dans 500 µL d'eau stérile

Kits d'extraction recommandés par type d'échantillons

Matrice	Kits d'extraction recommandés				
	MagVet™ Universal Isolation Kit	MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit	MagVet™ M. paratuberculosis DNA Isolation Kit	NucleoSpin™ Tissue	QIAamp™ DNA Mini Kit
Fèces	X ⁽¹⁾	X	X ⁽¹⁾	X	X
Tissus	—	—	—	X	X
Bouillons de culture liquides TREK et colonies sur gélose	X	—	X	X	X

⁽¹⁾ Avec utilisation du tampon de lyse T1 (MACHEREY-NAGEL) et du tampon MBL2 (Réf. MBL2).

Conservation des échantillons

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

Fèces

Suite au prélèvement, maintenir entre **2°C et 8°C** jusqu'à utilisation, dans un délai maximum de **8 jours après prélèvement**. Après utilisation ou passé le délai de 8 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.

Tissus

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 conservation jusqu'à 1 an ou en dessous de **-70°C** pour une conservation au-delà de 1 an.

Colonies sur gélose

Reprendre 2 à 3 colonies dans 500 µL d'eau stérile dans un microtube. Vortexer quelques secondes. Cette suspension peut être conservée et transportée entre **2°C et 8°C**.

Bouillons de culture liquide TREK

Suite à la culture, prélever **500 µL de culture liquide TREK** après agitation (au vortex 1 à 2 minutes). Cette suspension peut être conservée et transportée entre **2°C et 8°C**.

Matériel et réactifs requis pour l'analyse non fournis dans le kit

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 1000 µL) avec pointes DNase/RNase-free à filtre
- Un vortex ou équivalent
- Une centrifugeuse pour microtubes de 1.5 mL et 2 mL
- Balance de précision
- Un broyeur de laboratoire
- Billes de verre de 3 et 5 mm
- Poussière de billes de verres de 0.5 mm ou poussière de billes de zirconium de 0.1 mm selon l'extraction réalisée
- Microtubes DNase/RNase-free de 1.5 mL et 2 mL
- Tampon PBS 1X
- Eau stérile
- Eau DNase/RNase-free (pour le NCS)

Kits, réactifs et matériels pour l'extraction et la purification des ADN des échantillons

Tous les matériels et réactifs requis pour la préparation des échantillons pour analyse sont susceptibles d'être utilisés pour cette étape. S'assurer en plus de disposer des éléments suivants :

- Ethanol 96–100% ou éthanol 80% selon l'extraction réalisée

Extraction automatisée en billes magnétiques (les kits d'extraction sont disponibles sur **thermofisher.com**) :

- MagVet™ Universal Isolation Kit (Réf. MV384)
- MagVet™ M. paratuberculosis DNA Isolation Kit (Réf. MVMPPT)
- MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit (Réf. 4462359) + isopropanol 100%
- Tampon de lyse T1 (MACHEREY-NAGEL) selon les protocoles si non inclus dans le kit d'extraction
- Tampon MBL2 (Réf. MBL2) si non inclus dans le kit d'extraction et selon l'extraction réalisée
- Automate d'extraction : renseignements disponibles sur demande au Support Technique.
- Extraction manuelle sur colonnes de silice en format individuel :
 - QIAamp™ DNA Mini Kit (QIAGEN™) ou NucleoSpin™ Tissue (MACHEREY-NAGEL)
 - Une centrifugeuse pour microtubes

Extraction de l'ADN – Méthodes avec broyage, sans protéinase K, et sans incubation pour fèces (2 g) et bouillons de culture et colonies (500 µL)

Préparation des échantillons avant extraction

Fèces - Prise d'essai de 2 g

1. Dans un tube de 50 mL, peser 2 g de fèces ($\pm 10\%$), ajouter 30 mL d'eau stérile et 3 billes de 5 mm.
2. Vortexer pendant 1 minute pour bien homogénéiser les fèces.
3. Laisser **décanter pendant 5 à 10 minutes maximum** et prélever au milieu de la phase liquide.
4. Transférer **1.8 mL de surnageant** dans un tube de 2 mL (ou directement dans un tube de broyage compatible avec le broyeur utilisé si le tube de broyage est adapté pour une centrifugation).
5. Centrifuger **10 minutes à 15000 × g**.
6. Enlever le surnageant par pipetage en laissant un peu de liquide au-dessus du culot.
7. (Optionnel) Ajouter une deuxième fois 1.8 mL de surnageant dans un microtube - Centrifuger 10 minutes à 15000 × g - Enlever le surnageant.

