

MANUEL TECHNIQUE

Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit

Mode d'emploi du produit
AS1410

Mise en garde : manipulez les cartouches avec précautions ; les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit

Toute la littérature technique est disponible sur : www.promega.com/protocols/
 Consultez le site Internet pour vérifier que vous utilisez bien la version la plus récente de ce manuel technique.
 Si vous avez des questions concernant l'utilisation de ce système, envoyez un e-mail à Promega Technical Services :
techserv@promega.com

1. Description.....	1
2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles	2
3. Usage prévu du produit.....	5
4. Limites d'utilisation du produit	5
5. Avant de commencer : Préparation de solutions.....	6
6. Purification de l'ARN provenant de sang total frais dans des tubes d'EDTA	6
6.A. Prétraitement des échantillons de sang total	7
6.B. Préparation des cartouches Maxwell [®] CSC RNA Blood	8
7. Fonctionnement de l'appareil.....	10
8. Après la purification	12
9. Dépannage	13
10. Création d'un environnement sans ribonucléase	15
11. Références.....	15
12. Produits apparentés	16
13. Récapitulatif des modifications.....	16

Le Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit n'est disponible que dans certains pays. Ce produit satisfait aux exigences essentielles de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

1. Description

Le Maxwell[®] CSC RNA Blood Kit^(a) est utilisé en association avec les appareils Maxwell[®] spécifiés dans le Tableau 1 pour offrir une méthode facile de purification automatique efficace de l'ARN issu du sang total humain frais (pas congelé) prélevé dans des tubes d'EDTA. Les appareils Maxwell[®] CSC Instrument sont conçus pour être utilisés avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des réactifs supplémentaires fournis dans le kit avec des méthodes de purification préprogrammées, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. Les appareils Maxwell[®] CSC Instrument peuvent traiter d'un au nombre maximum autorisé d'échantillons en 60 minutes environ et l'ARN purifié peut être utilisé directement dans diverses applications en aval fondées sur l'amplification, telles que RT-PCR.

1. Description (suite)

Tableau 1. Appareils pris en charge

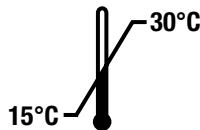
Appareil	Cat.#	Manuel technique
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Le Maxwell® CSC RNA Blood Kit purifie l'ARN à l'aide de particules paramagnétiques, qui fournissent une phase solide mobile pour optimiser le prélèvement d'échantillons, le lavage et la purification de l'ARN. Les appareils Maxwell® CSC Instrument sont des appareils magnétiques de traitement des particules. Ce système permet la fixation efficace de l'ARN aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie et déplace l'échantillon dans les puits de la cartouche. Cette approche de la capture magnétique évite des problèmes courants associés aux systèmes de traitement des liquides, tels que le colmatage des cônes ou des transferts partiels de réactifs, qui entraînent une purification sous-optimale par d'autres systèmes courants.

2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles

PRODUIT	TAILLE	CAT.#
Maxwell® CSC RNA Blood Kit	48 préparations	AS1410


Pour diagnostic in vitro. Usage professionnel uniquement. Suffisant pour 48 isolements automatisés à partir des échantillons de sang. Les cartouches Maxwell® CSC sont à usage unique.





Inclut :


- 48 Cartouches Maxwell® CSC RNA Blood
- 4 × 100 ml Solution A
- 30 ml Solution B
- 20 ml Tampon de lyse
- 2 flacons DNase I (lyophilisé)
- 900 µl 1-Thioglycérol
- 100 µl Blue Dye
- 2 × 1 ml Solution de protéinase K (PK)
- 25 ml Nuclease-Free Water
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 50 Tubes d'élution (0,5 ml)

Conditions de stockage : dès réception, retirez le 1-Thioglycérol et stockez-le entre +2 °C et +10 °C. Stockez les autres composants du kit à température ambiante (15 à 30 °C). Le 1-Thioglycérol peut être stocké à température ambiante (15 à 30 °C), où il est stable jusqu'à 9 mois. Stockez le DNase I réhydraté entre -30 °C et -10 °C. Ne dépassez pas 10 cycles de congélation-décongélation.

