

MagMAX[™] CORE Nucleic Acid Purification Kit

GUIDE DE L'UTILISATEUR

Purification automatisée d'ADN et d'ARN de haute qualité à partir d'échantillons vétérinaires

à utiliser avec :

KingFisher[™] Flex Purification System

MagMAX[™] Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor

KingFisher[™] Duo Prime Purification System

KingFisher[™] mL Purification System

Références catalogue A32700, A32702

Numéro de publication MAN0017830

Révision A.0



Fabricant : Life Technologies Corporation | 2130 Woodward Street | Austin, TX 78744

Traduit de l'anglais, publication numéro MAN0015944 Rév. C.0.

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

CLAUDE 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. MAN0015944 (anglais)

Révision	Date	Description
C.0	13 décembre 2017	- Mise à jour de la mention d'utilisation sur la première de couverture. - Réorganisation mineure de la section du matériel requis pour améliorer le style et la clarté. - Corrections mineures apportées aux noms de produits. - Modifications mineures pour améliorer le style et la cohérence.
B.0	30 juin 2017	- Méthodes combinées et renommées : - Simple : anciennement Méthodes A et C - Complexe : anciennement Méthode B - Digestion : anciennement Méthode D - Ajout d'une nouvelle méthode : Lyse avec incubation. - Ajout du traitement de plaques d'échantillons dans la méthode Digestion. - Ajout de la liste des scripts d'instrument. - Réorganisation des chapitres pour faciliter la navigation et améliorer la clarté.
A.0	22 décembre 2016	Nouveau document.

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.

Licence à usage limité n° 569 : Usage vétérinaire et recherche: Avis à l'Acheteur : L'achat de ce produit confère à l'acheteur le droit limité, non transférable d'utiliser la quantité de produit achetée uniquement à des fins de recherche et d'usage vétérinaire. Aucun autre droit n'est accordé par les présentes expressément, implicitement ou par préclusion (estoppel). L'achat de ce produit ne confère à l'acheteur aucun droit supplémentaire, y compris (sans s'y limiter) le droit de transférer ou de revendre le produit sous quelque forme que ce soit ou le droit d'utiliser le produit comme agent thérapeutique ou composant d'un test de diagnostic humain. Pour savoir comment obtenir des droits supplémentaires, veuillez contacter outlicensing@thermofisher.com ou le service Licensing and Commercial Supply, Thermo Fisher Scientific, 5823 Newton Drive, Carlsbad, CA, 92008, United States.

MARQUES DE COMMERCE: Toutes les marques sont la propriété de Thermo Fisher Scientific et de ses filiales, sauf indication contraire.

©2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Tous droits réservés.

Sommaire

■	CHAPITRE 1 Informations produit	5
	Description du produit	5
	Réactifs et conservation	5
	Matériel requis mais non fourni	6
	Méthodes recommandées	8
■	CHAPITRE 2 Avant de commencer	9
	Instructions	9
	Avant la première utilisation du kit	9
	Déterminer le réglage maximal de l'agitateur de plaques	9
	Téléchargement et installation du script	10
■	CHAPITRE 3 Méthode Simple	11
	Méthode : Simple	11
	Préparation des plaques	12
	Préparation du mélange Bead/PK	12
	Préparation de la solution de Lysis/Binding	13
	Préparation de l'échantillon	14
	Mélange de l'échantillon avec le mélange Bead/PK et la solution de Lysis/Binding	15
	Placement des échantillons dans l'instrument	15
■	CHAPITRE 4 Méthode Complexe	16
	Méthode : Complexe	16
	Préparation des plaques	17
	Préparation du mélange Bead/PK	17
	Préparation de la solution de Lysis	18
	Préparation du lysat clarifié	19
	Mélange du lysat clarifié avec le mélange Bead/PK et MagMAX™ CORE Binding Solution	20
	Placement des échantillons dans l'instrument	21

■	CHAPITRE 5	Méthode Digestion	22
	Méthode : Digestion		22
	Préparation des plaques		23
	Préparation de la solution de Lysis/Binding		23
	Préparation de la solution PK		24
	Traitement des échantillons avec la solution PK		25
	Traitement des échantillons avec la solution PK en tube		25
	Traitement des échantillons avec la solution PK en plaque		27
	Mélange des échantillons traités à la Proteinase K aux billes et à la solution de Lysis/Binding		28
	Placement des échantillons dans l'instrument		29
■	CHAPITRE 6	Méthode Lyse avec incubation	30
	Méthode : Lyse avec incubation		30
	Préparation des plaques		31
	Préparation du mélange de Lysis/Binding/Bead		31
	Préparation du lysat de biopsie auriculaire (circulaire)		32
	Mélange du lysat avec de la Proteinase K et mélange de Lysis/Binding/Bead		33
	Placement des échantillons dans l'instrument		33
■	ANNEXE A	Résolution des problèmes	34
■	ANNEXE B	Purification avec l'instrument KingFisher[™] Duo Prime ou KingFisher[™] mL	36
	Matériel requis mais non fourni		36
	Procédure de purification		37
■	ANNEXE C	Sécurité	38
	Sécurité chimique		39
	Sécurité en matière de risques biologiques		40
	Documentation et support		41
	Documentation connexe		41
	Assistance à la clientèle et support technique		41
	Garantie produit limitée		41



Informations produit

IMPORTANT ! Avant d'utiliser ce produit, lire et prendre soin de bien comprendre les informations précisées dans l'annexe « Sécurité » de ce document.

Description du produit

MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit est conçu pour la purification rapide d'ADN et d'ARN de haute qualité pour une analyse moléculaire en aval. Ce kit utilise une méthode de séparation à base de billes magnétiques et est compatible avec les instruments suivants :

- KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor
- MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor
- KingFisher™ Duo Prime Magnetic Particle Processor
- KingFisher™ mL Magnetic Particle Processor

Ce kit est optimisé pour un large éventail de types d'échantillons. Voir "Méthodes recommandées" en page 8.

Réactifs et conservation

Tableau 1 MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit

Composition	Réf. A32700 (100 réactions)	Réf. A32702 (500 réactions)	Conservation
MagMAX™ CORE Lysis Solution ^[1]	50 mL	275 mL	15–30 °C (température ambiante)
MagMAX™ CORE Binding Solution	45 mL	220 mL	
MagMAX™ CORE Wash Solution 1	60 mL	300 mL	
MagMAX™ CORE Wash Solution 2	60 mL	300 mL	
MagMAX™ CORE Elution Buffer	12 mL	55 mL	
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	2,2 mL	11 mL	
MagMAX™ CORE Proteinase K (20 mg/mL)	1,25 mL	5 mL	

^[1] Disponible à l'achat séparément (réf. A32837).

Matériel requis mais non fourni

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur **thermofisher.com**.
PFL : Fisher Scientific (**fisherscientific.com**) ou l'un des principaux fournisseurs de matériel de laboratoire.

