

MANUEL TECHNIQUE

Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit

Mode d'emploi du produit
AS1560

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

Remarque : le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit n'est compatible
qu'avec la version 4.0.0 ou supérieure du logiciel Maxwell® CSC ou avec
la version 4.1.1 ou supérieure du logiciel Maxwell® CSC 48.

Maxwell[®] CSC XtractAll FFPE DNA/RNA 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 et conditions de stockage..... | 3 |
| 3. Destination/Usage prévu du produit | 5 |
| 4. Limites d'utilisation du produit..... | 5 |
| 5. Avant de commencer..... | 6 |
| 5.A. Préparation d'échantillons de tissus FFPE | 6 |
| 6. Préparation de la Maxwell [®] CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge | 8 |
| 6.A. Préparation de la Maxwell [®] CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge | 8 |
| 6.B. Protocole d'extraction de l'ADN | 9 |
| 6.C. Protocole d'extraction de l'ARN | 10 |
| 6.D. Protocole d'extraction des acides nucléiques totaux | 11 |
| 6.E. Protocole d'extraction successive de l'ADN et de l'ARN | 12 |
| 7. Installation et utilisation du Maxwell [®] Instrument | 15 |
| 8. Efficacité des procédures..... | 19 |
| 9. Instructions après extraction | 19 |
| 10. Évaluation des performances analytiques | 20 |
| 10.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ADN..... | 20 |
| 10.B. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ARN..... | 22 |
| 10.C. Quantification par colorant fluorescent..... | 24 |
| 10.D. Reproductibilité | 25 |
| 10.E. Inhibition de l'amplification en raison de substances interférentes..... | 26 |
| 10.F. Contamination croisée | 28 |
| 11. Évaluation des performances cliniques | 29 |
| 11.A. Procédure d'extraction de l'ADN | 29 |
| 11.B. Procédure d'extraction de l'ARN | 29 |
| 11.C. Procédure d'extraction des acides nucléiques totaux | 29 |
| 11.D. Procédure d'extraction successive de l'ADN et de l'ARN | 30 |

| | |
|---|----|
| 12. Dépannage | 31 |
| 13. Création d'un environnement sans ribonucléase | 33 |
| 14. Produits associés | 34 |

Le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit n'est disponible que dans certains pays.

1. Description

Le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit est utilisé en association avec les appareils Maxwell® Instruments spécifiés dans le Tableau 1 pour offrir une méthode facile d'extraction automatique efficace de l'ADN, de l'ARN ou des acides nucléiques totaux (TNA), ou encore successivement de l'ADN et de l'ARN, à partir d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). Les appareils Maxwell® CSC Instrument sont conçus pour être utilisés avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des réactifs supplémentaires fournis dans le kit. Les méthodes d'extraction préprogrammées assurent une simplicité et une facilité d'emploi maximales des appareils Maxwell® CSC Instruments. Les appareils Maxwell® CSC Instruments peuvent traiter efficacement d'un au nombre maximum autorisé d'échantillons avec l'extraction automatisée de l'ADN, de l'ARN et des acides nucléiques totaux (TNA) en 30 minutes environ et les extractions successives de l'ADN et de l'ARN en moins de 1 heure. L'ADN, l'ARN ou les acides nucléiques totaux extraits peuvent être utilisés directement dans les essais d'amplification ultérieurs.

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 |

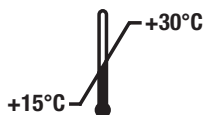
Principe de la méthode : le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrait l'acide nucléique à l'aide de particules paramagnétiques, qui fournissent une phase solide mobile pour optimiser le prélèvement d'échantillons, le lavage et l'extraction de l'ADN, de l'ARN et des acides nucléiques totaux. Il est possible d'extraire successivement l'ADN et l'ARN du même échantillon de tissus FFPE sans avoir à diviser le lysat. Les appareils Maxwell® CSC Instruments sont des appareils magnétiques de traitement des particules. Ce système permet la fixation efficace des acides nucléiques aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie et déplace les particules paramagnétiques dans les puits de la cartouche. 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 extraction sous-optimale par d'autres systèmes automatiques courants.

Considérations relatives aux échantillons : l'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons de tissus FFPE peut être complexe en raison des caractéristiques des tissus telles que la fibrosité, la composition en lipides, la teneur en nucléase et le nombre de cellules disponibles dans la section des tissus. De plus, les écarts dans la gestion des tissus avant et pendant la fixation, notamment la durée d'exposition à la formaline pendant le processus de fixation des tissus, influencent fortement le niveau de réticulation et de fragmentation des acides nucléiques dans les tissus FFPE. Ces attributs peuvent influencer la qualité et la quantité d'acides nucléiques amplifiables qui peuvent être extraits à partir de sections de tissus FFPE. Au cours du développement, le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit a été évalué avec différents types de tissus FFPE humains afin d'extraire les acides nucléiques totaux, l'ARN et l'ADN amplifiable disponible.

2. Composants du produit et conditions de stockage

| PRODUIT | TAILLE | CAT.# |
|---|-----------------|--------|
| Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit | 48 préparations | AS1560 |

Pour diagnostic in vitro. Usage professionnel uniquement. Suffisant pour 48 isolements automatisés à partir des échantillons de tissus FFPE. Les Maxwell® CSC Cartridges doivent être utilisées avec un seul échantillon.



Inclut :

- 35 ml Huile minérale
- 20 ml Tampon de lyse
- 2 × 1 ml Protéinase K
- 2 × 100 µl Blue Dye
- 2 × 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 3 flacons DNase I (lyophilisé)
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCR)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 2 × 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

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



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



Les composants du Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit sont conçus pour être utilisés avec des substances potentiellement infectieuses. Portez des équipements de protection individuelle appropriés (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.



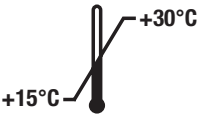













Mise en garde : manipulez les cartouches avec précautions ; les bords d'étanchéité peuvent être coupants.

2. Composants du produit et conditions de stockage (suite)

Informations supplémentaires : les composants du Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA 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. N'utilisez pas de cartouches reçues avec un joint endommagé.

Légende des symboles

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

3. Destination/Usage prévu du produit

Le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit est conçu pour être utilisé en conjonction avec les appareils Maxwell® CSC et les méthodes Maxwell® CSC XtractAll comme dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) pour isoler automatiquement l'ADN uniquement, l'ARN uniquement, l'ADN et l'ARN successivement ou les acides nucléiques totaux viraux à partir d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) humains. L'ADN, l'ARN ou les acides nucléiques totaux extraits sont adaptés aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit est destiné à être utilisé à une température comprise entre 15 °C et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut produire des résultats sous-optimaux. Les échantillons de tissus FFPE préparés à l'aide de formaline neutre à 10 % peuvent être utilisés avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

Le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit est destiné à un usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide de l'ADN, de l'ARN ou des acides nucléiques totaux extraits avec ce système doivent être interprétés conjointement à d'autres données cliniques ou de laboratoire.

4. Limites d'utilisation du produit

Le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit est conçu uniquement pour être utilisé avec des échantillons de tissus FFPE. Il n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non FFPE, tels que les échantillons de tissus frais ou congelés. La performance n'a pas été validée avec des échantillons de tissus FFPE été préparés avec d'autres fixatifs que la formaline neutre à 10 %.

L'adéquation des acides nucléiques extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit pour être utilisés dans le cadre du séquençage de nouvelle génération (NGS) a été démontrée pendant le développement du produit, mais n'a pas encore été validée.

L'utilisateur est tenu de valider la performance dans les applications de diagnostic en aval. Des contrôles appropriés doivent être inclus dans toute application diagnostique en aval utilisant l'ADN, l'ARN ou les acides nucléiques totaux extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

5. Avant de commencer

Matériel à fournir par l'utilisateur

- microcentrifugeuse
- vortex de paillasse
- pipettes et cônes de pipettes pour le prétraitement d'échantillons et leur transfert dans des cartouches de réactifs préemplies
- tubes de 1,5–2,0 ml pour l'incubation des échantillons (ex : Microtubes, 1,5 ml ; Cat.# V1231)
- blocs chauffants réglés à 56 °C et à 90 °C
- échantillons de tissus FFPE (**Remarque** : les échantillons doivent être stockés à température ambiante [15–30 °C].)
- isopropanol, ≥99,5 % de qualité biologie moléculaire (pour l'ARN, les TNA et les procédures successives ADN/ARN)
- lames de rasoir (**Remarque** : soyez prudent lors de l'utilisation de lames de rasoir pour racler l'échantillon de tissus FFPE sur la glissière.)

Si nécessaire, reconstituez un flacon lyophilisé de DNase I avec 275 µl de Nuclease-Free Water et 15 µl de Blue Dye. Retournez le flacon pour récupérer le DNase I au-dessous du bouchon et agitez délicatement pour mélanger. Ne vortexez pas. Stockez le DNase I reconstitué entre –30 °C et –10 °C. Ne congelez-décongelez pas plus de dix fois.

