

MANUEL TECHNIQUE

# Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA FFPE Kit

Mode d'emploi du produit  
**AS1360**

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

# Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA FFPE Kit

Toute la littérature technique est disponible sur : [www.promega.com/protocols/](http://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](mailto:techserv@promega.com)

1. Description.....	1
2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles .....	2
3. Usage prévu du produit.....	4
4. Limites d'utilisation du produit .....	4
5. Avant de commencer .....	5
5.A. Préparation d'échantillons FFPE.....	5
5.B. Préparation des cartouches Maxwell <sup>®</sup> CSC RNA FFPE .....	6
6. Fonctionnement de l'appareil.....	8
7. Après la purification .....	11
8. Dépannage .....	11
9. Création d'un environnement sans ribonucléase .....	13
10. Références.....	13
11. Produits apparentés .....	14
12. Récapitulatif des modifications.....	14

Le Maxwell<sup>®</sup> CSC RNA FFPE 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<sup>®</sup> CSC RNA FFPE Kit<sup>(a)</sup> est utilisé en association avec les appareils Maxwell<sup>®</sup> CSC Instrument spécifiés dans le Tableau 1 pour offrir une méthode facile de purification automatique efficace de l'ARN issu d'échantillons de tissus humains de poitrine, poumon ou côlon fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). Les appareils Maxwell<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> CSC Instrument peuvent traiter d'un au nombre maximum autorisé d'échantillons en 45 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**

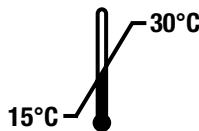
Appareil	Cat.#	Manuel technique
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit purifie l'acide nucléique 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 automatiques courants.

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

PRODUIT	TAILLE	CAT.#
Maxwell® CSC RNA FFPE Kit	48 préparations	AS1360


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





Inclut :

- 25 ml Huile minérale
- 20 ml Tampon de lyse
- 2 × 1 ml Protéinase K
- 100 µl Blue Dye
- 2 × 1 ml MnCl<sub>2</sub>, 0,09 M
- 1 ml Tampon de DNase
- 3 flacons DNase I (lyophilisé)
- 48 Cartouches Maxwell® FFPE
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 50 Tubes d'élution (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

**Conditions de stockage :** stockez le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit à température ambiante (15 à 30 °C). Stockez le DNase I réhydraté entre -10 et -30 °C. Ne congelez-décongelez pas plus de dix fois.



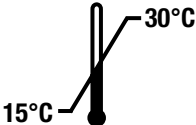











 **Informations relatives à la sécurité :** les cartouches contiennent de l'éthanol et de l'isopropanol. Ces substances doivent être considérées comme inflammables, nocives et irritantes.

 Les composants du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit sont conçus pour être utilisés avec des substances potentiellement infectieuses. Portez des équipements de protection individuelle appropriés (ex : gants et lunettes) lors de la manipulation de substances infectieuses. Suivez les directives de votre établissement concernant la manipulation et l'élimination de toute substance infectieuse utilisée en conjonction avec ce système.

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

**Informations supplémentaires :** les composants du Maxwell® CSC RNA FFPE 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.

### 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		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 FFPE Kit est conçu pour être utilisé en conjonction avec les appareils Maxwell® CSC Instrument et la méthode de purification Maxwell® CSC RNA FFPE comme dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) pour isoler l'ARN automatiquement à partir d'échantillons de tissus humains de poitrine, poumon ou côlon fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). L'ARN purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Maxwell® CSC RNA FFPE 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.

Les échantillons FFPE préparés à l'aide de formaline neutre à 10 % peuvent être utilisés avec le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit.

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

Le Maxwell® CSC RNA FFPE 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 FFPE Kit est uniquement destiné à être utilisé avec des échantillons FFPE recueillis à partir de tissus humains de poitrine, poumon ou côlon. Il n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non FFPE, tels que les échantillons de tissus frais ou congelés, ni avec des échantillons de tissus FFPE recueillis à partir d'autres tissus que des tissus humains de poitrine, poumon ou côlon. Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit n'est pas conçu pour être utilisé avec d'autres types d'échantillons, notamment de tissus non humains, ou pour la purification de l'ADN.


Le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus qui ont été préparés avec d'autres fixatifs que la formaline neutre à 10 %.

Les performances du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit ont été évaluées en isolant l'ARN des échantillons de tissus FFPE de taille comprise entre 0,1 et 2,0 mm<sup>3</sup>. Il ne doit pas être utilisé avec des échantillons de taille supérieure ni inférieure.

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 FFPE Kit.

