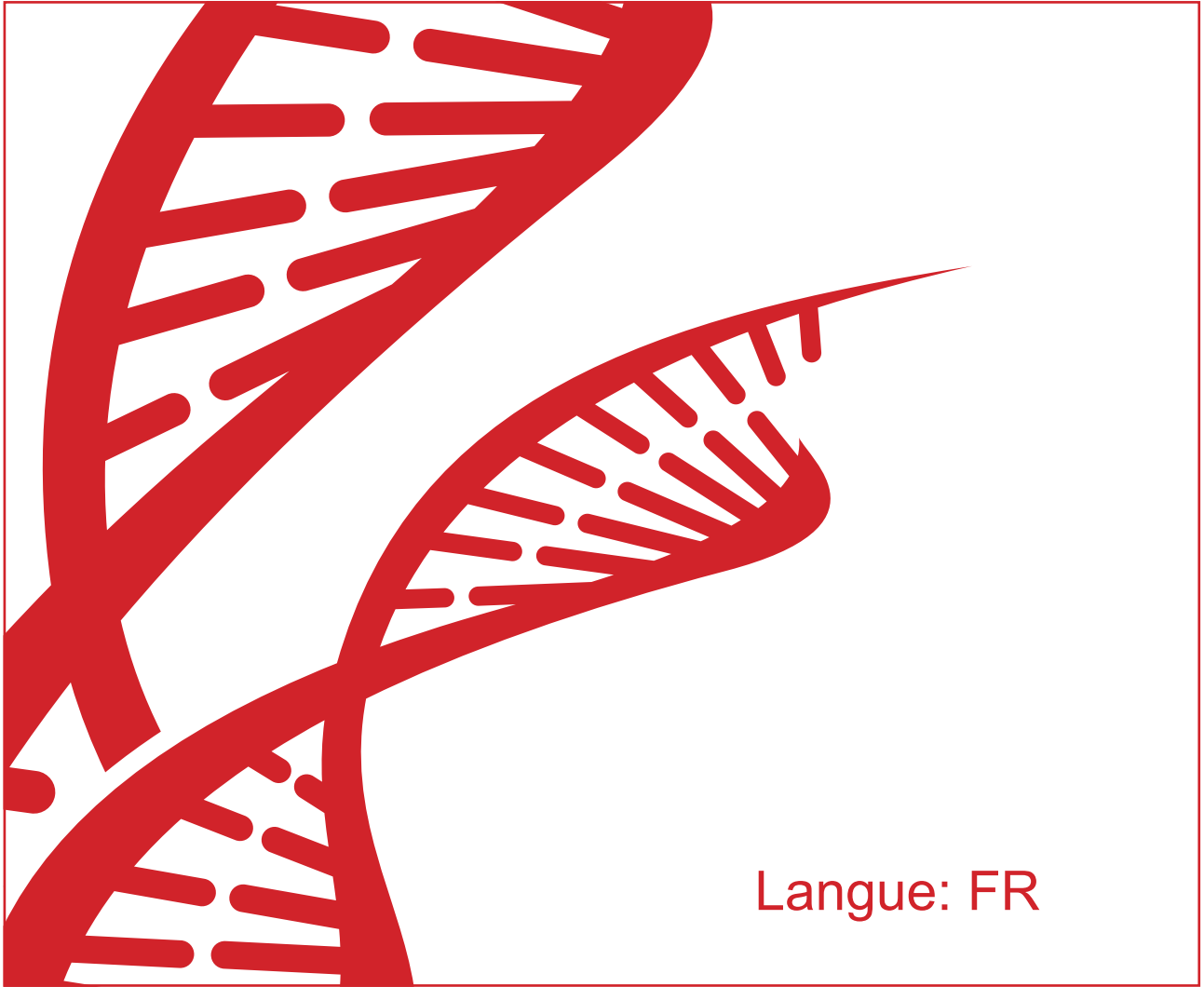


Instructions d'utilisation PSP® Spin Stool DNA Basic Kit



REF 1038120200
1038120300



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 **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** de la société Invitek Molecular.

