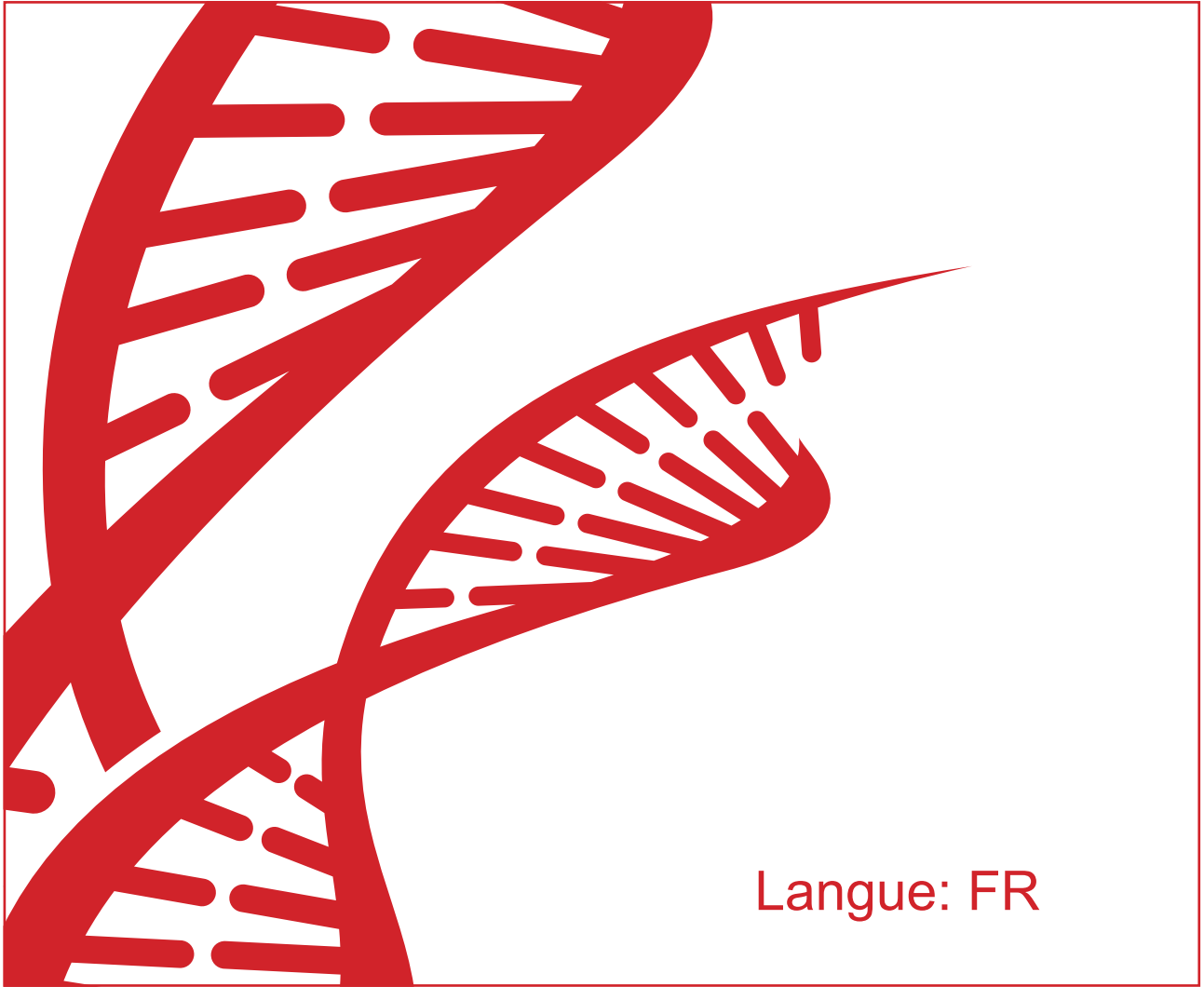


Instructions d'utilisation Invisorb® Spin Universal Kit



REF 1050100200
1050100300



50 préparations
250 préparations



Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin
Allemagne

INVITEK
Molecular

Remarques importantes :

Merci d'avoir acheté le dispositif médical **Invisorb® Spin Universal Kit** de la société Invitek Molecular.

Ce produit est conçu pour procéder à l'isolation manuelle d'acides nucléiques (ADN génomique, ADN bactérien, ADN/ARN viral) à partir d'une grande diversité d'échantillons cliniques en utilisant la technologie des colonnes de centrifugation.

AVERTISSEMENT ! Une manipulation incorrecte et une utilisation non conforme à l'usage prévu peuvent engendrer des risques et des dommages. Nous vous demandons par conséquent de bien vouloir lire le présent mode d'emploi dans son intégralité, et de l'appliquer scrupuleusement. Veuillez toujours le conserver à portée de la main. Afin d'éviter des dommages corporels, veuillez également respecter les consignes de sécurité.

Vous trouverez toutes les versions du mode d'emploi sur notre site Internet à des fins de téléchargement ou vous pouvez demander à les obtenir de notre part à l'adresse Internet suivante : www.invitek-molecular.com

Contact :

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (Allemagne)

+ 49 30 9489 2908

www.invitek-molecular.com

Assistance technique :

techsupport@invitek-molecular.com

© 2022 Invitek Molecular, tous droits réservés

Le kit est conforme au RÈGLEMENT (UE) 2017/746 sur les dispositifs médicaux diagnostics in vitro. Mais le kit n'est pas destiné à une utilisation de diagnostic in vitro dans les pays où le RÈGLEMENT (UE) 2017/746 sur les dispositifs médicaux diagnostics in vitro n'est pas reconnu.

Marque déposées : Invisorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. Même si elles ne sont pas spécialement désignées comme telles, les marques enregistrées, les marques déposées, etc. utilisées dans le présent document ne doivent pas être considérées comme étant non protégées par la loi.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® sont des marques enregistrées de la société Invitek Molecular GmbH.

