

MANUEL TECHNIQUE

Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit

Mode d'emploi du produit
AS1850

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

Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit

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

1. Description.....	2
2. Composants du produit, conditions de stockage et légende des symboles	3
3. Destination/Usage prévu du produit	5
4. Limites d'utilisation du produit	5
5. Avant de commencer	5
5.A. Préparation d'échantillons de sang total et de couche leucocytaire	6
5.B. Préparation d'échantillons d'aspirat de moelle osseuse	7
5.C. Préparation d'échantillons d'agglomérats de cellules	8
5.D. Préparation de lysats à partir d'échantillons de sang total, de couche leucocytaire, de moelle osseuse et d'agglomérats de cellules.....	9
5.E. Préparation de lysats à partir d'échantillons de tissus	10
5.F. Préparation de lysats à partir d'échantillons d'écouvillons buccaux	11
5.G. Préparation de la Maxwell [®] CSC Genomic DNA Cartridge.....	13
6. Fonctionnement de l'appareil Maxwell [®]	15
7. Après la purification	17
8. Évaluation des performances analytiques	17
8.A. Rendement de l'ADN	17
8.B. Qualité de l'ADN (pureté)	23
8.C. Reproductibilité	30
8.D. Amplificabilité.....	31
8.E. Inhibition (substances interférentes).....	40
8.F. Contamination croisée	46
9. Évaluation des performances cliniques	47
10. Dépannage	48
11. Produits apparentés	51

Le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit n'est disponible que dans certains pays.

1. Description

Le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit^(a) est utilisé avec les appareils Maxwell® spécifiés dans le Tableau 1 pour offrir une méthode facile de préparation des échantillons et de purification de l'ADN génomique (ADNg) issu de divers échantillons biologiques humains, de manière automatique et efficace. Les appareils Maxwell® CSC Instrument sont conçus pour être utilisés avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des méthodes de purification préprogrammées, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. La méthode Maxwell® pour le CSC Genomic DNA Kit peut traiter d'un au nombre maximum d'échantillons de l'appareil Maxwell® CSC Instrument en 40 minutes. L'ADN purifié peut être utilisé directement dans différentes applications en aval, comme les essais PCR.

Tableau 1. Appareils pris en charge.

Appareil	Cat.#	Manuel technique	Nombre maximal d'échantillons
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

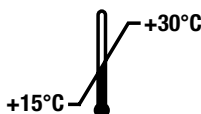
Principe de la méthode

Le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit purifie l'acide nucléique dans des échantillons 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'ADNg. Les appareils Maxwell® sont des appareils magnétiques de traitement des particules qui permettent la fixation efficace des acides nucléiques aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie. Les échantillons sont traités par une série de lavages avant l'élution de l'ADNg. Cette approche de la capture magnétique évite des problèmes courants, 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 Genomic DNA Kit	48 préparations	AS1850

Pour diagnostic in vitro. Usage professionnel uniquement. Contient une quantité suffisante de réactifs pour 48 isolements automatisés à partir de divers échantillons biologiques humains. Les cartouches sont à usage unique.



Inclut :

- 2 × 1 ml Solution de protéinase K (PK)
- 1 ml Solution de RNase A
- 20 ml Tampon de lyse
- 20 ml Amplificateur lytique (LE2)
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 50 Tubes d'éluion (0,5 ml)
- 20 ml Tampon d'éluion

Conditions de stockage : conservez le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit entre +15 °C et +30 °C.



Informations relatives à la sécurité : les Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ) contiennent de l'éthanol et de l'isopropanol. Ces substances doivent être considérées comme inflammables, nocives et irritantes. Vous trouverez des informations détaillées relatives à la sécurité dans la fiche de données de sécurité (SDS). Suivez les directives de l'établissement concernant la manipulation et l'élimination de tout déchet chimique utilisé en conjonction avec ce système.



Les Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ) sont conçues pour être utilisées avec des substances potentiellement infectieuses. Portez une protection appropriée (ex : gants et lunettes de sécurité) 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.



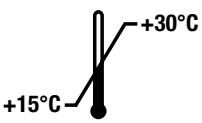















Mise en garde : manipulez les cartouches avec précaution ; les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

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

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

Légende des symboles

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

3. Destination/Usage prévu du produit

Le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit est conçu pour être utilisé en conjonction avec les appareils Maxwell® CSC Instrument et les méthodes de purification Maxwell® CSC et Maxwell® CSC 48 Genomic DNA comme dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) pour isoler l'ADN génomique automatiquement à partir de divers échantillons biologiques humains. L'ADN génomique purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit est destiné à être utilisé à une température comprise entre 15 et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut produire des résultats sous-optimaux.

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

4. Limites d'utilisation du produit

Le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit a été validé avec des échantillons de sang total humain, de couche leucocytaire, de moelle osseuse, d'écouvillons buccaux, de tissus et de cellules. L'utilisateur est tenu de valider son utilisation pour extraire l'ADN d'autres types d'échantillons.

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

5. Avant de commencer

Matériel à fournir par l'utilisateur

- vortex de paillasse
- pipettes et cônes de pipettes pour le transfert d'échantillons dans des cartouches de réactifs préremplies
- des tubes de 1,5 à 2,0 ml pour l'incubation des échantillons sont recommandés (ex : microtubes, 1,5 ml [Cat.# V1231]). Les autres types de tubes doivent être évalués par le laboratoire.
- bloc chauffant sec, bain d'eau ou mélangeur thermique réglé sur 56 °C
- eau désionisée ou Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191) pour échantillons d'agglomérats de cellules (Section 5.C) et de tissus (Section 5.E)
- 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) pour échantillons d'agglomérats de cellules préparés à partir d'urine (Section 5.C)
- **facultatif** : Clearing Columns (Cat.# Z3871) pour échantillons d'écouvillons buccaux (Section 5.F)
- **facultatif** : mélangeur de tubes rotatif

5.A. Préparation d'échantillons de sang total et de couche leucocytaire

Capacité de traitement d'échantillons

Le rendement total de l'ADN génomique issu d'échantillons de sang total et de couche leucocytaire dépend du volume de l'échantillon et de la quantité de leucocytes par millilitre. Il est possible d'utiliser une plage de volume de 50 à 300 µl pour ces types d'échantillons. Pendant le développement, le sang total et la couche leucocytaire préparée à partir de sang total avec une plage de 4×10^6 à 10×10^6 leucocytes/ml ont été testés et ont présenté des performances acceptables. Les échantillons en dehors de cette plage peuvent être compatibles avec le procédé chimique d'extraction, mais les performances d'extraction et la compatibilité avec les essais en aval doivent être évaluées par le laboratoire.

Une plage de volume d'élution comprise entre 50 et 200 µl peut être utilisée pour les échantillons de sang total. Comme les échantillons de couche leucocytaire produisent généralement une grande quantité d'ADN génomique, nous recommandons d'éluer avec 200 µl pour obtenir l'élution la plus efficace. Il est possible d'utiliser des volumes d'élution de 50 à 200 µl avec les échantillons de couche leucocytaire, mais des volumes inférieurs à 200 µl risquent de ne pas fournir de résultats optimaux.

Remarques :

- a. Ce kit a été testé avec des échantillons de sang total humain et de couche leucocytaire préparée à partir de sang total humain recueillis dans des tubes d'EDTA, de citrate ou d'héparine. L'utilisateur devrait évaluer les performances de ce kit avec d'autres types de tubes de sang.
 - b. Ce kit a été testé avec des échantillons de sang et de couche leucocytaire stockés dans les conditions suivantes : entre 15 et 30 °C pendant jusqu'à 72 heures, entre 2 et 10 °C pendant jusqu'à 7 jours ou à -65 °C ou moins avant la purification de l'ADN. D'autres conditions de stockage des échantillons peuvent fournir des performances acceptables, mais le laboratoire devrait les évaluer. Les échantillons congelés doivent être complètement décongelés avant leur traitement. Tous les échantillons de sang et de couche leucocytaire doivent être bien mélangés avant d'être utilisés.
1. Mélangez tous les échantillons de sang ou de couche leucocytaire pendant au moins 5 minutes entre 15 et 30 °C. Vous pouvez utiliser pour cela un mélangeur de tubes rotatif ou mélanger de manière intermittente avec un vortex.
 2. Vous trouverez les instructions de préparation du lysat à la section 5.D.

5.B. Préparation d'échantillons d'aspirat de moelle osseuse

Capacité de traitement d'échantillons

Le rendement de l'ADN génomique total des échantillons d'aspirat de moelle osseuse dépend du nombre total de cellules traité. Pendant le développement, des échantillons d'aspirat de moelle osseuse sur une plage de volume comprise entre 50 et 300 µl ont été testés et ont présenté des performances acceptables. Les échantillons en dehors de cette plage peuvent être compatibles avec le procédé chimique d'extraction, mais les performances d'extraction et la compatibilité avec les essais en aval doivent être évaluées par le laboratoire.

Comme les échantillons d'aspirat de moelle osseuse produisent généralement une grande quantité d'ADN génomique, nous recommandons d'éluer avec 200 µl pour obtenir l'élution la plus efficace. Il est possible d'utiliser des volumes d'élution de 50 à 200 µl avec les échantillons de moelle osseuse, mais des volumes inférieurs à 200 µl risquent de ne pas fournir de résultats optimaux.

Remarques :

- a. Ce kit a été testé avec des échantillons d'aspirat de moelle osseuse humaine recueillis dans des tubes d'EDTA, de citrate ou d'héparine. L'utilisateur devrait évaluer les performances de ce kit avec d'autres types de tubes de sang.
 - b. Ce kit a été testé avec des échantillons d'aspirat de moelle osseuse humaine stockés congelés (à -65 °C ou moins) avant la purification de l'ADN. D'autres conditions de stockage des échantillons peuvent fournir des performances acceptables, mais le laboratoire devrait les évaluer. Les échantillons congelés doivent être complètement décongelés avant leur traitement. Tous les échantillons d'aspirat de moelle osseuse doivent être bien mélangés avant d'être utilisés.
1. Mélangez tous les échantillons d'aspirat de moelle osseuse pendant au moins 30 minutes entre 15 et 30 °C avec un mélangeur de tubes rotatif ou de manière intermittente avec un vortex.
 2. Vous trouverez les instructions de préparation du lysat à la section 5.D.

5.C. Préparation d'échantillons d'agglomérats de cellules

Capacité de traitement d'échantillons

Les agglomérats de cellules peuvent être produits à partir de différents types d'échantillons, y compris des fluides biologiques (ex : urine ou liquide amniotique), de cellules purifiées (ex : cellules mononuclées de sang périphérique) ou de cellules en culture. La centrifugation de l'échantillon permet de produire un agglomérat de cellules et cet agglomérat est remis en suspension dans 300 µl de Nuclease-Free Water. Le rendement de l'ADN génomique total à partir d'échantillons d'agglomérat de cellules dépend du nombre de cellules présentes dans l'échantillon. Pendant le développement, des agglomérats de jusqu'à 5×10^6 cellules ont été testés (voir Tableau 2) et ont présenté des performances acceptables. Les échantillons en dehors de cette plage peuvent être compatibles avec le procédé chimique d'extraction, mais les performances d'extraction et la compatibilité avec les essais en aval doivent être évaluées par le laboratoire.

Tableau 2. Les types d'échantillons d'agglomérat de cellules évalués.

Type d'échantillon	Plage d'échantillons testée	Volume d'élution suggéré
Urine	15 à 50 ml	50 µl
Liquide amniotique	1 à 5 ml	50 µl
Cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC)	5×10^4 – 5×10^6 cellules	50 à 200 µl
Cellules en culture	5×10^2 – 5×10^6 cellules	50 à 200 µl

Pour les échantillons d'agglomérat de cellules, utilisez un volume d'élution compris entre 50 et 200 µl. Lors du traitement d'échantillons qui produisent peu de cellules dans l'agglomérat, nous recommandons d'utiliser un volume d'élution de 50 µl. Pour les échantillons avec plus de cellules, un volume d'élution supérieur peut produire des rendements d'ADN génomique supérieurs. Les laboratoires devraient confirmer que le volume d'élution pour un type d'échantillon d'agglomérat de cellules donné offre une pureté et une concentration suffisantes pour l'essai en aval.

Remarques :

- Ce kit a été testé avec des échantillons d'agglomérat de cellules traités immédiatement après la production d'un agglomérat de cellules et stockés congelés (à -65 °C ou moins) avant la purification de l'ADN. D'autres conditions de stockage des échantillons peuvent fournir des performances acceptables, mais le laboratoire devrait les évaluer. Les échantillons congelés doivent être complètement décongelés avant leur traitement.
- Si vous souhaitez congeler les échantillons, ils doivent être stockés congelés après la production de l'agglomérat de cellules. L'utilisation d'un agglomérat de cellules issu d'un échantillon qui a été congelé et décongelé peut entraîner une baisse des performances.

1. Centrifugez le volume d'échantillon souhaité à une vitesse minimale de $2\,000 \times g$ pendant 20 minutes pour produire un agglomérat de cellules.
 - a. Pour les échantillons d'urine, lavez l'agglomérat de cellules en remettant en suspension dans 750 µl de 1X PBS.
 - b. Centrifugez l'échantillon mis en suspension dans PBS pour produire un agglomérat de cellules.
2. Décantez ou aspirez le liquide dans les cellules agglomérées. Remettez l'agglomérat en suspension dans 300 µl de Nuclease-Free Water.
3. Vous trouverez les instructions de préparation du lysat à la section 5.D.

