Kit d'extraction purification AN pour Sang

NOTICE d'Utilidation (Version 12)

Kit d'extraction des purification d'acide nucléique -automatisable

par billes magnétiques

Vial: Kit-EP_96_112_I_PF
Tube: Kit-EP_14_112_I_PF
Tube: Kit-EP_24_112_I_PF

Pour Sang EDTA

ad Nucléis SAS
Siret 497 802 165 000 17
TVA intraCEE : FR 3649780216500017

24 B rue du Stade
F-69290 GREZIEU LA VARENNE

support@adnucleis.com
TEL : + 33 (0) 4 78 56 79 36

I. Données administratives

I.1 Nom du produit

Kit d'extraction purification AN pour Sang

I.2 Description du produit

Le kit d'extraction purification permet l'extraction des acides nucléiques sur matrice(s) : Sang EDTA

Le kit utilise une technologie basée sur les billes magnétiques.
Le kit est implémentable sur les plateformes robotiques de marque ADNucleis Sequence (PREP et EVO). L'utilisation d'autre robot est sous la responsabilité de l'utilisateur.

I.3 Généralités

La préparation d'acides nucléiques comprend l'extraction et la purification à partir d'un échantillon. L'étape d'extraction permet la libération des acides nucléiques de la cellule. L'étape de purification élimine les protéines et les lipides, les composés phénoliques ... pour obtenir un acide nucléique sans composé potentiellement inhibiteur. La lyse est un défi plus important lorsque l'on travaille avec des types d'échantillons complexes ou une plus grande variété d'agents pathogènes tels que les spores bactériens ou les oocystes. La combinaison de plusieurs réactifs (détergents, sels chaotropiques et enzymes) permet de lyser différents types de cellules et de pathogènes.
L'étape de purification peut être réalisée avec des billes paramagnétiques recouvertes de silice pour permettre la liaison des acides nucléiques. Les billes sont largement utilisées sur des plates-formes automatisées. Les particules paramagnétiques se mélangent librement avec un échantillon pour collecter les acides nucléiques. Étant donné que les billes se déplacent dans l'échantillon, le colmatage n'est pas un problème contrairement aux colonnes. Les billes peuvent ensuite être collectées avec un aimant. Les billes paramagnétiques peuvent se lier à la fois à l'ARN et à l'ADN.

I.4 Fabricant

ad Nucléis SAS
24 B rue du Stade
69290 GREZIEU LA VARENNE - France
contact@adnucleis.com
Tel: + 33 (0) 4 78 56 79 37

Bureaux ouverts du Lundi au Vendredi, de 9h à 17h.

II. Présentation du kit d'extraction purification

⚠ Avant utilisation, vérifier que le transport n'a pas endommagé les kits.

II.1 Principe

L'extraction et la purification des acides nucléiques des échantillons se réalise en 2 étapes. Une lyse thermique libère l'ADN et l'ARN de toutes les cellules et germes présents dans l'échantillon. La deuxième étape est une purification du lysat pour l'obtention des acides nucleiques purifiés des composés inhibants les méthodes d'analyses de biologie moléculaire.

II.2 Description et contenu du kit

II.2.1 Composition du kit d'extraction PVG

	content				A réception, Température/	Après 1er utilisation	remarques
désignation	Flacon 96R (µL	Tube 24R	Tube 14R (µL)	Barette			
PVG	18000.00	4500.00	2400.00	inclus dans la barrette	5°C ± 3 °C/ 1 an	5°C ± 3 °C/ 1 an	contient des sels chaotropiques
RNA carrier	120.00	inclus dans le PVG	inclus dans le PVG	inclus dans la barrette	5°C ± 3 °C/ 1 an	5°C ± 3 °C/ 1 an	polymers

PK	720.00	300.00	200.00	inclus dans la barrette	5°C ± 3 °C/ 1 an	5°C ± 3 °C/ 1 an	Enzymes protéolitique
BMB*	15000.00	4000.00	2000.00	inclus dans la barrette	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	contient des billes magnétiques
SP	6000.00	1500.00	800.00	inclus dans la barrette	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	-
Lavage 1	24000.00	5000.00	3500.00	inclus dans la barrette	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	contient des sels chaotropiques
Lavage 1	24000.00	5000.00	3500.00	inclus dans la barrette	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	contient des sels chaotropiques
Lavage 2	24000.00	5000.00	3500.00	inclus dans la barrette	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	contient de l'alcool
Elution	15000.00	4000.00	2000.00	inclus dans la barrette	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	(5°C ± 3 °C/ 1 an)	Solution tamponnée

Un traitement pré-analytique peut être nécessaire avant l'extraction (voir ci-dessous).