Sommaire

1.	Consignes de sécurité	3
2.	Informations sur le produit	4
2.1	Contenu du kit	4
2.2	Réactifs et équipements devant être fournis par l'utilisateur	5
2.3	Entreposage, apparence et durée de vie	5
2.4	Utilisation prévue	6
2.5	Informations sur le produit et spécifications	6
2.6	Principe et procédure	7
3.	Extraction d'acide nucléique effectuée au moyen du dispositif médical Invisorb® Spin Universal Kit	8
3.1	Avant de lancer un protocole	8
3.2	Échantillonnage et entreposage de matières premières	9
3.3	Préparation de matières premières	11
3.3.1	Sérum, plasma et autres liquides corporels exempts de cellules	11
3.3.2	Sang	11
3.3.3	Écouvillons	11
3.3.4	Échantillons de selles (surnageant)	11
3.3.5	Bactéries cultivées	12
3.3.6	Urine	12
3.3.7	Sécrétions trachéales, LBA, crachats	12
3.3.8	Biopsies de tissus	13
3.3.9	Surnageants de cultures cellulaires	13
3.4	Protocole court Invisorb® Spin Universal Kit	14
3.5	Protocole : Isolation simultanée de l'intégralité des acides nucléiques (ADN et ARN) à partir de tous les échantillons liquides	15
4.	Annexe	17
4.1	Résolution de problèmes	17
4.2	Garantie	18
4.3	Symboles utilisés sur les produits et étiquetage	18
4.4	Documents et informations supplémentaires	19
4.5	Informations sur les commandes	19

1. Consignes de sécurité

Veillez à ce que toute personne qui utilise ce produit ait pris connaissance des instructions portant sur les pratiques de sécurité générales applicables aux laboratoires et des informations de sécurité contenues dans le présent document.

- Lorsque et pendant que vous travaillez avec des produits chimiques, vous devez toujours porter des vêtements de protection, des gants jetables et des lunettes de sécurité.
- Changez toujours les pointes de pipettes entre les transferts de liquides. En vue d'éviter une contamination croisée, nous recommandons d'utiliser des embouts de filtres.
- Ne réutilisez pas des consommables.
- Jetez les gants si ceux-ci sont contaminés.
- Ne combinez pas les composants de différents kits, à moins que les numéros de lots soient identiques.
- Évitez une contamination microbienne des réactifs de kit.
- Afin de diminuer le risque d'infections émanant de matériels potentiellement infectieux, nous recommandons de travailler sous un caisson d'air laminaire jusqu'à ce que les échantillons soient lysés.

Avant de manipuler des produits chimiques, veuillez lire et comprendre l'intégralité des fiches de données de sécurité applicables (MSDS). Celles-ci sont disponibles en ligne à l'adresse Internet suivante : www.invitek-molecular.com.

Pour ce qui concerne l'élimination de résidus de kits et de déchets liquides conformément aux règlements/réglementations de votre pays, veuillez également vous reporter aux MSDS. La société Invitek Molecular n'a pas testé les déchets liquides générés par le kit quant à la présence de matériels infectieux résiduels. La contamination de déchets liquides par des matériels infectieux résiduels est hautement improbable, mais ne peut être entièrement exclue. Par conséquent, les déchets liquides doivent être considérés comme étant infectieux, et doivent être manipulés et éliminés conformément aux règlements/réglementations de sécurité locaux.

Les normes relatives aux risques et à la sécurité de la Communauté européenne applicables aux composants du dispositif médical **Invisorb® Spin Universal Mini Kit** auquel elles s'appliquent sont énumérées ci-dessous :

Proteinase K



Danger

H315-H319-H334-H335-P280-P305+P351+P338

Lysis Buffer HLT



Avertissement

H302-H315-H319-P280-P305+P351+P338

H302 : Nocif en cas d'ingestion.

H315 : Provoque une irritation cutanée.

H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

H334 : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.

H335 : Peut irriter les voies respiratoires.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

On peut obtenir des informations médicales d'urgence 24 h/24 auprès d'infotrac,
www.infotrac.net:

en dehors des États-Unis : 1 – 352 – 323 – 3500

aux États-Unis : 1 – 800 – 535 – 5053

2. Informations sur le produit

2.1 Contenu du kit

	50 purifications	250 purifications
N° de catalogue	1050100200	1050100300
Lysis Buffer HLT	15 ml/bouteille	60 ml/bouteille
Proteinase K	1 flacon pour 1,1 ml de solution de travail	3 flacons pour 3 x 2 ml de solution de travail
Carrier RNA	1 flacon pour 1,2 ml de solution de travail	3 flacons pour 3 x 2 ml de solution de travail
RNase Free Water	2 x 2 ml/flacon	15 ml/bouteille
Binding Solution (remplir avec de l'isopropanol à 99,7%)	bouteille vide (volume final 15 ml)	bouteille vide (volume final 80 ml)
Wash Buffer HLT	30 ml/bouteille (volume final 50 ml)	105 ml/bouteille (volume final 175 ml)
Wash Buffer	2 x 18 ml/bouteille (volume final 2 x 60 ml)	2 x 60 ml/bouteille (volume final 2 x 200 ml)
Elution Buffer M	30 ml/bouteille	120 ml/bouteille
RTA Spin Filter Set	50 unités	5 x 50 unités
RTA Receiver Tubes	2 x 50 unités	10 x 50 unités
1.5 ml Receiver Tubes	50 unités	5 x 50 unités
2.0 ml Safe-Lock-Tubes	50 unités	5 x 50 unités
Short Protocol	1 dépliant	1 dépliant

2.2 Réactifs et équipements devant être fournis par l'utilisateur

Équipement de laboratoire

- Microcentrifugeuse (*tous les protocoles ont été validés avec a_Centrifuge 5415 D Eppendorf*)
- Centrifugeuse disponible en option pour 15 ou 50 ml
- Thermo-shaker (37° C-95° C)
- Éprouvette graduée (250 ml)
- Gants jetables
- Pipettes et pointes de pipettes
- Mélangeur vortex
- Tubes de réaction (1,5 ml, 2,0 ml)

Liquides et solvants :

- DNase/RNase free water [eau exempte de DNase/RNase] ou 1 x une PBS [solution saline tamponnée au phosphate] pour ajuster le volume d'échantillons
- Éthanol 96%-100% (non dénaturé)
- Isopropanol*
- Disponible en option (pour des échantillons respiratoires présentant une viscosité élevée) : solution d'acétylcystéine saturée (ACC) (200 mg/ml)
- Disponible en option : Lysozyme (10 mg/ml)

* Le kit est validé avec 2-Propanol ; Rotipuran® > 99,7%, p.a. [pour analyse], ACS, ISO (N° de commande 6752) de Carl Roth

* Fournisseurs possibles pour l'isopropanol :

Carl Roth 2-Propanol Rotipuran® > 99,7%, p.a., ACS, ISO N° de commande 6752	Applichem 2-Propanol conçu pour la biologie moléculaire N° de commande A3928	Sigma 2-Propanol N° de commande 59304- 1L-F
---	--	---

2.3 Entreposage, apparence et durée de vie

Durée de vie : l'ensemble des tampons et des composants du kit doivent être entreposés à température ambiante, leur durée de vie étant indiquée sur l'étiquette extérieure de l'emballage du kit.