En combinaison avec le **Stool DNA Stabilizer** [stabilisateur d'ADN de selles] ou les **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** [tubes collecteurs de selles avec stabilisateur d'ADN], le dispositif médical est conçu pour procéder à l'isolation manuelle d'ADN de micro-organismes et d'hôtes provenant d'échantillons de selles 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. Safety instructions 3
- 2. Product information..... 4
 - 2.1 Kit contents 4
 - 2.2 Reagents and equipment to be supplied by user..... 5
 - 2.3 Storage, appearance and shelf life 6
 - 2.4 Intended use 6
 - 2.5 Product information and specifications 7
 - 2.6 Principle and procedure 8
- 3. Nucleic acid extraction with the PSP® Spin Stool DNA Basic Kit..... 9
 - 3.1 Before starting a protocol 9
 - 3.2 Sampling and storage of starting material10
 - 3.3 Preparation of starting materials.....10
 - 3.4 Short protocol PSP® Spin Stool DNA Basic Kit.....11
 - 3.5 Protocol 1: Isolation of DNA from fresh or frozen stool samples12
 - 3.6 Protocol 2: Isolation of DNA from stabilized stool samples14
- 4. Appendix.....16
 - 4.1 Troubleshooting16
 - 4.2 Warranty17
 - 4.3 Symbols used on product and labeling17
 - 4.4 Further documents and supplementary information.....18
 - 4.5 Ordering information.....18

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'ensemble des fiches de données de sécurité (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 **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** auquel elles s'appliquent sont énumérées ci-dessous :

Stool DNA Stabilizer



Avertissement

H319 -H412.-P280- P305-351-338-P273

Proteinase K



Danger

H315-319-334-335 P280-P305-P351-P338

Wash Buffer I



Avertissement

H302-H412-P280-P305-P351-P338-P273-EUH032

H302: Nocif en cas d'ingestion.

H315: Provoque une irritation cutanée.

H319: Provoque une grave irritation oculaire.

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

H335: Peut irriter les voies respiratoires.

H412: Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P273: Éviter le rejet dans l'environnement.

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.

EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

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

Le dispositif médical **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** ne contient pas de tampon pour procéder à la lyse d'échantillons. Pour effectuer la lyse d'échantillons, il faut combiner le dispositif médical **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** avec le **Stool DNA Stabilizer** ou les **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** (veuillez vous reporter au Chapitre 2.2 ou 4.5 pour les Informations sur les commandes). Le **Stool DNA Stabilizer** a la fonction d'un tampon de lyse.

Le **Stool DNA Stabilizer** (180 ml/bouteille) est conçu pour procéder à l'isolation directe d'échantillons de selles frais ou congelés.

Les **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** se prêtent à une gestion complète d'échantillons, et permettent de procéder à la collecte, au transport, à la stabilisation et à l'entreposage d'échantillons pour une période pouvant aller jusqu'à trois mois à température ambiante (TA).

	50 purifications	250 purifications
N° de catalogue	1038120200	1038120300
InviAdsorb	50 tubes	5 x 50 tubes
Zirconia Beads II	2 flacons	8 flacons
Proteinase K	1 flacon pour 1,5 ml solution de travail	5 flacons pour 5 x 1,5 ml solution de travail
Binding Buffer A	9 ml/bouteille (volume final 30 ml)	36 ml/bouteille (volume final 120 ml)
Wash Buffer I	30 ml/bouteille (volume final 60 ml)	80 ml/bouteille (volume final 160 ml)
Wash Buffer II	18 ml/bouteille (volume final 60 ml)	2 x 45 ml/bouteille (volume final 2 x 150 ml)
Elution Buffer	15 ml/bouteille	60 ml/bouteille
2.0 ml Safe- Lock-Tubes	2 x 50 tubes	2 x 250 tubes
RTA Spin Filter Set	50 jeux	5 x 50 jeux
RTA Receiver Tubes	2 x 50 tubes	10 x 50 tubes
1.5 ml Receiver Tubes	2 x 50 tubes	10 x 50 tubes
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 ou 2,0 ml)

Pour la lyse d'échantillons :

Produit	Taille de l'emballage	N° de catalogue
Stool DNA Stabilizer ^{*)}	180 ml	1038111100
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	50 tubes	1038111200
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	250 tubes	1038111300

***) Pour 50 réactions, une bouteille de Stool DNA Stabilizer est appropriée, alors que l'on a besoin de deux bouteilles pour 250 réactions.**

Liquides et solvants :

- Éthanol 96%-100% (non dénaturé)
- Isopropanol*

* 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 I et Wash Buffer II [tampon de lavage] : après avoir ajouté de l'éthanol, il faut les fermer hermétiquement et les entreposer à température ambiante.