*La solution BMB est à conserver éloignée des sources magnétiques

II.2.2 Matériel et réactifs non fournis

Consommables de routine liés aux bonnes pratiques de laboratoire
Plaques 96 puits type 'deep-well' Ritter Riplate, films X-percé et aluminium
Portoir aimanté : disponible chez ad Nucléis uniquement
Cônes stériles à filtre pour micropipettes
Microtubes stériles
Gants
Bloc chauffant ou bain-marie
Microtubes ou plaque deep-well; barrettes de microtubes PCR
Pipette mono 1000µl et/ou 8 canaux 200 ou 300µl

II.2.3 Spécifications du kit

Type	Kit d'extraction des purification d'acide nucléique -automatisable
Échantillon	Sang EDTA
Vol d'extrait final (µl)	120

rendement typique : 0.5-1.7 µg par prise d'échantillon recommandée

III Protocole d'extraction et de purification

Tableau récapitulatif des pré-traitements

Matrice	Pré-traitement	Vol recommandé pour l'échantillon (µl)
Sang	Prélever dirrectement le volume nécessaire	150

La prise de volume de l'échantillon recommandé est 150 µl. Le volume peut être adapté en fonction de l'analyse entre 50 et 200 µL sous la responsabilité de l'utilisateur

III.1 Extraction

Reconstitution du tampon d'extraction :

- Melanger les différents composés extemporanément suivant tableau ci-dessous (préparer le volume nécessaire pour le nombre d'échantillons correspondant).

- Préparer la plaque deep-well avec le tampon d'extraction reconstitué dans chaque puit. Sceller la plaque deep well à l'aide du film adhésif X-percé (pour extraction manuelle uniquement.)

- Transférer le volume recommandé d'échantillon (ou d'échantillon pré traité) dans un puits contenant le tampon d'extraction

Tableau récapitulatif des volumes spécifiques de prélévement et réactifs d'extraction-purification pour la matrice Kit d'extraction purification AN pour Sang

		tampon d'extraction			
Matrice	Vol échantillon (apres pré-traitement) pour l'extraction (µl)	Vol PVG (µl)	Vol PK (µl)	RNA Carrier (µl)	Vol Elution (µl)
Sang	150	150	6	1µL par échantillon pour les kits flacons uniquement	120

Profil thermique d'extraction :

Incuber à 56°C pendant 45 min.

- À cette étape, les échantillons traités peuvent être stockés à 4°C. Si les échantillons sont stockés à 4°C, ils doivent être chauffés 10 min à la température d'extraction recommandée avant de passer à l'étape de purification.

III.2 Purification

III.2.1 Protocole

- Ajouter 40µl de solution SP à l'échantillon extrait (homogénéiser 4 fois par pipetage).
- Homogénéiser puis prélever 125 µl de suspension de billes magnétiques et les mettre dans chaque puits.
- Attention à bien homogénéiser la suspension de billes magnétiques avant chaque aspiration car les microbilles
- Homogénéiser délicatement la solution de billes magnétiques avec l'échantillon par pipetage avec la pipette multicanaux. Faire 4 allers-retours. Utiliser un cône différent pour chaque puits.

- Incuber 2 minutes à température ambiante.
- Placer la plaque sur le portoir magnétique pendant 1 minute. Les billes magnétiques sont capturées sur le côté de
- Eliminer le surnageant avec une pipette multicanaux et des cônes de 250 µl. Pour cela, introduire les cônes
- Ôter la plaque du portoir magnétique.

- Ajouter 200 µl de tampon de lavage 1, homogénéiser délicatement par aspiration-refoulement avec la pipette multicanaux. Faire 6 allers-retours.

- Placer la plaque sur le portoir magnétique pendant 30 s. Les billes magnétiques sont capturées sur un côté de

- Eliminer le surnageant avec une pipette multicanaux et des cônes. Pour cela introduire les cônes verticalement dans les puits sans toucher les parois et aspirer le surnageant sans aspirer les billes magnétiques en gardant la

- Ôter la plaque du portoir magnétique.

- Ajouter 200 µl de tampon de lavage 2: homogénéiser, et placer les tubes sur le portoir magnétique pendant 30 s. Puis éliminer le surnageant comme pour le lavage 1.

- Ôter la plaque du portoir magnétique.