 **Informations relatives à la sécurité :** les cartouches contiennent de l'éthanol, qui est inflammable. Le 1-Thioglycérol est toxique. Le thiocyanate de guanidine et l'hydrochlorure de guanidine (composants de la solution B et du tampon de lyse) sont nocifs et irritants. Portez des gants et respectez les procédures de sécurité standard lorsque vous travaillez avec ces substances.

 Les composants du Maxwell® CSC RNA Blood Kit sont conçus pour être utilisés avec des substances potentiellement infectieuses. Les utilisateurs doivent porter des équipements de protection individuelle appropriés (ex : gants, tablier de laboratoire et lunettes) lors de la manipulation de substances infectieuses. Il convient de suivre les directives de l'établissement concernant la manipulation et l'élimination de toute substance infectieuse utilisée en conjonction avec ce système.



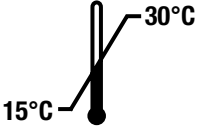













 **Remarque :** l'eau de Javel réagit avec le chlorure d'ammonium et le thiocyanate de guanidine et produit des fumées toxiques. Le chlorure d'ammonium et le thiocyanate de guanidine sont respectivement présents dans la Solution A et la Solution B. Ne décontaminez pas les déchets issus de ce kit à l'eau de Javel.

 **Mise en garde :** manipulez les cartouches et ouvrez le flacon de DNase I lyophilisé avec précautions ; les bords peuvent être coupants.

Informations supplémentaires : les composants du Maxwell® CSC RNA Blood Kit sont homologués et ont passé des tests de contrôle qualité pour fonctionner ensemble. Il n'est pas recommandé de mélanger les composants du kit entre différents lots. Utilisez uniquement les composants fournis dans le kit. Pour plus d'informations relatives à la sécurité, voir la fiche de données de sécurité, disponible à l'adresse suivante : **www.promega.com**

2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles (suite)

Légende des symboles

Symbole	Explication	Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Représentant agréé
	Stocker entre 15 et 30 °C.		Fabricant
	Mise en garde		Irritant
	Cancérogène		Poison
	Corrosif		Contenu suffisant pour « n » tests
	Conformité Européenne		Avertissement. Risque biologique.
	Avertissement. Risque de pincement.		Référence
	Numéro de lot		Ne pas réutiliser

3. Usage prévu du produit

Le Maxwell® CSC RNA Blood Kit est destiné à être utilisé en association avec les appareils Maxwell® CSC Instrument et la méthode de purification Maxwell® CSC RNA Blood, comme dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) pour isoler l'ADN automatiquement à partir de 2,5 ml de sang humain total recueilli dans des tubes d'EDTA avec un taux de leucocytes compris entre 4×10^6 et 10×10^6 par ml. L'ARN purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Maxwell® CSC RNA Blood Kit est destiné à être utilisé avec 2,5 ml de sang humain total. Le Maxwell® CSC RNA Blood Kit est destiné à être utilisé à une température comprise entre 15 et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut produire des résultats sous-optimaux.

Le Maxwell® CSC RNA Blood Kit n'est pas destiné à être utilisé dans le cadre d'un test spécifique de diagnostic.

Le Maxwell® CSC RNA Blood Kit est destiné à un usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide d'ARN purifié avec ce système doivent être interprétés avec d'autres données cliniques ou de laboratoire.

4. Limites d'utilisation du produit

Le Maxwell® CSC RNA Blood Kit est uniquement destiné à être utilisé avec des échantillons de sang humain total recueillis dans des tubes d'EDTA. Il n'est pas destiné à être utilisé avec des échantillons de sang non total, tels que la moelle osseuse ou la couche leucocytaire, des échantillons conservés dans d'autres tubes ou des échantillons conservés dans des conditions contraires aux instructions d'utilisation du produit.

Le Maxwell® CSC RNA Blood Kit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons non humains ni pour la purification de l'ADN.