5.A. Préparation d'échantillons de tissus FFPE

Maintenez un environnement sans RNase pendant le traitement. Utilisez toujours des cônes de pipettes résistants à l'aérosol et sans RNase. Changez régulièrement de gants afin de réduire les risques de contamination par la RNase. Voir Section 13, Création d'un environnement sans ribonucléase, pour plus de détails.

Pendant le développement, les performances optimales du kit ont été obtenues avec jusqu'à 20 µm d'épaisseur totale des sections de tissus FFPE. Il est possible d'associer plusieurs sections dans un tube d'échantillon pour une extraction avec une épaisseur maximale des sections combinées ≤80 µm. Les sections de plus de 20 µm perturbent la digestion de la Protéinase K et produisent de faibles rendements (voir Section 12). L'utilisateur doit optimiser le nombre de sections et l'épaisseur des sections selon les conditions d'analyse en aval.

Pendant le développement, des échantillons de tissus FFPE de la poitrine, du foie et de l'utérus ont été évalués à titre d'exemples et ont présenté des performances acceptables. Une vaste plage de types de tissus FFPE peut être compatible avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit, mais les performances d'extraction et la compatibilité avec les essais en aval doivent être évaluées par le laboratoire.

Prétraitement des sections de tissus FFPE

1. Placez la ou les sections de tissus FFPE dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml. Si vous utilisez des sections de tissus FFPE montées sur glissière, raclez la ou les sections de la ou des glissières à l'aide d'une lame de rasoir propre.

Remarque : utilisez une lame de rasoir neuve et propre pour différents échantillons de tissus FFPE pour éviter toute contamination croisée des échantillons.

2. Ajoutez 500 µl d'huile minérale aux tubes d'échantillon. Vortexez pendant 10 secondes.
3. Chauffez les échantillons à 90 °C pendant 5 minutes. Placez les échantillons à température ambiante pendant la préparation du master mix comme indiqué à l'étape 4.
4. Juste avant l'utilisation, préparez un master mix de tampon de lyse, de Protéinase K et de Blue Dye comme illustré ci-dessous.

| Réactif | Quantité/Réaction | Réactions | |
|----------------|-------------------|-----------------------------|------------------|
| | | (Nombre d'échantillons + 2) | Total |
| Tampon de lyse | 224 µl | n + 2 | 224 µl × (n + 2) |
| Protéinase K | 25 µl | n + 2 | 25 µl × (n + 2) |
| Blue Dye | 1 µl | n + 2 | 1 µl × (n + 2) |

5. Ajoutez 250 µl de master mix à chaque tube d'échantillon et vortexez pendant 5 secondes.
Remarque : ne stockez pas de master mix inutilisé restant.
6. Centrifugez les tubes d'échantillon à 10 000 × g pendant 20 secondes pour séparer les couches. Si un agglomérat est présent dans la couche aqueuse (couche bleue inférieure), mélangez délicatement avec le cône d'une pipette pour disperser cet agglomérat. Laissez l'huile minérale et les couches aqueuses dans le tube.
7. Transférez les tubes d'échantillon vers un bloc chauffant à 56 °C et laissez incuber pendant 15 minutes.
8. Transférez les tubes d'échantillon vers un bloc chauffant à 90 °C et laissez incuber pendant 1 heure.
9. Passez à la Section 6 pour la préparation de la cartouche.

6. Préparation de la Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge

6.A. Préparation de la Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge

1. Changez de gants avant de manipuler les Maxwell® CSC Cartridges (CSCR), les CSC/RSC Plungers et les Elution Tubes. Les cartouches sont installées dans le ou les plateaux en dehors de l'appareil Maxwell® et dans le ou les plateaux contenant les cartouches. Les échantillons sont alors transférés dans l'appareil pour être extraits. Placez chaque cartouche dans le plateau avec le puits n°1 (le plus grand puits de la cartouche) le plus éloigné des Elution Tubes (Figure 1). 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 soit retirée de la cartouche.



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

2. Placez un plongeur dans le puits n°8 de chaque cartouche.
3. Placez un Elution Tube vide à la position de l'Elution Tube pour chaque cartouche dans le ou les plateaux.

Remarque : utilisez uniquement les tubes d'élution fournis dans le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. Les autres tubes d'élution ne sont pas forcément compatibles avec les appareils Maxwell® CSC Instruments et pourraient affecter les performances d'extraction.

4. Ajoutez 50 µl de Nuclease-Free Water au fond de chaque Elution Tube. Maintenez les tubes d'élution ouverts pendant l'extraction (Figure 1).

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

5. Passez à la section appropriée indiquée ci-dessous pour trouver les instructions spécifiques à chaque procédure d'extraction.

| Type d'extraction | Section |
|--------------------------------|---------|
| ADN | 6.B |
| ARN | 6.C |
| Acides nucléiques totaux (TNA) | 6.D |
| ADN/ARN successivement | 6.E |

Remarques relatives à la préparation du plateau



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.



Figure 1. Installation et configuration du plateau. De la Nuclease-Free Water est ajoutée aux Elution Tubes comme indiqué. Ouvrez les Elution Tubes avant de commencer une méthode d'extraction.

6.B. Protocole d'extraction de l'ADN

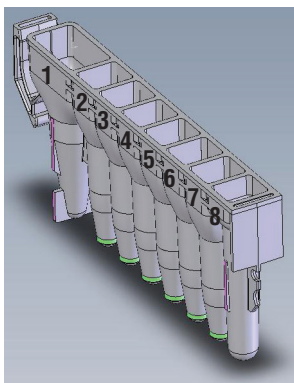
1. Une fois l'heure d'incubation terminée (Section 5.A), transférez immédiatement la phase aqueuse bleue dans le puits n°1 de la Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Utilisez un nouveau cône de pipette pour chaque échantillon afin d'éviter une contamination croisée.

Remarques :

- a. S'il reste du produit non digéré à la fin de l'incubation, centrifugez les tubes d'échantillon à $10\,000 \times g$ pendant 20 secondes pour agglomérer le produit non digéré. Ne transférez aucun produit aggloméré ou non digéré dans la cartouche.
 - b. Transférez tout le volume de phase aqueuse bleue dans la cartouche tout en évitant tout produit non digéré, et procédez à l'extraction dans les 30 minutes suivant la fin de l'incubation.
 - c. Le volume de la phase aqueuse bleue dans le tube varie en fonction de l'échantillon de tissu FFPE entré et de sa composition.
2. Scannez le code barres sur la boîte du kit, puis sélectionnez la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA. Touchez **Continuer** pour continuer.
 3. Placez le plateau dans l'appareil Maxwell®, entrez les informations de suivi de la cartouche et de l'échantillon sur l'écran « Configuration des cartouches », confirmez que les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés, et touchez le bouton **Démarrer** pour commencer le cycle d'extraction.

Remarque : vous trouverez des instructions d'installation de l'appareil détaillées à la Section 7.

6.B. Protocole d'extraction de l'ADN (suite)



L'utilisateur ajoute dans les puits :

1. Échantillons prétraités
8. CSC/RSC Plunger

Figure 2. Maxwell® CSC Cartridge. L'échantillon de tissu FFPE prétraité est ajouté au puits n°1 et un plongeur est ajouté au puits n°8.

6.C. Protocole d'extraction de l'ARN

1. Une fois l'heure d'incubation terminée (Section 5.A), transférez immédiatement la phase aqueuse bleue dans le puits n°1 de la Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Utilisez un nouveau cône de pipette pour chaque échantillon afin d'éviter une contamination croisée.

Remarques :

- a. S'il reste du produit non digéré à la fin de l'incubation, centrifugez les tubes d'échantillon à $10\,000 \times g$ pendant 20 secondes pour agglomérer le produit non digéré. Ne transférez aucun produit aggloméré ou non digéré dans la cartouche.
 - b. Transférez tout le volume de phase aqueuse bleue dans la cartouche tout en évitant tout produit non digéré, et procédez à l'extraction dans les 30 minutes suivant la fin de l'incubation.
 - c. Le volume de la phase aqueuse bleue dans le tube varie en fonction de l'échantillon de tissu FFPE entré et de sa composition.
2. Immédiatement après l'utilisation, préparez un cocktail de $MnCl_2$ et de DNase I comme illustré ci-dessous :

| Réactif | Quantité/Réaction | Réactions (nombre d'échantillons [n] + 2) | Total |
|--------------------------------------|-------------------|--|-----------------------------|
| $MnCl_2$, 0,09 M | 17 μ l | n + 2 | 17 μ l \times (n + 2) |
| DNase I (avec Blue Dye) ¹ | 10 μ l | n + 2 | 10 μ l \times (n + 2) |

¹Stockez le DNase I reconstitué restant avec du Blue Dye entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

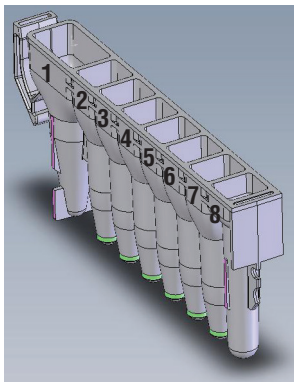
3. Ajoutez 27 μ l de cocktail de DNase I au puits n°7 de chaque cartouche.