Remarque : Le protocole peut être interrompu à cette étape, les culots peuvent être conservés entre 2°C et 8°C sur la nuit ou en dessous de -16°C pendant 7 jours.

8. Reprendre le culot de fèces avec le tampon de lyse compatible avec la méthode d'extraction utilisée :

Kit utilisé	Tampon de lyse par échantillon
MagVet™ M. paratuberculosis DNA Isolation Kit ou MagVet™ Universal Isolation Kit	700 µL de Tampon T1
MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit	500 µL de Tampon TL Fèces ⁽¹⁾
NucleoSpin™ Tissue	600 µL de Tampon T1
QIAamp™ DNA Mini Kit	600 µL de Tampon ATL

⁽¹⁾ Pour reconstituer le Tampon TL Fèces, ajouter 2 µL de carrier RNA à 500 µL de Tampon Lysis/Binding Solution Concentrate pour chaque échantillon. Le carrier RNA peut prendre un aspect visqueux une fois décongelé, ce qui rend le pipetage plus difficile. Dans ce cas, placer le tube à **37°C pendant 10-15 minutes**, vortexer vigoureusement, et centrifuger.

9. Transférer le tout dans un tube de broyage compatible avec le broyeur utilisé, si ce n'est pas déjà le cas.
10. Ajouter l'équivalent de 100 µL de poussière de billes de zirconium.
11. Broyer selon un des programmes suivants :
 - Precellys™ 24/Precess 24™ : 6800 rpm pendant 2 × 90 secondes
 - FastPrep™ : 6.5 M/s pendant 4 × 45 secondes
 - Mixer/Mill™ : 30 Hz pendant 10 minutes
12. Centrifuger le tube de broyage **3 minutes à 15000 × g**.

L'extraction sera réalisée directement à partir de **400 µL ou 500 µL de surnageant** selon la méthode d'extraction utilisée.

Bouillons de culture liquides « TREK » et colonies sur gélose - Prise d'essai de 500 µL

1. Travailler sur échantillon liquide homogénéisé :
 - Dans le cas d'analyses sur colonies : placer 2 à 3 colonies dans 500 µL d'eau stérile et bien vortexer pour mettre en suspension.
 - Dans le cas d'analyses sur bouillons de culture : bien vortexer pour homogénéiser le bouillon de culture.
2. Distribuer dans des microtubes compatibles avec le broyeur l'équivalent de 100 µL de poussière de billes de zirconium.
3. Ajouter dans chaque microtube l'échantillon selon la méthode d'extraction réalisée.

Réactifs	Préparation pour extraction automatisée en billes magnétiques (MagVet™ M. paratuberculosis DNA Isolation Kit ou MagVet™ Universal Isolation Kit)	Préparation pour extraction en colonnes (QIAamp™ DNA Mini Kit ou NucleoSpin™ Tissue)
Tampon de lyse	300 µL de Tampon T1 ⁽¹⁾	—
Prise d'essai	500 µL de bouillon de culture liquide « Trek » homogénéisé ou 500 µL de colonies en suspension	500 µL de bouillon de culture liquide « Trek » homogénéisé ou 500 µL de colonies en suspension

⁽¹⁾ Tampon non inclus dans le kit MagVet™ Universal Isolation Kit ; disponible chez MACHEREY-NAGEL.

4. Broyer selon un des programmes suivants :
 - Precellys™ 24/Precess 24™ : 6800 rpm pendant 2 × 90 secondes
 - FastPrep™ : 6.5 M/s pendant 4 × 45 secondes
 - Mixer/Mill™ : 30 Hz pendant 10 minutes
5. Centrifuger les tubes pendant 3 minutes à 15000 × g.

Procéder à l'extraction à partir de **200 µL ou 500 µL de surnageant** selon la méthode d'extraction utilisée.

Extraction de l'ADN avec le MagVet™ M. paratuberculosis DNA Isolation Kit ou MagVet™ Universal Isolation Kit

Remarques

Le protocole d'extraction sur billes magnétiques est applicable sur les matrices fèces, culture liquide « Trek », et colonies. Ce protocole est utilisable indifféremment avec les automates KingFisher™ mL et KingFisher™ 96/Flex. En effet, seul le nombre d'échantillons traités diffère.