Après l'ouverture, les composants individuels du kit ainsi que les composants préparés de manière correspondante avant la première utilisation ont une durée de vie de 3 mois.

Avant chaque utilisation, veillez à ce que l'intégralité des composants soit à température ambiante. Si les solutions contiennent des précipités liés à la température, veuillez les dissoudre en les faisant chauffer avec précaution (jusqu'à 30° C).

La température ambiante (TA) se situe dans une fourchette de 15° C à 30° C.

Wash Buffer : après avoir ajouté de l'éthanol, il faut le fermer hermétiquement et l'entreposer à température ambiante.

Wash Buffer HLT et Binding Solution : après avoir ajouté de l'isopropanol, il faut les fermer hermétiquement et les entreposer à température ambiante.

Carrier RNA : une fois qu'il a été dissout dans de la DNase/RNase free water, le Carrier RNA doit être entreposé à -20° C.

Proteinase K : une fois qu'elle a été dissoute dans de la DNase/RNase free water, la Proteinase K peut être entreposée à des températures situées entre 2° et 8° C, et ce jusqu'à deux mois. Pour un entreposage prolongé, maintenir à -20° C ; procéder à uniquement un seul cycle de gel-dégel.

2.4 Utilisation prévue

Le dispositif médical **Invisorb® Spin Universal Kit** est un kit d'extraction d'acides nucléiques qui se base sur la technologie des colonnes de centrifugation, et qui est conçu pour simultanément isoler et purifier de l'ADN génomique, de l'ADN bactérien et de l'ADN/ARN viral.

Le kit peut être utilisé pour une grande variété de types d'échantillons humains, comme du sang entier veineux frais ou congelé rendu anticoagulant au moyen d'EDTA [acide éthylène diamine tétra-acétique] ou de citrate ou les préparations de plasma respectives, du sérum, du liquide rincé provenant d'écouvillons, de crachats pré-traités, de lavage broncho-alvéolaire (LBA), sécrétion trachéale, bactéries cultivées, surnageant de suspension de selles, liquide céphalo-rachidien, surnageants de culture cellulaire, matériel/tissu de biopsie, urine et autres fluides corporels exempts de cellules.

Le produit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de sang héparinés. Le produit est conçu pour être uniquement utilisé par des professionnels, comme des techniciens de laboratoire, des médecins et des biologistes formés aux techniques de biologie moléculaire et aux procédures de diagnostic *in vitro*.

2.5 Informations sur le produit et spécifications

Matière première	Rendement	Qualité	Durée
<p>Jusqu'à 200 µl</p> <ul style="list-style-type: none">• sérum, plasma, autres liquides corporels exempts de cellules, urine• écouvillons (secs, stabilisés)• surnageant provenant de suspension de selles• bactéries cultivées• sécrétions trachéales, LBA, crachats• surnageant de cultures cellulaires <p>Jusqu'à 100 µl :</p> <ul style="list-style-type: none">• du sang frais ou congelé (stabilisé avec EDTA/citrate, mais <u>pas</u> par de l'héparine) <p>Jusqu'à 10 mg d'échantillons de tissus</p>	<p>En fonction de l'échantillon (entreposage et source)</p> <p>Sang entier : en moyenne 1 µg d'ADN</p>	<p>ADN génomique provenant de sang : A₂₆₀ : A₂₈₀ 1,8-2,1</p> <p>Autres types d'échantillons : en fonction du type d'échantillons, des acides nucléiques cibles</p>	<p>Approx. 30 minutes pour 12 échantillons (hors lyse)</p>

Le rendement et la qualité d'acides nucléiques purifiés dépendent du type d'échantillons ainsi que de la source, du transport, de l'entreposage et de l'âge des échantillons et du titre de virus, et pour des échantillons de sang, ils dépendent également du nombre de leucocytes.

Pour déterminer le rendement, veuillez tenir compte du fait que les acides nucléiques purifiés

avec ce kit contiennent du Carrier DNA (5 µg par 200 µl d'échantillon), ceci représentant la plus grande part d'acides nucléiques présents dans l'éluat. En particulier, les acides nucléiques viraux provenant de matériels d'échantillons biologiques présentent généralement une très faible concentration, ce qui par conséquent rend presque impossible de les quantifier par photométrie. Pour la détermination du rendement, on recommande la technique RT-PCR [transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase] quantitative.

Le dispositif médical **Invisorb® Spin Universal Kit** propose une procédure efficace pour isoler des acides nucléiques de grande qualité. Le kit est conçu pour isoler simultanément de l'ADN/ARN viral, de l'ADN bactérien et de l'ADN génomique via un protocole de colonnes de centrifugation lyser-liser-laver-éluer.

Le kit est validé pour des nombres de leucocytes de 3×10^6 - 1×10^7 cellules/ml. Des nombres de cellules très élevés peuvent entraîner l'engorgement du RTA Spin Filter, et ainsi des effets indésirables impactant le processus de purification. On recommande par conséquent de considérer dans le cadre de la mise en œuvre de votre protocole de diagnostic *in vitro* le volume entrant d'échantillons comme un paramètre. Il faut, le cas échéant, diluer au préalable les échantillons avec une PBS ou de la DNase/RNase free water avant de lancer le processus d'isolation et de purification.

Applications en aval :

En général, le rendement et la qualité des acides nucléiques isolés peuvent être utilisés pour de nombreuses applications moléculaires et de diagnostic, comme les techniques PCR, NGS [séquençage de la prochaine génération], des méthodes d'hybridation et le typage HLA [antigènes de leucocytes humains]. Les applications en aval doivent être effectuées conformément aux spécifications respectives des fabricants.