Les performances du Maxwell® CSC RNA Blood Kit ont été évaluées pour l'isolement de l'ARN à partir de 2,5 ml de sang humain total dans des tubes d'EDTA. Il n'est pas destiné à être utilisé avec des échantillons de plus ou moins de 2,5 ml. Il n'est pas destiné à être utilisé avec du sang total provenant de tubes autres que d'EDTA. Il n'est pas destiné à être utilisé avec des échantillons contenant moins de 4×10^6 leucocytes/ml ou avec des échantillons contenant plus de 10×10^6 leucocytes/ml.

L'utilisateur est tenu de valider la performance des acides nucléiques purifiés dans les applications de diagnostic en aval. Des contrôles appropriés doivent être prévus lors des applications de diagnostic en aval utilisant de l'ARN purifié avec le Maxwell® CSC RNA Blood Kit.

5. Avant de commencer : préparation de solutions

1-Thioglycérol/Solution B

Préparez un mélange de 1-Thioglycérol/Solution B selon l'une des méthodes suivantes :

Ajoutez 600 µl de 1-Thioglycérol au flacon de Solution B et mélangez bien. Le 1-Thioglycérol est visqueux et nécessite un pipetage soigné pour obtenir des mesures précises. Avant de l'utiliser, rafraîchissez le 1-Thioglycérol/Solution B sur de la glace ou entre 2 et 10 °C.

Vous pouvez également préparer de plus petits volumes en ajoutant 20 µl de 1-Thioglycérol par millilitre de Solution B. Préparez 200 µl de 1-Thioglycérol/Solution B rafraîchi par échantillon.

Remarque : stockez le 1-Thioglycérol/Solution B préparé entre 2 et 10 °C, où il est stable jusqu'à 30 jours.

DNase I

Ajoutez 275 µl de Nuclease-Free Water au flacon de DNase I lyophilisé. Retournez pour rincer le DNase I du dessous du bouchon et agitez délicatement pour mélanger. Ne vortexez pas. Ajoutez 25 µl de Blue Dye au DNase I reconstitué comme aide visuelle pour le pipetage et la préparation de la cartouche. Chaque purification nécessite 10 µl de solution de DNase I préparée. Stockez le DNase I reconstitué entre -30 et -10 °C. Ne congelez-décongelez pas plus de dix fois le DNase I reconstitué.



Mise en garde : ouvrez délicatement le flacon de DNase I ; les bords du flacon peuvent être coupants.

6. Purification de l'ARN provenant de sang total frais dans des tubes d'EDTA

Maintenez un environnement sans RNase pendant le traitement. Utilisez toujours des cônes de pipettes résistants à l'aérosol et sans RNase. Changez régulièrement de gants afin de réduire les risques de contamination par la RNase. Voir Section 10, Création d'un environnement sans ribonucléase, pour plus de détails.

Matériel à fournir par l'utilisateur

- sang total dans des tubes d'EDTA (non congelé) ; le sang peut être stocké jusqu'à 3 jours entre 2 et 10 °C avant la purification
- microcentrifugeuse
- pipettes sérologiques 10 ml (stériles)
- pipettes et cônes de pipettes stériles, résistants à l'aérosol et sans RNase
- tubes 15 ml (stériles)
- centrifuger avec un rotor à godets rotatifs

6.A. Prétraitement des échantillons de sang total

1. Transférez 2,5 ml de sang total bien mélangé (non congelé) du tube d'EDTA vers un tube stérile de 15 ml.
2. Ajoutez 7,5 ml de solution A, et retournez le tube 5 à 10 fois pour mélanger. Il s'agit d'une étape de lyse différentielle ; les globules rouges sont lysés, laissant les globules blancs intacts.
3. Incubez les lysats pendant 10 minutes à température ambiante. Deux fois pendant l'incubation, retournez les échantillons comme à l'étape 2 pour mélanger.
4. Centrifugez le ou les tubes à $3\,000 \times g$ pendant 10 minutes dans un rotor à godets rotatifs.
5. Éliminez le surnageant par décantation ou par pipetage. Faites tourner le tube brièvement afin de recueillir le liquide résiduel au fond du tube. Utilisez une pipette pour éliminer autant de surnageant que possible sans altérer l'agglomérat de leucocytes visible.
6. Ajoutez 200 µl de 1-Thioglycérol/Solution B rafraîchi à l'agglomérat et vortexez pour remettre en suspension.
7. Ajoutez 200 µl de tampon de lyse et 25 µl de protéinase K pour remettre l'agglomérat en suspension. Mélangez en vortexant pendant 15 à 20 secondes.