Il requiert l'utilisation du Tampon T1 et du Tampon MBL2 non fournis dans le MagVet™ Universal Isolation Kit.

Avant de commencer

- Reconstitution de la solution MBL2+Billes : Chaque réaction requiert 20 µL de NM_LSI_Beads et 500 µL de tampon de binding MBL2. Il est conseillé de reconstituer cette solution juste avant utilisation et de ne pas la conserver ensuite. Bien homogénéiser la solution contenant les billes en la vortexant juste avant utilisation.
- Préparer et identifier le nombre de microtubes, de barrettes d'extraction et de plaques d'extraction correspondant au nombre d'échantillons à extraire (comprenant les témoins négatifs et positifs).

Protocole

1. Préparer les consommables pour la série d'extraction :
 - Pour l'automate KingFisher™ mL : sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes d'extraction dessus, pour distribution des tampons sur paillasse.
 - Pour l'automate KingFisher™ 96/Flex : les tampons seront distribués dans les plaques sur paillasse.
2. Réaliser la lyse des échantillons comme décrit ci-dessous :

Position de la barrette ou plaque	Réactifs	Fèces, culture liquide « Trek », colonies	NCS
A / 1	Solution de lyse	500 µL de surnageant de broyage	300 µL de T1
	Prise d'essai		200 µL d'eau RNase/DNase-free
	5 - IPC TMPT	5 µL	5 µL
B / 2	Solution lavage 1	600 µL de NM3	600 µL de NM3
C / 3	Solution lavage 2	600 µL de NM4	600 µL de NM4
D / 4	Solution lavage 3	600 µL d'éthanol 80%	600 µL d'éthanol 80%
E / 5	Tampon d'éluéon	100 µL de NM6	100 µL de NM6

3. Après distribution de ces tampons, ajouter 520 µL de solution MBL2+Billes (ou 500 µL de MBL2 et 20 µL de NM_LSI_Beads) pour chaque échantillon dans le puits en position A de la barrette ou la plaque 1 (selon l'automate utilisé).
4. Positionner les peignes protecteurs des barreaux aimantés.
5. Placer les barrettes ou plaques dans l'automate.
6. Lancer le run d'extraction :
 - Script NM_LSI_15prep pour l'automate KingFisher™ mL
 - Script NM_LSI_RRC96 pour l'automate KingFisher™ 96/Flex
7. A la fin du run d'extraction :
 - a. Sur l'automate KingFisher™ mL : transférer les éluats contenus en position E de la barrette d'extraction dans des microtubes préalablement identifiés).
 - b. Sur l'automate KingFisher™ 96/Flex : recouvrir la plaque d'éluéon (plaque 5) avec un film adapté.
 - c. Jeter les autres consommables plastiques utilisés pour l'extraction (plaques, barrettes, peignes).

Maintenir les éluats obtenus (plaque fermée ou microtube) entre 2°C et 8°C si la PCR est réalisée tout de suite ou les conserver en dessous de -16°C.

Extraction de l'ADN avec le MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit

Remarques

Ce protocole d'extraction sur billes magnétiques est applicable uniquement sur la matrice fèces et est utilisable avec l'automate MagMAX™ Express 96 ou l'automate KingFisher™ 96/Flex.

Avant de commencer

- Reconstitution du tampon lavage 1 : ajouter la quantité requise d'isopropanol 100% au flacon Wash Solution 1 Concentrate selon les recommandations du fournisseur avant la première utilisation.
- Reconstitution du tampon lavage 2 : ajouter la quantité requise d'éthanol 96–100% au flacon Wash Solution 2 Concentrate selon les recommandations du fournisseur avant la première utilisation.
- Reconstitution de la solution **Mix Beads** : Chaque réaction requiert 10 µL de **Nucleic Acid Binding Beads** et 10 µL de **Lysis/Binding Enhancer**. Il est conseillé de reconstituer cette solution juste avant utilisation et de ne pas la conserver ensuite. Bien homogénéiser par agitation douce et placer entre 2°C et 8°C jusqu'à utilisation.
- Préparer et identifier le nombre de microtubes, de barrettes d'extraction et de plaques d'extraction correspondant au nombre d'échantillons à extraire (comprenant les témoins négatifs).