2.6 Principe et procédure

1. Échantillons de lyse

Les échantillons sont lysés à des températures élevées. La lyse est effectuée en présence du Lysis Buffer HLT, de Proteinase K et, en option, de la Lysozyme en vue de briser les parois des cellules bactériennes et de digérer les protéines.

L'ajout de Carrier RNA est requis pour l'amélioration et la stabilisation de la récupération d'ADN/ARN viral et pour purifier de très petites quantités d'acides nucléiques viraux.

2. Liaison d'acides nucléiques

En ajoutant une **Binding Solution** au lysat, on adapte des conditions de liaison optimales. Chaque lysat est ensuite appliqué à un RTA Spin Filter, et les acides nucléiques sont absorbés par la membrane.

3. Lavage destiné à éliminer des contaminations résiduelles

On élimine les contaminants de manière efficace en utilisant un Wash Buffer HLT et un Wash Buffer pendant que les acides nucléiques restent attachés à la membrane.

4. Éluer les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont élués du RTA Spin Filter en utilisant un Elution Buffer M 100-200 µl.

3. Extraction d'acide nucléique effectuée au moyen du dispositif médical Invisorb® Spin Universal Kit

3.1 Avant de lancer un protocole

Lorsque vous utilisez le kit pour la première fois, veuillez vous assurer que l'ensemble des tampons et des réactifs soient préparés ainsi que cela est indiqué :

Préparations de tampons avant la première utilisation : 50 préparations
<p>Carrier RNA : Remettez le Carrier RNA lyophilisé en suspension en ajoutant 1,2 ml de DNase/RNase free water au flacon, et mélangez soigneusement jusqu'à ce qu'il soit entièrement dissout (au moins 1 minute).</p> <p>Proteinase K : Remettez la Proteinase K lyophilisée en suspension en ajoutant 1,1 ml de DNase/RNase free water au flacon, et mélangez soigneusement jusqu'à ce qu'elle soit entièrement dissoute.</p> <p>Binding Solution (bouteille vide) : Remplissez 15 ml d'isopropanol à 99,7% (qualité de biologie moléculaire) dans la bouteille, et veillez à ce que la bouteille soit toujours bien fermée.</p> <p>Wash Buffer HLT : Ajoutez 20 ml d'isopropanol à 99,7% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.</p> <p>Wash Buffer : Ajoutez 42 ml d'éthanol à 96-100% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.</p>
Préparations de tampons avant la première utilisation : 250 préparations
<p>Carrier RNA : Remettez le Carrier RNA lyophilisé en suspension en ajoutant 1 ml de DNase/RNase free water au flacon, et mélangez soigneusement jusqu'à ce qu'il soit entièrement dissout (au moins 1 minute), et ajoutez ensuite encore 1 ml de DNase/RNase free Water.</p> <p>Proteinase K : Remettez la Proteinase K lyophilisée en suspension en ajoutant 2 ml de DNase/RNase free water au flacon, et mélangez soigneusement jusqu'à ce qu'elle soit entièrement dissoute.</p> <p>Binding Solution (bouteille vide) : Remplissez 80 ml d'isopropanol à 99,7% (qualité de biologie moléculaire) dans la bouteille.</p> <p>Wash Buffer HLT : Ajoutez 70 ml d'isopropanol à 99,7% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.</p> <p>Wash Buffer : Ajoutez 140 ml d'éthanol à 96-100% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.</p>

- Ajustez le thermo-shaker à 65° C.
- Faites chauffer la quantité requise d'**Elution Buffer M** à 65° C (par échantillon, on a besoin de 50 à 200 µl d'**Elution Buffer M**).
- Déterminez le nombre de réactions requises, y compris les contrôles, et étiquetez le nombre requis de RTA Spin Filters (couvercle), et le nombre requis de Receiver Tubes 1.5 ml (par échantillon : on a besoin d'un Receiver Tube).

Master Mix

Afin de faciliter la manipulation, nous recommandons de préparer un master mix [mélange maître], celui-ci consistant en un Lysis Buffer HLT, la Proteinase K et, le cas échéant, en un Carrier RNA. Lors de la préparation du master mix, on recommande de préparer un volume qui dépasse le nombre total de réactions de 5%.

Veillez toujours préparer un master mix frais et peu de temps avant l'utilisation.

Isolation d'ADN génomique, d'ADN bactérien et d'ADN/RNA viral :

Par échantillon, on a besoin de 200 µl de Lysis Buffer HLT, de 20 µl de Proteinase K et de 20 µl de Carrier RNA.

Isolation d'ADN génomique :

Par échantillon, on a besoin de 220 µl de Lysis Buffer HLT et de 20 µl de Proteinase K. L'utilisation de Carrier RNA n'est pas requise.

Contrôle d'extraction

Veillez vous reporter aux instructions du fabricant pour déterminer la quantité optimale de contrôle d'extraction en vue de mettre en œuvre des applications en aval spécifiques.

Il faut combiner de faibles volumes de contrôle d'extraction (ADN ou ARN) avec le Carrier RNA fourni dans un seul mélange. En fonction de la taille de l'emballage, les flacons avec le Carrier RNA contiennent 1,2 ml ou 2,0 ml de solution mère. Si on a besoin d'un volume élevé (> 25% du volume total de Carrier RNA), ajoutez la quantité respective d'acide nucléique de contrôle d'extraction au Carrier RNA, et remplacez la quantité appropriée de DNase/RNase free water pendant la dilution du Carrier RNA.

3.2 Échantillonnage et entreposage de matières premières

En vue d'obtenir des rendements élevés et reproductibles, un entreposage correct des échantillons est essentiel. Les rendements peuvent varier selon des facteurs comme la santé du donneur ainsi que l'âge, le type, le transport et l'entreposage des échantillons.