Remarque : si vous devez vous arrêter pendant le prétraitement, les échantillons peuvent être conservés après l'étape 7 jusqu'à 5 jours entre -30 °C et -10 °C . À ces températures de stockage, les échantillons peuvent geler complètement ou non. Lorsque vous êtes prêt à reprendre la purification des échantillons, décongelez les tubes à température ambiante pendant 10 minutes avant de passer à l'étape suivante.

8. Incubez à température ambiante pendant 10 minutes. Pendant ce temps, préparez les cartouches comme indiqué à la Section 6.B.
9. Ajoutez le lysat au puits n°1 de la cartouche Maxwell[®] CSC RNA Blood (le plus grand puits de la cartouche).

6.B. Préparation des cartouches Maxwell® CSC RNA Blood

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches Maxwell® CSC RNA Blood, les plongeurs CSC/RSC et les tubes d'élution. Les cartouches sont installées dans le ou les plateaux en dehors de l'appareil et dans le ou les plateaux contenant les cartouches. Les échantillons sont ensuite transférés dans l'appareil pour être purifiés. Placez chaque cartouche dans le plateau avec le puits n°1 (le plus grand puits de la cartouche) le plus éloigné des tubes d'élution (Figure 2). Appuyez sur la cartouche vers le bas pour bien la mettre en place. Veillez à ce que les deux extrémités de la cartouche soient bien en place dans le plateau. Retirez délicatement le joint afin de retirer tout le joint du haut de la cartouche. Veillez à ce que toute la bande d'étanchéité et tout résidu d'adhésif soient retirés de la cartouche.



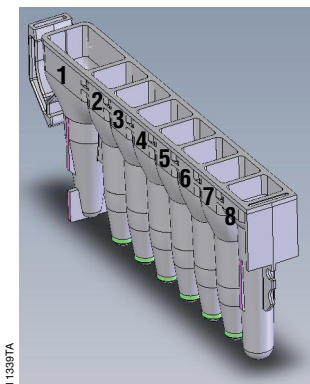
Mise en garde : manipulez les cartouches avec précautions ; les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

2. Placez un plongeur CSC/RSC dans le puits n°8 de chaque cartouche.
3. Placez un tube d'élution vide à la position du tube d'élution pour chaque cartouche dans le ou les plateaux.
Remarque : utilisez uniquement les tubes d'élution fournis dans le Maxwell® CSC RNA Blood Kit. Les autres tubes d'élution ne sont pas forcément compatibles avec les appareils Maxwell® CSC Instrument et peuvent affecter les performances de purification de l'ARN.
4. Ajoutez 50 µl de Nuclease-Free Water au fond de chaque tube d'élution. Les tubes d'élution doivent rester ouverts pendant la purification de l'ARN.
Remarque : utilisez uniquement la Nuclease-Free Water fournie dans le Maxwell® CSC RNA Blood Kit. L'utilisation d'autres tampons d'élution peut affecter les performances de purification de l'ARN ou l'utilisation ultérieure.
5. Ajoutez 10 µl de DNase I reconstitué (bleu) au puits n°4 (jaune) de chaque cartouche. La couleur verte produite est une indication visuelle que la solution de DNase I a été ajoutée au puits n°4.

Notes de préparation des cartouches Maxwell[®] CSC RNA Blood



Les échantillons ou réactifs renversés sur toute partie du plateau doivent être nettoyés avec une solution d'eau et de détergeant, puis une lingette ou un spray bactéricide et enfin de l'eau. N'utilisez de l'eau de Javel sur aucune partie de l'appareil.