5.D. Préparation de lysats à partir d'échantillons de sang total, de couche leucocytaire, de moelle osseuse et d'agglomérats de cellules

1. Préparez et étiquetez tous les tubes d'incubation qui seront placés dans un bloc chauffant réglé sur 56 °C.
2. Ajoutez 30 µl de solution de protéinase K (PK) à chaque tube d'incubation.
3. Transférez le volume d'échantillon souhaité dans chaque tube d'incubation. Remplacez les cônes de pipettes entre chaque transfert d'échantillon pour éviter toute contamination croisée.
Remarque : le transfert de produit grumeleux, gras ou d'une autre matière solide dans le tube d'incubation peut entraîner une mauvaise lyse des échantillons. Ne transférez dans le tube d'incubation que des échantillons liquides.
4. Bouchez et vortexez chaque tube à la vitesse maximale pendant 10 secondes.
5. Ajoutez 300 µl d'amplificateur lytique (LE2) à chaque tube d'incubation. Remplacez les cônes de pipettes après chaque distribution d'amplificateur lytique (LE2) pour éviter toute contamination croisée.
Remarque : passez à l'étape 6 sans mélanger ni vortexer.
6. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse à chaque tube d'incubation. Remplacez les cônes de pipettes après chaque distribution du tampon de lyse pour éviter toute contamination croisée.
7. Bouchez et vortexez chaque tube à la vitesse maximale pendant 10 secondes.
Remarque : confirmez que vous avez obtenu un lysat homogène en vortexant.
8. Incubez chaque tube dans le bloc chauffant à 56 °C pendant 20 minutes. Pendant cette incubation, préparez les Maxwell[®] CSC Cartridges comme indiqué à la Section 5.G.
9. Vortexez chaque tube à la vitesse maximale pendant 10 secondes.
10. Transférez chaque échantillon de lysat du tube d'incubation au puits n°1 d'une cartouche distincte et mélangez bien avec la solution de fixation dans le puits n°1 en aspirant et en distribuant 5 à 10 fois après le transfert pour produire un mélange homogène (le puits n°1 est le plus grand de la cartouche). Remplacez les cônes de pipettes entre chaque transfert d'échantillon pour éviter toute contamination croisée des échantillons.
Remarque : le rendement et la pureté de l'éluat final peuvent diminuer si vous ne créez pas un mélange homogène de lysat d'échantillon et de solution de fixation dans le puits n°1 de la cartouche.

5.E. Préparation de lysats à partir d'échantillons de tissus

Capacité de traitement d'échantillons

Le rendement de l'ADN génomique total des échantillons de tissus dépend de la masse et du type de tissu traité. Il est possible d'utiliser une plage d'échantillons de tissus comprise entre 5 et 50 mg. Pendant le développement, des échantillons de tissus cardiaques, du cœur, du pancréas et du cerveau ont été évalués à titre d'exemples et ont présenté des performances acceptables. Une plage de types de tissus plus large peut être compatible avec le procédé chimique d'extraction, mais les performances d'extraction et la compatibilité avec les essais en aval doivent être évaluées par le laboratoire.

Une plage de volume d'élution comprise entre 50 et 200 µl peut être utilisée pour les échantillons de tissus. Le volume de tampon d'élution à utiliser dépend de la masse et du type de tissu traité. Les laboratoires doivent évaluer les volumes d'élution offrant des performances acceptables dans leurs essais en aval pour la masse et les types de tissus traités.

Remarque : ce kit a été testé avec des échantillons de tissus stockés congelés (à -65 °C ou moins) avant la purification de l'ADN. D'autres conditions de stockage des échantillons peuvent fournir des performances acceptables, mais le laboratoire devrait les évaluer. Les échantillons congelés doivent être complètement décongelés avant leur traitement.

1. Pour lyser des échantillons de tissus, réglez la température d'un bloc chauffant sec, d'un bain d'eau ou d'un mélangeur thermique à 56 °C. Préparez et étiquetez des tubes d'incubation qui seront placés dans l'option de chauffage souhaitée.
2. Transférez de 5 à 50 mg de tissu dans chaque tube. La découpe des tissus en plus petits fragments peut accélérer la lyse. Centrifugez le tube à vitesse maximale pendant 15 secondes pour recueillir les morceaux de tissus au fond du tube.
3. Ajoutez 300 µl de Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191 ou équivalente) dans chaque tube d'incubation.
4. Ajoutez 30 µl de solution de protéinase K (PK) à chaque tube d'incubation. Remplacez les cônes de pipettes après chaque distribution de solution de protéinase K (PK) pour éviter toute contamination croisée.
5. Bouchez et vortexez chaque tube à la vitesse maximale pendant 10 secondes.
6. Ajoutez 300 µl d'amplificateur lytique (LE2) à chaque tube d'incubation. Remplacez les cônes de pipettes après chaque distribution d'amplificateur lytique (LE2) pour éviter toute contamination croisée.
7. Bouchez et vortexez chaque tube à la vitesse maximale pendant 10 secondes.
8. Incubez chaque tube à 56 °C en utilisant l'une des options suivantes :
 - a. Avec un mélangeur thermique, utilisez une grande vitesse de mélange (ex : 1 500 tr/min) pendant jusqu'à 2 heures.
 - b. Avec un bloc chauffant sec ou un réchauffeur de bain chaud, utilisez sans mélanger pendant au moins 16 heures.
9. Vortexez chaque tube à la vitesse maximale pendant 10 secondes.
10. Centrifugez chaque tube à la vitesse maximale dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes afin d'agglomérer tout produit non digéré.

11. Transférez le surnageant de chaque tube d'incubation dans un nouveau tube. Évitez de transférer tout produit aggloméré. Si une couche grasse distincte apparaît au-dessus de l'échantillon après centrifugation, ne transférez pas cette couche dans le nouveau tube.
12. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse à chaque nouveau tube. Remplacez les cônes de pipettes après chaque distribution du tampon de lyse pour éviter toute contamination croisée.
13. Bouchez et vortexez chaque tube à la vitesse maximale pendant 10 secondes.
14. Préparez les cartouches comme indiqué à la Section 5.G.
15. Transférez l'échantillon de lysat de tissus de chaque tube au puits n°1 d'une cartouche distincte et mélangez bien avec la solution de fixation dans le puits n°1 en aspirant et en distribuant au moins 10 fois après le transfert pour produire un mélange homogène (le puits n°1 est le plus grand de la cartouche). Remplacez les cônes de pipettes entre chaque transfert d'échantillon pour éviter toute contamination croisée des échantillons.

Remarques :

- a. Le transfert de l'agglomérat de tissus ou de la couche grasse du tube d'incubation dans le nouveau tube peut produire de mauvais rendements ou niveaux de pureté.
- b. Le rendement et la pureté de l'éluat final peuvent diminuer si vous ne créez pas un mélange homogène de lysat d'échantillon et de solution de fixation dans le puits n°1 de la cartouche.

5.F. Préparation de lysats à partir d'échantillons d'écouvillons buccaux

Capacité de traitement d'échantillons

Le rendement de l'ADN génomique total à partir d'échantillons d'écouvillons buccaux dépend de la qualité du transfert des cellules buccales à l'écouvillon. Pendant le développement, 1 et 2 écouvillons buccaux ont été testés et ont présenté des performances acceptables. Une plage de volume d'éluat comprise entre 50 et 200 µl peut être utilisée pour les échantillons d'écouvillons buccaux. Les laboratoires devraient choisir un volume d'éluat pour des échantillons d'écouvillons buccaux qui offre une pureté et une concentration suffisantes pour l'essai en aval.

Remarque : ce kit a été testé avec des échantillons d'écouvillons buccaux secs stockés entre 15 et 30 °C avant la purification de l'ADN. D'autres conditions de stockage des échantillons peuvent fournir des performances acceptables, mais le laboratoire devrait les évaluer.

1. Préparez et étiquetez des tubes d'incubation de 1,5 et 2,0 ml qui seront placés dans un bloc chauffant réglé sur 56 °C.
2. **Facultatif :** placez une Clearing Column (Cat. # Z3871) dans chaque tube d'incubation.
3. Placez 1 ou 2 têtes d'écouvillons buccaux dans chaque tube d'incubation ou Clearing Column dans chaque tube d'incubation. Retirez la tige de la ou des têtes d'écouvillons buccaux en coupant ou en cassant la tige de l'écouvillon au-dessus de sa tête afin de pouvoir placer le bouchon dans le tube ou la Clearing Column contenant la tête de l'écouvillon.

5.F. Préparation de lysats à partir d'échantillons d'écouvillons buccaux (suite)

4. Dans un autre tube, associez 300 µl d'amplificateur lytique (LE2) à 30 µl de solution de protéinase K (PK) pour chaque échantillon plus un échantillon supplémentaire. Voir le tableau ci-dessous. Par exemple, pour traiter 16 échantillons, créez un Master Mix pour 17 réactions en associant $300 \mu\text{l} \times 17 = 5100 \mu\text{l}$ d'amplificateur lytique (LE2) à $30 \mu\text{l} \times 17 = 510 \mu\text{l}$ de protéinase K.

Réactif	Quantité par réaction	Réactions (nombre d'échantillons + 1)	Total
Amplificateur lytique (LE2)	300 µl	n+1	$300 \times (n+1) \mu\text{l}$
Solution de protéinase K (PK)	30 µl	n+1	$30 \times (n+1) \mu\text{l}$

5. Mélangez la solution amplificateur lytique (LE2)/protéinase K (PK) en renversant le tube au moins 10 fois.
6. Ajoutez 330 µl de solution amplificateur lytique (LE2)/protéinase K (PK) à chaque échantillon et fermez le tube. Remplacez les cônes de pipettes après chaque distribution de solution amplificateur lytique (LE2)/protéinase K (PK) pour éviter toute contamination croisée.
7. Incubez chaque tube à 56 °C pendant 20 minutes. Pendant cette incubation, préparez les cartouches comme indiqué à la Section 5.G.
8. Utilisez l'une des options suivantes pour retirer la ou les têtes d'écouvillons du tube :
- Si vous utilisez une Clearing Column, placez le tube dans une microcentrifugeuse et centrifugez à la vitesse maximale pendant 2 minutes. Retirez le tube de la microcentrifugeuse. Ouvrez le tube et retirez et mettez au rebut la Clearing Column contenant la ou les têtes d'écouvillons.
 - Si vous n'utilisez pas de Clearing Column, utilisez des pinces pour retirer la ou les têtes d'écouvillons du tube, en pinçant délicatement pour éliminer le lysat restant de la ou des têtes d'écouvillons. Mettez au rebut la ou les têtes d'écouvillons. Nettoyez les pinces et changez de gants entre chaque retrait de tête d'écouvillon afin d'éviter toute contamination croisée.
9. Ajoutez 300 µl de tampon de lyse au puits n°1 de chaque cartouche à utiliser (le puits n°1 est le plus grand dans la cartouche).
10. Transférez chaque échantillon de lysat d'écouvillon du tube d'incubation au puits n°1 d'une cartouche distincte et mélangez avec le tampon de lyse et la solution de fixation dans le puits n°1 en aspirant et en distribuant 5 à 10 fois après le transfert pour produire un mélange homogène (le puits n°1 est le plus grand de la cartouche). Remplacez les cônes de pipettes entre chaque transfert d'échantillon pour éviter toute contamination croisée des échantillons.

Remarque : le rendement et la pureté de l'éluat final peuvent diminuer si vous ne créez pas un mélange homogène de lysat d'échantillon, de tampon de lyse et de solution de fixation dans le puits n°1.

5.G. Préparation de la Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches, les plongeurs CSC/RSC et les tubes d'élution (0,5 ml). Les cartouches sont installées dans le ou les plateaux en dehors de l'appareil avant le transfert du ou des plateaux contenant les cartouches et les échantillons dans l'appareil pour être purifiés. Placez chaque cartouche dans le ou les plateaux 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 précaution. Les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

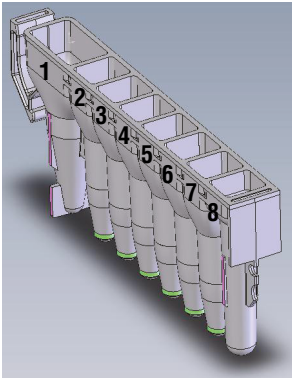
2. Ajoutez 15 µl de solution de RNase A dans le puits n°3 de la Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ).
3. Placez un plongeur dans le puits n°8 de chaque cartouche.
4. Placez un tube d'élution vide à la position du tube d'élution pour chaque cartouche dans le ou les plateaux.
Remarque : utilisez uniquement les tubes d'élution fournis dans le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. Les autres tubes d'élution peuvent être incompatibles avec les appareils Maxwell® CSC Instrument et affecter les performances de purification de l'ADN.
5. Ajoutez 50 à 200 µl de tampon d'élution au fond de chaque tube d'élution.
Remarque : utilisez uniquement le tampon d'élution fourni dans le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. L'utilisation d'autres tampons d'élution peut affecter les performances de la purification de l'ADN.
6. Passez à la Section 6, Utilisation du Maxwell® Instrument.

5.G. Préparation de la Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge (suite)

Remarques relatives à la préparation des cartouches Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge :



Les échantillons ou réactifs renversés sur toute partie du plateau doivent être nettoyés avec une solution d'eau et de détergent, 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.