En vue d'éviter la dégradation d'acides nucléiques, il convient d'éviter des cycles répétés de gel-dégel des échantillons. En général, on obtient les meilleurs résultats en utilisant des échantillons frais. Il est recommandé de tenir compte de conseils techniques, comme les normes CEN/TS et ISO pour le processus d'examen préalable pour procéder à des diagnostics moléculaires, conformément au IVDR [règlement relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro] ainsi que cela est souligné chez G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Sérum, plasma et autres liquides corporels exempts de cellules : Pour l'extraction, on peut utiliser du sérum ou du plasma provenant de sang entier veineux (traité avec des anticoagulants comme de l'EDTA ou du citrate, mais pas avec de l'héparine), d'échantillons de liquide synovial ou d'autres liquides corporels exempts de cellules. Afin d'éviter l'hémolyse, du sang entier ne doit pas être mélangé au vortex. Laissez les tubes de sérum se poser pendant au moins 30 minutes avant de procéder à la centrifugation. Veillez respecter pour la préparation de sérum ou de plasma les instructions relatives au système de collecte de sang. On recommande de séparer le plasma et le sérum via la centrifugation en l'espace de 12 heures. Les surnageants obtenus en utilisant des systèmes sans gel séparateur doivent être transférés vers des tubes d'échantillons frais. Pour un entreposage de courte durée, les échantillons peuvent être conservés sur de la glace pendant 1 à 2 heures. Les échantillons stockés jusqu'à 24 heures peuvent être entreposés à -20° C. Pour un entreposage de longue

durée, on recommande de congeler les échantillons dans des parties aliquotes à -80° C. Des cycles répétés de gel-dégel sont susceptibles d'affecter négativement l'intégrité des échantillons, et de par ex. provoquer la dénaturation/précipitation de protéines, fait qui à son tour peut aboutir à une diminution du rendement, de la qualité ou des titres viraux. En outre, des cryoprécipités qui se sont formés pendant les cycles de gel-dégel peuvent être à l'origine de problèmes. Si des cryoprécipités devaient apparaître, centrifugez à 6 800 x g pendant 3 minutes. Le surnageant clair doit être immédiatement utilisé.

Sang : On peut entreposer des échantillons de sang humain (stabilisés avec de l'EDTA ou du citrate mais pas héparinés) à température ambiante pendant 2 à 3 heures. Pour un entreposage de courte durée (jusqu'à 24 h), il faut entreposer les échantillons à des températures situées entre 2° C et 8° C. Pour un entreposage de longue durée, on recommande de congeler les échantillons à -20° C ou -80° C.

Écouvillons :

Écouvillons secs : préparez les échantillons ainsi que cela est décrit dans la méthode de préparation d'échantillons correspondante. Entreposez au sec entre 4° C et 8° C.

Écouvillons se trouvant dans des fluides de stabilisation : on peut manipuler le fluide de stabilisation comme un liquide corporel exempt de cellules. Veuillez tenir compte du fait qu'en raison de l'incompatibilité avec les produits chimiques utilisés dans le kit, certains agents de stabilisation peuvent faire diminuer le rendement. L'entreposage doit se faire conformément aux exigences du fabricant.

Échantillons de selles : Les échantillons contiennent des DNases et des RNases, ceux-ci pouvant rapidement mener à une dégradation de l'ADN et de l'ARN. Les échantillons doivent donc être entreposés en étant congelés à -80° C.

Bactéries cultivées : Après la mise en culture, les bactéries doivent être pastillées et congelées à -20° C ou -80° C pour un entreposage de longue durée. La remise en suspension est décrite dans la méthode de préparation d'échantillons correspondante.

Urine : En fonction du titre de bactéries et de l'application, on recommande un volume de départ de 15 à 50 ml d'urine. Centrifugez l'échantillon en vue de pastiller les bactéries et d'éliminer entièrement le surnageant (des contaminations d'urée sont susceptibles d'inhiber les réactions PCR). Pour certaines applications, on peut directement utiliser de l'urine fais. Pour un entreposage de longue durée, on recommande de congeler les échantillons à -20° C ou -80° C.

Sécrétions trachéales, LBA, crachats : Les échantillons contiennent des DNases et des Rnases, ceux-ci pouvant rapidement mener à une dégradation de l'ADN et de l'ARN. Les échantillons doivent donc être entreposés en étant congelés à -80° C.

Biopsies de tissus : Les échantillons doivent être immédiatement congelés et entreposés à -20° C ou -80° C. Il convient d'éviter des cycles répétés de gel-dégel. La quantité d'ADN purifié dépend du type de matière première. Dégeler l'échantillon dans un mélange de lyse.

Surnageants de cultures cellulaires : Préparez les échantillons de surnageants comme d'autres échantillons de liquides corporels exempts de cellules décrits dans la méthode de préparation d'échantillons correspondante. Pour un entreposage de longue durée, on recommande de congeler les échantillons à -20° C ou -80° C.

3.3 Préparation de matières premières

On trouvera ci-dessous une description de la préparation de la lyse d'échantillons pour différentes matières premières. Veuillez utiliser pour la préparation des échantillons des Safe-Lock-Tubes de 2 ml, puisque ceux-ci sont également requis dans le cadre de l'étape de lyse consécutive.

Après la préparation de matières premières, et sauf mention contraire, veuillez vous reporter au Chapitre 3.5 « Protocole : isolation simultanée de l'intégralité des acides nucléiques (ADN et ARN) à partir de tous les échantillons liquides » pour suivre l'étape 1a)-d) du protocole afin de continuer.

3.3.1 Sérum, plasma et autres liquides corporels exempts de cellules

Veuillez toujours bien mélanger l'échantillon avant de procéder à l'extraction.

Utilisez pour l'extraction 200 µl d'échantillons. Si le volume d'échantillons est inférieur à 200 µl, ajustez avec un PBS Buffer ou de la DNase/RNase free water pour obtenir un volume final de 200 µl.

3.3.2 Sang

Veuillez toujours bien mélanger l'échantillon avant de procéder à l'extraction.

Diluez 100 µl de sang frais ou décongelé avec 100 µl de DNase/RNase free water.

3.3.3 Écouvillons

a) Écouvillons secs

Rincez les écouvillons dans un flacon approprié avec le volume le plus faible possible de PBS ou de DNase/RNase free water (pour les prélèvements nasopharyngés, environ 400 µl et pour les prélèvements oraux, environ 600 µl). Pressez l'écouvillon contre la paroi intérieure du flacon en vue d'obtenir la plus grande quantité d'échantillons possible.

Utilisez pour l'extraction 200 µl de solution rincée.