Contenu du puits ajouté par l'utilisateur :

1. Échantillon de lysat prétraité
4. 10 µl de DNase I prétraité
8. Plongeur CSC/RSC

Figure 1. Cartouche Maxwell[®] CSC. Le lysat d'échantillon de sang prétraité est ajouté au puits n°1, 10 µl de DNase I sont ajoutés au puits n°4 et un plongeur CSC/RSC est ajouté au puits n°8.



Figure 2. Installation et configuration du plateau. De la Nuclease-Free Water (50 µl) est ajoutée aux tubes d'éluion comme illustré.

7. Fonctionnement de l'appareil

La méthode Maxwell® CSC RNA Blood pour le Maxwell® CSC Instrument peut être téléchargée depuis le site Web Promega : www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod. La méthode Maxwell® CSC RNA Blood pour le Maxwell® CSC 48 Instrument peut être téléchargée depuis le site Web Promega : www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method

Si vous pensez que votre appareil peut être contaminé avec du RNase, nettoyez l'appareil avant de l'utiliser à l'aide d'une solution d'eau et de détergent, telle que Steris LpH®. Respectez les instructions de la section Nettoyage et entretien du manuel d'utilisation Maxwell® CSC Instrument approprié.

1. Démarrez le Maxwell® Instrument et la tablette. Connectez-vous à la tablette et démarrez le logiciel Maxwell® en mode IVD en touchant deux fois l'icône sur le bureau. L'appareil réalise un autotest et place toutes les pièces mobiles en position de repos.
2. Sélectionnez **Démarrer** sur l'écran d'Accueil.
3. Scannez ou saisissez le code barres dans l'angle supérieur droit de l'étiquette du Maxwell® CSC RNA Blood Kit et appuyez sur **OK** pour sélectionner automatiquement la méthode à utiliser (Figure 3).

Remarque : le code barres de méthode du Maxwell® CSC RNA Blood Kit est requis pour la purification de l'ARN sur le Maxwell® CSC Instrument. L'étiquette du kit contient deux codes barres. Le code barres de la méthode est indiqué à la Figure 3. S'il n'est pas possible de scanner le code barres, contactez Promega Technical Services.



Figure 3. Étiquette de kit indiquant le code barres à scanner. Le code barres à scanner pour lancer un cycle de purification est indiqué dans le rectangle rouge en haut à droite de l'étiquette du kit.

4. Sur l'écran « Configuration des cartouches », touchez les positions de cartouches pour sélectionner/désélectionner toute position à utiliser pour ce cycle d'extraction. Entrez toute information de suivi des échantillons requise et appuyez sur le bouton **Poursuivre**.

Remarque : lors de l'utilisation du Maxwell® CSC 48 Instrument, appuyez sur le bouton **Avance** ou **Recul** pour sélectionner ou désélectionner les positions des cartouches sur chaque plateau.

- Une fois la porte ouverte, confirmez que tous les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés. Vérifiez que les échantillons prétraités ont été ajoutés au puits n°1 des cartouches, que les cartouches sont chargées sur l'appareil, que des tubes d'élution débouchés sont présents avec le tampon d'élution et que les plongeurs sont dans le puits n°8. Transférez le ou les plateaux contenant les cartouches préparées sur la plateforme de l'appareil Maxwell®.

Insertion du plateau Maxwell® : tenez le plateau par les côtés pour éviter de déplacer les cartouches. Vérifiez que le plateau est placé dans l'appareil Maxwell® avec les tubes d'élution le plus près de la porte. Inclinez l'arrière du plateau vers le bas et placez-le dans l'appareil de sorte que l'arrière du plateau repose contre l'arrière de la plateforme de l'appareil. Appuyez sur l'avant du plateau vers le bas pour bien installer le plateau sur la plateforme de l'appareil. Si vous avez des difficultés à installer le plateau sur la plateforme, vérifiez l'orientation correcte du plateau. Vérifiez que le plateau est à plat sur la plateforme de l'appareil et bien en place.

Remarque : vérifiez l'identifiant sur les plateaux Maxwell® à 24 positions afin de déterminer s'ils doivent être placés à l'avant ou à l'arrière de l'appareil.

- Confirmez que l'ensemble du prétraitement indiqué a été réalisé et touchez **Démarrer** pour fermer la porte de l'appareil et commencer le traitement.

