



Clean Cell Free DNA Kit

Mode d'emploi

V. 2 - FÉVRIER 2024



REF CCF-D0384



CleanNA, Coenecoop 75, 2741 PH, Waddinxveen, Pays-Bas

Destiné à un usage diagnostique in vitro.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. Consultez régulièrement la page www.cleanna.com/download-ccf pour vérifier les mises à jour de ce document.

Avis de non-responsabilité

CleanNA décline toute garantie concernant ce document, qu'elle soit expresse ou implicite, y compris, mais sans s'y limiter, les garanties de qualité marchande ou d'adaptation à un usage particulier. Dans la mesure autorisée par la loi, CleanNA ne peut en aucun cas être tenu responsable, que ce soit sur la base d'un contrat, d'un délit, d'une garantie, d'une loi ou sur toute autre base, de dommages spéciaux, accessoires, indirects, punitifs, multiples ou consécutifs en rapport avec ou découlant de ce document, y compris, mais sans s'y limiter, l'utilisation de celui-ci, qu'ils soient prévisibles ou non et que CleanNA ait été informé ou non de la possibilité de tels dommages.

Marques déposées

Toutes les marques déposées mentionnées appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Nous contacter

Coenecoop 75 | 2741 PH Waddinxveen | Pays-Bas | T : +31 (0) 182 22 33 50
F : +31 (0) 182 22 33 98 | info@cleanna.com | www.cleanna.com

Table des matières

Usage prévu.....	4
Utilisateur prévu	4
Introduction et principe	4
Aperçu schématique.....	5
Matériel fourni	6
Expédition, stockage et manipulation des réactifs.....	6
Avertissements	7
Précautions.....	8
Contrôle qualité	10
Limites	10
Prélèvement et stockage des échantillons	11
Matériel et équipement que doit fournir l'utilisateur.....	12
Préparation des réactifs.....	13
Clean Cell Free DNA Kit – Protocole à tube simple.....	14
Clean Cell Free DNA Kit – Protocole à plaque de 48 puits	17
Guide de dépannage	21
Symboles	23
Informations relatives aux commandes	24
Historique des révisions du document.....	24
Notes	25

Usage prévu

Le dispositif est destiné à extraire l'ADN libre de cellules circulantes (ADNcf) du plasma humain avec une pureté suffisante pour qu'il puisse être utilisé dans des procédures de détection en aval basées sur le principe de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR).

Utilisateur prévu

Les utilisateurs prévus sont des employés de laboratoire professionnels formés aux techniques de biologie moléculaire.

Introduction et principe

Le Clean Cell Free DNA Kit est conçu pour isoler l'ADN acellulaire du plasma humain. La procédure complète permet un traitement manuel ou automatisé des échantillons.

En combinant notre système de tampons exclusifs avec la commodité de nos particules magnétiques CleanNA Particles CCF, le besoin d'étapes de vide ou d'entonnoirs tout au long de la procédure est éliminé. Par conséquent, le Clean Cell Free DNA Kit offre un processus simple en 4 étapes : lyse, liaison, lavage et élution.

Nos particules CleanNA Particles CCF offrent une capacité de liaison élevée et, combinées au système de tampons, ciblent les fragments d'ADN plus petits (120 à 400 pb). Cette combinaison minimise le risque de contamination de l'ADN génomique. La capacité de liaison élevée des particules CleanNA Particles CCF diminue la quantité de particules nécessaires lors des étapes de liaison, réduisant ainsi le volume d'élution. Il est ainsi possible d'éluer l'ADN acellulaire isolé à partir de 1 ml de plasma en seulement 30 à 60 μ l.

L'ADN acellulaire isolé est prêt à être utilisé dans la PCR quantitative en tant qu'application en aval.

Aperçu schématique

Le tampon de lyse, de formulation unique, libère l'ADN circulant des protéines et des vésicules liées à l'ADN, tandis que les DNases sont inactivées. L'ADN est isolé du lysat en une seule étape en se liant à la surface des particules magnétiques. Les particules magnétiques CleanNA sont ensuite séparées du lysat à l'aide d'un séparateur magnétique. Après quelques étapes de lavage rapide pour éliminer les contaminants à l'état de traces, l'ADN purifié est élué des particules CleanNA à l'aide d'un tampon d'élué Elution Buffer.

Ajouter les microbilles

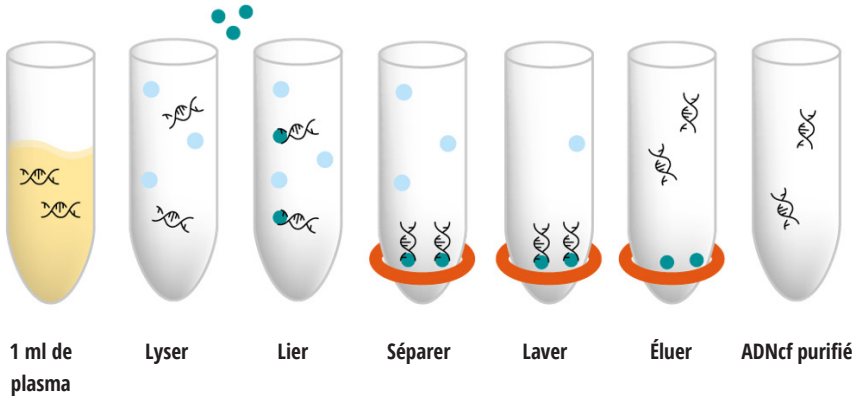


Figure 1 : Aperçu schématique de la procédure du Clean Cell Free DNA Kit.