De manière alternative, les écouvillons peuvent être directement rincés dans un mélange de 200 µl de Lysis Buffer HLT, de 20 µl de Proteinase K, de 20 µl de Carrier RNA (en option pour la préparation d'ADN génomique) et de 200 µl de DNase/RNase free water. Faites incuber les écouvillons pendant 5 à 10 minutes à température ambiante, mélangez occasionnellement. Veuillez à éviter une contamination croisée.

b) Écouvillons qui se trouvent dans un fluide de stabilisation

Utilisez pour l'extraction 200 µl de solution de stabilisation.

Certains fluides de stabilisation sont susceptibles d'interférer avec la réaction de lyse ; si vous avez des questions, veuillez vous référer aux FAQ ou prenez contact avec l'assistance.

3.3.4 Échantillons de selles (surnageant)

a) Extraction d'acides nucléiques à partir de virus

En vue de préparer le surnageant, transférez 100 µl / 100 mg d'échantillons de selles vers un flacon de 2 ml et ajoutez 900 µl de DNase/RNase free water. Mélangez au vortex pendant 30 secondes, cette opération étant suivie d'une étape de centrifugation à 12 000 x g pendant 1 minute.

Transférez en vue de procéder à l'extraction d'échantillons 200 µl de surnageant vers un flacon frais. Évitez la présence de particules solides dans l'échantillon.

b) Extraction d'ADN bactérien

En vue de préparer le surnageant, transférez 100 µl / 100 mg d'échantillons de selles vers un flacon de 2 ml et ajoutez 300 µl de DNase/RNase free water. Mélangez au vortex pendant 30 secondes, cette opération étant suivie d'une étape de centrifugation à 1 000 x g pendant 30 secondes.

Transférez en vue de procéder à l'extraction d'échantillons 200 µl de surnageant vers un flacon frais. Évitez la présence de particules solides dans l'échantillon.

3.3.5 Bactéries cultivées

Transférez 1 ml de bactéries mises en culture pendant la nuit vers un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml. Centrifugez pendant 2 minutes à 10 000 x g, et éliminez entièrement le surnageant. Remettez en suspension le culot dans un PBS Buffer de 200 µl, et lancez l'extraction d'échantillons.

3.3.6 Urine

En fonction du titre de bactéries et de l'application, on recommande un volume de départ de 15 à 50 ml d'urine. Centrifugez l'échantillon en vue de pastiller les bactéries et d'éliminer entièrement le surnageant (des contaminations d'urée sont susceptibles d'inhiber les réactions PCR). Remettez le culot bactérien en suspension dans un PBS Buffer de 200 µl.

Pour certaines applications, on peut directement utiliser 200 µl d'urine fais.

3.3.7 Sécrétions trachéales, LBA, crachats

a) Échantillons non visqueux ou à faible viscosité

Veillez toujours bien mélanger l'échantillon avant de procéder à l'extraction.

Utilisez pour l'extraction 200 µl d'échantillons. Si le volume d'échantillons est inférieur à 200 µl, ajustez avec un PBS Buffer ou de la DNase/RNase free water pour obtenir un volume final de 200 µl.

b) Isolation d'ADN bactérien à partir d'échantillons visqueux

Transférez 150 µl d'échantillons de crachats ou 1 ml de sécrétion trachéale ou de LBA vers un Safe-Lock-Tube, et ajoutez respectivement 150 µl ou 1 ml de solution d'acétylcystéine (ACC) saturée (le rapport échantillon-tampon doit être de 1:1).

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter.

Centrifugez à 10 000 x g pendant 5 minutes. Jetez le surnageant.

Remettez en suspension le culot bactérien dans 200 µl de PBS ou de DNase/RNase free water, et procédez à l'extraction d'échantillons.

c) Isolation d'ADN/ARN viral à partir d'échantillons visqueux

Transférez 150 µl de l'échantillon vers un Safe-Lock-Tube, et ajoutez 150 µl de solution d'acétylcystéine (ACC) saturée à l'échantillon (le rapport échantillon-tampon doit être de 1:1).

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter.

Laissez l'échantillon se refroidir.

Utilisez pour l'extraction 200 µl d'échantillons.

3.3.8 Biopsies de tissus

Transférez 1 à 10 mg d'échantillons de biopsies de tissus vers un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml et ajoutez à chaque échantillon 200 µl de DNase/RNase free water ou de PBS, 200 µl de Lysis Buffer HLT, 20 µl de Carrier RNA (en option, pour de faibles échantillons d'ADN/ARN) et 20 µl de Proteinase K.

Pour procéder à la rupture de tissus difficiles à lyser, comme des cartilages, les reins et le muscle cardiaque, on recommande d'appliquer un bead beating [battage de billes] effectué au moyen de billes en zircone.

Après le traitement mécanique, faites incuber pendant 10 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter.

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter.

Centrifugez pendant 1 minute à 10 000 x g, et transférez le surnageant vers un nouveau tube. Continuez avec le protocole d'extraction à l'étape 2 en ajoutant la Binding solution.

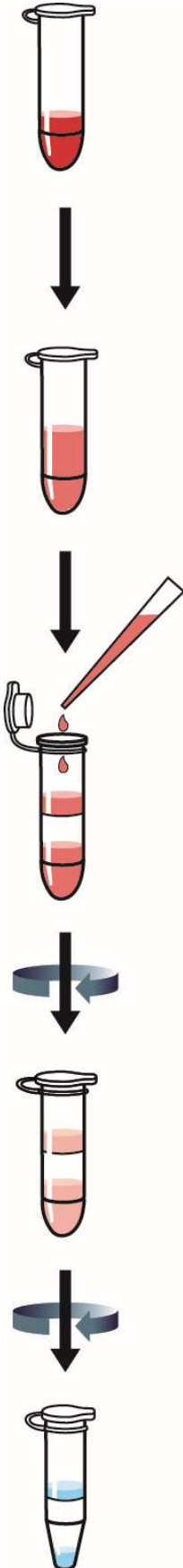
3.3.9 Surnageants de cultures cellulaires

Utilisez pour l'extraction 200 µl d'échantillons.

3.4 Protocole court Invisorb® Spin Universal Kit

Échantillons de lyse

Concernant le pré-traitement spécifique d'échantillons, veuillez vous reporter au Chapitre 3.3 « Préparation de la matière première ».