- laisser sécher les puits 5 min à température ambiante

- S'assurer visuellement de l'absence de tampon de lavage 3.

- Ajouter 120 µl de tampon d'élution (le volume de tampon d'elution dépend la matrice utilisée. Se référer au tableau des volumes de réactifs d'extraction purification précédent).

- Resuspendre les billes par pipettage et incuber 2 min à température ambiante.

- Placer la plaque sur le portoir magnétique pendant 30 s, pipeter l'éluat en évitant de prendre des billes

- Si des billes magnétiques ont été pipetées, centrifuger 5 min à 500 g les tubes contenant l'éluât et transférer le surnageant dans des nouveaux tubes sans prendre les billes magnétiques.

- Une élution avec un volume inférieur au volume recommandé augmente la concentration des ADN ou ARN mais peut augmenter les risques d'inhibition de la PCR.

- Une fois les acides nucléiques des échantillons extraits et purifiés, leur analyse doit s'effectuer immédiatement ou alors ils doivent être stockés à -20°C ± 4 °C.

III.2.2 Précautions d'usage

Vérifier le pH du tampon d'élution (pH 8.5 +/-0.2). Ajuster à l'aide de Chlorure d'Hydrogène HCl dilué si nécessaire.

Conserver la suspension de billes magnétiques à température ambiante et éloignée du portoir magnétique ou de toutes autres sources de champ magnétique.
Une fois la purification effectuée, les puits utilisés peuvent être refermés avec un film adhésif (non fourni).

Pour l'homogénéisation et pour enlever les surnageants et tampons d'élution, utiliser des cônes longs et fins pouvant aller au fond des puits sans occasionner de débordement.

Les cônes utilisés doivent pouvoir être introduits verticalement dans les puits sans toucher les parois.
Régler la pipette multicanaux sur 200. Pour l'homogénéisation, placer les cônes verticalement dans le liquide et pipeter lentement pour éviter les éclaboussures. Les cônes doivent impérativement rester dans le liquide lors de l'homogénéisation pour éviter toutes éclaboussures. Ne pas faire de mousse.

IV. Recommandations et résolution des problèmes

Pour toutes questions techniques, contacter ad Nucléis (voir coordonnées en debut de document).

V. Précautions générales d'emploi

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
Il est recommandé d' utiliser les pipettes entre 35% et 100% de leur volume d'utilisation.
Il est conseillé de tourner 1/3 de tour au-delà du volume désiré puis de retourner la molette dans l'autre sens pour atteindre le volume souhaité (ceci de même en ce qui concerne le volume maximal de la pipette) afin que le ressort de la pipette soit en bonne position.
Lors du pipetage, traverser seulement la surface du liquide de 1 à 6 mm et maintener la pipette vertical.
Il est recommandé d'appliquer une vitesse uniforme et lente lors du prélèvement et du dépôt du liquide.
Distribution sur le côté du puits car les volumes sont petits.
Le pré-rinçage des consommables (2-3 allers-retours) est recommandé afin d'humidifier les cônes avant prélèvement.
Un rythme constant de pipetage, de pression sur le bouton pressoir et une vitesse constante permettent de pipeter

La chaleur transmise par la main a un impact sur l'uniformité des pipetages. Il est recommandé de poser la pipette toutes les 10-15 mins sur support vertical pour reprendre la température ambiante.)
Choisir le consommable le mieux adapté à la pipette.)
Porter des gants non poudrés et une blouse lors de la manipulation des produits, les kits contiennent des produits irritants.
Tous les déchets potentiellement contaminés par un produit enrichi doivent être autoclavés.
Il est recommandé de manipuler les produits microbiologiques vivants sous une hotte de sécurité microbienne.
Toutes les manipulations doivent avoir lieu à une température ambiante inférieure à 25°C
Ne décongeler que les produits nécessaires.
Travailler dans un endroit bien ventilé.
Pour les recommandations spécifiques aux kits, se référer à la notice tecnique du kit cible.
Laver les paillasses et les portoirs avec d'eau de javel et de l'ethanol.
Utiliser des UV pour détruire l'ADN /ARN contaminant (se référer aux recommandations du constructeur).
Contrôle PCR des surfaces de travail par échantillonnage sur écouvillon.
Les échantillons et les consommables permettant l'extraction/purification et l'amplification des acides nucléiques sont éliminés suivant les recommandations de la réglementation sur les DASRI et assimilés.

VI. Bibliographie

DNA/RNA preparation for molecular detection. Thatcher SA. Clin Chem. 2015 Jan;61(1):89-99.