Remarque : ne stockez pas de cocktail de DNase I inutilisé restant.

4. Ajoutez 500 μ l d'isopropanol à 100 % au puits n°1.

5. Scannez le code barres sur la boîte du kit, puis sélectionnez la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA. Touchez **Continuer** pour continuer.
6. Placez le plateau dans l'appareil Maxwell®, entrez les informations de suivi de la cartouche et de l'échantillon sur l'écran « Configuration des cartouches », confirmez que les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés, et touchez le bouton **Démarrer** pour commencer le cycle d'extraction.

Remarque : vous trouverez des instructions d'installation de l'appareil détaillées à la Section 7.



L'utilisateur ajoute dans les puits :

1. Échantillons prétraités et 500 µl d'isopropanol à 100 %
7. 27 µl de cocktail de DNase I
8. CSC/RSC Plunger

Figure 3. Maxwell® CSC Cartridge. L'échantillon de tissus FFPE prétraité et l'isopropanol sont ajoutés au puits n°1, le cocktail de DNase I au puits n°7 et un plongeur au puits n°8.

6.D. Protocole d'extraction des acides nucléiques totaux

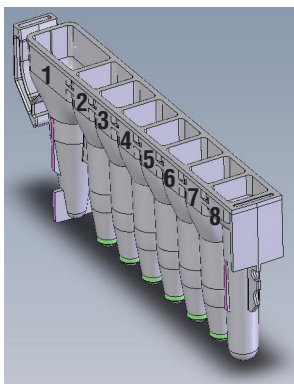
1. Une fois l'heure d'incubation terminée (Section 5.A), transférez immédiatement la phase aqueuse bleue dans le puits n°1 de la Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Utilisez un nouveau cône de pipette pour chaque échantillon afin d'éviter une contamination croisée.

Remarques :

- a. S'il reste du produit non digéré à la fin de l'incubation, centrifugez les tubes d'échantillon à 10 000 × g pendant 20 secondes pour agglomérer le produit non digéré. Ne transférez aucun produit aggloméré ou non digéré dans la cartouche.
 - b. Transférez tout le volume de phase aqueuse bleue dans la cartouche tout en évitant tout produit non digéré, et procédez à l'extraction dans les 30 minutes suivant la fin de l'incubation.
 - c. Le volume de la phase aqueuse bleue dans le tube varie en fonction de l'échantillon de tissu FFPE entré et de sa composition.
2. Ajoutez 500 µl d'isopropanol à 100 % au puits n°1.
 3. Scannez le code barres sur la boîte du kit, puis sélectionnez la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE Total Nucleic Acid. Touchez **Continuer** pour continuer.
 4. Placez le plateau dans l'appareil Maxwell®, entrez les informations de suivi de la cartouche et de l'échantillon sur l'écran « Configuration des cartouches », confirmez que les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés, et touchez le bouton **Démarrer** pour commencer le cycle d'extraction.

Remarque : vous trouverez des instructions d'installation de l'appareil détaillées à la Section 7.

6.D. Protocole d'extraction des acides nucléiques totaux (suite)



L'utilisateur ajoute dans les puits :

1. Échantillons prétraités et 500 µl d'isopropanol à 100 %
8. CSC/RSC Plunger

Figure 4. Maxwell® CSC Cartridge. L'échantillon de tissus FFPE prétraité et l'isopropanol sont ajoutés au puits n°1 et un plongeur est ajouté au puits n°8.

6.E. Protocole d'extraction successive de l'ADN et de l'ARN

Lorsque vous sélectionnez la méthode d'extraction successive de l'ADN et de l'ARN, le logiciel Maxwell® réalise deux cycles d'extraction distincts à la suite, et l'utilisateur doit ajouter quelques réactifs aux cartouches entre ces cycles. Pour la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential, la première méthode consiste à extraire l'ADN de l'échantillon de tissus FFPE lysés dans le premier Elution Tube, et la deuxième à extraire l'ARN du même échantillon dans un deuxième Elution Tube à l'aide de la même cartouche et du même plongeur. Vous trouverez ci-dessous les instructions pour la préparation des cartouches pour chacun de ces cycles d'extraction.

Cycle 1 : Extraction de l'ADN

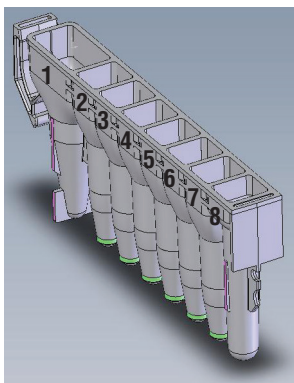
1. Une fois l'heure d'incubation terminée (Section 5.A), transférez immédiatement la phase aqueuse bleue dans le puits n°1 de la Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Utilisez un nouveau cône de pipette pour chaque échantillon afin d'éviter une contamination croisée.

Remarques :

- a. S'il reste du produit non digéré à la fin de l'incubation, centrifugez les tubes d'échantillon à 10 000 × g pendant 20 secondes pour agglomérer le produit non digéré. Ne transférez aucun produit aggloméré ou non digéré dans la cartouche.
 - b. Transférez tout le volume de phase aqueuse bleue dans la cartouche tout en évitant tout produit non digéré, et procédez à l'extraction dans les 30 minutes suivant la fin de l'incubation.
 - c. Le volume de la phase aqueuse bleue dans le tube varie en fonction de l'échantillon de tissu FFPE entré et de sa composition.
2. Scannez le code barres sur la boîte du kit, puis sélectionnez la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential et touchez **Continuer** pour continuer.

- Placez le plateau dans l'appareil Maxwell[®], entrez les informations de suivi de la cartouche et de l'échantillon sur l'écran « Configuration des cartouches », confirmez que les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés, et touchez le bouton **Démarrer** pour commencer le cycle d'extraction.

Remarque : vous trouverez des instructions d'installation de l'appareil détaillées à la Section 7.



L'utilisateur ajoute dans les puits :

- Échantillons prétraités
- CSC/RSC Plunger

Figure 5. Maxwell[®] CSC Cartridge. L'échantillon de tissus FFPE prétraité est ajouté au puits n°1 et un plongeur est ajouté au puits n°8.

Instructions entre les cycles

Réalisez les opérations suivantes entre le premier cycle d'extraction d'ADN FFPE et le deuxième cycle d'extraction d'ARN FFPE pour la méthode successive ADN/ARN :

- Suivez les instructions à l'écran à la fin de la méthode d'extraction FFPE DNA Sequential. Vérifiez que les plongeurs sont situés dans le puits n°8 des cartouches à la fin du cycle. Si les plongeurs ne sont pas retirés de la barre, suivez les instructions du manuel d'utilisation approprié à votre Maxwell[®] Instrument (voir le Tableau 1) pour réaliser une procédure d'Éjection des plongeurs afin de décharger les plongeurs. Pour préparer le cycle d'extraction FFPE RNA Sequential, un nouvel écran d'installation de cartouche apparaît.
- Bouchez et retirez les Elution Tubes contenant de l'ADN juste après le cycle pour éviter l'évaporation des éluats.
- À la fin du cycle d'extraction FFPE DNA Sequential, la résine est déposée dans le puits n°2 afin de préparer le cycle d'extraction FFPE RNA Sequential.

Remarques :

- Ne retirez pas les cartouches ni les plongeurs du plateau, et ne les jetez pas. Ils seront réutilisés pour l'extraction FFPE RNA Sequential.
 - Réalisez l'extraction FFPE RNA Sequential dans les 2 heures suivant la fin de l'extraction FFPE DNA Sequential.
- Un écran d'installation des cartouches apparaît, et indique les positions des échantillons et les informations de suivi entrées avant le premier cycle d'extraction de l'ADN. Si nécessaire, vous pouvez modifier ces informations pour refléter toute modification apportée aux cartouches traitées en touchant le bouton **Activer fonction de modification**. Veuillez consulter la Section 8 pour plus d'informations.
 - Touchez le bouton **Continuer** pour faire apparaître l'écran « Liste de contrôle d'extraction ».