Binding Buffer A [tampon de liaison] : après avoir ajouté de l'isopropanol, il faut le fermer hermétiquement et l'entreposer à température ambiante.

Proteinase K : une fois qu'elle a été dissoute dans de la DNase/RNase free water [eau exempte de DNase/RNase], 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.

Stool DNA Stabilizer/Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer (à commander de manière distincte) : si le DNA Stabilizer devait contenir des précipités liés à la température, veuillez les dissoudre en les faisant chauffer avec précaution à 30° C dans un bain-marie, et agitez occasionnellement pendant le processus de dissolution.

2.4 Utilisation prévue

Le dispositif médical **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** est un kit d'extraction d'acides nucléiques qui se base sur la technologie des colonnes de centrifugation, et qui est conçu pour isoler et purifier de l'ADN bactérien et de l'ADN hôte à partir d'échantillons de selles humaines.

Le dispositif médical **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** est conçu pour être utilisé avec des échantillons de selles humaines frais, congelés ou stabilisés. Pour des échantillons de selles frais ou congelés, il faut combiner le dispositif médical avec le **Stool DNA Stabilizer**. En vue d'assurer une gestion complète d'échantillons (échantillonnage, transport) et une stabilisation à température ambiante, il faut combiner le dispositif médical avec les **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer**. Le fait d'ajouter le Stool DNA Stabilizer au dispositif médical **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** est une opération essentielle pour la lyse d'échantillons. Le **Stool DNA Stabilizer** et les **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** doivent être achetés de manière distincte.

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
Échantillons de selles frais ou congelés : max. 200 mg Échantillons de selles stabilisés (Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer) : 1,4 ml	Jusqu'à 50 µg, en fonction de l'échantillon (entreposage et source)	$A_{260} : A_{280}$ 1,4-1,8	Approx. 45 minutes (y compris, la lyse)

Le rendement et la qualité d'ADN purifié provenant d'excréments dépendent du contenu bactérien ainsi que de la source, du transport, de l'entreposage et de l'âge des échantillons. L'état de santé du donneur peut également avoir un impact sur le rendement et la qualité ; c'est en particulier dans le cas de certaines maladies et de certains médicaments/traitements médicaux que la qualité des acides nucléiques purifiés peut diminuer.

Applications en aval :

en général, le rendement et la qualité d'acides nucléiques isolés peuvent servir à de nombreuses applications moléculaires et diagnostiques, comme les techniques PCR, l'analyse du microbiome (NGS) [séquençage de la prochaine génération] ou des méthodes d'hybridation. Les applications en aval doivent être effectuées conformément aux spécifications respectives des fabricants.

2.6 Principe et procédure

1. Échantillons de lyse

Les échantillons de selles sont lysés dans le Stool DNA Stabilizer dans des conditions de dénaturation et avec différents niveaux de température, spécifiques aux acides nucléiques cibles. Les cellules humaines destinées à une isolation d'ADN hôte sont lysées à température ambiante, alors que les cellules bactériennes doivent être incubées à des températures plus élevées. Pour procéder à la lyse de cellules bactériennes et en vue d'améliorer l'efficacité de la lyse, on ajoute des Zirconia beads [billes en zircone].

2. Élimination d'inhibiteurs PCR et digestion de protéines

Après la lyse, les substances dégradant l'ADN et les inhibiteurs PCR existant dans les excréments sont absorbés par la matrice InviAdsorb. InviAdsorb se trouve dans des Safe-Lock-Tubes [tubes haute sécurité] pré-remplis, tubes dans lesquels il faut déposer le lysat. Les contaminants liés et les débris cellulaires sont pastillés par centrifugation. Le surnageant contient l'ADN pré-purifié.

On ajoute de la Protéinase K au surnageant en vue de digérer et de dégrader les protéines à des températures élevées.