L'utilisateur ajoute dans les puits

1. Échantillon lysé
3. 15 µl de solution de RNase A
8. Plongeur CSC/RSC

Figure 1. Maxwell® CSC Cartridge. L'échantillon lysé est ajouté dans le puits n°1, 15 µl de solution RNase A sont ajoutés dans le puits n°3 et un plongeur est ajouté dans le puits n°8.



Figure 2. Installation et configuration du ou des plateaux. Un tampon d'élution est ajouté aux tubes d'élution comme indiqué. Le plateau illustré est issu de l'appareil Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

6. Fonctionnement de l'appareil Maxwell®

Vous trouverez des informations détaillées dans le manuel technique spécifique à votre Maxwell® CSC Instrument. Voir le Tableau 1.

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. Touchez **Démarrer** sur l'écran d'Accueil.
3. Scannez ou saisissez le code barres dans l'angle supérieur droit de l'étiquette du Maxwell® CSC Genomic DNA Kit et appuyez sur **OK** pour sélectionner automatiquement la méthode à utiliser (Figure 3).

Remarque : le code barres de méthode du Maxwell® CSC Genomic DNA Kit est requis pour la purification de l'ADN 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 », confirmez que la méthode Maxwell® CSC Genomic DNA est affichée en haut de l'écran. Touchez les positions de cartouches pour sélectionner ou désélectionner toute position à utiliser pour ce cycle d'extraction. Entrez toute information de suivi des échantillons requise et appuyez sur le bouton **Poursuivre**.

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

6. Fonctionnement de l'appareil Maxwell® (suite)

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

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

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

- Touchez le bouton **Démarrer** pour lancer le cycle d'extraction. La plateforme se rétracte et la porte se ferme.



Avertissement : risque de pincement.

Remarque : si vous utilisez un appareil Maxwell® à 48 positions et si le système Vision a été activé, les plateaux seront scannés lors du retrait de la plateforme. 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.

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

Remarques :

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

Fin de cycle

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

10. Retirez le ou les plateaux de l'appareil juste après le cycle pour éviter l'évaporation des éluats. Retirez les tubes d'élution contenant de l'ADN et bouchez les tubes.

Remarque : après la procédure de purification automatique, le ou les plateaux seront chauds. Pour retirer un 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.



11. Retirez les cartouches et les plongeurs du ou des plateaux Maxwell®. Mettez au rebut comme déchet dangereux conformément aux procédures de votre établissement. Ne réutilisez pas les cartouches Maxwell® CSC Cartridges, les plongeurs CSC/RSC ni les tubes d'élution.

7. Après la purification

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

8. Évaluation des performances analytiques

L'évaluation des performances analytiques a été réalisée à l'aide d'échantillons humains avec le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit et les appareils Maxwell® CSC Instrument.

8.A. Rendement de l'ADN

Le rendement de l'ADN a été évalué à l'aide d'ADN purifié avec le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit à partir de sang total humain frais et congelé prélevé dans des tubes d'EDTA ; sang total congelé prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine ; échantillons de couche leucocytaire frais et congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes d'EDTA ; échantillons de couche leucocytaire congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine ; un et deux écouvillons buccaux prétraités avec une Clearing Column ; tissus cardiaques, du pancréas et du cerveau ; cellules en culture de tissus ; et aspirats de moelle osseuse congelés prélevés dans des tubes d'EDTA, de citrate et d'héparine.

Les graphiques et le tableau de cette section représentent le rendement d'absorbance de chaque répétition qui a été purifiée pour chaque type d'échantillon. Chaque point sur les graphiques représente une mesure individuelle sur la gauche alors que la moyenne avec l'écart-type se trouve sur la droite. Chaque ensemble de données inclut au total 12 répétitions, quatre répétitions purifiées avec le Maxwell® CSC Instrument et huit répétitions purifiées avec le Maxwell® CSC 48 Instrument.

Les tableaux sous les légendes de figures décrivent les informations pour chaque ensemble d'échantillons affiché dans les graphiques associés.

8.A. Rendement de l'ADN (suite)

Sang total

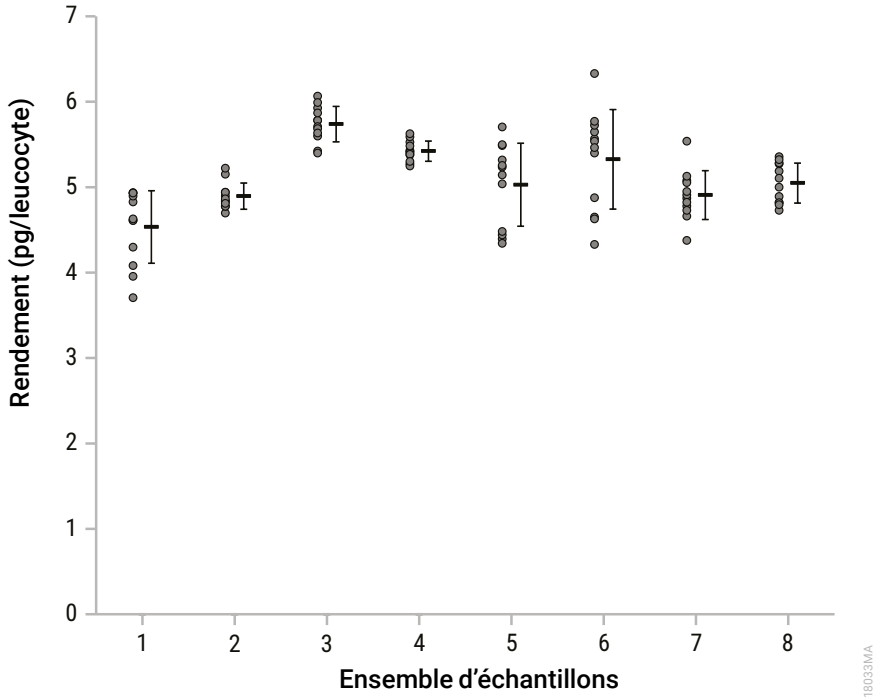


Figure 4. Rendement de l'ADN du sang total. Pour 300 µl d'échantillons de sang total frais et congelé prélevé dans des tubes d'EDTA et d'échantillons de sang total congelé prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, les rendements moyens de l'ADN étaient compris entre 4,5 et 5,7 pg/leucocyte.

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Stockage	Volume d'entrée (µl)	Volume d'éluion (µl)
1	EDTA	Congelé	300	50
2	EDTA	Congelé	300	200
3	EDTA	Frais	300	50
4	EDTA	Frais	300	200
5	Citrate	Congelé	300	50
6	Citrate	Congelé	300	200
7	Héparine	Congelé	300	50
8	Héparine	Congelé	300	200

Couche leucocytaire

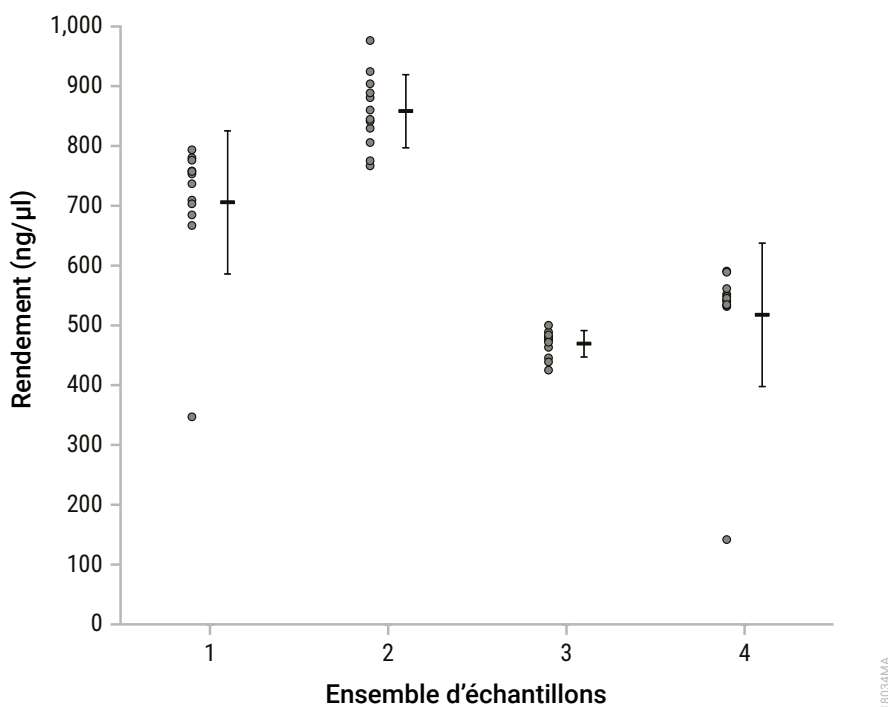


Figure 5. Rendement de l'ADN de la couche leucocytaire. Avec un volume d'entrée de l'échantillon de 300 μl et un volume d'élution de 200 μl pour les échantillons de couche leucocytaire frais et congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes d'EDTA et les échantillons de couche leucocytaire congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, les concentrations d'ADN moyennes étaient comprises entre 469,3 et 858,2 ng/μl.

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Stockage	Volume d'entrée (μl)	Volume d'élution (μl)
1	EDTA	Congelé	300	200
2	EDTA	Frais	300	200
3	Citrate	Congelé	300	200
4	Héparine	Congelé	300	200

8.A. Rendement de l'ADN (suite)

Écouvillon buccal

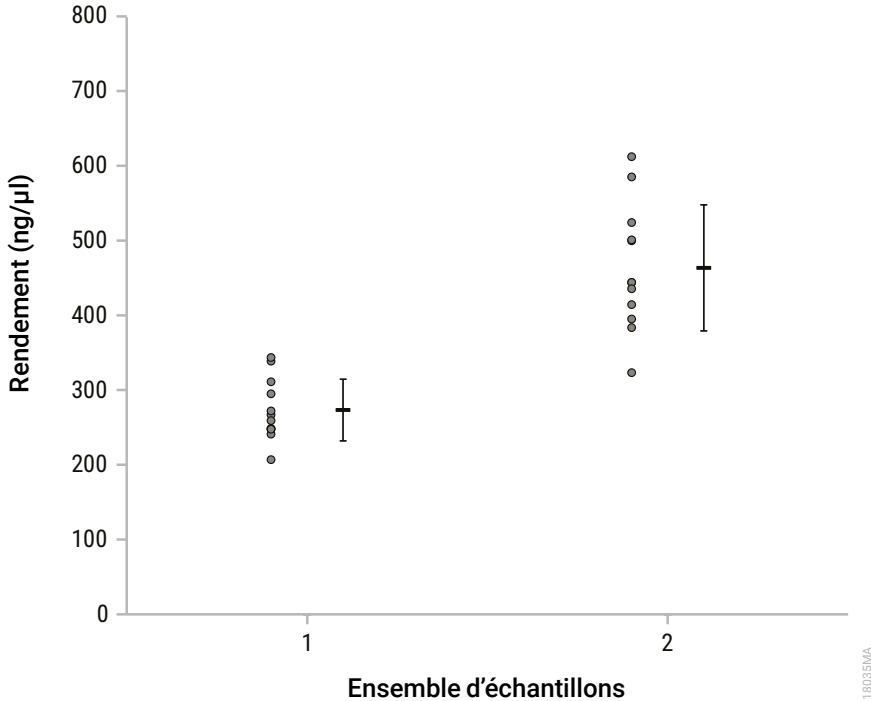


Figure 6. Rendement de l'ADN des écouvillons buccaux. Pour un et deux écouvillons buccaux prétraités avec une Clearing Column, les concentrations d'ADN moyennes étaient comprises entre 273,2 et 463,5 ng/µl. L'ensemble d'échantillons 1 correspond à un écouvillon et l'ensemble d'échantillons 2 correspond à deux écouvillons. Un volume d'éluion de 50 µl a été utilisé pour tous les échantillons.

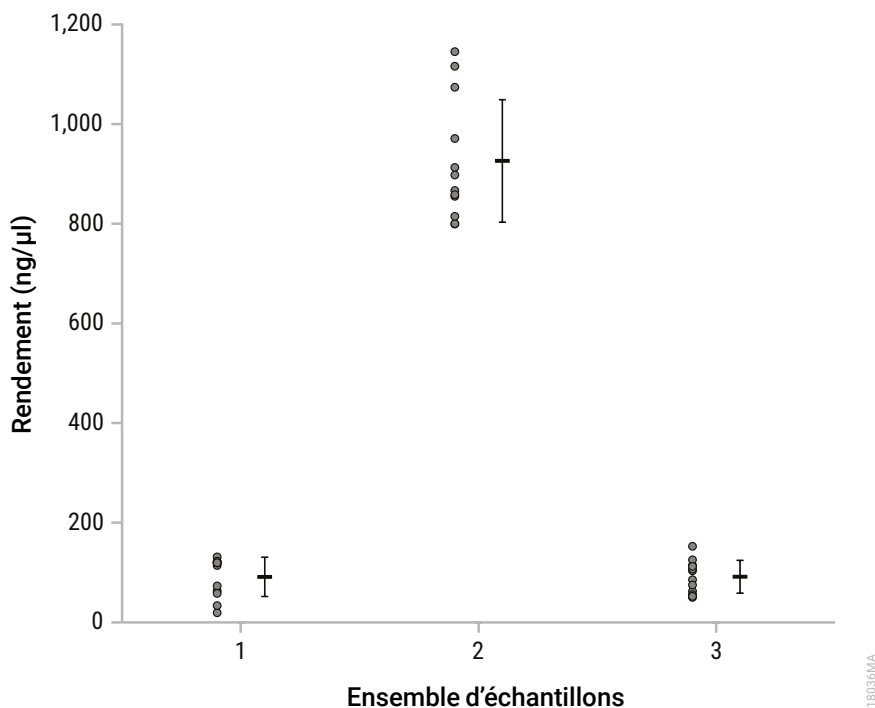
Tissu


Figure 7. Rendement de l'ADN des tissus. Pour 50 mg de tissus cardiaques, du pancréas et du cerveau avec un volume d'éluion de 200 μl, les concentrations moyennes d'ADN étaient comprises entre 91,2 et 926,0 ng/μl. L'ensemble d'échantillons 1 correspond aux tissus cardiaques, l'ensemble d'échantillons 2 correspond aux tissus du pancréas et l'ensemble d'échantillons 3 correspond aux tissus du cerveau.