Protocole

1. Préparer les consommables pour la série d'extraction : les tampons seront distribués dans les plaques sur paillasse.
2. Réaliser la lyse et la purification des échantillons comme décrit ci-dessous (Ajouter les composants de la plaque 1 dans l'ordre indiqué) :

Position de la plaque	Réactifs	Fèces	NCS
1	Billes magnétiques	20 µL de Mix Beads	20 µL de Mix Beads
	Prise d'essai	400 µL de surnageant de fèces broyé	400 µL d'eau RNase/DNase-free
	Isopropanol	350 µL d'isopropanol 100%	350 µL d'isopropanol 100%
	5 - IPC TMPT	5 µL	5 µL
2	Solution lavage 1	300 µL Tampon lavage 1	300 µL Tampon lavage 1
3	Solution lavage 1	300 µL Tampon lavage 1	300 µL Tampon lavage 1
4	Solution lavage 2	450 µL Tampon lavage 2	450 µL Tampon lavage 2
5	Solution lavage 2	450 µL Tampon lavage 2	450 µL Tampon lavage 2
6	Tampon d'élution	90 µL Tampon d'élution	90 µL Tampon d'élution

3. Positionner les peignes protecteurs des barreaux aimantés.
4. Placer les plaques dans l'automate.
5. Lancer le run d'extraction : Script **4462359** sur l'automate MagMAX™ Express 96 ou l'automate KingFisher™ 96/Flex.
6. A la fin du run d'extraction :
 - a. Recouvrir la plaque d'élution (**plaque 6**) avec un film adapté.
 - b. Jeter les autres consommables plastiques utilisés pour l'extraction (plaques et peignes).

Maintenir les éluats obtenus entre 2°C et 8°C si la PCR est réalisée tout de suite ou les conserver en dessous de -16°C.

Extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin™ Tissue

Avant de commencer

- Reconstitution Tampon **B3** : à réaliser selon les recommandations du fournisseur.
- Reconstitution Tampon **B5** : ajouter la quantité requise d'éthanol 96–100% selon les recommandations du fournisseur avant la première utilisation.
- Préparer et identifier le nombre de microtubes et de colonnes correspondant au nombre d'échantillon à extraire (comprenant les témoins négatifs).

Protocole

1. Réaliser la lyse des échantillons comme décrit ci-dessous :

Réactifs	Fèces	Cultures et colonies	NCS
Prise d'essai	400 µL de surnageant de fèces broyé	200 µL de surnageant de broyage	200 µL d'eau RNase/DNase-free
Tampon T1			400 µL
<i>Vortexer immédiatement pendant 30 secondes.</i>			
Tampon B3	400 µL	400 µL	400 µL
5 - IPC TMPT	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Vortexer immédiatement pendant 30 secondes.</i>			

2. Ajouter dans chaque tube **400 µL d'éthanol 96–100%** - Homogénéiser en vortexant pendant 15 secondes - Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le **lysate de l'échantillon**.
3. Prendre une mini-colonne du kit NucleoSpin™ Tissue - Identifier la colonne.
4. Transférer la **totalité du lysate de l'échantillon** sur la colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 11000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne.**
5. Distribuer **500 µL** de Tampon **BW** (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 11000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne.**
6. Distribuer **600 µL** de Tampon **B5** (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 11000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne.**
7. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2 mL - Centrifuger 3 minutes à 11000 × g (pour sécher la membrane) - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne.**
8. Placer la colonne dans un **microtube de 1.5 mL** - Distribuer **100 µL** de Tampon **BE** - Boucher.
9. **Incuber 1 minute** à température ambiante.
10. Centrifuger 1 minute à 11000 × g pour éluer - Jeter la colonne - **Conserver le microtube.**

Maintenir les éluats obtenus entre 2°C et 8°C si la PCR est réalisée tout de suite ou les conserver en dessous de -16°C.

Extraction de l'ADN avec le QIAamp™ DNA Mini Kit

Avant de commencer

- Reconstitution Tampons AW1 et AW2 : ajouter la quantité requise d'éthanol 96–100% selon les recommandations du fournisseur avant la première utilisation.
- Préparer et identifier le nombre de microtubes et de colonnes correspondant au nombre d'échantillon à extraire (comprenant les témoins négatifs).