Tableau 2 Matériel nécessaire pour toutes les méthodes^[1]

Article	Source
Instrument et équipement	
L'un des instruments suivants : - KingFisher™ Flex Purification System - MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor Voir page 36 pour d'autres instruments compatibles.	Contactez le représentant commercial local.
Microcentrifugeuse de paillasse pouvant atteindre 15 000 × g	PFL
Vortex, agitateur vortex ou équivalent	PFL
Réactifs	
PBS, pH 7.4 ^[2]	10010023
(Facultatif) L'un des contrôles positifs internes (IPC) suivants :	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	A29764
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	A29763
IPC fourni avec votre kit VetMAX™ PCR	thermofisher.com
Tubes, plaques et autres consommables	
Adhesive PCR Plate Foils , ou équivalent	AB0626
KingFisher™ Flex Microtiter Deepwell 96 plates , 50 plaques	95040460
KingFisher™ 96 KF microplates (200 µL), 48 plaques	97002540
KingFisher™ 96 tip comb for DW magnets , 100 peignes	97002534

^[1] Voir le Tableau 4 et le Tableau 5 pour connaître le matériel supplémentaire nécessaire pour les méthodes Simple et Digestion.

^[2] Non requis pour la méthode Lyse avec incubation.

Tableau 3 Équipement en option

Article	Source
Biotang Inc Microplate Shaker , ou agitateur de plaques de titrage équivalent (pour mélanger les billes avec les échantillons ; toutes les méthodes)	Fisher Scientific™ 50-751-4965
Centrifugeuse de paillasse avec adaptateurs pour plaques (pour la préparation du lysat dans les plaques ; méthodes Complexe et Digestion)	PFL

Tableau 4 Matériel supplémentaire requis pour la méthode Simple (échantillons de tissu uniquement)

Article	Source
Fisher Scientific™ Bead Mill 24 Homogenizer	Fisher Scientific™ 15-340-163
PYREX™ Solid Glass Beads for Distillation Columns (3 mm)	Fisher Scientific™ 11-312-10A

Tableau 5 Matériel supplémentaire requis pour la méthode Digestion

Article	Source
PK Buffer for MagMAX™ -96 DNA Multi-Sample Kit	4489111

Méthodes recommandées

Remarque : Pour les bactéries difficiles à lyser, par exemple *M. paratuberculosis* (MAP), utiliser MagMAX™ CORE Mechanical Lysis Module (réf. A32836, A37487).

Matrice d'échantillon	Acide nucléique	Méthode recommandée
Biopsie auriculaire (forme circulaire, 2 à 3 mm de diamètre) dans Lysis Solution	Acide nucléique viral	Lyse avec incubation ^[1] (page 30)
- Biopsie auriculaire (forme circulaire, 2 à 3 mm de diamètre) dans PBS - Biopsie auriculaire (forme triangulaire, largeur d'environ 1 cm) - Lait - Plasma - Sérum	- Acide nucléique viral - ADN bactérien	Simple (page 11)
Culture Biomed Diagnostics InPouch™ TF (<i>Tritrichomonas foetus</i>)	ADN de <i>Tritrichomonas foetus</i>	
Sperme	Acide nucléique viral	
- Écouvillons—animaux - Sang total	- Acide nucléique viral - ADN génomique	
Tissu ou organe	- Acide nucléique viral - ADN bactérien^[2]	
	- ADN bactérien - ADN génomique	Digestion (page 22)
Follicules pileux	ADN génomique	
- Échantillons environnementaux - Fèces - Écouvillons—environnementaux ou fécaux	ADN bactérien	
	- Acide nucléique viral - ADN bactérien^[2]	Complexe (page 16)
Fluides oraux	- Acide nucléique viral - ADN bactérien	

^[1] Recommandé si une incubation sur la nuit est requise.

^[2] Si l'isolation simultanée de l'acide nucléique viral et de l'ADN bactérien n'est pas requise, utiliser la méthode Digestion.



Avant de commencer

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 nécessaires pour l'automate 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 paillasse de laboratoire et les pipettes avant de commencer.

Avant la première utilisation du kit

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 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 web du produit MagMAX[™] CORE Nucleic Acid Purification Kit (sur thermofisher.com, chercher selon le numéro de référence), faire défiler jusqu'à la section **Documentation du produit**.
2. Cliquer avec le bouton droit de la souris sur le fichier adéquat pour télécharger la dernière version du script MagMAX_CORE pour votre instrument.

Tableau 6 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 votre laboratoire l'exige, utiliser l'un des scripts suivants, qui ne chauffent pas les échantillons pendant l'étape d'élution.

Tableau 7 Autres scripts sans étape d'élution 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.

La méthode Simple est recommandée pour les types d'échantillons suivants. L'acide nucléique pour lequel cette méthode est optimisée varie selon le type d'échantillon ; voir "Méthodes recommandées" en page 8 pour plus de détails.

- Culture Biomed Diagnostics
InPouch™ TF (*Tritrichomonas foetus*)
- Biopsie auriculaire (forme triangulaire, largeur d'environ 1 cm)
- Biopsie auriculaire (forme circulaire, 2 à 3 mm de diamètre ; incubation PBS)
- Lait
- Plasma
- Sperme
- Sérum
- Écouvillons—animaux
- Tissu ou organe
- Sang total

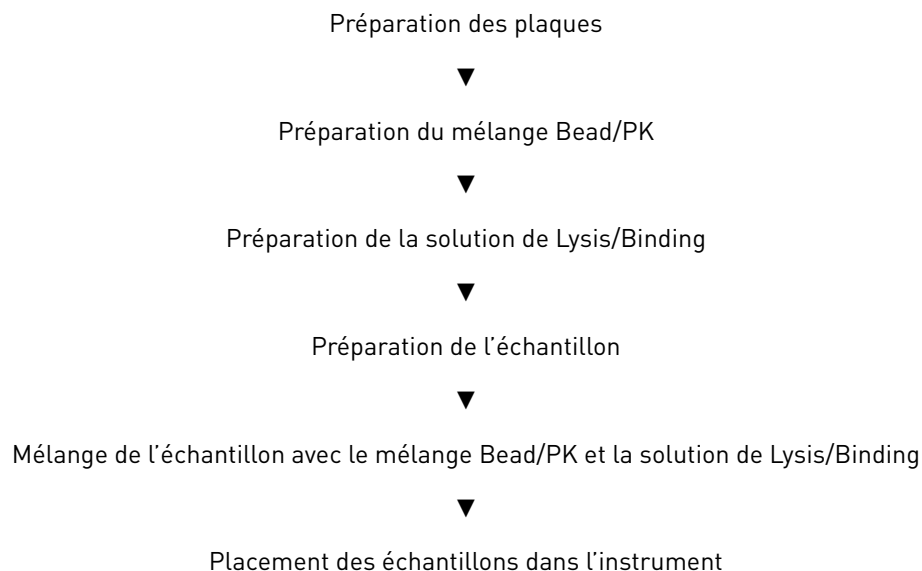
Suivez cette procédure si vous utilisez ces instruments :

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

Suivre Annexe B, "Purification avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL" si vous utilisez ces instruments :

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

Méthode : Simple



Préparation des plaques

1. Préparation des plaques.

Tableau 8 Configuration des plaques : KingFisher™ Flex ou instrument MagMAX™ Express-96

ID de la plaque	Position de la plaque ^[1]	Type de plaque	Réactif	Volume par cupule
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 sur 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.