6.E. Protocole d'extraction successive de l'ADN et de l'ARN (suite)

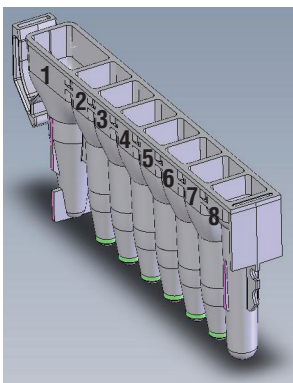
Cycle 2 : Extraction de l'ARN

9. Placez un Elution Tube vide à la position de l'Elution Tube pour chaque cartouche dans le ou les plateaux.
Remarque : utilisez uniquement les Elution Tubes fournis dans le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. Les autres tubes d'éluion ne sont pas forcément compatibles avec le Maxwell® CSC Instrument et peuvent affecter les performances d'extraction de l'ARN.
10. Ajoutez 50 µl de Nuclease-Free Water au fond de chaque Elution Tube. Les Elution Tubes doivent rester ouverts pendant l'extraction de l'ARN (Figure 7).
Remarque : utilisez uniquement la Nuclease-Free Water fournie dans le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. L'utilisation d'autres tampons d'éluion peut affecter les performances d'extraction de l'ARN ou l'utilisation ultérieure.
11. Immédiatement après l'utilisation, préparez un cocktail de $MnCl_2$ et de DNase I comme illustré ci-dessous :

| Réactif | Quantité/Réaction | Réactions (Nombre d'échantillons + 2) | Total |
|--------------------------------------|-------------------|--|-----------------|
| $MnCl_2$, 0,09 M | 17 µl | n + 2 | 17 µl × (n + 2) |
| DNase I ¹ (avec Blue Dye) | 10 µl | n + 2 | 10 µl × (n + 2) |

¹Stockez le DNase I reconstitué restant avec du Blue Dye entre -30 °C et -10 °C.

12. Ajoutez 27 µl de cocktail de DNase I au puit n°7 de chaque cartouche.
Remarque : Ne stockez pas de cocktail de DNase I inutilisé restant.
13. Ajoutez 500 µl d'isopropanol à 100 % au puits n°1.
14. Placez le plateau dans l'appareil Maxwell®, confirmez que les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés, et touchez le bouton **Démarrer** pour commencer le deuxième cycle d'extraction FFPE RNA Sequential.
Remarque : vous trouverez des instructions d'installation de l'appareil détaillées à la Section 7.



L'utilisateur ajoute dans les puits :

1. 500 µl d'isopropanol à 100 % (ajoutez à l'échantillon présent dans le puits n°1).
7. 27 µl de cocktail de DNase I
8. CSC/RSC Plunger (même plongeur que celui utilisé pendant l'extraction FFPE DNA Sequential qui devrait déjà être présent dans le puits n°8)

Figure 6. Maxwell® CSC Cartridge. De l'isopropanol est ajouté à l'échantillon existant dans le puits n°1, du cocktail de DNase I dans le puits n°7, et le plongeur utilisé dans le cycle d'extraction FFPE DNA Sequential devrait être présent dans le puits n°8.



Figure 7. Installation et configuration du plateau. De la Nuclease-Free Water est ajoutée aux Elution Tubes comme indiqué. Ouvrez les Elution Tubes avant de commencer la méthode d'extraction.

7. Installation et utilisation du Maxwell® Instrument

Les Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, RNA, TNA et DNA/RNA Sequential Methods pour l'appareil Maxwell® CSC Instrument peuvent être téléchargées à l'adresse suivante :

www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-cscsoftware-firmware-methods/

Les Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, RNA, TNA et DNA/RNA Sequential Methods pour l'appareil Maxwell® CSC 48 Instrument peuvent être téléchargées à l'adresse suivante :

www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

Remarque : le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit n'est compatible qu'avec la version 4.0.0 ou supérieure du logiciel Maxwell® CSC ou avec la version 4.1.1 ou supérieure du logiciel Maxwell® CSC 48.

Si vous pensez que votre appareil peut être contaminé avec du RNase, nettoyez l'appareil avant de l'utiliser. Respectez les instructions de la section Nettoyage et entretien du *manuel d'utilisation du Maxwell® CSC Instrument IVD Mode #TM457* ou du *manuel d'utilisation du Maxwell® CSC 48 Instrument IVD Mode #TM623*.

1. Démarrez le Maxwell® Instrument et la tablette. Connectez-vous à la tablette et démarrez le logiciel Maxwell® CSC IVD-mode en touchant deux fois l'icône sur le bureau. L'appareil réalise un autotest et place toutes les pièces mobiles en position de repos.
2. Sélectionnez **Démarrer** sur l'écran « Accueil ».

7. Installation et utilisation du Maxwell® Instrument (suite)

3. Scannez ou saisissez le code barres dans l'angle supérieur droit de l'étiquette du Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit (Figure 8).

Remarque : le code barres de méthode du Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit est requis pour l'extraction sur les appareils Maxwell® CSC Instruments. L'étiquette du kit contient deux codes barres. Le code barres de la méthode est indiqué à la Figure 8. S'il n'est pas possible de scanner le code barres, contactez Promega Technical Services (techserv@promega.com).

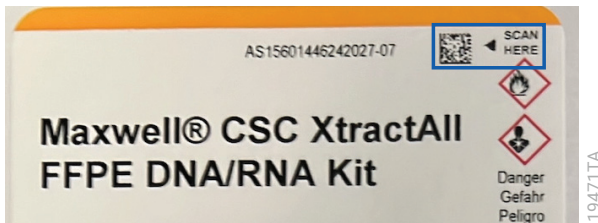


Figure 8. Étiquette de kit indiquant le code barres à scanner. Le code barres à scanner pour lancer une méthode d'extraction est indiqué dans le rectangle bleu en haut à droite de l'étiquette du kit.

4. Sur l'écran de sélection de la méthode, sélectionnez la méthode correspondant à la procédure traitée : Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, Maxwell® CSC XtractAll FFPE Total Nucleic Acid ou Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential.

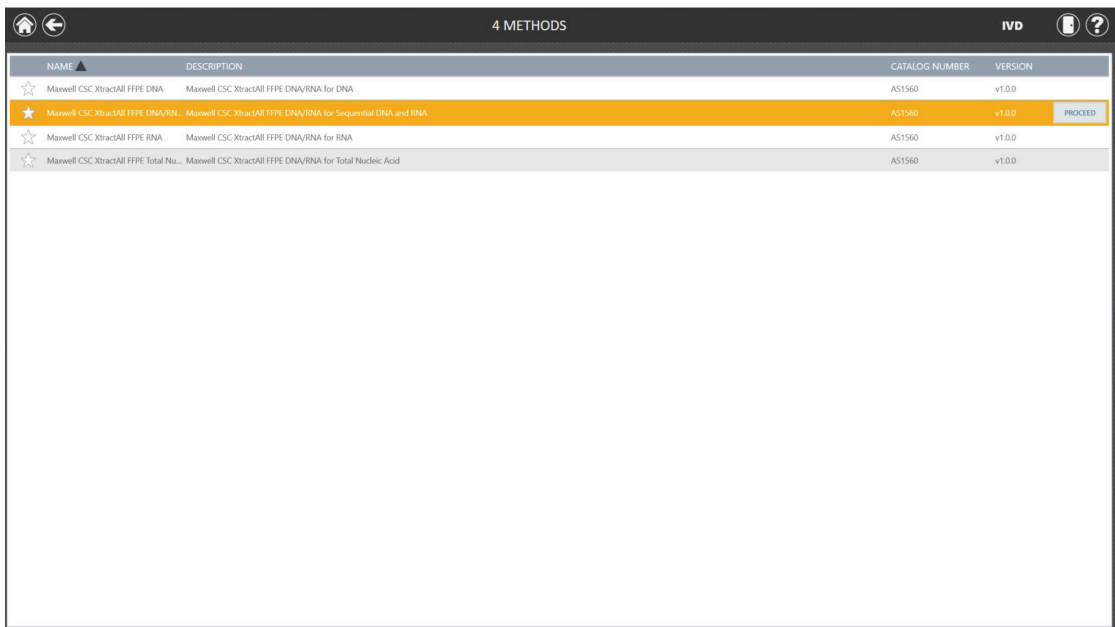


Figure 9. Écran de sélection de méthode. Sélectionnez la méthode correspondant à la procédure souhaitée.

5. Vérifiez que la bonne méthode d'extraction a été sélectionnée, et touchez le bouton **Continuer**.
6. Sur l'écran « Configuration des cartouches », touchez les positions de cartouches pour sélectionner ou désélectionner toute position à utiliser pour le cycle d'extraction. Entrez toute information de suivi des échantillons requise et touchez le bouton **Continuer**.

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

7. Une fois la porte de l'appareil ouverte, confirmez que tous les éléments de la liste de contrôle d'extraction ont été réalisés. Vérifiez que les échantillons prétraités ont été ajoutés au puits n°1 des cartouches, que de l'isopropanol a été ajouté au puits n°1 de la cartouche (pour les procédures RNA, TNA et FFPE RNA Sequential uniquement), que du cocktail de DNase I a été ajouté au puits n°7 de la cartouche (pour les procédures RNA et FFPE RNA Sequential uniquement), que les cartouches sont chargées sur l'appareil, que les Elution Tubes non bouchées sont présents avec de la Nuclease-Free Water et que les plongeurs sont présents dans le puits n°8. Transférez le plateau contenant les cartouches préparées sur la plateforme de l'appareil Maxwell®.