Remarque : lorsque vous utilisez un appareil Maxwell® à 48 positions, si le système Vision a été activé, les plateaux seront scannés lors du retrait de la porte. Toute erreur de configuration des plateaux (ex : plongeurs pas dans le puits n°8, tubes d'élution absents ou ouverts) entraîne un retour du logiciel à l'écran « Configuration des cartouches » et les positions qui posent problème sont repérées par un point d'exclamation dans un cercle rouge. Touchez le point d'exclamation pour obtenir une description de l'erreur et résoudre tous les états d'erreur. Touchez à nouveau le bouton **Démarrer** pour scanner à nouveau le plateau et lancer le cycle d'extraction.

Avertissement : risque de pincement.

- L'appareil Maxwell® lance immédiatement le cycle de purification. L'écran affiche les étapes réalisées et la durée restante approximative du cycle.

Remarques :

- Le bouton **Annuler** permet de mettre fin au cycle. Tous les échantillons d'un cycle abandonné seront perdus.
- Si le cycle est abandonné avant la fin, il pourra vous être demandé de vérifier si les plongeurs sont encore chargés sur la barre de plongeurs. Si des plongeurs sont présents sur la barre, vous devez réaliser le **Nettoyage** lorsque cela vous est demandé. Si aucun plongeur n'est présent sur la barre, vous pouvez ignorer le **Nettoyage** lorsque cela vous est demandé. Les échantillons seront perdus.

- Une fois le cycle terminé, l'interface utilisateur affiche un message indiquant que la méthode est terminée.

Fin de cycle

- Suivez les instructions à l'écran à la fin de la méthode pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont situés dans le puits n°8 de la cartouche à la fin du cycle. Si les plongeurs ne sont pas retirés de la barre, suivez les instructions du manuel d'utilisation approprié à votre appareil Maxwell® (voir le Tableau 1) pour réaliser une procédure de **Nettoyage** afin d'essayer de décharger les plongeurs.





7. Fonctionnement de l'appareil (suite)

10. Bouchez et retirez les tubes d'élution contenant de l'ARN juste après le cycle pour éviter l'évaporation des éluats. Retirez le ou les plateaux Maxwell® de l'appareil.

Remarque : pour retirer le plateau de la plateforme de l'appareil, tenez-le par les côtés. Les échantillons d'ARN peuvent être conservés la nuit entre -30 °C et -10 °C , ou à moins de -60 °C pour un stockage de plus longue durée.

Assurez-vous que les échantillons sont retirés de l'appareil avant de réaliser un protocole désinfection aux UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques purifiés.



11. Retirez les cartouches et les plongeurs du ou des plateaux Maxwell® et mettez-les au rebut comme déchets dangereux conformément aux procédures de votre établissement. Les cartouches, plongeurs et tubes d'élution sont à usage unique. Ne réutilisez pas les cartouches Maxwell® CSC, les plongeurs CSC/RSC ni les tubes d'élution.

8. Après la purification

Déterminez si l'échantillon d'ARN purifié présente un rendement et une pureté conformes aux exigences de l'essai de diagnostic en aval avant de l'utiliser.

9. Dépannage

Pour les questions qui ne sont pas abordées ici, contactez votre succursale ou distributeur local Promega. Les coordonnées sont disponibles à l'adresse : www.promega.com. E-mail : techserv@promega.com

Symptômes

Concentration d'ARN dans l'éluat inférieure à celle prévue (un échantillon classique devrait produire >50 ng/µl d'ARN purifié.)

Causes possibles et commentaires

Le nombre de leucocytes dans l'échantillon de sang était inférieur ou supérieur à la plage d'utilisation prévue du produit de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml. Le kit est optimisé pour purifier l'ARN des échantillons de sang avec un nombre de leucocytes de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml.

Un volume de sang total incorrect a été utilisé. L'ajout de plus ou moins de 2,5 ml de sang total peut produire un rendement inférieur.

L'échantillon de sang était trop ancien. Les échantillons de sang frais fournissent les meilleurs rendements. Les échantillons stockés entre 2 et 10 °C pendant plus de 3 jours peuvent produire des rendements réduits.