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. Vortexer vigoureusement MagMAX™ CORE Magnetic Beads pour s'assurer que les billes sont complètement remises en suspension.
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 (-IPC)	700 µL
(Facultatif) L'un des contrôles positifs internes (IPC) suivants :	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	2 µL
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	2 µL
Contrôle positif interne (IPC) fourni avec votre kit VetMAX™ PCR	Comme indiqué dans les instructions du kit
Solution de Lysis/Binding totale (+IPC)	700 µL + volume d'IPC

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 selon le type d'échantillon.

Pour...	Faire...
Culture Biomed Diagnostics InPouch™ TF	Procéder avec 300 µL de milieu de culture préalablement enrichi.
Biopsie auriculaire (forme triangulaire, largeur d'environ 1 cm)	1. Ajouter une biopsie auriculaire dans un tube à échantillons de 5 mL. 2. Ajouter 2 mL de PBS, pH 7.4 à chaque échantillon. 3. Incuber à température ambiante avec ou sans agitation : • Sans agitation : 15 minutes • Avec agitation modérée : 10 minutes 4. Procéder avec 200 µL de surnageant.
Biopsie auriculaire (forme circulaire, 2 à 3 mm de diamètre)	1. Ajouter une biopsie auriculaire dans un tube de 2 mL. 2. Ajouter 200 µL de PBS, pH 7.4 à chaque échantillon. 3. Incuber à température ambiante avec ou sans agitation : • Sans agitation : 15 minutes • Avec agitation modérée : 10 minutes 4. Procéder avec 50–200 µL de surnageant.
Lait, plasma, sérum ou sang total	Procéder avec un échantillon de 200 µL.
Sperme	1. Ajouter 500 µL de sperme dans un tube propre. 2. Centrifuger à 15 000 × <i>g</i> pendant 2 minutes. 3. Procéder avec 200 µL de surnageant.
Écouvillons— animaux	Respecter le protocole recommandé par le fabricant, ou suivre la procédure suivante : 1. Casser la pointe de l'écouvillon et l'ajouter à un tube de 2 mL. 2. Ajouter 1 mL de PBS, pH 7.4 à chaque échantillon. 3. Vortexer pendant 3 minutes. 4. Procéder avec 200 µL de surnageant.
Tissu ou organe	1. Ajouter les composants suivants dans un tube de 2 mL : • tissu : 20 à 30 mg • PBS, pH 7.4 : 1 mL • PYREX™ Solid Glass Beads for Distillation Columns (3 mm) : 2 billes 2. Broyer les échantillons (les agiter avec les billes) dans un Fisher Scientific™ Bead Mill 24 Homogenizer à 6 m/s pendant 45 secondes. 3. Centrifuger à 1 000 × <i>g</i> pendant 1 minute. 4. Procéder avec 100 µL de surnageant.

Mélange de l'échantillon avec le mélange Bead/PK et la solution de Lysis/Binding

1. Retourner plusieurs fois le tube de mélange Bead/PK pour remettre 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 le volume adéquat de chaque échantillon préparé dans un puits contenant le mélange Bead/PK.

Pour...	Composer...
Culture Biomed Diagnostics InPouch™ TF	300 µL de surnageant
Biopsie auriculaire (forme triangulaire, largeur d'environ 1 cm) Sperme Écouvillons—animaux	200 µL de surnageant
Biopsie auriculaire (forme circulaire, 2 à 3 mm de diamètre)	50–200 µL de surnageant
Lait, plasma, sérum ou sang total	200 µL d'échantillon
Tissu ou organe	100 µL de surnageant

3. Mélanger l'échantillon avec le mélange Bead/PK pendant 2 minutes à température ambiante selon la méthode de votre choix :
 - **En utilisant un agitateur de plaques** : agiter vigoureusement pendant 2 minutes (voir "Déterminer le réglage maximal de l'agitateur de plaques" en page 9).
 - **En pipetant** : par plusieurs aspiration-refoulement, puis incuber 2 minutes à température ambiante. (Pour un traitement en aval sur le KingFisher™ mL Magnetic Particle Processor, mélanger par aspiration-refoulement.)
4. Ajouter 700 µL de solution de Lysis/Binding dans chaque puits ou tube contenant un échantillon.
5. Placer immédiatement les échantillons dans l'instrument (section suivante).

Placement des échantillons dans l'instrument

1. Sélectionner le script adéquat sur l'instrument (voir "Téléchargement et installation du script" en page 10).
2. Lancer le cycle, puis charger les plaques ou barrettes de tubes préparées sur leur position lorsque l'instrument le demande.

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

La méthode Complexe est recommandée pour les types d'échantillons suivants. L'acide nucléique pour lequel cette méthode est optimisée varie selon le type d'échantillon ; voir "Méthodes recommandées" en page 8 pour plus de détails.

- Échantillons environnementaux
- Fèces
- Fluides oraux
- Écouvillons—environnementaux ou fécaux

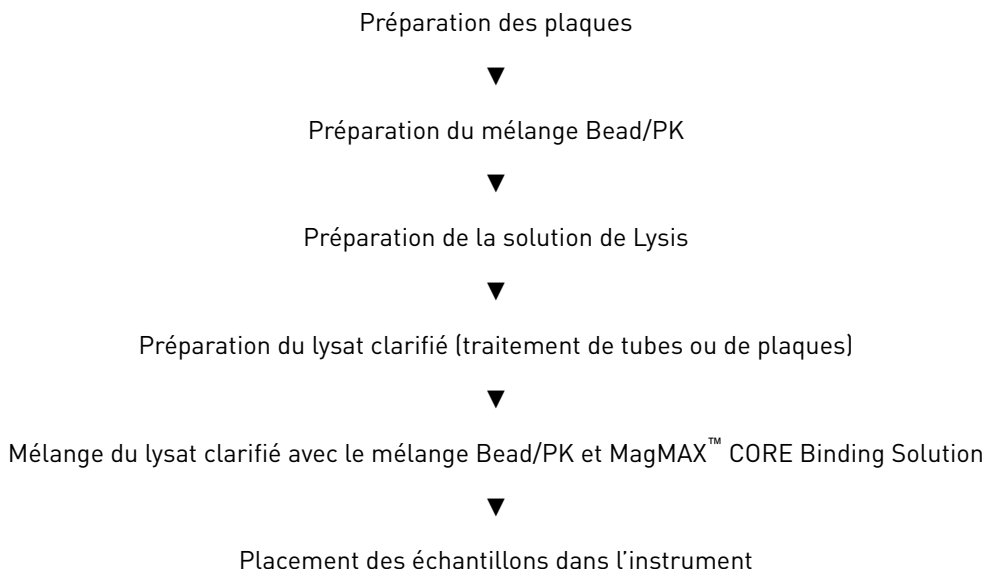
Suivez cette procédure si vous utilisez ces instruments :

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

Suivre Annexe B, "Purification avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL" si vous utilisez ces instruments :

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

Méthode : Complexe



Préparation des plaques

1. Préparation des plaques.

Tableau 9 Configuration des plaques : KingFisher™ Flex ou instrument MagMAX™ Express-96

ID de la plaque	Position de la plaque [1]	Type de plaque	Réactif	Volume par cupule
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 sur la plaque.	