8.A. Rendement de l'ADN (suite)

Cellules

Pour 5×10^6 cellules en culture de tissus HEK293 avec un volume d'éluion de 200 μl , la concentration moyenne d'ADN était de 550,2 ng/ μl .

Type de cellules	Nombre de cellules d'entrée	Volume d'éluion	Concentration (ng/ μl)
Cellules en culture de tissus HEK293	5×10^6	200 μl	523,4
			526,8
			536,1
			650,1
			481,6
			522,9
			530,4
			618,9
			546,5
			550,1
			569,9
545,4			
Moyenne			550,2

Moelle osseuse

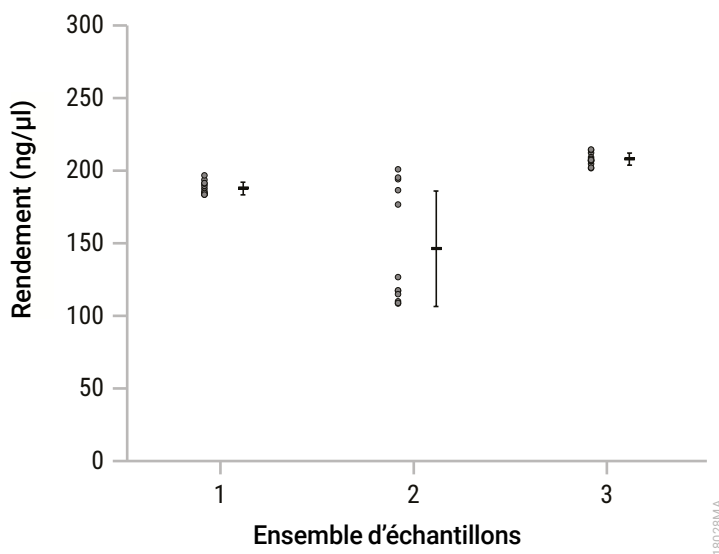


Figure 8. Rendement de l'ADN de la moelle osseuse. Pour 300 μ l d'aspirats de moelle osseuse congelés prélevés dans des tubes d'EDTA, de citrate et d'héparine et avec un volume d'éluion de 200 μ l, les concentrations d'ADN moyennes étaient comprises entre 146,3 et 207,8 ng/ μ l. L'ensemble d'échantillons 1 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'EDTA, l'ensemble d'échantillons 2 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes de citrate et l'ensemble d'échantillons 3 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'héparine.

8.B. Qualité de l'ADN (pureté)

Les puretés de l'ADN ont été évaluées à l'aide d'ADN purifié avec le Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit à partir de sang total humain frais et congelé prélevé dans des tubes d'EDTA, de sang total congelé prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, d'échantillons de couche leucocytaire frais et congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes d'EDTA, d'échantillons de couche leucocytaire congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, d'un et deux écouvillons buccaux prétraités avec une Clearing Column, de tissus cardiaques, du pancréas et du cerveau, de cellules en culture de tissus et aspirats de moelle osseuse congelés prélevés dans des tubes d'EDTA, de citrate et d'héparine.

Les graphiques et le tableau de cette section représentent les ratios d'absorbance et de pureté A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} de chaque répétition qui a été purifiée pour chaque type d'échantillon. Chaque point sur les graphiques représente une mesure individuelle sur la gauche alors que la moyenne avec l'écart-type se trouve sur la droite. Chaque ensemble de données inclut au total 12 répétitions, quatre répétitions purifiées avec le Maxwell[®] CSC Instrument et huit répétitions purifiées avec le Maxwell[®] CSC 48 Instrument.

Les tableaux sous les légendes de figures décrivent les informations pour chaque ensemble d'échantillons affiché dans les graphiques associés.

8.B. Qualité de l'ADN (pureté, suite)

Sang total

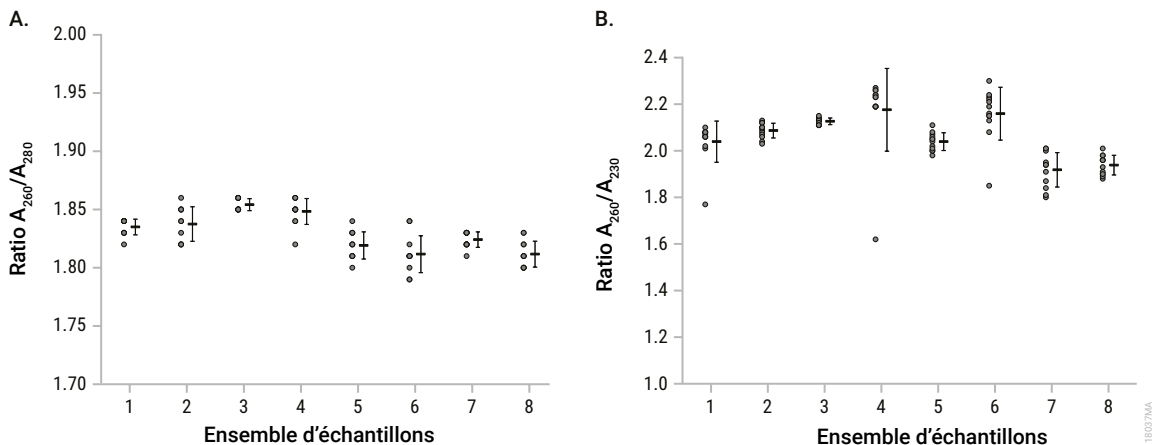


Figure 9. Qualité de l'ADN du sang total. Pour 300 μ l d'échantillons de sang total frais et congelés prélevés dans des tubes d'EDTA et d'échantillons de sang total congelés prélevés dans des tubes de citrate et d'héparine, les ratios A_{260}/A_{280} moyens étaient compris entre 1,8 et 1,9 (**Panneau A**) et les ratios A_{260}/A_{230} moyens étaient compris entre 1,9 et 2,2 (**Panneau B**).

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Stockage	Volume d'entrée (μ l)	Volume d'éluion (μ l)
1	EDTA	Congelé	300	50
2	EDTA	Congelé	300	200
3	EDTA	Frais	300	50
4	EDTA	Frais	300	200
5	Citrate	Congelé	300	50
6	Citrate	Congelé	300	200
7	Héparine	Congelé	300	50
8	Héparine	Congelé	300	200

Couche leucocytaire

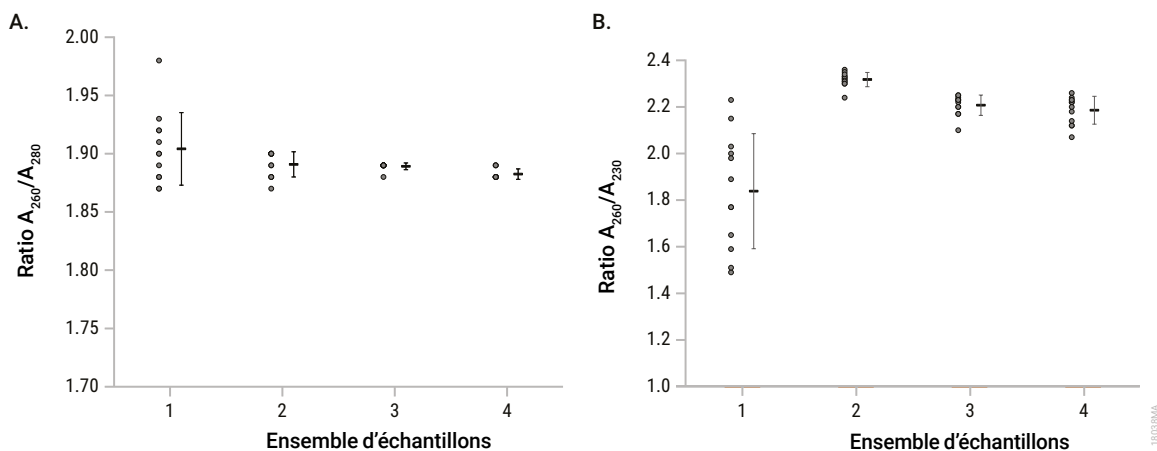


Figure 10. Qualité de l'ADN de la couche leucocytaire. Avec un volume d'entrée de l'échantillon de 300 μ l et un volume d'éluion de 200 μ l pour les échantillons de couche leucocytaire frais et congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes d'EDTA et les échantillons de couche leucocytaire congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, les ratios A_{260}/A_{280} moyens étaient aux alentours de 1,9 (**Panneau A**) et les ratios A_{260}/A_{230} moyens étaient compris entre 1,8 et 2,3 (**Panneau B**).

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Stockage	Volume d'entrée (μ l)	Volume d'éluion (μ l)
1	EDTA	Congelé	300	200
2	EDTA	Frais	300	200
3	Citrate	Congelé	300	200
4	Héparine	Congelé	300	200

8.B. Qualité de l'ADN (pureté, suite)

Écouvillon buccal

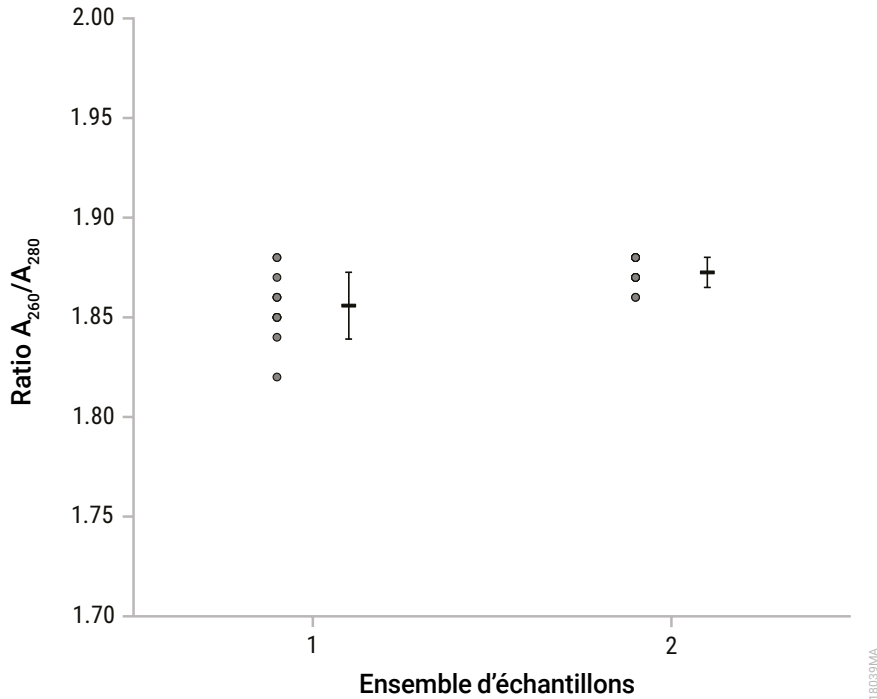


Figure 11. Qualité de l'ADN des écouvillons buccaux. Pour un et deux écouvillons buccaux prétraités avec une Clearing Column et avec un volume d'éluion de 50 μ l, les ratios A_{260}/A_{280} moyens étaient compris entre 1,8 et 1,9. Dans le graphique, l'ensemble d'échantillons 1 correspond à un écouvillon et l'ensemble d'échantillons 2 correspond à deux écouvillons.