L'échantillon a été stocké à moins de 2 °C ou à plus de 10 °C avant la purification. Des températures de stockage inappropriées peuvent provoquer une dégradation de l'ARN ou la lyse des leucocytes.

Des RNases ont peut-être été introduits pendant le traitement ou la quantification des échantillons. Vous trouverez à la Section 10 des informations sur la création d'un environnement sans ribonucléase.

Élimination inappropriée du surnageant suite à la lyse différentielle. Veillez à éliminer autant de surnageant que possible.

L'agglomérat de leucocytes a été déplacé pendant l'élimination du surnageant. Évitez de toucher l'agglomérat de leucocytes lors de l'élimination du surnageant.

Type d'échantillon incorrect. Ce kit est destiné à être utilisé avec du sang total humain. Les autres types d'échantillons (ex : tels que la moelle osseuse, le plasma, couche leucocytaire, etc.) n'ont pas été testés avec ce kit.

Type de tube de prélèvement de sang incorrect. Ce kit est destiné à être utilisé avec du sang total humain dans des tubes d'EDTA. Les autres types de tubes n'ont pas été testés avec ce kit et ne sont peut-être pas compatibles avec le produit chimique de purification.

9. Dépannage (suite)

Symptômes

ARN de mauvaise qualité
(les éluats doivent présenter un rapport A_{260}/A_{280} supérieur à 1,8 et un rapport A_{260}/A_{230} compris entre 1,8 et 2,4.)

Causes possibles et commentaires

Le nombre de leucocytes dans l'échantillon de sang était supérieur à la plage d'utilisation prévue du produit de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml. Le kit est optimisé pour purifier l'ARN des échantillons de sang avec un nombre de leucocytes de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml.

Un volume de sang total incorrect a été utilisé. L'ajout de plus de 2,5 ml de sang total peut produire un éluat de faible pureté.

L'échantillon de sang était trop ancien. Les échantillons de sang frais fournissent les meilleurs rendements. Les échantillons stockés entre 2 et 10 °C pendant plus de 3 jours peuvent produire un ARN de moins bonne qualité.

L'échantillon a été stocké à moins de 2 °C ou à plus de 10 °C avant la purification. Des températures de stockage inappropriées peuvent provoquer une dégradation de l'ARN ou la lyse des leucocytes.

Élimination inappropriée du surnageant suite à la lyse différentielle. Veillez à éliminer autant de surnageant que possible.

Type d'échantillon incorrect. Ce produit est destiné à être utilisé avec du sang total humain. Les autres types d'échantillons (ex : tels que la moelle osseuse, le plasma, couche leucocytaire, etc.) n'ont pas été testés avec ce produit.

Les niveaux d'ADN présents dans les éluats sont élevés
(les éluats sont contaminés par de l'ADN, qui peut interférer avec les essais en aval).

Le nombre de leucocytes dans l'échantillon de sang est supérieur à la plage d'utilisation prévue du produit de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml.

Un volume de sang total incorrect a été utilisé. L'ajout de plus de 2,5 ml de sang total peut provoquer une contamination de l'ADN dans les éluats.

Il n'a pas été ajouté de DNase I dans la cartouche. Si possible, examinez les puits n°4 dans les cartouches passées. Le puits n°4 devrait paraître vert (pas jaune) si du DNase I a été ajouté aux cartouches à la Section 6.B, étape 5.

Le lysat prétraité est trop visqueux pour être pipeté

Le nombre de leucocytes dans l'échantillon de sang était supérieur à la plage d'utilisation prévue du produit de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml.

Un volume de sang total incorrect a été utilisé. L'ajout de plus de 2,5 ml de sang total peut produire des lysats visqueux et difficiles à pipeter.

10. Création d'un environnement sans ribonucléase

Les ribonucléases sont extrêmement difficiles à inactiver. Veillez à éviter d'introduire une activité RNase dans vos échantillons d'ARN pendant et après l'isolation. C'est particulièrement important si le produit de départ a été difficile à obtenir ou est irremplaçable. Les remarques suivantes peuvent contribuer à éviter une contamination accidentelle de vos échantillons avec du RNase.