[1] Position sur l'instrument.

- (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.

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.

- Vortexer vigoureusement MagMAX™ CORE Magnetic Beads pour s'assurer que les billes sont complètement remises en suspension.
- 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

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

Composant	Volume par échantillon
MagMAX™ CORE Lysis Solution	450 µL
(Facultatif) L'un des contrôles positifs internes (IPC) suivants :	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	2 µL
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	2 µL
Contrôle positif interne (IPC) fourni avec votre kit VetMAX™ PCR	Comme indiqué dans les instructions du kit
Solution de Lysis totale (+IPC)	450 µL + volume d'IPC

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

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

Préparation du lysat clarifié

1. Préparer les échantillons selon le type d'échantillon.

Pour...	Faire...
Échantillons environnementaux Fèces	- Transférer 0,2–0,3 g d'échantillon dans un tube de 2 mL. - Ajouter 1 mL de PBS, pH 7.4 puis vortexer vigoureusement pendant 3 minutes. - Centrifuger comme indiqué. Pour la purification de l'acide nucléique viral : centrifuger à 15 000 × <i>g</i> pendant 1 minute. Pour la purification de l'ADN bactérien ou la purification simultanée des acides nucléiques bactérien et viral : centrifuger à 100 × <i>g</i> pendant 1 minute. - Procéder avec 200 µL de surnageant.
Fluides oraux	- Mélanger brièvement l'échantillon de fluides oraux. - Procéder avec un échantillon de 300 µL.
Écouvillons—environnementaux ou fécaux	Échantillons fécaux : écouvillonner un échantillon fécal. Écouvillons environnementaux : procéder avec un écouvillon environnemental. - Ajouter 1 mL de PBS, pH 7.4 dans un tube de 2 mL. - Agiter l'écouvillon dans 1 mL de PBS, pH 7.4 pendant 5–10 secondes en retirant autant de matériau d'échantillon que possible, puis jeter l'écouvillon. Sinon, casser la pointe de l'écouvillon et la laisser dans le PBS, pH 7.4. - Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes ou jusqu'à ce que l'échantillon soit en suspension. - Centrifuger comme indiqué. Pour la purification de l'acide nucléique viral : centrifuger à 15 000 × <i>g</i> pendant 1 minute. Pour la purification de l'ADN bactérien ou la purification simultanée des acides nucléiques bactérien et viral : centrifuger à 100 × <i>g</i> pendant 1 minute. - Procéder avec 200 µL de surnageant.

2. Ajouter la solution de Lysis, puis clarifier le lysat.

Pour...	Faire...
Traitement de tubes	1. Pour chaque échantillon, ajouter 450 µL de solution de Lysis dans un nouveau tube de 2 mL. 2. Ajouter le volume d'échantillon indiqué à l'étape 1 en page 19 à la solution de Lysis. 3. Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes. 4. Centrifuger à 15 000 × <i>g</i> pendant 2 minutes. 5. Prélever le surnageant (lysate clarifié) sans remuer le culot.
Traitement de plaques	1. Pour chaque échantillon, ajouter 450 µL de solution de Lysis dans les puits adéquats d'une plaque à puits profonds. 2. Ajouter le volume d'échantillon indiqué à l'étape 1 en page 19 à la solution de Lysis. 3. Sceller la plaque avec un film adhésif. 4. Secouer la plaque à une vitesse modérée pendant 5 minutes. 5. Centrifuger à 3 000 × <i>g</i> pendant 5 minutes. 6. Prélever le surnageant (lysate clarifié) sans remuer le culot.

Mélange du lysat clarifié avec le mélange Bead/PK et MagMAX™ CORE Binding Solution

1. Retourner plusieurs fois le tube de mélange Bead/PK pour remettre 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 le volume adéquat de chaque lysat clarifié (voir "Préparation du lysat clarifié" en page 19) dans un puits contenant le mélange Bead/PK.

Pour...	Composer...
Fluides oraux	600 µL
Échantillons environnementaux, échantillons fécaux et écouvillons	500 µL

3. Mélanger l'échantillon avec le mélange Bead/PK pendant 2 minutes à température ambiante selon la méthode de votre choix :
 - **En utilisant un agitateur de plaques** : agiter vigoureusement pendant 2 minutes (voir "Déterminer le réglage maximal de l'agitateur de plaques" en page 9).
 - **En pipetant** : par plusieurs aspiration-refoulement, puis incubé 2 minutes à température ambiante. (Pour un traitement en aval sur le KingFisher™ mL Magnetic Particle Processor, mélanger par aspiration-refoulement.)
4. Ajouter 350 µL de MagMAX™ CORE Binding Solution.
5. Placer immédiatement les échantillons dans l'instrument (section suivante).

Placement des échantillons dans l'instrument

1. Sélectionner le script adéquat sur l'instrument (voir "Téléchargement et installation du script" en page 10).
2. Lancer le cycle, puis charger les plaques ou barrettes de tubes préparées sur leur position lorsque l'instrument le demande.

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

La méthode Digestion est recommandée pour les types d'échantillons suivants. L'acide nucléique pour lequel cette méthode est optimisée varie selon le type d'échantillon ; voir "Méthodes recommandées" en page 8 pour plus de détails. La méthode Digestion n'est pas recommandée pour la purification de l'ARN.

- Échantillons environnementaux
- Fèces
- Follicules pileux
- Écouvillons—environnementaux ou fécaux
- Tissu ou organe

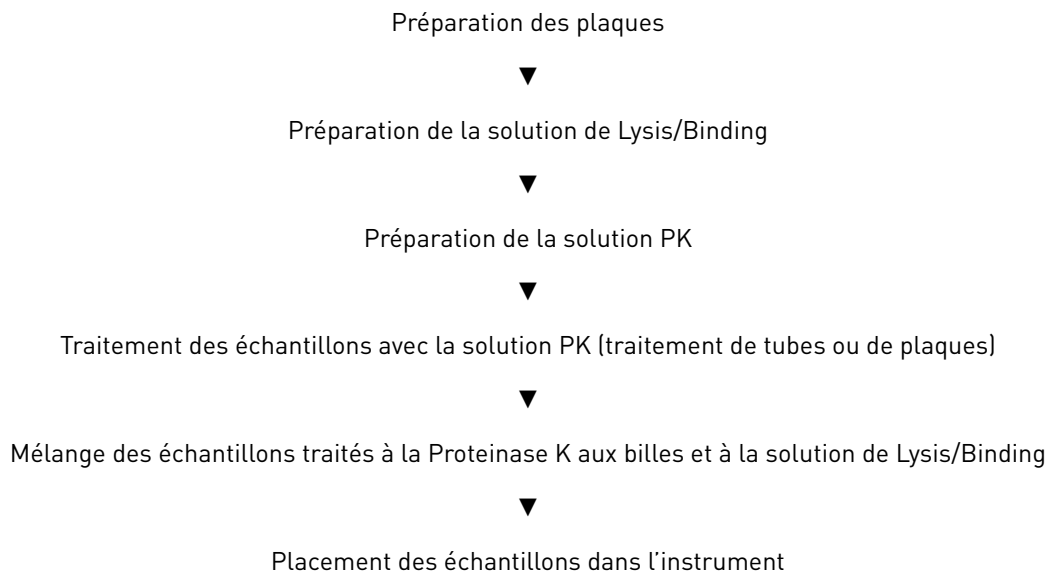
Suivez cette procédure si vous utilisez ces instruments :