Protocole

1. Réaliser la lyse des échantillons comme décrit ci-dessous :

Réactifs	Fèces	Cultures et colonies	NCS
Prise d'essai	400 µL de surnageant de fèces broyé	200 µL de surnageant de broyage	200 µL d'eau RNase/DNase-free
Tampon ATL			400 µL
<i>Vortexer immédiatement pendant 30 secondes.</i>			
Tampon AL	400 µL	400 µL	400 µL
5 - IPC TMPT	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Vortexer immédiatement pendant 30 secondes.</i>			

2. Ajouter dans chaque tube **400 µL d'éthanol 96–100%** - Homogénéiser en vortexant pendant 15 secondes - Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le **lysate de l'échantillon**.
3. Prendre une mini-colonne du QIAamp™ DNA Mini Kit - Identifier la colonne.
4. Transférer **la totalité du lysate de l'échantillon** sur la colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 15000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
5. Distribuer **500 µL** de Tampon AW1 (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 15000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
6. Distribuer **500 µL** de Tampon AW2 (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 15000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
7. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2 mL - Centrifuger 3 minutes à 15000 × g (pour sécher la membrane) - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
8. Placer la colonne dans un **microtube de 1.5 mL** - Distribuer **100 µL** de Tampon AE - Boucher.
9. **Incuber 1 minute** à température ambiante.
10. Centrifuger 1 minute à 15000 × g pour éluer - Jeter la colonne - **Conserver le microtube**.

Maintenir les éluats obtenus entre 2°C et 8°C si la PCR est réalisée tout de suite ou les conserver en dessous de –16°C.

Extraction de l'ADN – Méthodes avec broyage, protéinase K, et incubation pour tissus (40 mg)

Préparation des échantillons avant extraction

Tissus - Prise d'essai de 40 mg

1. Disséquer finement le morceau de tissu dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et bistouri stériles.
2. Dans un microtube compatible avec le broyeur, peser 40 mg de tissu préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision.
3. Ajouter l'équivalent de 100 μL de poussière de billes de verre.
4. Ajouter 500 μL d'eau stérile et 2 billes de verre de 3 mm.
5. Broyer selon un des programmes suivant :
 - Precellys™ 24/Precess 24™ : 6800 rpm pendant 2 \times 90 secondes
 - FastPrep™ : 6.5 M/s pendant 4 \times 45 secondes
 - Mixer/Mill™ : 30 Hz pendant 10 minutes
6. Centrifuger 1 minute à 6000 \times g.

Procéder à l'extraction à partir de **200 μL de surnageant**.

Extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin™ Tissue

Avant de commencer

- Reconstitution Tampon **B3** : à réaliser selon les recommandations du fournisseur.
- Reconstitution Tampon **B5** : ajouter la quantité requise d'éthanol 96–100% selon les recommandations du fournisseur avant la première utilisation.
- Reconstitution de la **protéinase K** : ajouter la quantité requise de tampon PB selon les recommandations du fournisseur avant la première utilisation.
- Préparer et identifier le nombre de microtubes et de colonnes correspondant au nombre d'échantillon à extraire (comprenant les témoins négatifs).

Protocole

1. Réaliser la lyse tissulaire en Tampon T1 comme décrit ci-dessous.

Réactifs	Tissus broyés	NCS tissus
Tampon T1	180 µL	180 µL
Protéinase K	25 µL	25 µL
Prise d'essai	200 µL de surnageant de tissu broyé	200 µL d'eau DNase/RNase-free
5 - IPC TMPT	5 µL	5 µL

2. Vortexer pendant 15 secondes.
3. Incuber pendant 30 minutes à 70°C ou 16–18 heures à 56°C.
4. Laisser refroidir les tubes et centrifuger brièvement avant ouverture.
5. Ajouter 200 µL de Tampon B3 dans chaque tube.
6. Vortexer immédiatement pendant 1 minute.
7. Incuber 10 minutes à 70°C.
8. Laisser refroidir les tubes et centrifuger brièvement avant ouverture.
9. Ajouter dans chaque tube **200 µL d'éthanol 96–100%** - Homogénéiser en vortexant pendant 15 secondes - Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le **lysate de l'échantillon**.
10. Prendre une mini-colonne du kit NucleoSpin™ Tissue - Identifier la colonne.
11. Transférer **la totalité du lysate de l'échantillon** sur la colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 11000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
12. Distribuer **500 µL** de Tampon **BW** (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 11000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
13. Distribuer **600 µL** de Tampon **B5** (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 11000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
14. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2 mL - Centrifuger 3 minutes à 11000 × g (pour sécher la membrane) - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
15. Placer la colonne dans un **microtube de 1.5 mL** - Distribuer **100 µL** de Tampon **BE** - Boucher.
16. **Incuber 1 minute** à température ambiante.
17. Centrifuger 1 minute à 11000 × g pour éluer - Jeter la colonne - **Conserver le microtube**.