1.a) Purification d'acides nucléiques bactériens

Mélangez 200 µl d'échantillons* avec 20 µl de Lysozyme dans un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml
Faites incuber pendant 10 minutes à 37° C
Ajoutez 20 µl de Carrier RNA, 200 µl de **Lysis Buffer HLT** et 20 µl de **Proteinase K**

Faites incuber pendant 15 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter

1.b) Purification simultanée d'acides nucléiques bactériens et viraux

Mélangez 200 µl d'échantillons* avec 20 µl de Lysozyme dans un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml

Faites incuber pendant 10 minutes à température ambiante

Ajoutez 20 µl de Carrier RNA, 200 µl de **Lysis Buffer HLT** et 20 µl de **Proteinase K**

Faites incuber pendant 10 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter

1.c) Purification d'acides nucléiques viraux

Mélangez 200 µl d'échantillon* avec 200 µl de **Lysis Buffer HLT**, 20 µl de **Carrier RNA** et 20 µl de **Proteinase K** dans un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml
Faites incuber pendant 10 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter
Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter

1.d) Purification d'ADN génomique

Mélangez 200 µl d'échantillon* avec 220 µl de **Lysis Buffer HLT** et 20 µl de **Proteinase K** dans un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml

Faites incuber pendant 10 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter

(faites l'économie de cette étape pour des échantillons de sang)

* Si le volume d'échantillons est inférieur à 200 µl, ajustez avec une PBS ou de la DNase/RNase free water

Liaison d'acides nucléiques

2. Ajoutez 260 µl de **Binding Solution**, et mélangez en pipetant vers le haut et vers le bas ou au vortex.

Faites incuber pendant 5 minutes à température ambiante

Transférez l'échantillon vers le RTA Spin Filter Set

Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g

Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.

Lavage destiné à éliminer des contaminations résiduelles

3. Ajoutez 600 µl de **Wash Buffer HLT**, et faites centrifuger pendant 1 minute à 11 000 x g.

Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.

4. Ajoutez 700 µl de **Wash Buffer**, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.

Jetez le filtrat et remettez le RTA Spin Filter dans le RTA Receiver Tube.

5. Répétez cette étape de lavage une fois

6. Centrifugez pendant 5 minutes à vitesse maximale en vue d'éliminer l'éthanol résiduel

Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat

Eluer les acides nucléiques

7. Placez le Spin Filter dans un Receiver Tube de 1,5 ml
Ajoutez 50- 200 µl d'**Elution Buffer M** (préchauffé à 65° C) directement sur le RTA Spin Filter.

Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.

Jetez le RTA Spin Filter et entreposez les acides nucléiques élués sur de la glace

3.5 Protocole : Isolation simultanée de l'intégralité des acides nucléiques (ADN et ARN) à partir de tous les échantillons liquides

Concernant le pré-traitement spécifique d'échantillons, veuillez vous reporter au Chapitre 3.3 « Préparation de la matière première ».

1.a) Lyse d'échantillons en vue de procéder à la purification d'acides nucléiques bactériens

Mélangez 200 µl de l'échantillon ou du culot bactérien remis en suspension avec 20 µl de Lysozyme dans un Safe-Lock-Tube de 2 ml.

Faites incuber pendant 10 minutes à 37° C

Ajoutez 20 µl de Carrier RNA. Mélangez au vortex.

Ajoutez 200 µl de **Lysis Buffer HLT** et 20 µl de **Proteinase K**.

De manière alternative, ajoutez 240 µl de master mix à chaque échantillon.

Mélangez soigneusement au vortex pendant 10 secondes, et faites incuber pendant 10 à 15 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter.

Disponible en option pour des bactéries difficiles à lyser comme les *mycobactéries* : faites incuber pendant 10 minutes à 95° C

1.b) Lyse d'échantillons effectué en vue de procéder à la purification simultanée d'acides nucléiques bactériens et viraux

Mélangez 200 µl de l'échantillon à 20 µl de Lysozyme dans un Safe-Lock-Tube de 2 ml.

Faites incuber pendant 10 minutes à température ambiante.

Ajoutez 20 µl de Carrier RNA. Mélangez au vortex.

Ajoutez 200 µl de **Lysis Buffer HLT** et 20 µl de **Proteinase K**.

De manière alternative, ajoutez 240 µl de master mix à chaque échantillon.

Mélangez soigneusement au vortex pendant 10 secondes, et faites incuber pendant 10 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter.

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C, tout en continuant à agiter.

1.c) Lyse d'échantillons en vue de procéder à la purification d'acides nucléiques viraux

Mélangez 200 µl de l'échantillon à 200 µl de **Lysis Buffer HLT**, 20 µl de **Carrier RNA** et 20 µl de **Proteinase K** dans un Safe-Lock-Tube de 2 ml.

De manière alternative, ajoutez 240 µl de master mix à chaque échantillon.

Mélangez soigneusement au vortex pendant 10 secondes, et faites incuber pendant 10 à 15 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter.

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C

1.d) Lyse d'échantillons en vue de procéder à la purification d'ADN génomique

Mélangez 200 µl de l'échantillon à 200 µl de **Lysis Buffer HLT** et 20 µl de **Proteinase K** dans un Safe-Lock-Tube de 2 ml.

De manière alternative, ajoutez 240 µl de master mix à chaque échantillon.

Mélangez soigneusement au vortex pendant 10 secondes, et faites incuber pendant 10 à 15 minutes à 65° C, tout en continuant à agiter.

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C (faites l'économie de cette étape pour l'isolation d'ADN génomique tiré d'échantillons de sang dilués)

Remarque : Si vous souhaitez ajouter des acides nucléiques en vue de réaliser le contrôle d'extraction, ajoutez-les maintenant, avant l'étape de liaison.