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

Suivre Annexe B, "Purification avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL" si vous utilisez ces instruments :

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

Méthode : Digestion



Préparation des plaques

1. Préparation des plaques.

Tableau 10 Configuration des plaques : KingFisher™ Flex ou instrument MagMAX™ Express-96

ID de la plaque	Position de la plaque [1]	Type de plaque	Réactif	Volume par cupule
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 sur la plaque.	

[1] Position sur l'instrument.

- (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.

Préparation de la solution de Lysis/Binding

- 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 (-IPC)	700 µL
(Facultatif) L'un des contrôles positifs internes (IPC) suivants :	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	2 µL
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	2 µL
Contrôle positif interne (IPC) fourni avec votre kit VetMAX™ PCR	Comme indiqué dans les instructions du kit
Solution de Lysis/Binding totale (+IPC)	700 µL + volume d'IPC

- 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 la solution PK

Préparer la solution PK immédiatement avant utilisation.

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

Composant	Volume par échantillon
PK Buffer for MagMAX™ -96 DNA Multi-Sample Kit	90 µL
MagMAX™ CORE Proteinase K	10 µL
Solution PK totale	100 µL

2. Retourner plusieurs fois le tube pour homogénéiser, puis centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube.
3. Passer immédiatement à l'étape suivante :
 - **Pour le traitement de tube** : passer à "Traitement des échantillons avec la solution PK en tube" en page 25.
 - **Pour le traitement de plaque** : passer à "Traitement des échantillons avec la solution PK en plaque" en page 27.

Traitement des échantillons avec la solution PK

Traitement des échantillons avec la solution PK en tube

Traiter les échantillons avec la solution PK selon le type d'échantillon.

Type d'échantillon	Procédure
Échantillons environnementaux Fèces	1. Transférer 0,2–0,3 g d'échantillon dans un tube de 2 mL. 2. Ajouter 1 mL de PBS, pH 7.4 puis vortexer vigoureusement pendant 3 minutes. 3. Centrifuger à $100 \times g$ pendant 1 minute. 4. Transférer 200 μL du surnageant dans un nouveau tube. 5. Ajouter 100 μL de solution PK au surnageant transféré, puis vortexer brièvement pour mélanger. 6. Incuber 30 minutes à 55 °C. 7. Centrifuger à $15\,000 \times g$ pendant 2 minutes. 8. Procéder avec 200 μL d'échantillon digéré.
Follicules pileux	1. Placer 10–15 follicules pileux dans un tube de 2 mL. 2. Ajouter 100 μL de solution PK à l'échantillon. 3. Incuber 30 minutes à 55 °C. 4. Centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube. 5. Procéder avec le volume d'échantillon digéré disponible pour le pipetage. Le volume disponible est inférieur à 100 μL.
Écouvillons— environnementaux ou fécaux	1. Échantillons fécaux : écouvillonner un échantillon fécal. Écouvillons environnementaux : procéder avec un écouvillon environnemental. 2. Ajouter 1 mL de PBS, pH 7.4 dans un tube de 2 mL. 3. Agiter l'écouvillon dans le PBS, pH 7.4 pendant 5–10 secondes en retirant autant de matériau d'échantillon que possible, puis jeter l'écouvillon. Sinon, casser la pointe de l'écouvillon et la laisser dans le PBS, pH 7.4. 4. Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes ou jusqu'à ce que l'échantillon soit en suspension. 5. Centrifuger à $100 \times g$ pendant 1 minute. 6. Transférer 200 μL du surnageant dans un nouveau tube. 7. Ajouter 100 μL de solution PK au surnageant transféré, puis vortexer brièvement pour mélanger. 8. Incuber 30 minutes à 55 °C. 9. Centrifuger à $15\,000 \times g$ pendant 2 minutes. 10. Procéder avec 200 μL d'échantillon digéré.
Tissu ou organe	1. Transférer 20–30 mg de tissu dans un tube de 2 mL. 2. Ajouter 100 μL de solution PK à l'échantillon. 3. Incuber 2 heures à 55 °C.

Type d'échantillon	Procédure
	4. Centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube. 5. Procéder avec le volume d'échantillon digéré disponible pour le pipetage. Le volume disponible est inférieur à 100 µL. Utiliser un cône de pipette P1000 pour transférer les échantillons visqueux.

Traitement des échantillons avec la solution PK en plaque

Traiter les échantillons avec la solution PK selon le type d'échantillon.

Type d'échantillon	Procédure
Échantillons environnementaux Fèces	1. Transférer 0,2–0,3 g d'échantillon dans le puits d'un tube de 2 mL. 2. Ajouter 1 mL de PBS, pH 7.4 à chaque échantillon, puis vortexer vigoureusement pendant 3 minutes. 3. Centrifuger à $100 \times g$ pendant 1 minute. 4. Transférer 200 μL de chaque surnageant dans une plaque à puits profonds. 5. Ajouter 100 μL de solution PK à chaque surnageant transféré, puis mélanger par aspiration-refoulement. 6. Sceller la plaque avec un film adhésif. 7. Incuber 30 minutes à 55 °C. 8. Centrifuger à $3\,000 \times g$ pendant 5 minutes. 9. Procéder avec 200 μL d'échantillon digéré.
Follicules pileux	1. Placer 10–15 follicules pileux dans le puits d'une plaque à puits profonds. 2. Ajouter 100 μL de solution PK à chaque échantillon. 3. Sceller la plaque avec un film adhésif. 4. Incuber 30 minutes à 55 °C. 5. Centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond de la plaque. 6. Procéder avec le volume d'échantillon digéré disponible pour le pipetage. Le volume disponible est inférieur à 100 μL.
Écouvillons—environnementaux ou fécaux	1. Échantillons fécaux : écouvillonner un échantillon fécal. Écouvillons environnementaux : procéder avec un écouvillon environnemental. 2. Ajouter 1 mL de PBS, pH 7.4 dans un tube de 2 mL. 3. Agiter l'écouvillon dans le PBS, pH 7.4 pendant 5–10 secondes en retirant autant de matériau d'échantillon que possible, puis jeter l'écouvillon. Sinon, casser la pointe de l'écouvillon et la laisser dans le PBS, pH 7.4. 4. Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes ou jusqu'à ce que les échantillons soient en suspension. 5. Centrifuger à $100 \times g$ pendant 1 minute. 6. Transférer 200 μL de chaque surnageant dans une plaque à puits profonds. 7. Ajouter 100 μL de solution PK à chaque surnageant transféré, puis mélanger par aspiration-refoulement. 8. Sceller la plaque avec un film adhésif. 9. Incuber 30 minutes à 55 °C. 10. Centrifuger à $3\,000 \times g$ pendant 2 minutes. 11. Procéder avec 200 μL d'échantillon digéré.