Insertion du plateau Maxwell® : tenez le plateau par les côtés pour éviter de déplacer les cartouches. Vérifiez que le plateau est placé dans l'appareil Maxwell® avec les Elution Tubes 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® CSC 48 à 24 positions afin de déterminer s'ils doivent être placés à l'avant ou à l'arrière de l'appareil.

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

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



Avertissement : risque de pincement.

9. Le Maxwell® Instrument lance immédiatement le cycle d'extraction. L'écran affiche les étapes réalisées et la durée restante approximative du cycle.

Remarques :

- a. Le bouton **Interrompre** permet de mettre fin au cycle. Tous les échantillons d'un cycle interrompu seront perdus.
 - b. Si le cycle est interrompu 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 l'Éjection des plongeurs lorsque cela vous est demandé et respecter les instructions du manuel d'utilisation de votre Maxwell® Instrument (voir Tableau 1). Si aucun plongeur n'est présent sur la barre, vous pouvez ignorer l'Éjection des plongeurs lorsque cela vous est demandé. Les échantillons seront perdus.
10. Une fois le cycle d'extraction (procédures pour ADN, ARN et TNA) ou que les cycles d'extraction successifs de l'ADN et de l'ARN sont terminés, l'interface utilisateur affiche un message indiquant que la méthode est terminée.

7. Installation et utilisation du Maxwell® Instrument (suite)

Fin de cycle

11. Suivez les instructions à l'écran à la fin de la méthode pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont situés dans le puits n°8 de la cartouche à la fin du cycle. Si les plongeurs ne sont pas retirés de la barre, suivez les instructions du manuel d'utilisation de votre Maxwell® Instrument (voir le Tableau 1) pour réaliser une procédure d'Ejection des plongeurs afin d'essayer de décharger les plongeurs.
12. Bouchez et retirez les Elution Tubes contenant vos acides nucléiques juste après le cycle pour éviter l'évaporation des éluats. Retirez le ou les plateaux Maxwell® de l'appareil.

Remarque : pour retirer le plateau de la plateforme de l'appareil, tenez-le par les côtés. Vérifiez que les échantillons sont retirés de l'appareil avant de réaliser un protocole de désinfection aux UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques extraits. Les échantillons d'ADN peuvent être stockés jusqu'à une semaine à 4 °C et jusqu'à un mois à -20 °C. Les échantillons d'ARN et de TNA peuvent être stockés une nuit entre -30 °C et -10 °C, ou à moins de -60 °C pour un stockage de plus longue durée.



13. Retirez les cartouches et les plongeurs du ou des plateaux Maxwell® et mettez-les au rebut comme déchets dangereux conformément aux procédures de votre établissement. Les cartouches et les plongeurs sont conçus pour être utilisés avec un seul échantillon de tissu FFPE pendant une seule procédure, et les tubes d'éluat sont à usage unique. Ne réutilisez pas les Maxwell® CSC Cartridges, les CSC/RSC Plungers ni les Elution Tubes avec plusieurs échantillons.

8. Efficacité des procédures

La procédure DNA/RNA séquentiel du Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit associe la méthode d'extraction de l'ADN uniquement et la méthode d'extraction de l'ARN uniquement en un seul protocole. Ainsi, lorsque vous utilisez la procédure DNA/RNA Séquentiel, l'extraction de l'ADN est réalisée en premier, suivie de l'extraction de l'ARN du même échantillon de tissus FFPE. La procédure DNA/RNA séquentiel est conçue pour extraire l'ADN et l'ARN dans des Elution Tubes distincts tout en conservant les informations de suivi de l'échantillon, mais le suivi de l'échantillon est assez souple pour accepter les modifications entre deux cycles.

| Étape | Procédures disponibles dans la méthode d'extraction successive de l'ADN et de l'ARN | | |
|---|---|----------------|----------------|
| | ADN/ARN successivement | ADN uniquement | ARN uniquement |
| Ajout des échantillons, des cartouches et des informations de suivi des échantillons | Ajouter | Ajouter | |
| Première extraction (ADN) de la méthode successive | X | X | |
| Retrait des éluats d'ADN de l'appareil | X | X | |
| Modification des échantillons, des cartouches et des informations de suivi des échantillons | X | Supprimer | Ajouter |
| Deuxième extraction (ARN) de la méthode successive | X | | X |
| Retrait des éluats d'ARN de l'appareil | X | | X |

9. Instructions après extraction

Déterminez si les acides nucléiques extraits présentent un rendement et une pureté conformes aux exigences de l'essai de diagnostic en aval avant de les utiliser. Les performances du kit ont été évaluées en fonction de l'amplification et de la quantification par colorant fluorescent des acides nucléiques extraits. Les autres méthodes de quantification, y compris l'absorbance, ne sont pas forcément corrélées avec l'amplification des acides nucléiques ou la quantification par fluorescence. Les valeurs d'absorbance pour les acides nucléiques extraits d'échantillons de tissus FFPE peuvent surestimer le rendement. Nous recommandons d'utiliser des méthodes plus spécifiques pour déterminer le rendement des acides nucléiques.

10. Évaluation des performances analytiques

Les performances analytiques du Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit ont été évaluées avec des échantillons de tissus FFPE humains traités sur les Maxwell® CSC et Maxwell® CSC 48 Instruments. Les performances d'extraction de l'ADN ont été évaluées à l'aide de la procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential, car la procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA est identique à la partie extraction de l'ADN initiale de la procédure d'extraction Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential.

10.A. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ADN

Tableau 2. Amplification de l'ADN extrait à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential et TNA. L'ADN et les acides nucléiques totaux ont été extraits séparément de six répétitions individuelles d'échantillons de sections de taille typique unique de tissus FFPE de la poitrine, du foie et de l'utérus respectivement à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential et TNA. L'ADN et les acides nucléiques totaux extraits ont été utilisés dans un essai qPCR pour l'amplification de la RNase P H1 (102bp) afin d'évaluer la quantité d'ADN et le gène de la transcriptase inverse de la télomérase (TERT) (164 bp) comme cible plus longue de l'ADN afin d'évaluer la qualité de l'ADN. La concentration moyenne de l'ADN de chaque ensemble de répétitions est illustrée. Le rendement moyen de l'ADN depuis tous les échantillons de tissus FFPE était d'au moins 100 copies/µl de RNase P H1 et d'au moins 25 copies/µl de TERT.

| Procédure Maxwell® CSC XtractAll | Type de tissu FFPE | Concentration moyenne de l'ADN (copies/µl) | |
|----------------------------------|--------------------|--|-------|
| | | RNase P H1 | TERT |
| DNA/RNA Sequential | Poitrine | 5333 | 7162 |
| | Foie | 10363 | 19609 |
| | Utérus | 2762 | 936 |
| TNA | Poitrine | 1234 | 3815 |
| | Foie | 3718 | 11894 |
| | Utérus | 1173 | 894 |

Tableau 3. Évolutivité du rendement de l'ADN à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential et TNA. L'ADN et les acides nucléiques totaux ont été extraits séparément de six répétitions individuelles d'échantillons d'une et deux sections de taille typique de tissus FFPE de la poitrine, du foie et de l'utérus respectivement à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential et TNA. L'ADN et les acides nucléiques totaux extraits ont été utilisés dans un essai qPCR pour l'amplification de la RNase P H1 (102bp) afin d'évaluer la quantité d'ADN et le TERT (164 bp) comme cible plus longue du gène afin d'évaluer la qualité de l'ADN. Le ratio moyen de concentration de l'ADN entre la section unique et les deux sections de tissus FFPE pour chaque ensemble de répétitions est illustré. Le ratio moyen de concentration de l'ADN extrait des deux sections et de la section unique d'échantillons de tissus FFPE était d'au moins 1,4 pour RNase P H1 et TERT.

| Procédure Maxwell® CSC XtractAll | Type de tissu FFPE | Ratio moyen de concentration de l'ADN pour deux sections ou une section unique de tissus FFPE | |
|----------------------------------|--------------------|---|------|
| | | RNase P H1 | TERT |
| DNA/RNA Sequential | Poitrine | 2,1 | 2,2 |
| | Foie | 1,7 | 1,7 |
| | Utérus | 2,1 | 2,3 |
| TNA | Poitrine | 1,9 | 2,0 |
| | Foie | 2,1 | 2,2 |
| | Utérus | 1,9 | 1,9 |