3. Liaison d'acides nucléiques

En ajoutant un Binding Buffer A au lysat, on adapte des conditions de liaison optimales. Chaque lysat est ensuite appliqué à un RTA Spin Filter, les acides nucléiques étant absorbés par la membrane.

4. Lavage destiné à éliminer des contaminations résiduelles

On élimine les contaminants de manière efficace en utilisant un Wash Buffer I et un Wash Buffer II, alors que les acides nucléiques restent attachés à la membrane.

5. Éluer l'ADN

Les acides nucléiques sont élués à partir du RTA Spin Filter en utilisant un Elution Buffer [tampon d'éluion] de 100 à 200 µl.

3. Extraction d'acides nucléiques effectuée au moyen du dispositif médical PSP® Spin Stool DNA Basic 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
Binding Buffer A : Remplissez 21 ml d' isopropanol à 99,7% (qualité de biologie moléculaire) dans la bouteille, et mélangez en agitant vigoureusement pendant 1 minute. Mélangez en inversant plusieurs fois juste avant l'utilisation. Maintenez toujours la bouteille bien fermée.
Proteinase K : remettez la Proteinase K lyophilisée en suspension en ajoutant 1,5 ml de DNase/RNase free water au flacon, et mélangez soigneusement jusqu'à ce qu'elle soit entièrement dissoute.
Wash Buffer I : Ajoutez 30 ml d' éthanol à 96-100% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.
Wash Buffer II : Ajoutez 42 ml d' éthanol à 96-100% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.
Préparations de tampons avant la première utilisation : 250 préparations
Binding Buffer A : Remplissez 84 ml d' isopropanol à 99,7% (qualité de biologie moléculaire) dans la bouteille, et mélangez en agitant vigoureusement pendant 1 minute. Mélangez en inversant plusieurs fois juste avant l'utilisation. Maintenez toujours la bouteille bien fermée.
Proteinase K : remettez la Proteinase K lyophilisée en suspension en ajoutant 1,5 ml de DNase/RNase free water à chaque flacon, et mélangez soigneusement jusqu'à ce qu'elle soit entièrement dissoute.
Wash Buffer I : Ajoutez 80 ml d' éthanol à 96-100% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.
Wash Buffer II : Ajoutez 105 ml d' éthanol à 96-100% à la bouteille. Mélangez soigneusement, tout en gardant toujours la bouteille bien fermée.

- Ajustez le thermo-shaker à 70° C.
- Ajustez le thermo-shaker/les blocs chauffants à 70° C et 95° C
- Faites chauffer la quantité requise d'**Elution Buffer** à 70° C (par échantillon, on a besoin de 100 à 200 µl d'**Elution Buffer**).
- 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 [tubes récepteurs] de 1,5 ml (par échantillon, on a besoin d'un Receiver Tube).

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 l'état nutritionnel 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>).

Échantillons de selles frais : Les échantillons contiennent des DNases, ceux-ci pouvant rapidement mener à une dégradation de l'ADN. On peut entreposer des échantillons de selles frais pendant 1 à 2 heures à température ambiante ; il faut le plus rapidement possible ajouter du Stool DNA Stabilizer à l'échantillon. Sinon, il faut entreposer les échantillons en les congelant à -80° C.

Échantillons de selles stabilisés : On peut stabiliser les échantillons de selles en utilisant les Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer de la société Invitek Molecular (veuillez vous reporter aux Informations sur les commandes), cette opération permettant de procéder à l'échantillonnage, à l'entreposage et au transport des échantillons. Pour procéder à l'échantillonnage, on recueille 1 g de selles au moyen d'une cuillère, celle-ci étant intégrée dans le couvercle du Collection Tube [tube collecteur]. Après avoir procédé à l'échantillonnage, il faut hermétiquement fermer le Collection Tube. L'échantillon doit être mélangé en agitant soigneusement ou au vortex en vue d'homogénéiser l'échantillon avec le Stool DNA Stabilizer dans le tube. On peut stocker les échantillons dans les Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer pour une période pouvant aller jusqu'à trois mois à température ambiante. Une durée de stockage inférieure à 3 mois n'a aucune influence sur la qualité ou sur la quantité d'ADN. Pour un entreposage de longue durée, on peut congeler les échantillons à -20° C ou -80° C ; avant la congélation, on recommande de procéder à l'aliquotage des échantillons.