## 5. Avant de commencer

### Matériel à fournir par l'utilisateur

- microcentrifugeuse
- pipettes et cônes de pipettes pour le prétraitement d'échantillons et leur transfert dans des cartouches de réactifs préremplies
- tubes de 1,5 à 2,0 ml pour l'incubation des échantillons (ex : microtubes, 1,5 ml; Cat.# V1231)
- blocs chauffants réglés à 56 °C et à 80 °C
- échantillons FFPE avec un volume total de tissus compris entre 0,1 et 2,0 mm<sup>3</sup> ; l'épaisseur de la section ne doit pas dépasser 5 µm (**Remarque** : les échantillons doivent être stockés à température ambiante [15 à 30 °C].)
-  • lames de rasoir (**Remarque** : soyez prudent lors de l'utilisation de lames de rasoir pour racler l'échantillon sur la glissière.)

Si nécessaire, reconstituez un flacon lyophilisé de DNase I avec 275 µl de Nuclease-Free Water. Retournez le flacon pour rincer le DNase I du dessous du bouchon et agitez délicatement pour mélanger. Ne vortexez pas.

### 5.A. Préparation d'échantillons FFPE

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 9, Création d'un environnement sans ribonucléase, pour plus de détails.

### Prétraitement des échantillons de section

1. Placez la section dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml. Si vous utilisez des sections de tissus montées sur glissière, raclez la section de la glissière à l'aide d'une lame de rasoir propre.
2. Ajoutez 300 µl d'huile minérale aux tubes d'échantillon. Vortexez pendant 10 secondes.
3. Chauffez les échantillons à 80 °C pendant 2 minutes. Placez les échantillons à température ambiante pendant la préparation du master mix.
4. Préparez un master mix de tampon de lyse, de Protéinase K et de Blue Dye comme illustré ci-dessous :

Réactif	Quantité/Réaction	Réactions (Nombre à réaliser + 1)	Total
Tampon de lyse	224 µl	n + 1	224 µl × (n + 1)
Protéinase K	25 µl	n + 1	25 µl × (n + 1)
Blue Dye	1 µl	n + 1	1 µl × (n + 1)

5. Ajoutez 250 µl de master mix à chaque tube d'échantillon et vortexez pendant 5 secondes.
6. Centrifugez les tubes d'échantillon à 10 000 × g pendant 20 secondes pour séparer les couches. Si un agglomérat est présent dans la couche aqueuse (couche bleue inférieure), mélangez délicatement pour disperser cet agglomérat. Laissez les deux phases dans le tube.

### 5.A. Préparation d'échantillons FFPE (suite)

7. Transférez les tubes d'échantillon vers un bloc chauffant à 56 °C et laissez incuber pendant 15 minutes.
8. Transférez les tubes d'échantillon vers un bloc chauffant à 80 °C et laissez incuber pendant 1 heure.
9. Retirez les tubes d'échantillon du bloc chauffant et laissez les échantillons redescendre à température ambiante pendant 15 minutes. Pendant que les échantillons refroidissent, préparez le cocktail de DNase comme indiqué à l'étape 10.
10. Préparez un cocktail de MnCl<sub>2</sub>, de tampon de DNase et de DNase I dans l'ordre illustré ci-dessous :

Réactif <sup>1</sup>	Quantité/Réaction	Réactions (Nombre à réaliser + 1)	Total
MnCl <sub>2</sub> , 0,09 M	26 µl	n + 1	26 µl × (n + 1)
Tampon de DNase <sup>2</sup>	14 µl	n + 1	14 µl × (n + 1)
DNase I <sup>3</sup>	10 µl	n + 1	10 µl × (n + 1)

<sup>1</sup>Si les réactifs du cocktail de DNase sont ajoutés individuellement aux tubes d'échantillon, veillez à bien les ajouter dans l'ordre indiqué ci-dessus. Incorporez chaque réactif en pipetant soigneusement avant d'ajouter le réactif suivant.

<sup>2</sup>Stockez le tampon de DNase entre 15 et 30 °C ; il peut se précipiter s'il est stocké à des températures inférieures. Si le tampon contient du précipité, résolubilisez le précipité en chauffant à 56 °C pendant 2 minutes puis en vortexant brièvement pour mélanger.

<sup>3</sup>Stockez le DNase I reconstitué restant entre -30 et -10 °C.

11. Ajoutez 50 µl de cocktail de DNase à la phase aqueuse bleue de chaque tube d'échantillon. Mélangez en pipetant 10 fois.
12. Incubez les tubes d'échantillon pendant 15 minutes à température ambiante (15 à 30 °C). Pendant cette incubation, préparez les cartouches comme indiqué à la Section 5.B.
13. Centrifugez les tubes d'échantillon à pleine vitesse dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes.
14. Transférez immédiatement la phase aqueuse bleue dans le puits n°1 d'une cartouche Maxwell® CSC RNA FFPE.