10.B. Quantité, qualité et amplificabilité de l'ARN

Tableau 4. Amplification de l'ARN extrait à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential et TNA. L'ARN et les acides nucléiques totaux ont été extraits de six répétitions individuelles de sections de taille typique unique de tissus FFPE de la poitrine, du foie et de l'utérus. L'extraction de l'ARN a été réalisée avec les procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA ou DNA/RNA Sequential. L'extraction des acides nucléiques totaux a été réalisée avec la procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. L'ARN et les acides nucléiques totaux extraits ont été utilisés dans un essai RT-qPCR pour l'amplification de l'ARN de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 (HPRT1) (100 bp) afin d'évaluer la quantité d'ARN et l'ARN β -actin (ACTB) (171 bp) comme cible plus longue de l'ARN afin d'évaluer la qualité de l'ADN. La concentration moyenne de l'ARN de chaque ensemble de répétitions est illustrée. Le rendement moyen de l'ARN depuis tous les échantillons de tissus FFPE était d'au moins 0,032 ng/ μ l pour les cibles d'ARN ACTB et HPRT1.

| Procédure Maxwell® CSC XtractAll | Type de tissu FFPE | Concentration moyenne d'ARN (ng/ μ l) | |
|----------------------------------|--------------------|---|------|
| | | HPRT1 | ACTB |
| RNA | Poitrine | 0,27 | 0,17 |
| | Foie | 0,71 | 0,30 |
| | Utérus | 0,91 | 0,30 |
| DNA/RNA Sequential | Poitrine | 0,52 | 0,21 |
| | Foie | 0,76 | 0,21 |
| | Utérus | 0,64 | 0,13 |
| TNA | Poitrine | 0,91 | 0,21 |
| | Foie | 1,11 | 0,09 |
| | Utérus | 1,45 | 0,28 |

Tableau 5. Évolutivité du rendement de l'ARN à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential et TNA. L'ARN et les acides nucléiques totaux ont été extraits de six répétitions individuelles d'une ou deux sections de taille typique de tissus FFPE de la poitrine, du foie et de l'utérus. L'ARN a été extrait avec les procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA ou DNA/RNA Sequential. Les acides nucléiques totaux ont été extraits avec la procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. L'ARN et les acides nucléiques totaux extraits ont été utilisés dans un essai RT-qPCR pour l'amplification de l'ARN de HPRT1 (100 bp) afin d'évaluer la quantité d'ARN et l'ARN ACTB (171 bp) comme cible plus longue de l'ARN afin d'évaluer la qualité de l'ADN. Le ratio moyen de concentration de l'ARN entre la section unique et les deux sections pour chaque ensemble de répétitions est illustré. Le ratio moyen de concentration de l'ARN extrait des deux sections et de la section unique d'échantillons de tissus FFPE était d'au moins 1,4 pour les cibles HPRT1 et ACTB.

| Procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE | Type de tissu FFPE | Ratio moyen de concentration de l'ARN pour deux sections ou une section unique de tissus FFPE | |
|---------------------------------------|--------------------|---|------|
| | | HPRT1 | ACTB |
| RNA | Poitrine | 1,6 | 1,4 |
| | Foie | 1,7 | 1,5 |
| | Utérus | 1,8 | 1,6 |
| DNA/RNA Sequential | Poitrine | 1,8 | 1,6 |
| | Foie | 1,7 | 1,5 |
| | Utérus | 2,1 | 2,0 |
| TNA | Poitrine | 1,4 | 1,6 |
| | Foie | 2,6 | 2,2 |
| | Utérus | 1,9 | 1,7 |

10.C. Quantification par colorant fluorescent

Tableau 6. Quantification de l'ADN et de l'ARN par colorant fluorescent à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential et RNA. L'ADN et l'ARN ont été extraits de six répétitions individuelles de sections de taille typique unique de tissus FFPE de la poitrine, du foie et de l'utérus. L'ADN a été extrait à l'aide de la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential. L'ARN a été extrait avec la procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA ou DNA/RNA Sequential. La quantité d'ADN extraite a été évaluée avec un colorant fluorescent spécifique à l'ADN à double brin, et la quantité d'ARN extraite a été évaluée avec un colorant fluorescent spécifique à l'ARN. Les rendements d'ADN et d'ARN moyens pour chaque ensemble de répétitions ont été calculés à l'aide des volumes d'élution récupérés, et sont illustrés ci-dessous. Le rendement de l'ADN et de l'ARN extraits de tous les échantillons de tissus FFPE quantifiés à l'aide d'une méthode avec colorant fluorescent était d'au moins 100 ng.

| Analyte | Procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE | Type de tissu FFPE | Rendement (ng) |
|---------|---------------------------------------|--------------------|----------------|
| DNA | DNA/RNA Sequential | Poitrine | 279 |
| | | Foie | 367 |
| | | Utérus | 154 |
| RNA | RNA | Poitrine | 445 |
| | | Foie | 2 199 |
| | | Utérus | 1 153 |
| | DNA/RNA Sequential | Poitrine | 616 |
| | | Foie | 1 330 |
| | | Utérus | 736 |

10.D. Reproductibilité

Tableau 7. Reproductibilité de l'extraction des acides nucléiques à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential et TNA. Pour évaluer la reproductibilité de l'extraction des acides nucléiques, un utilisateur unique a réalisé trois cycles d'extraction individuels pour chacune des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential et TNA à l'aide d'échantillons de tissus FFPE prétraités regroupés. Les éluats ont été utilisés dans un essai qPCR afin de déterminer la quantité d'ADN ciblant la RNase P H1 (102bp) ou dans un essai RT-qPCR afin de déterminer la quantité d'ADN ciblant l'ARN HPRT1 (100bp). Les coefficients de variation sur un même cycle et entre les cycles ont été calculés pour différentes procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE à l'aide des volumes d'élution récupérés, et sont illustrés ci-dessous. Tous les coefficients de variation obtenus étaient inférieurs à 15 %.

| Analyte | Procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE | Nombre de cycles | Coefficient de variation | Coefficient de variation |
|---------|--|------------------|--------------------------|------------------------------|
| | | | sur un même cycle en % | entre différents cycles en % |
| DNA | DNA/RNA Sequential | 1 | 13 % | 10 % |
| | | 2 | 8 % | |
| | | 3 | 7 % | |
| | TNA | 1 | 12 % | 11 % |
| | | 2 | 9 % | |
| | | 3 | 8 % | |
| RNA | RNA | 1 | 14 % | 12 % |
| | | 2 | 9 % | |
| | | 3 | 13 % | |
| | DNA/RNA Sequential | 1 | 5 % | 6 % |
| | | 2 | 6 % | |
| | | 3 | 8 % | |
| | TNA | 1 | 14 % | 11 % |
| | | 2 | 5 % | |
| | | 3 | 12 % | |

10.E. Inhibition de l'amplification en raison de substances interférentes

Tableau 8. Évaluation de l'inhibition de l'amplification de l'ADN extrait à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential et TNA. L'ADN ou les acides nucléiques totaux ont été extraits de quatre répétitions individuelles d'une ou deux sections de taille typique de tissus FFPE de la poitrine, du foie et de l'utérus. L'extraction de l'ADN a été réalisée avec les procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential. L'extraction des acides nucléiques totaux a été réalisée avec la procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Deux microlitres d'un éluat non dilué et dilués quatre fois de chacun des mêmes éluats d'ADN ou d'acides nucléiques totaux ont été utilisés dans un essai qPCR ciblant la RNase P H1 (102bp) afin d'évaluer l'effet de toute substance interférente. Les valeurs C_q des éluats non dilués et des éluats dilués quatre fois ont été comparées afin d'évaluer l'inhibition au sein de différents éluats avec une valeur ΔC_q de 2 ± 1 cycles, ce qui indique l'absence d'inhibition. Les valeurs ΔC_q pour tous les éluats pour les échantillons individuels étaient comprises entre 1,9 et 2,5, ce qui indique une inhibition indétectable de l'amplification de l'ADN à l'aide de l'ADN ou des acides nucléiques totaux extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

| Type de tissu FFPE | Nombre d'échantillons | Nombre de sections | Procédure TNA | Procédure DNA/RNA Sequential |
|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------|------------------------------|
| Poirine | 1 | 1 | 2,1 | 2,0 |
| | 2 | | 2,0 | 2,1 |
| | 3 | | 2,1 | 2,1 |
| | 4 | | 2,1 | 2,2 |
| | 1 | 2 | 2,1 | 2,3 |
| | 2 | | 2,2 | 2,2 |
| | 3 | | 2,2 | 2,4 |
| | 4 | | 2,1 | 2,3 |
| Foie | 1 | 1 | 2,0 | 2,1 |
| | 2 | | 2,0 | 2,0 |
| | 3 | | 2,0 | 2,2 |
| | 4 | | 2,2 | 2,3 |
| | 1 | 2 | 1,9 | 2,1 |
| | 2 | | 2,1 | 2,0 |
| | 3 | | 2,1 | 2,3 |
| | 4 | | 2,2 | 2,2 |

| Type de tissu FFPE | Nombre d'échantillons | Nombre de sections | Procédure TNA | Procédure DNA/RNA Sequential |
|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------|------------------------------|
| Utérus | 1 | 1 | 2,3 | 2,5 |
| | 2 | | 2,3 | 2,2 |
| | 3 | | 2,2 | 2,3 |
| | 4 | | 2,2 | 2,4 |
| | 1 | 2 | 2,1 | 2,2 |
| | 2 | | 2,0 | 2,1 |
| | 3 | | 2,0 | 2,0 |
| | 4 | | 2,1 | 2,2 |