3.3 Préparation de matières premières

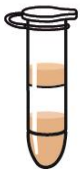
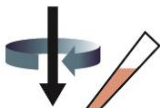
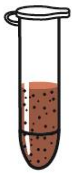
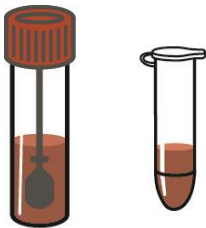
Échantillons de selles frais (liquides) : Si l'échantillon est liquide, pipetez 200 µl dans un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml. Coupez l'extrémité de la pointe de la pipette afin de faciliter le pipetage. Poursuivez en ajoutant du Stool DNA Stabilizer ainsi que cela est décrit dans le protocole d'extraction.

Échantillons de selles congelés : Utilisez un scalpel ou une spatule pour gratter de petits morceaux de selles dans un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml déposé sur de la glace. Veillez à ce que les échantillons ne dégèlent pas avant que l'on ait ajouté du Stool DNA Stabilizer, sinon l'ADN contenu dans l'échantillon peut se dégrader.

On peut directement dégeler les échantillons contenus dans le Stool Stabilizer en les faisant chauffer avec précaution ; veuillez éviter de multiples cycles de gel-dégel, ceci pouvant engendrer un cisaillement de l'ADN, en aliquotant les échantillons respectifs.

3.4 Short protocol PSP® Spin Stool DNA Basic Kit

Échantillons de lyse



1. **Échantillons frais/congelés** : Pesez 200 mg d'échantillons de selles (frais ou congelés) dans un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml, ajoutez 1,2 ml de Stool DNA Stabilizer et mélangez vigoureusement au vortex pendant 1 minute. **Échantillons stabilisés** : transférez après l'entreposage ou directement après l'échantillonnage 1,4 ml d'échantillon du Stool Collection Tube with DNA Stabilizer vers un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml.

a) **Isolation d'ADN hôte**

Faites incuber pendant 10 minutes à température ambiante et agitez continuellement à 900 rpm
Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g

b) **Isolation d'ADN bactérien**

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C et agitez continuellement à 900 rpm.
Ajoutez 5 **Zirconia Beads II** au homogénat, et mélangez au vortex pendant 2 minutes
Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g

c) **Isolation d'ADN à partir de bactéries difficiles à lyser**

Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C et agitez continuellement à 900 rpm
Faites incuber pendant 3 minutes sur de la glace
Ajoutez 5 **Zirconia Beads II**, et faites incuber pendant 3 minutes à 95° C.
Mélangez l'échantillon au vortex pendant 2 minutes, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g

Élimination d'inhibiteurs PCR et digestion de protéines

2. Transférez le surnageant vers un **InviAdsorb-Tube**, et mélangez vigoureusement au vortex pendant 15 secondes

Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante ; centrifugez pendant 3 minutes à pleine vitesse.

3. Transférez entièrement le surnageant vers un nouveau Receiver Tube de 1,5 ml ; jetez le culot avec l'**InviAdsorb**. Centrifugez pendant 3 minutes à pleine vitesse.

4. Transférez 25 µl de **Proteinase K** vers un nouveau Safe-Lock-Tube de 2,0 ml, pipetez 400 µl, ou **800 µl pour les échantillons stabilisés**, du surnageant de l'étape 3 dans un Safe-Lock-Tube contenant de la **Proteinase K** ; mélangez brièvement au vortex. Faites incuber pendant 10 minutes à 70° C et agitez continuellement à 900 rpm.

Liaison d'ADN génomique

5. Ajoutez au lysat 200 µl de **Binding Buffer A** ou **400 µl de Binding Buffer A pour les échantillons stabilisés** ; mélangez brièvement au vortex ou en pipétant plusieurs fois vers le haut et vers le bas

Prenez un RTA Spin Filter Set Transférez entièrement le mélange, **en deux étapes pour les échantillons stabilisés**, vers le RTA Spin Filter.

Fermez le RTA Spin Filter et faites incuber pendant 1 minute à température ambiante.

Centrifugez pendant 2 minutes à 11 000 x g. Jetez le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube de 2,0 ml.