Tissu

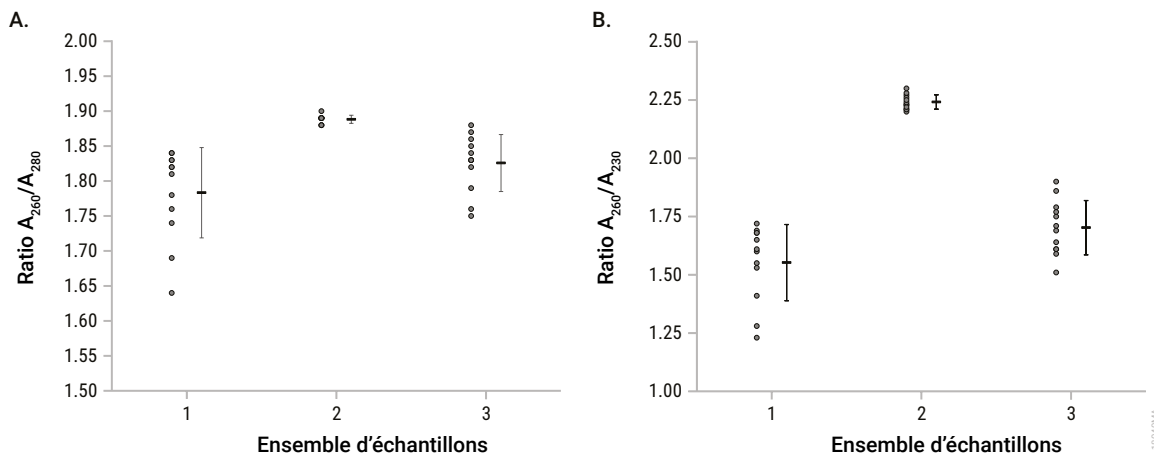


Figure 12. Qualité de l'ADN des tissus. Pour 50 mg de tissus cardiaques, du pancréas et du cerveau avec un volume d'élution de 200 μ l, les ratios A_{260}/A_{280} moyens étaient compris entre 1,7 et 1,9 (**Panneau A**) et les ratios A_{260}/A_{230} moyens étaient compris entre 1,5 et 2,3 (**Panneau B**). Sur le graphique, l'ensemble d'échantillons 1 correspond aux tissus cardiaques, l'ensemble d'échantillons 2 correspond aux tissus du pancréas et l'ensemble d'échantillons 3 correspond aux tissus du cerveau.

8.B. Qualité de l'ADN (pureté, suite)

Cellules

Pour 5×10^6 cellules en culture de tissus HEK293 avec un volume d'éluion de 200 μ l, le ratio A_{260}/A_{280} moyen était de 1,9 et le ratio A_{260}/A_{230} moyen était de 2,3.

Type de cellules	Nombre de cellules d'entrée	Volume d'éluion	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Cellules en culture de tissus HEK293	5×10^6	200 μ l	1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,2
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,2
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
		Moyenne	1,9	2,3

Moelle osseuse

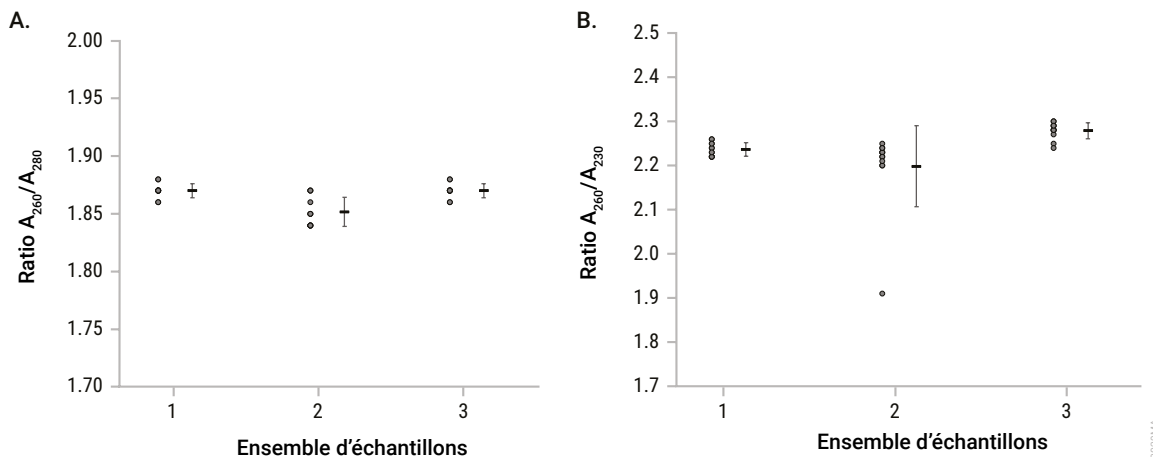


Figure 13. Qualité de l'ADN de la moelle osseuse. Pour 300 μ l d'aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'EDTA, de citrate et d'héparine et avec un volume d'éluion de 200 μ l, les ratios A_{260}/A_{280} moyens étaient compris entre 1,8 et 1,9 (**Panneau A**) et les ratios A_{260}/A_{230} moyens étaient compris entre 2,2 et 2,3 (**Panneau B**). Sur le graphique, l'ensemble d'échantillons 1 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'EDTA, l'ensemble d'échantillons 2 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes de citrate et l'ensemble d'échantillons 3 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'héparine.

8.C. Reproductibilité

Pour évaluer la précision de la purification de l'ADN lors de chaque cycle d'extraction, l'ADN a été purifié à partir de huit répétitions de 300 µl d'un seul échantillon de sang total humain pendant trois cycles de l'appareil avec l'Instrument 1 et 300 µl de répétitions d'un seul échantillon de sang total humain pendant trois cycles de l'appareil avec l'Instrument 2. Le rendement de l'ADN a été quantifié par absorbance et le coefficient de variation (pourcentage de CV) a ensuite été calculé pour chacun des trois cycles pour chaque appareil. Le rendement de l'ADN avec le Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit était reproductible lors de chaque cycle, avec des pourcentages de CV intracycle compris entre 6 et 9 % pour l'Instrument 1 et des pourcentages de CV intracycle compris entre 5 et 12 % pour l'Instrument 2.

Pour déterminer la précision de la purification de l'ADN entre les cycles d'extraction, l'ADN a été purifié à partir de huit répétitions de 300 µl d'un seul échantillon de sang total humain pendant trois cycles de l'appareil avec l'Instrument 1 et 300 µl de répétitions d'un seul échantillon de sang total humain pendant trois cycles de l'appareil avec l'Instrument 2. Le rendement de l'ADN a été quantifié par absorbance et le coefficient de variation (pourcentage de CV) a ensuite été calculé pour tous les échantillons des trois cycles pour chaque appareil. Le rendement de l'ADN avec le Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit était reproductible entre les cycles, avec 7 % de CV entre les cycles pour l'Instrument 1 et 8 % de CV entre les cycles pour l'Instrument 2.

Appareil	N° de cycle	Pourcentage de CV intracycle	Pourcentage de CV entre cycles
1	1 (n = 8)	9 %	7 %
	2 (n = 8)	7 %	
	3 (n = 8)	6 %	
2	1 (n = 4)	12 %	8 %
	2 (n = 4)	7 %	
	3 (n = 4)	5 %	

8.D. Amplificabilité

La compatibilité avec l'amplification en aval a été évaluée à l'aide d'ADN purifié à partir de sang total humain frais et congelé prélevé dans des tubes d'EDTA, de sang total congelé prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, d'échantillons de couche leucocytaire frais et congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes d'EDTA, d'échantillons de couche leucocytaire congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, de 1 et 2 écouvillons buccaux avec et sans prétraitement avec une Clearing Column, de tissu cardiaque, du pancréas et du cerveau, de cellules en culture de tissus, de liquide amniotique, d'urine, de PBMC et d'aspirats de moelle osseuse congelés prélevés dans des tubes d'EDTA, de citrate et d'héparine avec le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit.

Des purifications de l'ADN ont été réalisées pour chaque type d'échantillon avec les quantités d'entrée d'échantillons et les volumes d'élution les plus hauts et les plus bas pour chaque type d'échantillon. Les cellules en culture de tissus et les PBMC incluait également une série de dilution du nombre de cellules.

L'ADN obtenu à partir de tous les échantillons a été quantifié par absorbance, dilué à une concentration sur la courbe standard qPCR puis amplifié avec un essai qPCR avec la cible de 300 bp. La valeur C_q pour chaque échantillon d'ADN purifié et la valeur C_q moyenne pour trois répétitions du standard d'ADN génomique humain de 0,0032 ng/ μ l fournis avec l'essai qPCR sont indiquées.

Les graphiques de cette section représentent les valeurs C_q de chaque répétition qui a été purifiée pour chaque type d'échantillon. Chaque point sur les graphiques représente une mesure individuelle sur la gauche alors que la moyenne avec l'écart-type se trouve sur la droite. Chaque ensemble de données inclut au total 12 répétitions, quatre répétitions purifiées avec le Maxwell® CSC Instrument et huit répétitions purifiées avec le Maxwell® CSC 48 Instrument.

Les tableaux sous les légendes de figures décrivent les informations pour chaque ensemble d'échantillons affiché dans les graphiques associés.

8.D. Amplificabilité (suite)

Sang total

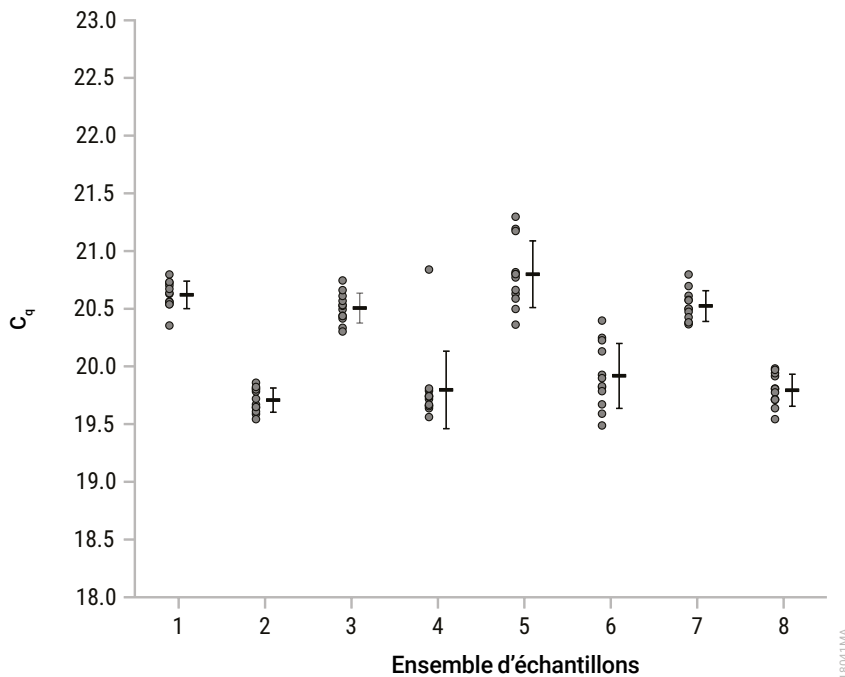


Figure 14. Amplification de l'ADN du sang total. Pour les échantillons frais et congelés de sang total prélevés dans des tubes d'EDTA, les valeurs C_q étaient comprises entre 19,54 et 20,80 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/µl (33,11 cycles). Pour les échantillons congelés de sang total prélevés dans des tubes de citrate et d'héparine, les valeurs C_q étaient comprises entre 19,49 et 21,30 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/µl (32,88 cycles).

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Stockage	Volume d'entrée (µl)	Volume d'éluion (µl)
1	EDTA	Congelé	50	50
2	EDTA	Congelé	300	200
3	EDTA	Frais	50	50
4	EDTA	Frais	300	200
5	Citrate	Congelé	50	50
6	Citrate	Congelé	300	200
7	Héparine	Congelé	50	50
8	Héparine	Congelé	300	200

Couche leucocytaire

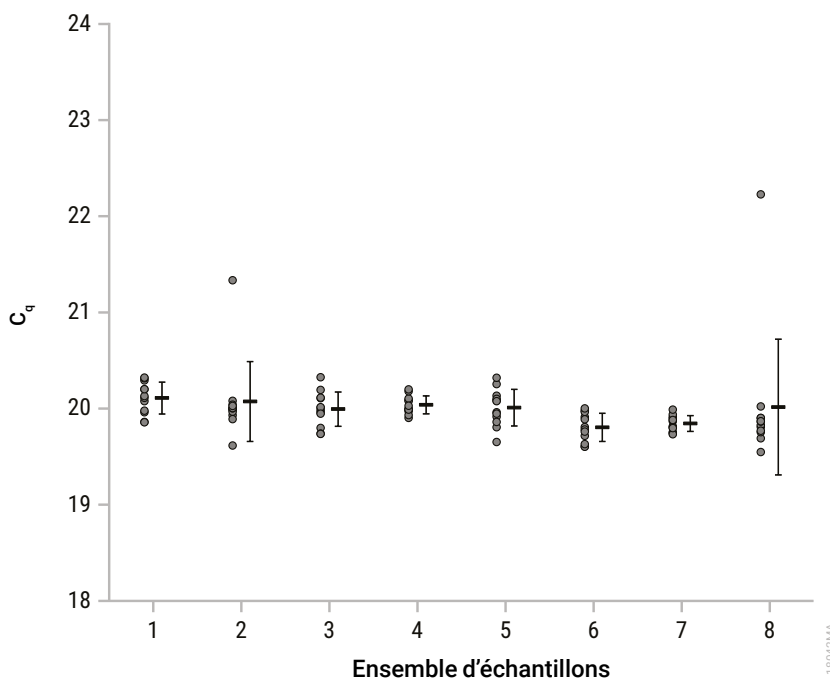


Figure 15. Amplification de l'ADN de la couche leucocytaire. Pour les échantillons frais et congelés de couche leucocytaire générés à partir de sang total prélevé dans des tubes d'EDTA, les valeurs C_q étaient comprises entre 19,62 et 21,34 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/ μ l (33,09 cycles). Pour les échantillons congelés de couche leucocytaire générés à partir de sang total prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, les valeurs C_q étaient comprises entre 19,55 et 22,23 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/ μ l (32,86 cycles).