## 5.B. Préparation des cartouches Maxwell® CSC RNA FFPE

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches Maxwell® FFPE, 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 alors 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 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 FFPE Kit. Les autres tubes d'élu­tion ne sont pas forcément compatibles avec le Maxwell® CSC Instrument et peuvent affecter les performances de purification de l'ARN.

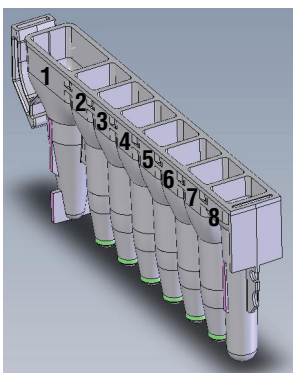
4. Ajoutez 50 µl de Nuclease-Free Water au fond de chaque tube d'élu­tion. Les tubes d'élu­tion doivent rester ouverts pendant la purification de l'ARN.

**Remarque :** utilisez uniquement la Nuclease-Free Water fournie dans le Maxwell® CSC RNA FFPE Kit. L'utilisation d'autres tampons d'élu­tion peut affecter les performances de purification de l'ARN ou l'utilisation ultérieure.

### Notes de préparation des cartouches Maxwell® CSC RNA FFPE



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. Échantillons prétraités
8. Plongeur CSC/RSC

**Figure 1. Cartouche Maxwell® CSC.** L'échantillon FFPE prétraité est ajouté au puits n°1 et un plongeur est ajouté au puits n°8.

## 5.B. Préparation des cartouches Maxwell® CSC RNA FFPE (suite)



**Figure 2. Installation et configuration du plateau.** De la Nuclease-Free Water est ajoutée aux tubes d'éluion comme indiqué.

## 6. Fonctionnement de l'appareil

La méthode Maxwell® CSC RNA FFPE pour le Maxwell® CSC Instrument peut être téléchargée depuis le site Web Promega : [www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod](http://www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod). La méthode Maxwell® CSC RNA FFPE pour le Maxwell® CSC 48 Instrument peut être téléchargée depuis le site Web Promega : [www.promega.com/resources/tools/maxwellcsc48method](http://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 du Maxwell® CSC Instrument #TM457* ou du *manuel d'utilisation du Maxwell® CSC 48 Instrument #TM623*.

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 FFPE Kit et appuyez sur **OK** pour sélectionner automatiquement la méthode à utiliser (Figure 3).

**Remarque :** le code barres de méthode du Maxwell® CSC RNA FFPE Kit est requis pour la purification de l'ARN sur les appareils 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**.
5. 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'éluion débouchés sont présents avec le tampon d'éluion et que les plongeurs sont dans le puits n°8. Transférez le plateau 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'éluion 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.

## 6. Fonctionnement de l'appareil (suite)

6. Confirmez que l'ensemble du prétraitement indiqué a été réalisé et touchez **Démarrer** pour fermer la porte de l'appareil et lancer 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.

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

### Remarques :

1. Le bouton **Annuler** permet de mettre fin au cycle. Tous les échantillons d'un cycle abandonné seront perdus.
  2. 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.
8. Une fois le cycle terminé, l'interface utilisateur affiche un message indiquant que la méthode est terminée.

### Fin de cycle

9. 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.
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. Vérifiez que les échantillons sont retirés de l'appareil avant de réaliser un protocole désinfection aux UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques purifiés. 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.



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.

## 7. 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. Les performances du kit ont été évaluées en fonction de la purification de l'ARN amplifiable. Les autres moyens de quantification, y compris l'absorbance ou la fixation du colorant fluorescent, peuvent ne pas être corrélés avec l'amplification (1). Les valeurs d'absorbance pour les échantillons FFPE peuvent surestimer le rendement. Nous recommandons d'utiliser des méthodes plus spécifiques pour déterminer le rendement (1).

## 8. 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](http://www.promega.com). E-mail : [techserv@promega.com](mailto:techserv@promega.com)

### Symptômes

Concentration d'ARN plus basse que prévu dans l'éluat  
(une section FFPE typique devrait produire de l'ARN amplifiable en fonction de la taille des tissus, de la cellularité, de la condition de fixation de la formaline et de la manipulation.)

### Causes possibles et commentaires

Les performances du kit ont été évaluées en isolant l'ARN d'échantillons de tissus FFPE de taille comprise entre 0,1 mm<sup>3</sup> et 2,0 mm<sup>3</sup>. Le kit ne doit pas être utilisé avec des échantillons de taille supérieure ni inférieure. Utilisez des sections sur cette plage.

Le kit a été conçu pour être utilisé avec des échantillons FFPE recueillis à partir de tissus humains de poitrine, poumon ou côlon. Il n'a pas été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non FFPE, tels que les échantillons de tissus frais ou congelés, ni avec des échantillons de tissus FFPE recueillis à partir d'autres tissus que des tissus humains de poitrine, poumon ou côlon. Les durées et températures d'incubation ont été testées pour la poitrine, les poumons et le côlon humains uniquement. Utilisez des tissus de poitrine, poumon et côlon humains uniquement.