2. Ajoutez 260 µl de **Binding Solution** et mélangez entièrement en pipetant vers le haut et vers le bas ou au vortex.
Faites incuber l'échantillon à température ambiante pendant 5 minutes.
Prenez un RTA Spin Filter Set Transférez le mélange vers le RTA Spin Filter
Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g
Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.
3. Ajoutez 600 µl de **Wash Buffer HLT** au RTA Spin Filter, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.
Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube.
4. Ajoutez 700 µl de **Wash Buffer** au RTA Spin Filter, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.
Jetez le filtrat, et remettez le RTA Spin Filter dans le RTA Receiver Tube utilisé.
5. Ajoutez 700 µl de **Wash Buffer** au RTA Spin Filter, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.
Jetez le filtrat, et remettez le RTA Spin Filter dans le RTA Receiver Tube utilisé.
6. Centrifugez pendant 5 minutes à 11 000 x g en vue d'éliminer entièrement l'éthanol.
Jetez le RTA Receiver Tube avec le filtrat.
7. Placez le RTA Spin Filter dans un Elution Tube de 1,5 ml.
Ajoutez directement 50 à 200 µl de l'**Elution Buffer M** préchauffé (65° C) sur la surface du RTA Spin Filter.
Faites incuber à température ambiante pendant 1 minute.
Centrifugez à 11 000 x g pendant 1 minute.
Jetez le RTA Spin Filter.
Fermez le tube récepteur de 1,5 ml et entreposez l'échantillon entre -20° C et -80° C.

4. Annexe

4.1 Résolution de problèmes

Problème	Cause possible	Préconisations
Faible quantité d'acides nucléiques	Insuffisance de la lyse cellulaire	Augmentez la durée de la lyse avec le Lysis Buffer HLT Une agitation continue améliore l'efficacité de la lyse Réduisez la quantité de matière première en vue d'éviter une surcharge des colonnes
	Élution incomplète	Augmentez la durée d'incubation avec un Élution Buffer M préchauffé à 5 à 10 minutes Éluez deux fois avec un Elution Buffer M de 100 µl Utilisez un volume plus élevé d' Elution Buffer M
	Faible concentration d'acides nucléiques dans l'échantillon	Eluer les acides nucléiques avec un volume inférieur de tampon d'élution M ; ne pas utiliser moins de 30 µl.
	Entreposage incorrect de la matière première	Veillez vous assurer que la matière première soit correctement entreposée. Évitez des cycles répétés de gel-dégel du matériel d'échantillons.
	Les Wash Buffers ont été mal préparés	Veillez vous assurer que ce soit la bonne quantité d'éthanol/d'isopropanol qui est ajoutée aux Wash Buffers, et que toutes les solutions soient entreposées en étant bien fermées.
	Volume/concentration de Proteinase K trop faibles	Veillez avant l'utilisation vous assurer que la Proteinase K lyophilisée soit remise en suspension avec le volume d'eau approprié.
Acides nucléiques dégradés	Entreposage incorrect de matière première	Veillez à ce que l'échantillon soit prélevé et entreposé correctement, Pour de plus amples informations, veuillez vous reporter à la section FAQ ou à notre site Internet.
	Vieux matériel	Veillez vous assurer que la matière première soit entreposée dans des conditions adaptées (-20° C/-80° C).
Les acides nucléiques ne présentent pas une bonne performance dans le cadre d'applications en aval (par ex. PCR, NGS)	Transfert d'éthanol pendant l'élution	Veillez augmenter la durée de séchage pour éliminer l'éthanol.
	Pendant l'élution, il peut se produire un transfert de sel	Contrôlez les Wash Buffers quant à la présence de précipités de sel. Si des précipités devaient apparaître, veuillez les dissoudre en les faisant chauffer avec précaution jusqu'à 30° C Veillez vous assurer qu'avant l'utilisation les Wash Buffers soient à la température ambiante.
Présence de résidus	Insuffisance de la lyse cellulaire	Voir ci-dessus.

colorés sur le RTA Spin Filter après le lavage	Lavage insuffisant	Relaver avec un Wash Buffer
	Les Wash Buffers ont été mal préparés	Voir ci-dessus.

4.2 Garantie

La société Invitek Molecular garantit le fonctionnement correct du kit pour les applications décrites dans le présent manuel et en accord avec l'usage prévu. Conformément au Système de gestion de la qualité de la société Invitek Molecular, certifié selon la norme EN ISO 13485, la performance de l'intégralité des composants du kit a été testée en vue d'assurer la qualité du produit.

Dès sa détection, tout problème, tout incident ou tout défaut doit immédiatement être signalé à la société Invitek Molecular. Veuillez dès la réception examiner le produit afin de vous assurer qu'il soit complet et intact. En cas de différences, vous devez sans délai en informer la société Invitek Molecular par écrit. Des modifications apportées au kit et aux protocoles, et une utilisation qui s'écarte de l'usage prévu ne sont pas couvertes par la garantie.

La société Invitek Molecular se réserve le droit de changer, de transformer ou de modifier à tout moment tout produit en vue d'améliorer sa performance et sa conception.

La société Invitek Molecular garantit les produits ainsi que cela est indiqué dans les Conditions Générales de Vente, celles-ci étant disponibles à l'adresse Internet suivante : www.invitek-molecular.com. Si vous avez des questions, veuillez prendre contact avec techsupport@invitek-molecular.com.

4.3 Symboles utilisés sur les produits et étiquetage



Fabricant



Numéro de lot



Identifiant unique d'un dispositif médical



Numéro de catalogue



Date d'expiration



Consultez le mode d'emploi



Limitation de la température



Ne pas réutiliser



Quantité de préparations d'échantillons



Dispositif de diagnostic médical in vitro

4.4 Documents et informations supplémentaires

Consultez www.invitek-molecular.com pour de plus amples informations sur :

- Foire aux questions et conseils pour la résolution de problèmes
- Manuels rédigés en plusieurs langues
- Fiches de données de sécurité (MSDS)
- Assistance Internet
- Vidéos produits

Si malgré une lecture attentive du mode d'emploi et des informations supplémentaires, vous avez encore besoin d'aide, veuillez nous contacter à l'adresse Internet suivante : techsupport@invitek-molecular.com ou adressez-vous au concessionnaire qui est compétent pour vous.

4.5 Informations sur les commandes

Produit	Taille de l'emballage	N° de catalogue
Invisorb® Spin Universal Kit	50 préparations	1050100200
Invisorb® Spin Universal Kit	250 préparations	1050100300

Historique des révisions

Révision	Date	Description
FR-v1-2022	2022-05-18	Nouveau document

INVITEK Molecular

Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Allemagne

Téléphone: +49 30 9489 2908
Fax: +49 30 9489 3795
info@invitek-molecular.com

www.invitek-molecular.com



<https://www.invitek-molecular.com/resources/manuals.html>

2022-05-18 FR-v1-2022