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Stockage	Volume d'entrée (μ l)	Volume d'éluion (μ l)
1	EDTA	Congelé	50	50
2	EDTA	Congelé	300	200
3	EDTA	Frais	50	50
4	EDTA	Frais	300	200
5	Citrate	Congelé	50	50
6	Citrate	Congelé	300	200
7	Héparine	Congelé	50	50
8	Héparine	Congelé	300	200

8.D. Amplificabilité (suite)

Écouvillon buccal

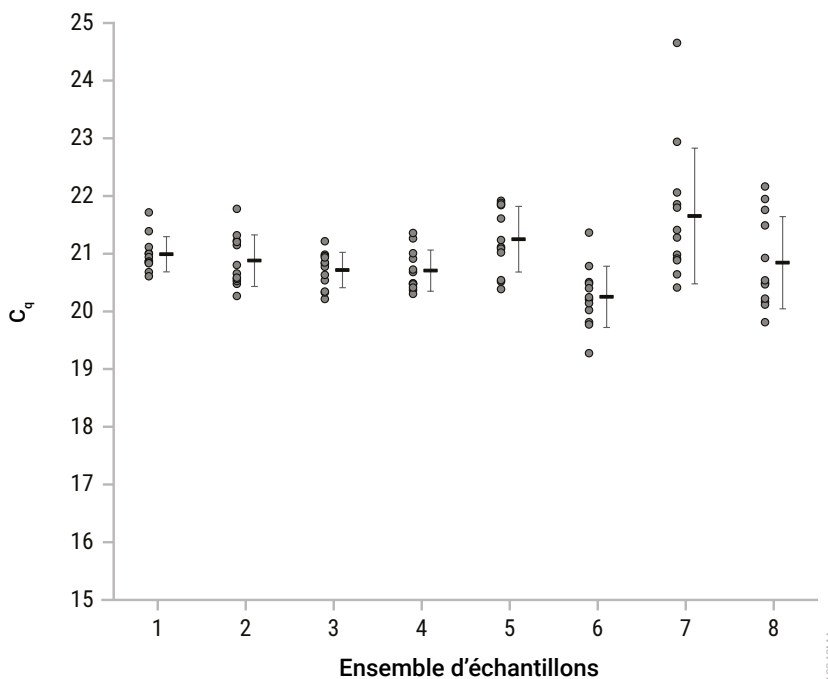


Figure 16. Amplification de l'ADN des écouvillons buccaux. Pour un et deux écouvillons buccaux prétraités avec une Clearing Column, les valeurs C_q étaient comprises entre 20,22 et 21,78 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/µl (32,45 cycles). Pour un et deux écouvillons buccaux prétraités sans Clearing Column, les valeurs C_q étaient comprises entre 19,28 et 24,65 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/µl (32,54 cycles).

Ensemble d'échantillons	Nombre d'écouvillons	Prétraitement	Volume d'éluion (µl)
1	1 écouvillon	Avec Clearing Column	50
2	1 écouvillon	Avec Clearing Column	200
3	2 écouvillons	Avec Clearing Column	50
4	2 écouvillons	Avec Clearing Column	200
5	1 écouvillon	Sans Clearing Column	50
6	1 écouvillon	Sans Clearing Column	200
7	2 écouvillons	Sans Clearing Column	50
8	2 écouvillons	Sans Clearing Column	200

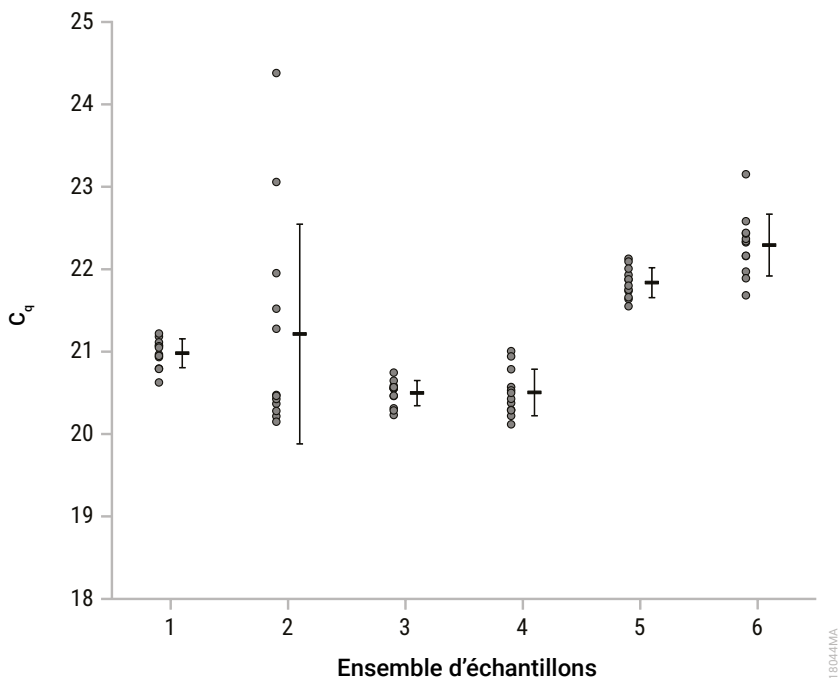
Tissu


Figure 17. Amplification de l'ADN des tissus. Pour les tissus cardiaques et du pancréas, les valeurs C_q étaient comprises entre 20,12 et 24,38 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/ μ l (32,98 cycles). Pour le tissu du cerveau, les valeurs C_q étaient comprises entre 21,55 et 23,15 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/ μ l (33,68 cycles).

Ensemble d'échantillons	Type de tissu	Quantité d'entrée (mg)	Volume d'éluion (μ l)
1	Cœur	5	50
2	Cœur	50	200
3	Pancréas	5	50
4	Pancréas	50	200
5	Cerveau	5	50
6	Cerveau	50	200

8.D. Amplificabilité (suite)

Cellules

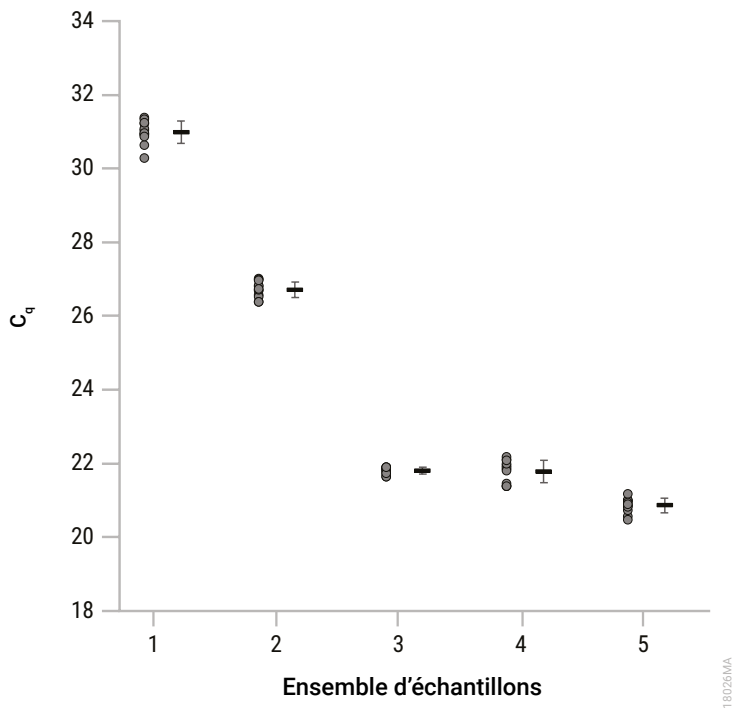


Figure 18. Amplification de l'ADN des cellules en culture de tissus. Pour la série de dilution des cellules en culture de tissus HEK293, les valeurs C_q étaient comprises entre 20,48 et 31,38 cycles et elles étaient toutes inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/µl (33,04 cycles).

Ensemble d'échantillons	Type de cellules	Nombre de cellules	Volume d'éluion (µl)
1	Cellules en culture de tissus HEK293	5×10^2	50
2	Cellules en culture de tissus HEK293	5×10^3	50
3	Cellules en culture de tissus HEK293	5×10^4	50
4	Cellules en culture de tissus HEK293	5×10^5	200
5	Cellules en culture de tissus HEK293	5×10^6	200

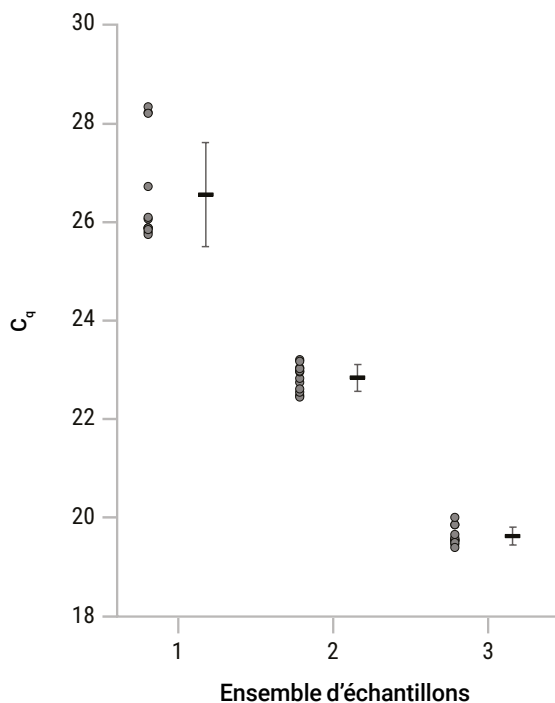


Figure 19. Amplification de l'ADN des PBMC. Pour la série de dilution des PBMC, les valeurs C_q étaient comprises entre 19,40 et 28,33 cycles et elles étaient toutes inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/ μ l (32,80 cycles).

Ensemble d'échantillons	Type de cellules	Nombre de cellules	Volume d'éluion (μ l)
1	PBMC	5×10^4	50
2	PBMC	5×10^5	100
3	PBMC	5×10^6	200

8.D. Amplificabilité (suite)

Cellules (suite)

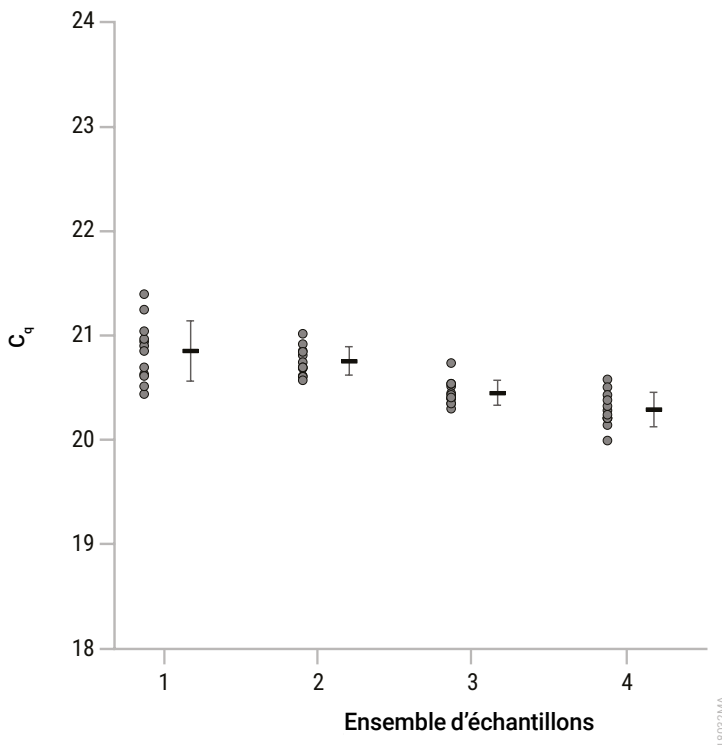


Figure 20. Amplification de l'ADN de l'urine et du liquide amniotique. Pour les cellules obtenues à partir d'échantillons d'urine et de liquide amniotique, les valeurs C_t étaient comprises entre 20,00 et 21,40 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_t moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/µl (32,71 cycles).

Ensemble d'échantillons	Type de cellules	Volume d'entrée (ml)	Volume d'élution (µl)
1	Urine	15	50
2	Urine	50	50
3	Liquide amniotique	1	50
4	Liquide amniotique	5	50

Moelle osseuse

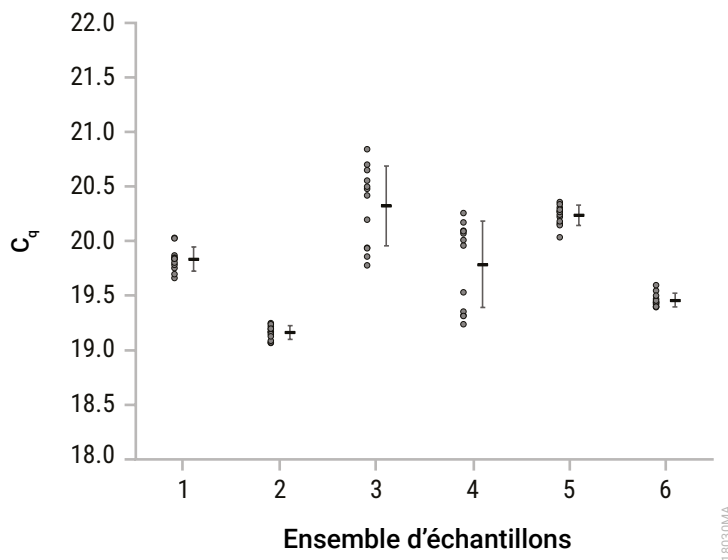


Figure 21. Amplification de l'ADN de la moelle osseuse. Pour les aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'EDTA et de citrate, les valeurs C_q étaient comprises entre 19,07 et 20,84 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/µl (32,42 cycles). Pour les aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'héparine, les valeurs C_q étaient comprises entre 19,40 et 20,36 cycles et elles étaient toutes nettement inférieures à la valeur C_q moyenne pour le standard d'ADN de 0,0032 ng/µl (32,82 cycles).