Lavage destiné à éliminer des contaminations résiduelles

6. Ajoutez 500 µl de **Wash Buffer I**, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g. Jetez le filtrat, et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube de 2,0 ml

7. Ajoutez 700 µl de **Wash Buffer II**, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g. Jetez le filtrat et **remettez** le RTA Spin Filter dans le RTA Receiver Tube de 2,0 ml

8. Centrifugez pendant 4 minutes à vitesse maximale en vue d'éliminer entièrement l'éthanol.

Jetez le RTA Receiver Tube

Éluer l'ADN

9. Placez le RTA Spin Filter dans un Receiver Tube de 1,5 ml. Ajoutez 100 à 200 µl de l'**Elution Buffer préchauffé (70° C)**

Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante

Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue d'éluer l'ADN. Jetez le RTA Spin Filter

3.5 Protocole 1 : Isolation d'ADN à partir d'échantillons de selles frais ou congelés

1. Pesez 200 mg d'échantillons de selles (frais ou congelés) dans un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml, et ajoutez 1,2 ml de **Stool DNA Stabilizer** à chaque échantillon. Mélangez vigoureusement au vortex pendant 1 minute ; utilisez également la même quantité de **Stool DNA Stabilizer** pour de plus petits volumes d'échantillons.
 - a) **Isolation d'ADN hôte**
Faites incuber pendant 10 minutes à température ambiante et agitez continuellement à 900 rpm.
Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue de pastiller les particules de selles solides.
 - b) **Isolation d'ADN bactérien**
Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C et agitez continuellement à 900 rpm.
Ajoutez 5 **Zirconia Beads II** au homogénat, et mélangez au vortex pendant 2 minutes.
Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue de pastiller les particules de selles solides et les billes.
 - c) **Isolation d'ADN à partir de bactéries difficiles à lyser**
Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C et agitez continuellement à 900 rpm.
Faites incuber pendant 3 minutes sur de la glace.
Ajoutez 5 **Zirconia Beads II** au homogénat, et faites incuber pendant 3 minutes à 95° C.
Mélangez l'échantillon au vortex pendant 2 minutes, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue de pastiller les particules de selles solides et les billes.
2. Transférez le surnageant vers un **InviAdsorb-Tube**, et mélangez vigoureusement au vortex pendant 15 secondes.
Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante.
Centrifugez pendant 3 minutes à pleine vitesse.
3. Transférez entièrement le surnageant vers un nouveau Receiver Tube de 1,5 ml ; jetez le culot avec l'**InviAdsorb**.
Centrifugez pendant 3 minutes à pleine vitesse.
4. Transférez 25 µl de **Proteinase K** vers un nouveau Safe-Lock-Tube de 2,0 ml, pipetez 400 µl du surnageant provenant de l'étape 3 dans un Safe-Lock-Tube contenant de la **Proteinase K** et mélangez brièvement au vortex.
Faites incuber pendant 10 minutes à 70° C et agitez continuellement à 900 rpm.
5. Ajoutez 200 µl de **Binding Buffer A** au lysat ; mélangez brièvement au vortex ou en pipetant plusieurs fois vers le haut et vers le bas.
Prenez un RTA Spin Filter Set. Transférez entièrement le mélange vers le RTA Spin Filter
Fermez le RTA Spin Filter et faites incuber pendant 1 minute à température ambiante.
Centrifugez pendant 2 minutes à 11 000 x g.
Jetez le filtrat et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube de 2,0 ml.
6. Ajoutez 500 µl de **Wash Buffer I** et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.
Jetez le filtrat et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube de 2,0 ml.

7. Ajoutez 700 µl de **Wash Buffer II** et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g. Jetez le filtrat et **remettez** le RTA Spin Filter dans le RTA Receiver Tube de 2,0 ml.
8. Centrifugez pendant 4 minutes à vitesse maximale en vue d'éliminer entièrement l'éthanol. Jetez le RTA Receiver Tube.
9. Placez le RTA Spin Filter dans un Receiver Tube de 1,5 ml. Ajoutez 100 à 200 µl de **l'Elution Buffer préchauffé (70° C)**. Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante. Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue d'éluer l'ADN. Jetez le RTA Spin Filter.