Type d'échantillon	Procédure
Échantillons de tissus ou d'organes	1. Transférer 20–30 mg de tissu dans le puits d'une plaque à puits profonds. 2. Ajouter 100 µL de solution PK à chaque échantillon. 3. Sceller la plaque avec un film adhésif. 4. Incuber 2 heures à 55 °C. 5. Centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond de la plaque. 6. Procéder avec le volume d'échantillon digéré disponible pour le pipetage. Le volume disponible est inférieur à 100 µL. Utiliser un cône de pipette P1000 pour transférer les échantillons visqueux.

Mélange des échantillons traités à la Proteinase K aux billes et à la solution de Lysis/Binding

1. Vortexer plusieurs fois le tube de MagMAX™ CORE Magnetic Beads pour remettre les billes en suspension, puis ajouter 20 µL de billes dans les puits requis de la plaque ou de la barrette.

Remarque : Ne pas utiliser le Bead/PK Mix.

2. Ajouter le volume adéquat de chaque échantillon traité à la Proteinase K dans un puits avec des billes.

Pour...	Composer...
Échantillons environnementaux, matières fécales Écouillons	200 µL
Follicules pileux Échantillons de tissus ou d'organes	Jusqu'à 100 µL

3. Mélanger l'échantillon avec les billes pendant 2 minutes à température ambiante selon la méthode de votre choix :
 - **En utilisant un agitateur de plaques :** agiter vigoureusement pendant 2 minutes (voir "Déterminer le réglage maximal de l'agitateur de plaques" en page 9).
 - **En pipetant :** par plusieurs aspiration-refoulement, puis incuber 2 minutes à température ambiante. (Pour un traitement en aval sur le KingFisher™ mL Magnetic Particle Processor, mélanger par aspiration-refoulement.)
4. Ajouter 700 µL de solution de Lysis/Binding à chaque échantillon.
5. Placer immédiatement les échantillons dans l'instrument (section suivante).

Placement des échantillons dans l'instrument

1. Sélectionner le script adéquat sur l'instrument (voir "Téléchargement et installation du script" en page 10).
2. Lancer le cycle, puis charger les plaques ou barrettes de tubes préparées sur leur position lorsque l'instrument le demande.

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

6

Méthode Lyse avec incubation

La méthode Lyse avec incubation est recommandée pour les biopsies auriculaires (circulaires) nécessitant un traitement avec :

- Une étape de lyse étendue avant l'isolation de l'acide nucléique.
- L'ajout de biopsies directement dans une solution de lyse.

Suivez cette procédure si vous utilisez ces instruments :

- KingFisher™ Flex
- MagMAX™ Express-96

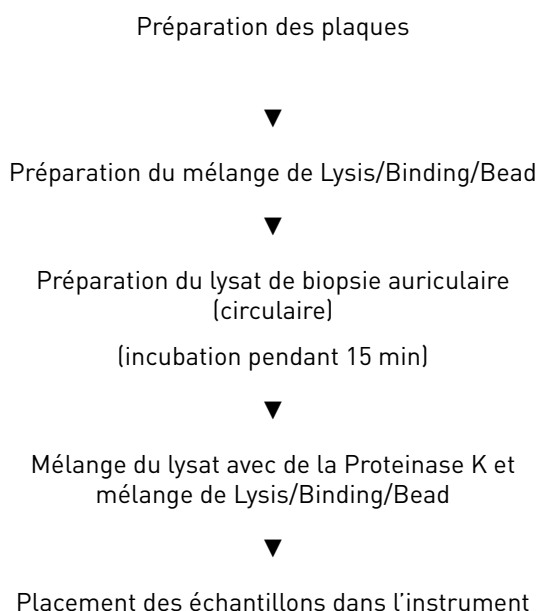
Suivre Annexe B, "Purification avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime ou KingFisher™ mL" si vous utilisez ces instruments :

- KingFisher™ Duo Prime
- KingFisher™ mL

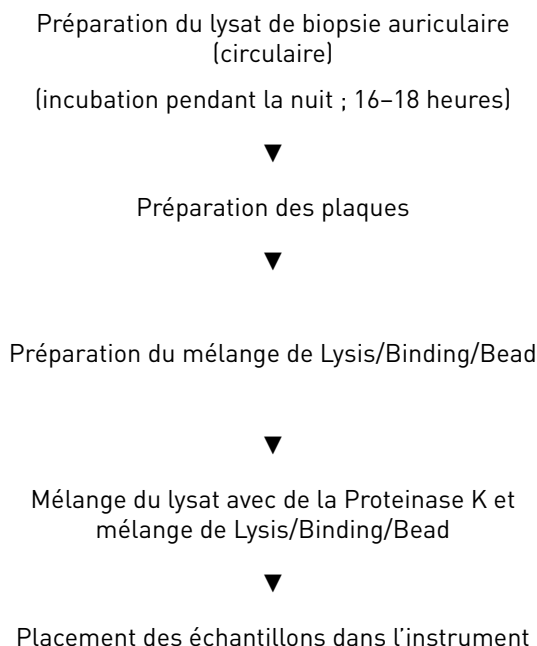
Méthode : Lyse avec incubation

La méthode Lyse avec incubation peut être réalisée avec une incubation de 15 minutes ou sur toute une nuit dans la solution de Lysis. Si les échantillons sont incubés toute la nuit, installer les plaques pour le traitement et préparer le mélange de Lysis/Binding/Bead une fois l'incubation terminée.

Incubation pendant 15 min



Incubation pendant la nuit (16–18 heures)



Préparation des plaques

1. Préparation des plaques.

Tableau 11 Configuration des plaques : KingFisher™ Flex ou instrument MagMAX™ Express-96

ID de la plaque	Position de la plaque [1]	Type de plaque	Réactif	Volume par cupule
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 sur la plaque.	

[1] Position sur l'instrument.

- (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.

Préparation du mélange de Lysis/Binding/Bead

- 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
Total du mélange de Lysis/Binding/Bead (– IPC)	720 µL
(Facultatif) L'un des contrôles positifs internes (IPC) suivants :	
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control DNA	2 µL
VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA	2 µL
Contrôle positif interne (IPC) fourni avec votre kit VetMAX™ PCR	Comme indiqué dans les instructions du kit
Total du mélange de Lysis/Binding/Bead (+IPC)	720 µL + volume d'IPC

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

Préparation du lysat de biopsie auriculaire (circulaire)

1. Ajouter 300 µL de MagMAX™ CORE Lysis Solution à chaque biopsie auriculaire.
2. Incuber sans agiter à température ambiante pendant la durée souhaitée.
 - 15 minutes
 - Pendant la nuit (16–18 heures)
3. Procéder avec les lysats individuels ou de mélange.