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Volume d'entrée (µl)	Volume d'élution (µl)
1	EDTA	50	50
2	EDTA	300	200
3	Citrate	50	50
4	Citrate	300	200
5	Héparine	50	50
6	Héparine	300	200

8.E. Inhibition (substances interférentes)

L'inhibition de l'amplification a été évaluée à l'aide d'ADN purifié à partir de sang total humain frais et congelé prélevé dans des tubes d'EDTA, de sang total congelé prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, d'échantillons de couche leucocytaire frais et congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes d'EDTA, d'échantillons de couche leucocytaire congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, d'un et deux écouvillons buccaux avec et sans prétraitement avec une Clearing Column, de tissus cardiaques, du pancréas et du cerveau, de cellules en culture de tissus, de liquide amniotique, d'urine, de PBMC et d'aspirats de moelle osseuse congelés prélevés dans des tubes d'EDTA, de citrate et d'héparine avec le Maxwell[®] CSC Genomic DNA Kit.

Des purifications de l'ADN ont été réalisées pour chaque type d'échantillon. Les quantités d'entrée d'échantillon et les volumes d'élution pour lesquels la plus faible quantité de dilution serait nécessaire pour les échantillons à utiliser dans le qPCR ont été évalués pour cette analyse.

L'ADN a été quantifié et dilué à une concentration comprise dans la courbe standard qPCR et une aliquote de chaque ADN a ensuite encore été diluée huit fois. Les dilutions initiales de l'ADN et les dilutions huit fois ont été amplifiées avec un essai qPCR. La différence des valeurs C_q ($|\Delta C_q|$) pour la séquence cible de 300 bp est indiquée. Un $|\Delta C_q|$ de 3 ± 1 cycles correspond à aucune inhibition de l'amplification de l'ADN due à des substances endogènes et exogènes qui pourraient être présentes dans les échantillons.

Les graphiques de cette section représentent le $|\Delta C_q|$ de chaque répétition qui a été purifiée pour chaque type d'échantillon. Chaque point sur les graphiques représente une mesure individuelle sur la gauche alors que la moyenne avec l'écart-type se trouve sur la droite. Chaque ensemble de données inclut au total 12 répétitions, quatre répétitions purifiées avec le Maxwell[®] CSC Instrument et huit répétitions purifiées avec le Maxwell[®] CSC 48 Instrument.

Les tableaux sous les légendes de figures décrivent les informations pour chaque ensemble d'échantillons affiché dans les graphiques associés.

Sang total

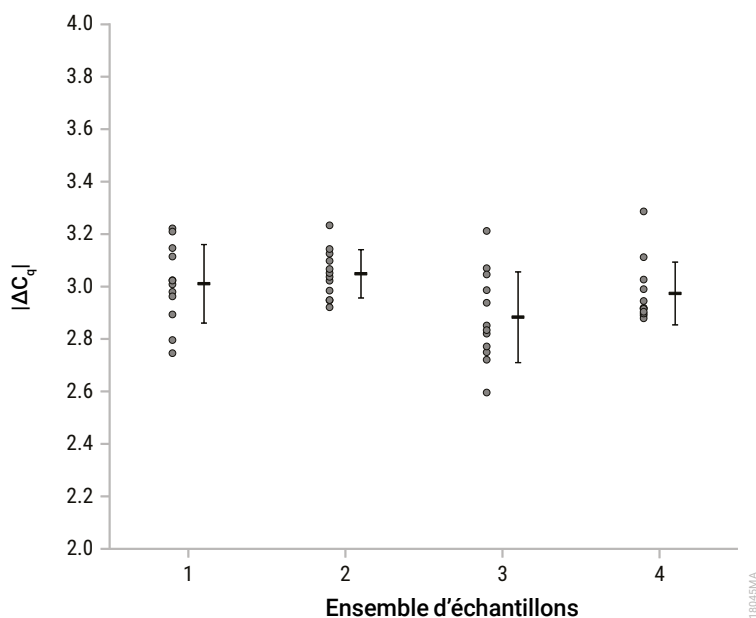


Figure 22. Test d'inhibition dans l'amplification de l'ADN du sang total. Pour les échantillons de sang total frais et congelés prélevés dans des tubes d'EDTA, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,75 et 3,23 cycles. Pour les échantillons de sang total congelés prélevés dans des tubes de citrate et d'héparine, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,60 et 3,29 cycles.

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Stockage	Volume d'entrée (μl)	Volume d'éluion (μl)
1	EDTA	Congelé	50	50
2	EDTA	Frais	50	50
3	Citrate	Congelé	50	50
4	Héparine	Congelé	50	50

8.E. Inhibition (substances interférentes, suite)

Couche leucocytaire

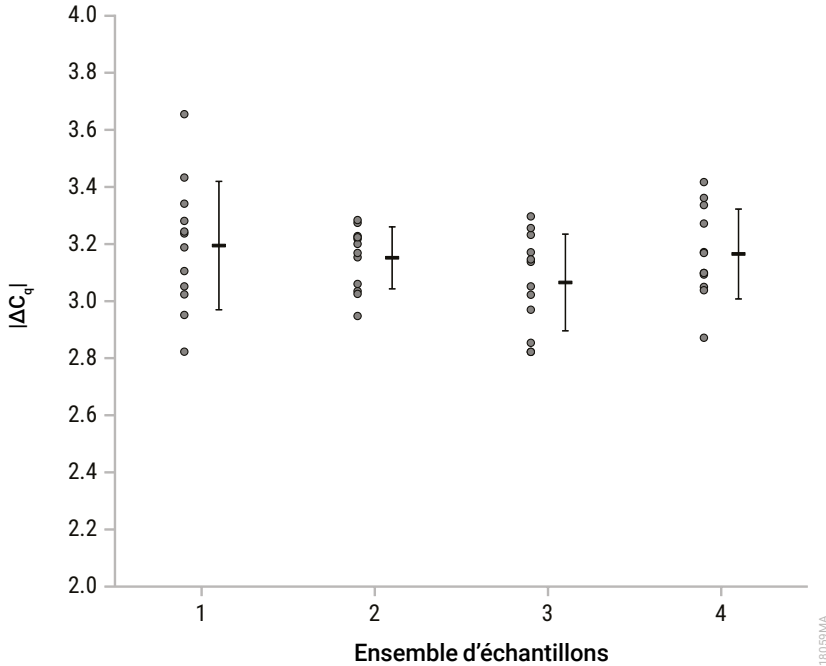


Figure 23. Test d'inhibition dans l'amplification de l'ADN de la couche leucocytaire. Pour les échantillons de couche leucocytaire frais et congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes d'EDTA, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,82 et 3,65 cycles. Pour les échantillons de couche leucocytaire congelés générés à partir de sang total prélevé dans des tubes de citrate et d'héparine, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,82 et 3,42 cycles.

Ensemble d'échantillons	Anticoagulant	Stockage	Volume d'entrée (μl)	Volume d'élution (μl)
1	EDTA	Congelé	50	50
2	EDTA	Frais	50	50
3	Citrate	Congelé	50	50
4	Héparine	Congelé	50	50

Écouvillon buccal

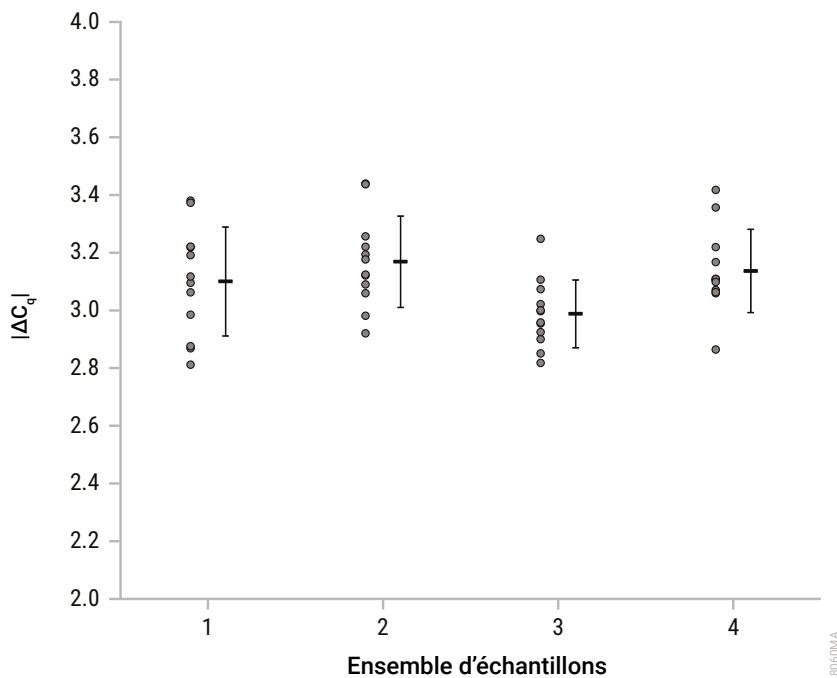


Figure 24. Test d'inhibition dans l'amplification de l'ADN des écouvillons buccaux. Pour un et deux écouvillons buccaux prétraités avec une Clearing Column, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,81 et 3,44 cycles. Pour un et deux écouvillons buccaux prétraités sans Clearing Column, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,82 et 3,42 cycles.

Ensemble d'échantillons	Nombre d'écouvillons	Prétraitement	Volume d'élution (µl)
1	1 écouvillon	Avec Clearing Column	50
2	2 écouvillons	Avec Clearing Column	50
3	1 écouvillon	Sans Clearing Column	50
4	2 écouvillons	Sans Clearing Column	50

8.E. Inhibition (substances interférentes, suite)

Tissu

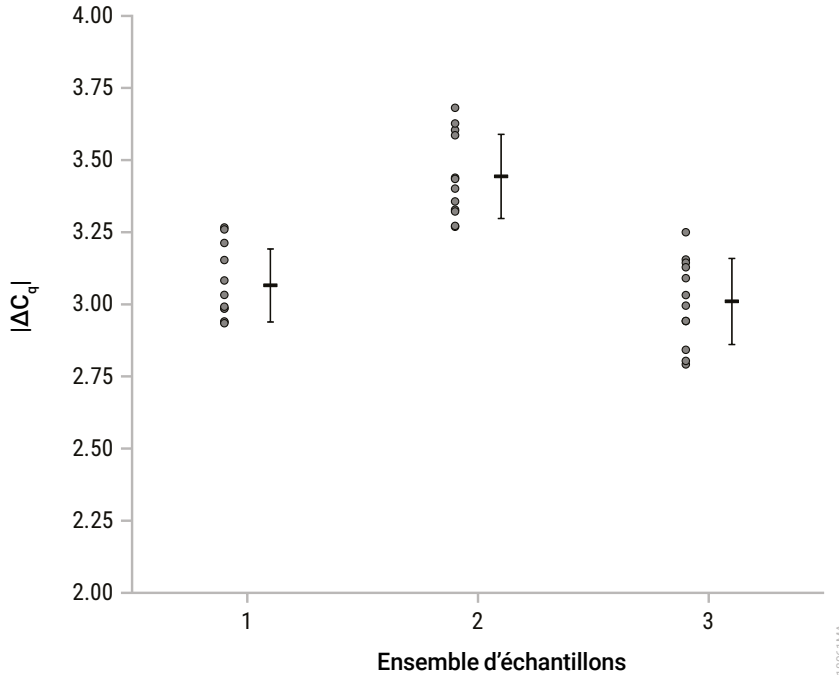


Figure 25. Test d'inhibition dans l'amplification de l'ADN des tissus. Pour 5 mg de tissus cardiaques et du pancréas, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,93 et 3,68 cycles. Pour 5 mg de tissu du cerveau, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,79 et 3,25 cycles. Un volume d'éluion de 50 μ l a été utilisé pour tous les échantillons. Sur le graphique, l'ensemble d'échantillons 1 correspond aux tissus cardiaques, l'ensemble d'échantillons 2 correspond aux tissus du pancréas et l'ensemble d'échantillons 3 correspond aux tissus du cerveau.