Remarque : *On peut également éluer l'ADN dans un volume inférieur d'Elution Buffer (en fonction du rendement escompté). Le volume d'élution minimum est de 50 µl ; veuillez tenir compte du fait qu'utiliser un faible volume d'élution est susceptible de réduire le rendement maximum. Si l'on escompte une grande quantité d'ADN, on peut également augmenter le volume d'élution.*

Remarque : *Pour un entreposage de longue durée, nous recommandons de conserver l'ADN élué à -20° C.*

3.6 Protocole 2 : Isolation d'ADN à partir d'échantillons de selles stabilisés

1. Recueillez l'échantillon avec le **Stool Collection Tube with DNA Stabilizer**.
Transférez après l'entreposage ou directement après l'échantillonnage 1,4 ml de l'échantillon de selles bien homogénéisé du Collection Tube vers un Safe-Lock-Tube de 2,0 ml.
 - a) **Isolation d'ADN hôte**
Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue de pastiller les particules de selles solides.
 - b) **Isolation d'ADN bactérien**
Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C et agitez continuellement à 900 rpm.
Ajoutez 5 **Zirconia Beads II** au homogénat, et mélangez au vortex pendant 2 minutes.
Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue de pastiller les particules de selles solides et les billes.
 - c) **Isolation d'ADN à partir de bactéries difficiles à lyser**
Faites incuber pendant 10 minutes à 95° C et agitez continuellement à 900 rpm.
Faites incuber pendant 3 minutes sur de la glace.
Ajoutez 5 **Zirconia Beads II** au homogénat
Faites incuber pendant 3 minutes à 95° C.
Mélangez l'échantillon au vortex pendant 2 minutes, et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue de pastiller les particules de selles solides et les billes.
2. Transférez le surnageant vers un **InviAdsorb-Tube**, et mélangez vigoureusement au vortex pendant 15 secondes.
Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante.
Centrifugez pendant 3 minutes à pleine vitesse.
3. Transférez entièrement le surnageant vers un nouveau Receiver Tube de 1,5 ml ; jetez le culot avec l'**InviAdsorb**.
Centrifugez pendant 3 minutes à pleine vitesse.
4. Transférez 25 µl de **Proteinase K** vers un nouveau Safe-Lock-Tube de 2,0 ml, pipetez 800 µl du surnageant provenant de l'étape 3 dans un Safe-Lock-Tube contenant de la **Proteinase K** et mélangez brièvement au vortex.
Faites incuber pendant 10 minutes à 70° C et agitez continuellement à 900 rpm.
5. Ajoutez 400 µl de **Binding Buffer A** au lysat ; mélangez brièvement au vortex ou en pipetant plusieurs fois vers le haut et vers le bas.
Prenez un RTA Spin Filter Set. Transférez entièrement le mélange, **en deux étapes**, vers le RTA Spin Filter..
Fermez le RTA Spin Filter et faites incuber pendant 1 minute à température ambiante.
Centrifugez pendant 2 minutes à 11 000 x g.
Jetez le filtrat et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube de 2,0 ml.
6. Ajoutez 500 µl de **Wash Buffer I** et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.
Jetez le filtrat et placez le RTA Spin Filter dans un nouveau RTA Receiver Tube de 2,0 ml.
7. Ajoutez 700 µl de **Wash Buffer II** et centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g.
Jetez le filtrat et **remettez** le RTA Spin Filter dans le RTA Receiver Tube de 2,0 ml.

8. Centrifugez pendant 4 minutes à vitesse maximale en vue d'éliminer entièrement l'éthanol.
Jetez le RTA Receiver Tube.
9. Placez le RTA Spin Filter dans un Receiver Tube de 1,5 ml. Ajoutez 100 à 200 µl de l'**Elution Buffer préchauffé (70° C)**.
Faites incuber pendant 1 minute à température ambiante.
Centrifugez pendant 1 minute à 11 000 x g en vue d'éluer l'ADN. Jetez le RTA Spin Filter.