Pour...	Faire...
Échantillons individuels	Procéder avec 250 µL de lysats.
Mélange	1. Mélanger 50 µL de lysats individuels dans un tube de microcentrifugeuse de 2 mL. 2. Si le volume du mélange n'atteint pas 250 µL, ajouter de MagMAX™ CORE Lysis Solution pour obtenir un total de 250 µL. 3. Vortexer brièvement pour mélanger les échantillons de mélange. 4. Procéder avec 250 µL de mélange. Par exemple : • Pour un mélange de 10 échantillons, le volume est de 500 µL (10 × 50 µL). Passer à l'étape suivante avec 250 µL du mélange. • Pour un mélange de 4 échantillons, le volume est de 200 µL (4 × 50 µL). Ajouter 50 µL de MagMAX™ CORE Lysis Solution et passer à l'étape suivante avec le mélange de 250 µL.
Analyse individuelle d'un mélange positif	Procéder avec les lysats restants de chaque échantillon individuel dans le mélange positif. Le volume peut être inférieur à 250 µL.

Conserver les lysats individuels et de mélange pour le recontrôle : jusqu'à 48 heures à température ambiante, ou à plus long terme en dessous de -16 °C.

Mélange du lysat avec de la Proteinase K et 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 de tubes.
2. Ajouter 250 µL de lysat individuel ou de mélange.
3. Mélanger le lysat avec la Proteinase K en le pipetant et rejetant plusieurs fois, puis incuber 2 minutes à température ambiante.
4. Retourner le tube contenant le mélange de Lysis/Binding/Bead plusieurs fois pour remettre les billes en suspension, puis ajouter 720 µL de mélange de Lysis/Binding/Bead à chaque échantillon.
5. Placer immédiatement les échantillons dans l'instrument (section suivante).

Placement des échantillons dans l'instrument

1. Sélectionner le script adéquat sur l'instrument (voir "Téléchargement et installation du script" en page 10).
2. Lancer le cycle, puis charger les plaques ou barrettes de tubes préparées sur leur position lorsque l'instrument le demande.

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



Résolution des problèmes

Observation	Cause possible	Action recommandée
L'éluat est de couleur marron clair.	Les billes magnétiques ont été transférées dans l'éluat.	Une petite quantité de billes dans l'échantillon n'inhibe pas les réactions RT-PCR ou PCR. Retirer les billes de l'acide nucléique élué en plaçant la plaque ou la barrette sur un support magnétique (~1 minute) puis transférer la solution d'acide nucléique dans une nouvelle plaque ou barrette exempte de nucléase.
Signal ARN ou ADN faible ou inexistant (c'est-à-dire que la valeur C_t est plus élevée que prévu). Dans les échantillons testés, la valeur C_t de la cible IPC est en dehors de la plage de valeurs validée (valeur IPC C_t non conforme ; échantillon non valide).	Des inhibiteurs sont présents dans l'acide nucléique récupéré. Ces méthodes produisent de l'acide nucléique de haute qualité pour la plupart des échantillons. Toutefois, les échantillons contenant des quantités exceptionnellement élevées d'inhibiteurs peuvent transporter des inhibiteurs à des niveaux suffisants pour affecter la RT-PCR ou la PCR.	- Diluer l'échantillon d'acide nucléique non valide au 1:10 dans du tampon TE 1X. - Réaliser une nouvelle analyse PCR avec l'acide nucléique dilué. - Si l'acide nucléique dilué est positif pour la cible, ou s'il est négatif pour la cible avec une valeur C_t IPC conforme, le résultat est validé. - Si l'acide nucléique dilué est négatif pour la cible avec une valeur C_t IPC non conforme, le résultat n'est pas validé. Dans ce cas, diluer l'échantillon biologique d'origine au 1:10 dans du PBS1X, puis répéter la purification et la PCR. Si le résultat est toujours non validé, répéter la purification et la PCR sur un nouvel échantillon biologique.
	Les échantillons présentant des quantités élevées d'acide nucléique, comme les tissus, le sang aviaire et les cultures bactériennes, peuvent saturer les billes magnétiques. La saturation des billes réduit la récupération de l'acide nucléique.	Répéter la purification avec la méthode Complexe.
	L'ARN ou l'ADN IPC ne s'est pas lié efficacement aux billes magnétiques à cause d'un matériau extra-cellulaire présent dans l'échantillon.	Pour les échantillons présentant une récupération réduite de l'ARN ou de l'ADN IPC, diluer les échantillons au 1:2, 1:4, 1:8, et 1:16 dans du PBS 1X. Utiliser la dilution permettant la meilleure récupération IPC. Ajouter MagMAX™ CORE Magnetic Beads à la solution de Lysis/Binding au lieu de préparer un mélange Bead/PK ou d'ajouter directement les billes à l'échantillon.



Observation	Cause possible	Action recommandée
Mauvais rendement de l'ARN viral provenant d'échantillons tissulaires, fécaux, environnementaux ou d'écouvillons.	La méthode Digestion a été utilisée pour la purification de l'acide nucléique viral.	Suivre la méthode adéquate. Voir "Méthodes recommandées" en page 8.
Variation d'un puits à l'autre du rendement de l'ARN/ADN provenant d'échantillons identiques.	Les billes magnétiques n'ont pas été totalement remises en suspension/dispersées.	En général, les billes magnétiques se dispersent plus facilement lorsque la température du mélange est > 20 °C. Veiller à : • Bien vortexer les billes magnétiques avant de préparer un mélange de billes. • Bien remettre le mélange de billes en suspension avant de l'ajouter aux échantillons.
Les échantillons positifs sont agrégés en cluster dans la plaque PCR.	Les échantillons à titre élevé (présentant une valeur de C_t faible ou précoce) ont contaminé les puits environnants.	Répéter la purification de l'acide nucléique des échantillons positifs ou suspects sans les échantillons à titre élevé.
	Si la même disposition de plaque est utilisée de la purification de l'acide nucléique à la PCR, il peut s'avérer difficile de déterminer si la contamination a eu lieu pendant la purification de l'acide nucléique ou pendant la PCR.	Éviter toute projection lors du pipetage des réactifs ou des échantillons.



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

Matériel requis mais non fourni

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur **thermofisher.com.PFL** : Fisher Scientific (**fisherscientific.com**) ou l'un des principaux fournisseurs de matériel de laboratoire.

Tableau 12 Matériel requis pour le traitement avec l'instrument KingFisher™ Duo Prime

Article	Source
KingFisher™ Duo Prime Purification System	5400110
KingFisher™ Duo Combi pack for Microtiter 96 Deepwell plate (tip combs, plates and elution strips for 96 samples)	97003530
KingFisher™ Duo Elution Strip , 40 pieces ^[1]	97003520
KingFisher™ Duo 12-tip comb, for Microtiter 96 Deepwell plate , 50 pieces ^[1]	97003500
KingFisher™ Flex Microtiter Deepwell 96 plates ^[1]	95040460

^[1] Included in the KingFisher™ Duo Combi pack (Cat. No. 97003530).