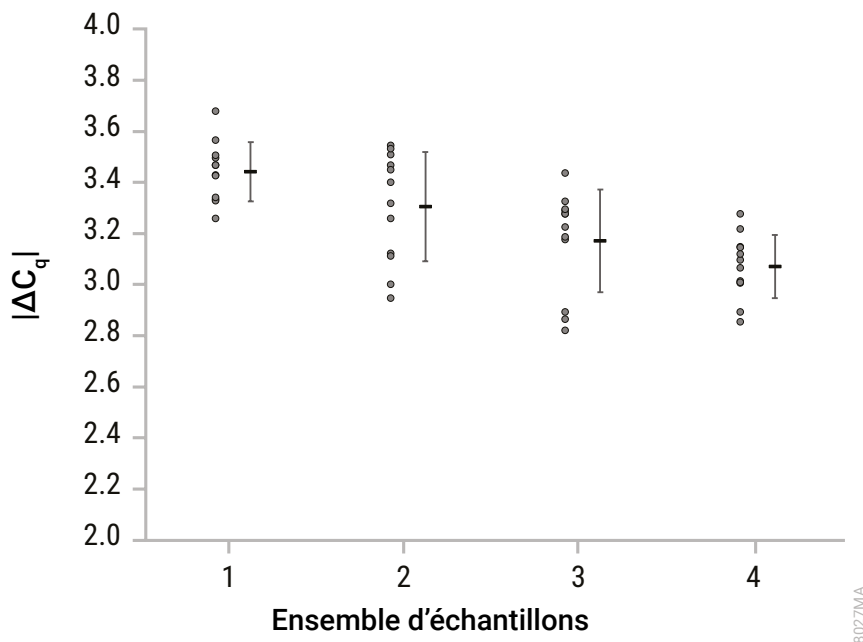
Cellules


Figure 26. Test d'inhibition dans l'amplification de l'ADN des cellules. Pour 5×10^4 cellules en culture de tissus HEK293 avec un volume d'élution de 50 μ l, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 3,26 et 3,68 cycles. Pour 5×10^5 PBMC avec un volume d'élution de 100 μ l, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,95 et 3,55 cycles. Pour les cellules obtenues à partir d'échantillons de 50 ml d'urine et de 5 ml liquide amniotique avec un volume d'élution de 50 μ l, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,82 et 3,44 cycles.

Ensemble d'échantillons	Type de cellules	Quantité d'entrée	Volume d'élution (μ l)
1	Cellules en culture de tissus HEK293	5×10^4 cellules	50
2	PBMC	5×10^5 cellules	100
3	Urine	50 ml	50
4	Liquide amniotique	5 ml	50

8.E. Inhibition (substances interférentes, suite)

Moelle osseuse

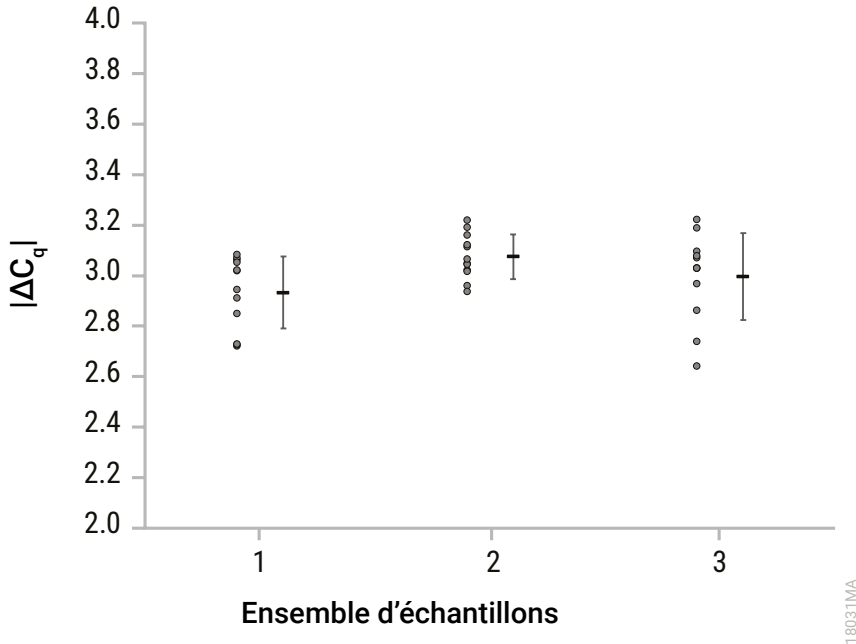


Figure 27. Test d'inhibition dans l'amplification de l'ADN de la moelle osseuse. Pour 50 µl d'aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'EDTA et de citrate, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,72 et 3,22 cycles. Pour 50 µl d'aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'héparine, les valeurs $|\Delta C_q|$ étaient comprises entre 2,64 et 3,22 cycles. Un volume d'élution de 50 µl a été utilisé pour tous les échantillons. Sur le graphique, l'ensemble d'échantillons 1 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'EDTA, l'ensemble d'échantillons 2 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes de citrate et l'ensemble d'échantillons 3 correspond à des aspirats de moelle osseuse prélevés dans des tubes d'héparine.

8.F. Contamination croisée

Les échantillons de couche leucocytaire masculins (300 µl) et féminins (50 µl) ont été traités dans différentes positions de plateaux des appareils Maxwell® et les échantillons d'ADN féminins purifiés obtenus ont été amplifiés à l'aide d'une cible d'ADN du chromosome Y avec un essai qPCR. La présence de cette cible du chromosome Y dans les échantillons féminins a été utilisée pour identifier une contamination croisée potentielle à partir d'échantillons voisins. Lorsque des échantillons de couche leucocytaire féminins étaient traités sur des plateaux à des positions adjacentes à celles d'échantillons de couche leucocytaire masculins, aucun échantillon d'ADN féminin ne présentait une valeur C_q pour la cible d'ADN du chromosome Y.

9. Évaluation des performances cliniques

L'évaluation des performances cliniques a été réalisée à l'aide d'échantillons humains avec le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit et le Maxwell® CSC 48 Instrument.

Sang total

Deux testeurs d'un laboratoire externe ont purifié l'ADN provenant de 200 µl d'échantillons de sang total humain avec un volume d'élution de 100 µl de 12 donneurs avec le système de purification Maxwell® CSC et une méthode d'extraction de référence des laboratoires. Les éluats obtenus ont été analysés par amplification du gène domestique HCP5 témoin positif dans l'essai HLA-B27. Les 12 échantillons d'ADN purifiés avec le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit présentaient une concordance entre les deux testeurs et avec la méthode d'extraction de référence des laboratoires.

Écouvillon buccal

Un testeur d'un laboratoire externe a purifié l'ADN provenant d'un échantillon d'écouvillon buccal humain prétraité avec une Clearing Column et un volume d'élution de 100 µl de 12 donneurs avec le système de purification Maxwell® CSC et une méthode d'extraction de référence des laboratoires. Les éluats obtenus ont été analysés par amplification du gène domestique HCP5 témoin positif dans l'essai HLA-B27. Les 12 échantillons d'ADN purifiés avec le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit présentaient une concordance avec la méthode d'extraction de référence des laboratoires.

Tissu

Un testeur d'un laboratoire externe a purifié l'ADN provenant de 10 à 25 µl d'échantillons de tissus humains avec un volume d'élution de 200 µl de 12 donneurs avec le système de purification Maxwell® CSC et une méthode d'extraction de référence des laboratoires. Les éluats obtenus ont été analysés par amplification du gène domestique HCP5 témoin positif dans l'essai HLA-B27. Les 12 échantillons d'ADN purifiés avec le Maxwell® CSC Genomic DNA Kit présentaient une concordance avec la méthode d'extraction de référence des laboratoires.

10. Dépannage

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

Symptômes

Causes et commentaires

Concentration d'ADN plus basse que prévu

L'ADN des échantillons qui ont subi plusieurs cycles de congélation-décongélation a pu être dégradé. Vous trouverez des directives de prélèvement et de stockage pour chaque type d'échantillon.

L'échantillon contenait une faible quantité d'ADN génomique. Le rendement de l'ADN génomique dépend de la quantité d'échantillon traitée et de la teneur de cet échantillon en ADN.

La solution de protéinase K n'a pas été ajoutée, un volume incomplet de solution de protéinase K a été ajouté ou la protéinase K n'a pas été bien mélangée avec l'échantillon. La lyse et le rendement dépendent de l'extraction complète avec la protéinase K.

L'échantillon d'entrée n'a pas été mélangé avant le traitement. Veuillez mélanger les échantillons avant le traitement.

Le volume d'éluat utilisé pour l'extraction était trop élevé pour l'échantillon traité. Pour augmenter la concentration en ADN élué, réduisez le volume initial de tampon d'éluat.

L'échantillon traité était en trop grande quantité ou contenait trop d'ADN génomique. Une quantité excessive d'échantillon ou d'ADN génomique peut provoquer un échec du procédé chimique d'extraction et une concentration en éluat sans corrélation avec la quantité d'échantillon traitée.

Le lysat n'a pas été mélangé avec la solution de fixation dans le puits n°1 en aspirant et en le distribuant 5 à 10 fois après le transfert afin de produire un mélange homogène. Le rendement et la pureté de l'éluat final peuvent diminuer si vous ne créez pas un mélange homogène de lysat d'échantillon et de solution de fixation dans le puits n°1.

Les échantillons n'ont pas été mélangés de manière appropriée ou lors des bonnes étapes du traitement. Les performances peuvent être affectées si les réactifs et les échantillons ne sont pas mélangés correctement dans le tube d'incubation.

Le tampon de lyse et l'amplificateur lytique (LE2) ont été utilisés de manière interchangeable, lors de la mauvaise étape ou avec un volume incorrect. Retraitez les échantillons, en utilisant le tampon de lyse et l'amplificateur lytique (LE2) conformément aux instructions.

Symptômes

Causes et commentaires

Pureté plus basse que prévu

La solution de protéinase K n'a pas été ajoutée, un volume incomplet de solution de protéinase K a été ajouté ou la protéinase K n'a pas été bien mélangée avec l'échantillon. La lyse et le rendement dépendent de l'extraction complète avec la protéinase K.

Le lysat n'a pas été mélangé avec la solution de fixation dans le puits n°1 en l'aspirant et en le distribuant 5 à 10 fois après le transfert afin de produire un mélange homogène. Le rendement et la pureté de l'éluat final peuvent diminuer si vous ne créez pas un mélange homogène de lysat d'échantillon et de solution de fixation dans le puits n°1.

L'ADN des échantillons qui ont subi plusieurs cycles de congélation-décongélation a pu être dégradé. Utilisez des échantillons recueillis et conservés selon les directives indiquées pour chaque type d'échantillon.

Pour les échantillons de sang total, de couche leucocytaire et de moelle osseuse, le transfert de produit grumeleux ou gras dans le tube d'incubation peut provoquer une mauvaise lyse de l'échantillon. Transférez uniquement des échantillons liquides pour la purification.

Le tampon de lyse et l'amplificateur lytique (LE2) ont été utilisés de manière interchangeable, lors de la mauvaise étape ou avec un volume incorrect. Retraitez les échantillons, en utilisant le tampon de lyse et l'amplificateur lytique (LE2) conformément aux instructions.

Certains types de tissus peuvent produire des valeurs de pureté plus basses que prévu. Si vous souhaitez des valeurs de pureté plus élevées, réduisez la quantité d'entrée du tissu traité.

Les échantillons n'ont pas été mélangés de manière appropriée ou lors des bonnes étapes du traitement. Les performances peuvent être affectées si les réactifs et les échantillons ne sont pas mélangés correctement dans le tube d'incubation.

Le transfert de produit solide dans le puits n°1 de la cartouche peut entraîner une copurification du produit solide et des contaminants. Retirez le produit solide avant de transférer l'échantillon lysé dans la cartouche.

Contamination de l'ARN

Il n'y a pas eu d'ajout de solution de RNase A au puits n°3 de la cartouche ou pas dans un volume suffisant. Retraitez l'échantillon avec de la solution de RNase A ou traitez l'échantillon d'ADNg extrait avec de la RNase A.

10. Dépannage (suite)

Symptômes

Incorporation de résine

Causes et commentaires

Les échantillons n'ont pas été mélangés de manière appropriée ou pendant les bonnes étapes du traitement. L'incorporation de résine dans la cartouche et le tube d'éluion peut être affectée si les réactifs et les échantillons ne sont pas mélangés correctement dans le tube d'incubation ou le puits n°1.

L'échantillon traité était en trop grande quantité ou contenait trop d'ADN génomique. Une quantité excessive d'échantillon peut entraîner une incorporation excessive de résine dans la cartouche et le tube d'éluion.

Une certaine incorporation de résine est normale et n'affecte pas les performances en aval. Si nécessaire, utilisez un aimant d'éluion ([Cat.# AS4017, Cat.# AS4018 ou les deux] ; disponible séparément) pour transférer l'éluat dans un nouveau tube. Voir la Section 11, Produits apparentés.

11. Produits apparentés

Instruments et accessoires

Produit	Taille	Cat.#
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 chacun	AS8000
Maxwell® CSC Instrument*	1 chacun	AS6000
Plateau Maxwell® RSC/CSC	1 chacun	SP6019
Plateau avant Maxwell® RSC/CSC 48	1 chacun	AS8401
Plateau arrière Maxwell® RSC/CSC 48	1 chacun	AS8402
Plongeurs RSC/CSC	50/pack	AS1331
Tubes d'élution (0,5 ml)	50/pack	AS6201
Aimant d'élution, 16 positions	1 chacun	AS4017
Aimant d'élution, 24 positions	1 chacun	AS4018
Clearing Columns	50 pièces	Z3871
Solution de RNase A	1 ml	A7973
	5 ml	A7974
Solution de protéinase K (PK)	4 ml	MC5005
Nuclease-Free Water	25 ml	MC1191

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

Kits de réactifs Maxwell® CSC

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

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

© 2022 Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell est une marque déposée de Promega 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.