Remarque : *On peut également éluer l'ADN dans un volume inférieur d'Elution Buffer (en fonction du rendement escompté). Le volume d'élution minimum est de 50 µl ; veuillez tenir compte du fait qu'utiliser un faible volume d'élution est susceptible de réduire le rendement maximum. Si l'on escompte une grande quantité d'ADN, on peut également augmenter le volume d'élution.*

Remarque : *Pour un entreposage de longue durée, nous recommandons de conserver l'ADN élué à -20° C.*

4. Annexe

4.1 Résolution de problèmes

Problème	Cause possible	Préconisations
RTA Spin Filter bouché	Lyse cellulaire insuffisante et/ou trop de matière première	Augmentez la durée de la lyse Augmentez la vitesse de centrifugation Diminuez la quantité de matière première
Contamination du RNA	Le RTA Spin Filter peut purifier de faibles quantités de RNA	Ajoutez 20 µl de RNase A (10 mg/ml), et faites incuber pendant 10 minutes avant d'ajouter un Binding Buffer A.
Faible quantité d'acides nucléiques	Insuffisance de la lyse cellulaire	Augmentez la durée de la lyse Réduisez la quantité de matière première en vue d'éviter une surcharge des colonnes Prolongez la durée d'incubation à 95° C ; utilisez des Zirconia Beads
	Élution incomplète	Augmentez la durée d'incubation avec un Élution Buffer préchauffé à 5 minutes Éluez deux fois avec un Elution Buffer de 100 µl Utilisez un volume plus élevé d' Elution Buffer
	Faible concentration d'acides nucléiques dans l'échantillon	Éluez l'ADN avec un volume plus faible d' Elution Buffer ; n'utilisez pas des volumes inférieurs à 50 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 Buffers ont été mal préparés	Veillez vous assurer que ce soit la bonne quantité d'éthanol/d'isopropanol qui est ajoutée aux Buffers et que toutes les solutions soient entreposées en étant bien fermées.
	Homogénéisation insuffisante de l'échantillon et du Stool DNA Stabilizer	Répétez la procédure de purification d'ADN avec un nouvel échantillon. Veillez à mélanger l'échantillon dans le Stool DNA Stabilizer jusqu'à ce que l'échantillon soit soigneusement homogénéisé. Pour procéder à l'homogénéisation, utilisez des Zirconia Beads II et mélangez au vortex.
	Mélange insuffisant de l'échantillon avec le Binding Buffer A	Mélangez correctement l'échantillon par pipetage avant de transférer l'échantillon vers la membrane du RTA Spin Filter.
Acides nucléiques dégradés/faible ratio A₂₆₀/A₂₈₀	Élimination inefficace de substances à effet inhibiteur due à un mélange insuffisant avec la matrice InviAdsorb	Répétez la procédure de purification d'ADN avec un nouvel échantillon. Veillez à mélanger l'échantillon et la matrice InviAdsorb jusqu'à ce que l'échantillon soit soigneusement homogénéisé.
	Diminution de l'activité de la protéinase	Répétez la procédure de purification d'ADN avec un nouvel échantillon et avec de la Protéinase K. Veillez pour les cas difficiles utiliser le double volume de Protéinase K.
	Wash Buffer I et Wash Buffer II utilisés dans le mauvais ordre	Veillez à ce que le Wash Buffer I et le Wash Buffer II soient utilisés dans le bon ordre prévu dans le protocole.

Les acides nucléiques ne présentent pas une bonne performance dans le cadre d'applications en aval (par ex. PCR ou NGS en temps réel)	Pour la réaction en aval, on a utilisé une trop grande quantité d'ADN	L'ADN extrait peut provenir de différents organismes présents dans l'échantillon de selles original (par ex. humains, animaux, végétaux, bactériens). Réduisez la quantité d'éluat ou diluez l'échantillon utilisé dans le cadre de la réaction en aval.
	Insuffisance de la lyse cellulaire	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
PSP® Spin Stool DNA Basic Kit	50 préparations	1038120200
PSP® Spin Stool DNA Basic Kit	250 préparations	1038120300

Pour la lyse d'échantillons :

Produit	Taille de l'emballage	N° de catalogue
Stool DNA Stabilizer*)	180 ml	1038111100
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	50 tubes	1038111200
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	250 tubes	1038111300

***) Pour 50 réactions, une bouteille de Stool DNA Stabilizer est appropriée, alors que l'on a besoin de deux bouteilles pour 250 réactions.**

Historique des révisions

Révision	Date	Description
FR-v1-2022	2022-06-15	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>

2022-06-15 FR-v1-2022