Tableau 13 Matériel requis pour le traitement avec l'instrument KingFisher™ mL

Article	Source
KingFisher™ mL Purification System	5400050
KingFisher™ mL Tubes and tip combs pour 240 échantillons	97002141
KingFisher™ mL Tip comb, 800 pieces	97002111
KingFisher™ mL Tube, 20 x 45 pieces	97002121

Procédure de purification

Remarque : Au cours de cette procédure pour le traitement sur l'instrument KingFisher™ mL, mélanger les échantillons en les pipetant puis en les rejetant. Ne pas utiliser d'agitateur de plaques avec les barrettes requises par l'automate.

1. Suivre la méthode adaptée à votre type d'échantillon en commençant par la préparation du lysat d'échantillon puis en mélangeant les échantillons à des billes et à une solution de Lysis.

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

2. Ajouter MagMAX™ CORE Wash Solutions et 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 nécessite pas de charger les articles individuellement.

Tableau 14 Configuration de la plaque : KingFisher™ Duo Prime instrument

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 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 15 Configuration de la barrette de tubes : KingFisher™ mL instrument

ID de la position	Position de la barrette	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. Suivre "Placement des échantillons dans l'instrument" en page 15.



Sécurité



AVERTISSEMENT ! SÉCURITÉ GÉNÉRALE. Toute utilisation de ce produit non conforme avec les indications fournies dans le guide de l'utilisateur peut provoquer des blessures corporelles ou endommager l'instrument ou le dispositif. S'assurer que toute personne utilisant ce produit a pris connaissance des consignes de sécurité générale en vigueur dans les laboratoires ainsi que des informations de sécurité décrites dans le présent document.

- Avant d'utiliser un instrument ou un dispositif, lire les informations de sécurité décrites dans le guide de l'utilisateur fourni par le fabricant de l'instrument ou du dispositif en question, et veiller à bien les comprendre.
 - Avant de manipuler des produits chimiques, lire toutes les fiches de données de sécurité (FDS) qui s'appliquent, et s'assurer de bien le comprendre, et porter les équipements de protection appropriés (gants, blouses, lunettes de protection, etc.). Pour obtenir les FDS, se reporter à la section « Documentation et support » du présent document.
-



Sécurité chimique



AVERTISSEMENT ! CONSIGNES GÉNÉRALES POUR LA

MANIPULATION DES PRODUITS CHIMIQUES. Pour minimiser les risques, veiller à ce que le personnel du laboratoire lise attentivement et mette en œuvre les consignes de sécurité générales relatives à l'utilisation et au stockage des produits chimiques et à la gestion des déchets qui en découlent, décrites ci-dessous. Consulter également la FDS appropriée pour connaître les précautions et instructions particulières à respecter :

- Lire et comprendre les fiches de données de sécurité (FDS) fournies par le fabricant avant de stocker, manipuler ou utiliser les matériaux dangereux ou les produits chimiques. Pour obtenir les FDS, se reporter à la section "Documentation et support" du présent document.
- Limiter les contacts avec les produits chimiques. Porter des équipements de protection appropriés lors de la manipulation des produits chimiques (par exemple : lunettes de sûreté, gants ou vêtements de protection).
- Limiter l'inhalation des produits chimiques. Ne pas laisser les récipients de produits chimiques ouverts. Ils ne doivent être utilisés qu'avec une ventilation adéquate (par exemple, sorbonne).
- Vérifier régulièrement l'absence de fuite ou d'écoulement des produits chimiques. En cas de fuite ou d'écoulement d'un produit, respecter les directives de nettoyage du fabricant recommandées sur la fiche de données de sécurité.
- Manipuler les déchets chimiques dans une sorbonne.
- Veiller à utiliser des récipients à déchets primaire et secondaire. (Le récipient primaire contient les déchets immédiats, le récipient secondaire contient les fuites et les écoulements du récipient primaire. Les deux récipients doivent être compatibles avec les matériaux jetés et conformes aux exigences locales, nationales et communautaires en matière de confinement des récipients.)
- Une fois le récipient à déchets vidé, il doit être refermé hermétiquement avec le couvercle fourni.
- Caractériser (par une analyse si nécessaire) les déchets générés par les applications, les réactifs et les substrats particuliers utilisés dans le laboratoire.
- Vérifier que les déchets sont convenablement stockés, transférés, transportés et éliminés en respectant toutes les réglementations locales, nationales et/ou communautaires en vigueur.
- **IMPORTANT !** Les matériaux représentant un danger biologique ou radioactif exigent parfois une manipulation spéciale, et des limitations peuvent s'appliquer à leur élimination.

Sécurité en matière de risques biologiques



AVERTISSEMENT ! RISQUE BIOLOGIQUE. Les échantillons biologiques tels que les tissus, les fluides corporels, les agents infectieux et le sang humain ou animal présentent un risque de transmission de maladies infectieuses. Réaliser toutes les tâches dans des installations équipées de manière adéquate en utilisant les équipements de sécurité appropriés (par exemple, des dispositifs de confinement physique). Les équipements de sécurité peuvent aussi inclure des articles de protection personnelle, tels que des gants, des blouses, des couvre-chaussures, des bottes, des respirateurs, des masques faciaux, des lunettes de protection ou des lunettes de sécurité. Avant toute manipulation de matières biologiques potentiellement dangereuses, il convient de former les opérateurs conformément aux réglementations en vigueur et aux besoins de l'entreprise/institution. Suivre toutes les réglementations locales, nationales et/ou communautaires en vigueur. Les références suivantes fournissent des directives générales pour la manipulation d'échantillons biologiques en laboratoire.

- Ministère de la Santé et des Services sociaux des États-Unis, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)* (Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux [BMBL]), 5ème édition, HHS Publication n° (CDC) 21-1112, révisée en décembre 2009 ; disponible sur : www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf
- Organisation mondiale de la Santé, *Laboratory Biosafety Manual* (Manuel de sécurité biologique en laboratoire), 3ème édition, OMS/CDS/CSR/LYO/2004.11 ; disponible sur : www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf

Documentation et support

Documentation connexe

Document	Publication Number
<i>Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex User Manual</i>	N07669
<i>Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime Technical Manual</i>	N16621
<i>Thermo Scientific™ KingFisher™ mL User Manual</i>	1508260
<i>Applied Biosystems™ MagMAX™ Express 96 User Manual</i>	N07849
<i>MagMAX™ CORE Mechanical Lysis Module User Guide</i>	MAN0015945

Assistance à la clientèle et support technique

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

- Numéros de téléphone de contact internationaux
- Support produit, dont :
 - FAQ relatives aux produits
 - Logiciels, correctifs et mises à jour
 - Formations sur de nombreux instruments et applications
- Commandes et assistance en ligne
- Documentation produit, dont :
 - 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 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.html. Si vous avez des questions, vous pouvez prendre contact avec Life Technologies à l'adresse web suivante : www.thermofisher.com/support.