Tableau 9. Évaluation de l'inhibition de l'amplification de l'ARN extrait à l'aide des procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential et TNA. L'ARN ou les acides nucléiques totaux ont été extraits de quatre répétitions individuelles d'une ou deux sections de taille typique de tissus FFPE de la poitrine, du foie et de l'utérus. L'extraction de l'ARN a été réalisée avec les procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA ou DNA/RNA Sequential. L'extraction des acides nucléiques totaux a été réalisée avec la procédure Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Deux microlitres d'un éluat non dilué et dilués quatre fois de chacun des mêmes éluats d'ARN ou d'acides nucléiques totaux ont été utilisés dans un essai RT-qPCR ciblant l'ARN HPRT1 (100bp) afin d'évaluer l'effet de toute substance interférente. Les valeurs C_q des éluats non dilués et des éluats dilués quatre fois ont été comparées afin d'évaluer l'inhibition au sein de différents éluats avec un ΔC_q de 2 ± 1 cycles, ce qui indique l'absence d'inhibition. Les valeurs ΔC_q pour tous les éluats pour les échantillons individuels étaient comprises entre 1,2 et 2,7, ce qui indique une inhibition indétectable de l'amplification de l'ARN à l'aide de l'ARN ou des acides nucléiques totaux extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

| Type de tissu FFPE | Nombre d'échantillons | Nombre de sections | Procédure RNA | Procédure TNA | Procédure DNA/RNA Sequential |
|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------|---------------|------------------------------|
| Poitrine | 1 | 1 | 2,7 | 1,7 | 2,4 |
| | 2 | | 1,6 | 1,5 | 1,4 |
| | 3 | | 2,0 | 1,4 | 1,5 |
| | 4 | | 1,5 | 1,7 | 1,7 |
| | 1 | 2 | 1,4 | 1,5 | 1,6 |
| | 2 | | 1,7 | 1,4 | 1,5 |
| | 3 | | 1,8 | 2,3 | 2,1 |
| | 4 | | 2,4 | 1,7 | 1,6 |

| Type de tissu FFPE | Nombre d'échantillons | Nombre de sections | Procédure RNA | Procédure TNA | Procédure DNA/RNA Sequential |
|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------|---------------|------------------------------|
| Foie | 1 | 1 | 1,7 | 1,3 | 1,5 |
| | 2 | | 1,6 | 2,2 | 1,6 |
| | 3 | | 1,9 | 1,5 | 1,6 |
| | 4 | | 1,9 | 1,5 | 2,1 |
| | 1 | 2 | 1,8 | 1,8 | 1,4 |
| | 2 | | 1,3 | 1,5 | 1,9 |
| | 3 | | 1,7 | 1,8 | 2,0 |
| | 4 | | 1,9 | 2,1 | 1,2 |
| Utérus | 1 | 1 | 1,8 | 1,7 | 2,1 |
| | 2 | | 1,7 | 2,3 | 1,4 |
| | 3 | | 2,0 | 2,0 | 1,9 |
| | 4 | | 1,8 | 2,1 | 1,6 |
| | 1 | 2 | 2,0 | 2,2 | 1,8 |
| | 2 | | 1,7 | 1,4 | 1,2 |
| | 3 | | 1,9 | 1,5 | 1,6 |
| | 4 | | 1,7 | 1,8 | 2,1 |

10.F. Contamination croisée

La contamination croisée a été évaluée avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit et les appareils Maxwell® CSC Instruments en alternant les positions des Maxwell® CSC Cartridges contenant des échantillons de tissus FFPE humains et des échantillons de tissus FFPE de souris sur le plateau Maxwell® CSC/RSC sur un seul cycle d'extraction. Les procédures Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential et TNA ont été testées. La présence d'ADN et d'ARN humains dans les échantillons de souris évaluée respectivement par les essais qPCR ou RT-qPCR a permis d'identifier toute éventuelle contamination croisée par des Maxwell® CSC cartridges voisines. Tous les échantillons de tissus FFPE de souris qui ont été traités à des positions du plateau adjacentes à des échantillons de tissus FFPE humains avaient des valeurs C_q supérieures aux valeurs C_q obtenues pour les concentrations d'ADN ou d'ARN les plus faibles de la courbe standard correspondante.

11. Évaluation des performances cliniques

L'évaluation des performances cliniques du Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit a été réalisée par un laboratoire clinique externe avec le Maxwell® CSC 48 Instrument. L'ADN, l'ARN et les acides nucléiques totaux (TNA) ont été extraits d'échantillons de tissus FFPE humains à l'aide des différentes méthodes d'extraction Maxwell® CSC XtractAll FFPE, et les acides nucléiques ont été amplifiés dans un essai adapté du point de vue clinique.

11.A. Procédure d'extraction de l'ADN

De l'ADN a été extrait d'échantillons de tissus FFPE humains de douze donneurs individuels par un testeur unique à l'aide de la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA et de la méthode standard de purification de l'ADN du laboratoire clinique externe pour référence. Les éluats d'ADN obtenus ont été analysés par un essai qPCR à l'aide du cobas® EGFR Mutation Test. Les résultats des tests par amplification étaient concordants entre les douze échantillons d'ADN extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit et la méthode d'extraction d'ADN de référence du laboratoire.

11.B. Procédure d'extraction de l'ARN

De l'ARN a été extrait d'échantillons de tissus FFPE humains de douze donneurs individuels par un testeur unique à l'aide de la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA et de la méthode standard de purification de l'ARN du laboratoire clinique externe pour référence. Les éluats d'ARN obtenus ont été analysés par un essai RT-qPCR avec des amorces d'hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 (HPRT1). Les résultats des essais d'amplification étaient concordants entre les douze échantillons d'ARN extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit et la méthode d'extraction d'ARN de référence du laboratoire.

11.C. Procédure d'extraction des acides nucléiques totaux

Des acides nucléiques totaux ont été extraits d'échantillons de tissus FFPE humains de douze donneurs individuels par un testeur unique à l'aide de la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Des sections de douze même échantillons de tissus FFPE ont été utilisées par le même testeur pour extraire l'ADN et l'ARN séparément à l'aide des méthodes d'extraction de l'ADN et de l'ARN de référence du laboratoire clinique externe.

Les éluats de TNA obtenus avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit et les éluats d'ADN obtenus avec la méthode d'extraction de l'ADN de référence du laboratoire ont été analysés par un essai qPCR à l'aide du cobas® EGFR Mutation Test. Par ailleurs, les éluats de TNA obtenus avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit et les éluats d'ARN obtenus avec la méthode d'extraction de l'ARN de référence du laboratoire ont été analysés par un essai RT-qPCR avec des amorces HPRT1. Les résultats de l'amplification des tests EGFR Mutation et HPRT1 ont démontré la concordance entre tous les échantillons de TNA extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit et l'ADN et l'ARN extraits à l'aide des méthodes de référence du laboratoire.

11.D. Procédure d'extraction successive de l'ADN et de l'ARN

L'ADN et l'ARN ont été extraits dans des éluats distincts à partir d'échantillons de tissus FFPE humains de douze donneurs individuels par deux testeurs à l'aide de la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential. Des sections de douze même échantillons de tissus FFPE ont été utilisées pour extraire l'ADN et l'ARN séparément à l'aide des méthodes de purification de l'ADN et de l'ARN de référence du laboratoire clinique externe.

Les éluats d'ADN obtenus avec le système Maxwell® CSC avec la méthode d'extraction de l'ADN de référence du laboratoire ont été analysés par un essai qPCR à l'aide du cobas® EGFR Mutation Test. Les résultats de l'amplification ont démontré la concordance entre tous les échantillons d'ADN extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit à l'aide de la méthode DNA/RNA Sequential et de la méthode d'extraction d'ADN de référence du laboratoire, ainsi qu'entre les deux testeurs.

De même, les éluats d'ARN obtenus avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit et la méthode d'extraction de l'ARN de référence du laboratoire ont été analysés par un essai RT-qPCR avec des amorces HPRT1. Les résultats de l'amplification ont démontré la concordance entre tous les échantillons d'ARN extraits avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit à l'aide de la méthode DNA/RNA Sequential et de la méthode d'extraction d'ARN de référence du laboratoire, ainsi qu'entre les deux testeurs.