Le kit n'a pas été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus qui ont été préparés avec d'autres fixatifs que la formaline neutre à 10 %. Confirmez qu'aucun autre fixatif n'a été utilisé.

Des RNases ont peut-être été introduits pendant le traitement ou la quantification des échantillons. Vous trouverez à la Section 9 des informations sur la création d'un environnement sans ribonucléase.

Les tissus utilisés provenaient d'une section ou glissière souillée. Nous n'accordons aucune garantie pour les sections ou glissières souillées. Réalisez à nouveau la purification avec une section ou glissière non souillée.

## 8. Dépannage (suite)

### Symptômes

### Causes possibles et commentaires

Concentration d'ARN plus basse que prévu dans l'éluat (une section FFPE typique devrait produire de l'ARN amplifiable en fonction de la taille des tissus, de la cellularité, de la condition de fixation de la formaline et de la manipulation.) (suite)

Les performances du kit ont été évaluées en fonction de la purification de l'ARN amplifiable. Les autres moyens de quantification, y compris l'absorbance ou la fixation du colorant fluorescent, peuvent ne pas être corrélés avec l'amplification. Utilisez une méthode de quantification de l'amplification pour évaluer le rendement.

Qualité plus basse que prévu (l'éluat contient de l'ARN hautement fragmenté ou des inhibiteurs des essais ultérieurs).

La fixation de formaline et l'inversion de la réticulation associée fragmentent l'ARN. Si l'ARN est fragmenté avant l'extraction/purification, l'ARN fragmenté sera purifié avec ce kit. Recommencez avec une section adjacente pour évaluer s'il y a un problème avec la section sélectionnée ou avec le processus.

Certains essais d'amplification sont particulièrement sensibles à la présence d'inhibiteurs. Les contrôles ultérieurs devraient identifier la présence d'un inhibiteur de l'amplification dans l'éluat. L'utilisateur doit vérifier la compatibilité de ce produit avec tous les essais ultérieurs.

ADN présent dans les éluats (les éluats sont contaminés avec de l'ADN, ce qui affecter les essais ultérieurs.)

Le cocktail de DNase ajouté à l'échantillon présente une activité DNase excessive lorsqu'il est utilisé avec des échantillons de tissus FFPE de taille comprise entre 0,1 mm<sup>3</sup> et 2,0 mm<sup>3</sup>. Il n'a pas été conçu pour des échantillons de taille supérieure ou inférieure et n'est peut-être pas optimal. Utilisez des sections sur cette plage.

Un mélange insuffisant du cocktail de DNase dans l'échantillon pendant le prétraitement peut entraîner une dégradation incomplète de l'ADN. Veillez à bien mélanger le cocktail de DNase dans l'échantillon.

Si les composants du cocktail de DNase sont ajoutés à l'échantillon séparément, veillez à les ajouter dans l'ordre indiqué à la Section 5.A, étape 10. Par ailleurs, veillez à bien mélanger chaque composant lors de son ajout. L'ajout de composants dans un autre ordre ou un mélange incomplet peut inactiver le DNase.

## 9. 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. Ceci est particulièrement important si le produit de départ n'est disponible qu'en quantité limitée. 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 aseptique 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 et le plastique 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.
4. Traitez les solutions non fournies avec le système en ajoutant du pyrocarbonate de diéthyle (DEPC) à 0,1 % 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.

## 10. Références

1. Bonin, S. *et al.* (2010) Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* 457, 309–17.

## 11. Produits apparentés

### Instruments et accessoires

Produit	Taille	Cat.#
Maxwell <sup>®</sup> CSC Instrument*	1 chacun	AS6000
Plateau Maxwell <sup>®</sup> RSC/CSC	1 chacun	SP6019
Maxwell <sup>®</sup> CSC 48 Instrument*	1 chacun	AS8000
Plateau avant Maxwell <sup>®</sup> RSC/CSC 48	1 chacun	AS8401
Plateau arrière Maxwell <sup>®</sup> 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<sup>®</sup> CSC

Visitez [www.promega.com](http://www.promega.com) pour une liste des kits de purification Maxwell<sup>®</sup> CSC disponibles.

## 12. 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<sup>®</sup> CSC 48 Instrument.
2. Mise à jour de la Section 6.
3. Nouvelle numérotation des Sections 9–12.
4. Mise à jour de la Section 11.
5. Ajout d'un avis de non-responsabilité.
6. Mise à jour de la page de couverture.

<sup>(a)</sup>Numéro de brevet américain 7 329 488 et numéro de brevet coréen 10-0483684.

© 2013–2021 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.