1. Deux des principales sources de contamination par RNase sont les mains de l'utilisateur et les bactéries ou les moisissures qui peuvent être présentes sur les particules de poussière en suspension dans l'air. Pour éviter ces sources de contamination, utilisez une technique stérile lors de la manipulation des réactifs fournis avec ce système. Portez des gants en permanence. Changez de gants immédiatement si vous avez pu être en contact avec des ribonucléases.
2. Dès que possible, utilisez des matières plastiques stériles jetables pour manipuler l'ARN. Ces matières sont généralement exemptes de RNase et ne nécessitent pas de prétraitement pour inactiver le RNase.
3. Traitez le verre, le plastique et les chambres d'électrophorèse non stériles avant de les utiliser pour garantir l'absence de RNase. Chauffez le verre à 200 °C pendant la nuit et rincez abondamment les plastiques avec 0,1 N de NaOH, 1 mM d'EDTA puis de l'eau exempte de RNase. Il est également possible d'utiliser des produits d'élimination de RNase du commerce selon les instructions du fabricant.

Remarque : les chambres d'électrophorèse peuvent être contaminées avec des ribonucléases, en particulier le RNase A, issus de l'analyse d'échantillons d'ADN. Dès que possible, mettez de côté un équipement neuf ou décontaminé pour l'analyse de l'ARN uniquement.

4. Traitez les solutions non fournies avec le système en ajoutant du pyrocarbonate de diéthyle (DEPC) à 0,1 %v/v dans une hotte. Laissez incuber une nuit sous agitation et à température ambiante dans la hotte. Passez à l'autoclave pendant 30 minutes pour éliminer toute trace de DEPC.



Mise en garde : le DEPC est un produit cancérigène présumé et ne doit être utilisé que dans une hotte chimique. Le DEPC réagit rapidement avec les amines et ne peut pas être utilisé pour traiter les tampons Tris.

Remarque : pour toutes les applications en aval, il est essentiel de continuer à protéger vos échantillons d'ARN contre les RNases. Portez des gants propres et utilisez des solutions et des tubes centrifuges exemptes de RNase.

11. Références

1. Clinical Laboratory Standards Institute (2007) Handling, transport, and storage of specimens for molecular methods. Ce document est accessible en ligne : www.clsi.org
2. Murray, P.R. *et al.* (2007) *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, ASM Press.

12. Produits apparentés

Instruments et accessoires

Produit	Taille	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 chacun	AS6000
Plateau Maxwell® RSC/CSC	1 chacun	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 chacun	AS8000
Plateau avant Maxwell® RSC/CSC 48	1 chacun	AS8401
Plateau arrière Maxwell® RSC/CSC 48	1 chacun	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1 000/pack	V1231

*Pour diagnostic in vitro. Ce produit n'est disponible que dans certains pays.

Kits de réactifs Maxwell® CSC

Visitez www.promega.com pour une liste des kits de purification Maxwell® CSC disponibles.

13. Récapitulatif des modifications

Les modifications suivantes ont été apportées lors de la révision de ce document datant de mars 2021 :

1. Ajout des instructions d'utilisation du Maxwell® CSC 48 Instrument.
2. Mise à jour de la Section 7.
3. Mise à jour de la Section 12.
4. Mise à jour de la déclaration de brevet.
5. Mise à jour de la page de couverture.

^(a)Numéro de brevet américain 7 329 488 et numéro de brevet coréen 100483684.

© 2014–2021 Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell est une marque déposée de Promega Corporation.

LpH est une marque déposée de Steris Corporation.

Les produits peuvent être couverts par des brevets publiés ou en attente d'approbation ou peuvent présenter certaines limites. Veuillez consulter notre site Web pour plus d'informations.

Tous les prix et spécifications peuvent être modifiés sans préavis.

Les allégations concernant les produits peuvent être modifiées. Veuillez contacter Promega Technical Services ou accéder au catalogue en ligne de Promega pour bénéficier des informations les plus récentes sur les produits Promega.