12. Dépannage

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

Symptômes

Concentration d'acides nucléiques plus basse que prévu dans l'éluat (une section de tissus FFPE typique devrait fournir des acides nucléiques amplifiables en fonction de la taille des tissus, de la cellularité, des conditions de fixation de la formaline et de la manipulation)

Causes et commentaires

Les performances du kit ont été évaluées en isolant les acides nucléiques dans jusqu'à quatre sections de tissus FFPE avec une épaisseur de section maximale de 20 µm. N'utilisez que des sections qui respectent la spécification de taille.

Ce kit a été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus FFPE. Il n'a pas été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non FFPE, tels que les échantillons de tissus frais ou congelés. Les températures et la durée d'incubation ont été testées pour garantir un rendement optimal des acides nucléiques.

Le kit n'a pas été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus FFPE qui ont été préparés avec d'autres fixatifs que la formaline neutre à 10 %. Vérifiez auprès du laboratoire de pathologie ou du fournisseur qu'aucun autre fixatif n'a été utilisé.

Le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit n'a pas été testé avec des sections ou des glissières de tissus FFPE souillées. Réalisez à nouveau l'extraction avec une section ou glissière non souillée.

Les performances du kit ont été évaluées en fonction de l'amplification et de la quantification par colorant fluorescent des acides nucléiques extraits. Les autres méthodes de quantification, y compris l'absorbance, ne sont pas forcément corrélées avec les concentrations déterminées par amplification et par fluorescence.

Des RNases ou des DNases ont peut-être été introduits pendant le traitement ou la quantification des échantillons. Vous trouverez à la Section 13 des informations sur la création d'un environnement sans ribonucléase.

Un cocktail de DNase I a été ajouté à la cartouche pour la procédure incorrecte. Le cocktail de DNase I ne doit être ajouté qu'au puits n°7 de la cartouche pour les procédures RNA et RNA Sequential.

Il n'a pas été ajouté d'isopropanol à la cartouche pour la méthode appropriée (RNA, TNA ou RNA Sequential), ou de l'isopropanol a été ajouté dans le mauvais puits de la cartouche.

La mauvaise méthode d'extraction Maxwell® a été utilisée sur l'appareil. Confirmez que la méthode d'extraction Maxwell® utilisée correspond à la préparation de la cartouche pour la procédure utilisée.

Il n'a pas été ajouté de Nuclease-Free Water, ou il en a été ajouté un volume incorrect dans les tubes d'éluat. Le kit a été testé avec un volume d'éluat de 50 µl.

12. Dépannage (suite)

Symptômes

Qualité plus basse que prévu (l'éluat contient des acides nucléiques hautement fragmentés ou des inhibiteurs des essais ultérieurs)

Causes et commentaires

La ou les sections de tissus FFPE utilisées pour l'extraction peuvent contenir des acides nucléiques fragmentés en raison des conditions de fixation de la formaline ou de la manipulation. Si les acides nucléiques sont fragmentés avant la méthode d'extraction, les acides nucléiques fragmentés seront purifiés avec ce kit. Recommencez l'extraction avec une section adjacente pour évaluer s'il y a un problème avec la section de tissus FFPE ou avec le processus d'extraction.

Certains essais par amplification sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs. Les contrôles ultérieurs devraient identifier la présence d'un inhibiteur de l'amplification dans l'éluat. Vous êtes responsable de la vérification de la compatibilité de ce produit avec tous les essais ultérieurs.

La présence de plusieurs types d'acides nucléiques (ADN et ARN) dans un éluat peut provoquer une compétition dans les essais ultérieurs. En cas de compétition, optimisez l'essai pour l'analyte étudié.

ADN présent dans les éluats d'ARN, ce qui peut affecter les essais ultérieurs

Il n'a pas été ajouté de cocktail de DNase I à la cartouche pour la méthode appropriée (RNA ou RNA Sequential), ou de l'isopropanol a été ajouté dans le mauvais puits de la cartouche. Le cocktail de DNase I ne doit être ajouté qu'au puits n°7 de la cartouche.

L'Elution Tube n'a pas été retiré du plateau et remplacé par un nouveau tube d'éluat et un nouveau tampon d'éluat pendant la procédure DNA/RNA Sequential.

ARN présent dans les éluats d'ADN, ce qui peut affecter les essais ultérieurs

Les éluats d'ADN peuvent être traités avec de la RNase afin de retirer tout ARN présent dans les échantillons d'ADN si un ADN exempt d'ARN est nécessaire.

La méthode DNA est interrompue accidentellement ou volontairement pendant la procédure DNA/RNA Sequential.

Il est possible de récupérer des échantillons d'ARN en utilisant la cartouche avec la méthode Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA.

Incorporation de résine dans les éluats

Des tissus FFPE non digérés ont été transférés dans la cartouche. S'il reste des tissus FFPE non digérés après 1 heure d'incubation (Section 5.A), centrifugez les tubes d'échantillon à 10 000 x g pendant 20 secondes pour agglomérer le produit non digéré. Ne transférez aucun produit aggloméré ou non digéré dans la cartouche.

Une certaine incorporation de résine est normale et n'affecte pas les performances en aval. Si nécessaire, utilisez un Elution Magnet ([Cat.# AS4017, Cat.# AS4018 ou les deux] ; disponible séparément) pour transférer l'éluat dans un nouveau tube. Voir la Section 14, Produits apparentés.

Symptômes
Causes et commentaires

Souillures de résine marron sur les parois des tubes d'élution.

Des résidus de paraffine ou d'échantillons ont adhéré à la paroi du tube pendant le traitement. Ces souillures sont normales. Elles varient en fonction de la composition des échantillons (ex : nombre de boucles, teneur en paraffine), et n'affectent pas la qualité des éluats ni les performances ultérieures.

Le volume d'élution récupéré est trop faible ou trop élevé pour l'utiliser dans des essais ultérieurs

Des volumes d'élution de 30–100 µl ont été testés avec le Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit et ont fourni de bonnes performances.

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif qui a entraîné, ou pourrait entraîner, le décès ou une grave blessure d'un utilisateur ou patient doit être signalé immédiatement au fabricant. Les utilisateurs installés dans l'Union Européenne devraient également signaler tout incident grave à l'Autorité Compétente de l'État Membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

13. Création d'un environnement sans ribonucléase

Les ribonucléases sont extrêmement difficiles à inactiver. Veillez à éviter d'introduire une activité RNase dans vos échantillons d'ARN pendant et après l'isolation. Ceci est particulièrement important si le produit de départ n'est disponible qu'en quantité limitée. Les remarques suivantes peuvent contribuer à éviter une contamination accidentelle de vos échantillons avec du RNase.

1. Deux des principales sources de contamination par RNase sont les mains de l'utilisateur et les bactéries ou les moisissures qui peuvent être présentes sur les particules de poussière en suspension dans l'air. Pour éviter ces sources de contamination, utilisez une technique aseptique lors de la manipulation des réactifs fournis avec ce système. Portez des gants en permanence. Changez de gants immédiatement si vous avez pu être en contact avec des ribonucléases.
2. Dès que possible, utilisez des matières plastiques stériles jetables pour manipuler l'ARN. Ces matières sont généralement exemptes de RNase et ne nécessitent pas de prétraitement pour inactiver le RNase.
3. Traitez le verre et le plastique non stériles avant de les utiliser pour garantir l'absence de RNase. Chauffez le verre à 200 °C pendant la nuit et rincez abondamment les plastiques avec 0,1 N de NaOH, 1 mM d'EDTA puis de l'eau exempte de RNase. Il est également possible d'utiliser des produits d'élimination de RNase du commerce selon les instructions du fabricant.
4. Traitez les solutions non fournies avec le système en ajoutant du pyrocarbonate de diéthyle (DEPC) à 0,1 % dans une hotte. Laissez incuber une nuit sous agitation et à température ambiante dans la hotte. Passez à l'autoclave pendant 30 minutes pour éliminer toute trace de DEPC.

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

Remarque : pour toutes les applications en aval, il est essentiel de continuer à protéger vos échantillons d'ARN contre les RNases.

14. Produits associés

Instruments et accessoires

| Produit | Taille | Cat.# |
|-------------------------------------|-------------|--------|
| Maxwell® CSC Instrument* | 1 de chaque | AS6000 |
| Maxwell® CSC 48 Instrument* | 1 de chaque | AS8000 |
| Maxwell® RSC/CSC Deck Tray | 1 de chaque | SP6019 |
| Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray | 1 de chaque | AS8401 |
| Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray | 1 de chaque | AS8402 |
| Microtube, 1,5 ml | 1 000/pack | V1231 |
| Elution Magnet, 16 positions | 1 de chaque | AS4017 |
| Elution Magnet, 24 positions | 1 de chaque | AS4018 |

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

Maxwell® CSC Reagent Kits

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

© 2025 Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell est une marque déposée de Promega Corporation.

cobas est une marque déposée de Roche Diagnostics Operations, Inc.

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.