Maintenir les éluats obtenus entre 2°C et 8°C si la PCR est réalisée tout de suite ou les conserver en dessous de –16°C.

Extraction de l'ADN avec le QIAamp™ DNA Mini Kit

Avant de commencer

- Reconstitution Tampons **AW1** et **AW2** : ajouter la quantité requise d'éthanol 96–100% selon les recommandations du fournisseur avant la première utilisation.
- Préparer et identifier le nombre de microtubes et de colonnes correspondant au nombre d'échantillon à extraire (comprenant les témoins négatifs).

Protocole

1. Réaliser la lyse tissulaire en Tampon ATL comme décrit ci-dessous.

Réactifs	Tissus broyés	NCS tissus
Tampon ATL	180 µL	180 µL
Protéinase K	20 µL	20 µL
Prise d'essai	200 µL de surnageant de tissu broyé	200 µL d'eau DNase/RNase-free
5 - IPC TMPT	5 µL	5 µL

2. Vortexer pendant 15 secondes.
3. Incuber pendant 30 minutes à 70°C ou 16–18 heures à 56°C.
4. Laisser refroidir les tubes et centrifuger brièvement avant ouverture.
5. Ajouter 200 µL de Tampon AL dans chaque tube.
6. Vortexer immédiatement pendant 1 minute.
7. Incuber 10 minutes à 70°C.
8. Laisser refroidir les tubes et centrifuger brièvement avant ouverture.
9. Ajouter dans chaque tube **200 µL d'éthanol 96–100%** - Homogénéiser en vortexant pendant 15 secondes - Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le **lysate de l'échantillon**.
10. Prendre une mini-colonne du QIAamp™ DNA Mini Kit - Identifier la colonne.
11. Transférer **la totalité du lysate de l'échantillon** sur la colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 15000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
12. Distribuer **500 µL** de Tampon **AW1** (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 15000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
13. Distribuer **500 µL** de Tampon **AW2** (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 minute à 15000 × g - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
14. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2 mL - Centrifuger 3 minutes à 15000 × g (pour sécher la membrane) - Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne**.
15. Placer la colonne dans un **microtube de 1.5 mL** - Distribuer **100 µL** de Tampon **AE** - Boucher.
16. **Incuber 1 minute** à température ambiante.
17. Centrifuger 1 minute à 15000 × g pour éluer - Jeter la colonne - **Conserver le microtube**.

Maintenir les éluats obtenus entre 2°C et 8°C si la PCR est réalisée tout de suite ou les conserver en dessous de –16°C.

Documentation et support

Service clientèle et assistance technique

Support technique : rendez-vous sur thermofisher.com/askaquestion

Visiter thermofisher.com/support pour avoir accès aux dernières nouveautés relatives aux services et à l'assistance technique, notamment :

- Numéros de téléphone partout dans le monde
- Commande et Support web
- Guides de l'utilisateur, manuels et protocoles
- Certificats d'analyse
- Fiches de Données de Sécurité (FDS, également appelées FS (Fiches Signalétiques))

Remarque : Pour les FDS relatives aux réactifs et aux produits chimiques d'autres fabricants, contacter chaque fabricant.

Garantie produit limitée

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. Si vous avez des questions, vous pouvez prendre contact avec Life Technologies à l'adresse web suivante : thermofisher.com/support.

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

CLAUSE DE NON-RESPONSABILITÉ : DANS LA MESURE PERMISE PAR LA LOI, LIFE TECHNOLOGIES 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.

Historique des révisions : Pub. N° MAN0009881 (français)

Révision	Date	Description
C.0	31 mai 2017	Mise à jour sur le modèle du document en cours, avec mises à jour associées à la garantie, aux marques et aux logos.
B.0	9 septembre 2015	Corrections techniques et réorganisation du document
A.0	3 mars 2014	Nouveau document

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

©2017 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 est une marque de MP Biomedicals, LLC. Mixer/Mill est une marque de SPEX SamplePrep, LLC. NucleoSpin est une marque de MACHEREY-NAGEL GMBH & Co. 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.