Matériel fourni

Contenu du kit :

Composant	Volume CCF-D0384
CCF Lysis	30 ml
CCF Binding	430 ml
CCF Wash 1	2 x 225 ml
CCF Wash 2	2 x 45 ml
Elution Buffer	100 ml
Proteinase K Solution	6,5 ml
CleanNA Particles CCF	4,3 ml

Expédition, stockage et manipulation des réactifs

L'expédition du Clean Cell Free DNA Kit doit se faire à température ambiante (15 à 25 °C). Ne pas congeler les composants du Clean Cell Free DNA Kit.

Composant	Stockage
CCF Lysis*	Température ambiante (15 à 25 °C)
CCF Binding	Température ambiante (15 à 25 °C)
CCF Wash 1	Température ambiante (15 à 25 °C)
CCF Wash 2	Température ambiante (15 à 25 °C)
Elution Buffer	Température ambiante (15 à 25 °C)
Proteinase K Solution	Température ambiante (15 à 25 °C) (pour un stockage d'une durée supérieure à 12 mois, stocker à une température comprise entre 2 et 8 °C)
CleanNA Particles CCF	2 à 8 °C

* Si le tampon de lyse présente un précipité blanc dans le flacon, préchauffer le tampon à 37 °C pour dissoudre le précipité.

Stabilité en cours d'utilisation : Après ouverture du Clean Cell Free DNA Kit, le produit peut être utilisé en toute sécurité pendant une période de 19 jours.

Ne pas utiliser le Clean Cell Free DNA Kit après la date de péremption figurant sur l'étiquette de la boîte extérieure.

Avertissements

Lire attentivement les instructions avant d'utiliser le kit.

Ne pas mélanger de kits ayant des numéros de LOT différents.

S'assurer que les flacons du kit ne sont pas endommagés et qu'aucun liquide ne s'est échappé des flacons. Ne pas utiliser un kit endommagé.

Le numéro de LOT sur le conditionnement en boîte des particules CleanNA Particles CCF est différent du numéro de LOT sur le flacon des particules CleanNA Particles CCF. Le numéro de LOT sur la boîte correspond au numéro de LOT du kit entier et celui sur les flacons est spécifique aux particules. Étant donné que les particules CleanNA Particles CCF sont conservées à une température différente, veuillez vous assurer que le numéro de LOT figurant sur le conditionnement en boîte des particules correspond au numéro de LOT du kit avant de l'utiliser.

Tout incident grave survenu concernant le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient sont établis.

Précautions

Pour toutes les informations relatives à la sécurité, veuillez consulter la fiche de données de sécurité (FDS). Demandez votre FDS via cleanna.com/sds-request.

CCF Binding



Liquide et vapeurs inflammables. Provoque des lésions oculaires graves. Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.



Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et autres sources d'inflammation. Ne pas fumer. Garder le récipient hermétiquement fermé. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Mise à la terre et liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception. Utiliser des équipements électriques / de ventilation / d'éclairage / à sécurité intrinsèque antidéflagrants. Utiliser des outils ne produisant pas d'étincelles. Prendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques. Laver soigneusement toutes les zones corporelles externes exposées après manipulation. Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit. Éviter le rejet dans l'environnement.



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

Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin/un secouriste.

En cas d'incendie : Utiliser de la mousse résistante à l'alcool ou de la mousse protéique normale pour éteindre l'incendie.

EN CAS D'INGESTION : Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin/un secouriste en cas de malaise.

EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.

EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau [ou se doucher].

Rincer la bouche.

En cas d'irritation cutanée : Demander un avis médical/Consulter un médecin.

Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

CCF Lysis



Nocif pour les organismes aquatiques. Provoque des lésions oculaires graves. Provoque une irritation cutanée.

Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Éviter le rejet dans l'environnement.

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

Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.

Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.

En cas d'irritation cutanée : Demander un avis médical/Consulter un médecin.

CCF Wash 1



Nocif en cas d'ingestion. Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.



Ne pas respirer les brouillards/vapeurs/aérosols. Laver soigneusement toutes les zones corporelles externes exposées après manipulation. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit. Éviter le rejet dans l'environnement.

EN CAS D'INGESTION : Rincer la bouche. Ne PAS faire vomir.

EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau [ou se doucher].

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

Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin/un secouriste.
Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.

EN CAS D'INGESTION : Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin/un secouriste en cas de malaise.

EN CAS D'INHALATION : Transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.

Proteinase K Solution



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

Éviter de respirer les brouillards/vapeurs/aérosols. Lorsque la ventilation du local est insuffisante, porter un équipement de protection respiratoire.

EN CAS D'INHALATION : Transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.

En cas de symptômes respiratoires : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Remarque : Pour une élimination en toute sécurité, veuillez consulter les réglementations locales en matière de déchets.

Contrôle qualité

CleanNA produit chaque lot du Clean Cell Free DNA Kit selon des protocoles prédéterminés et validés dans le cadre du système de gestion de la qualité (QMS). En outre, un contrôle qualité est effectué après la production de chaque lot afin de garantir une qualité constante du produit. Le système de gestion de la qualité de CleanNA est certifié EN-ISO 13485.

Limites

Les performances du Clean Cell Free DNA Kit ont été établies avec du plasma humain conservé dans les anticoagulants suivants :

- EDTA
- Citrate-phosphate-dextrose (CPD)
- Citrate de sodium

Un éventail de donneurs de plasma individuels a été incluse dans l'évaluation des performances. Les performances du Clean Cell Free DNA Kit n'ont pas été testées avec du plasma hémolysé.

Il incombe à l'utilisateur de valider les performances du matériel d'échantillonnage non utilisé dans l'évaluation des performances.

Nous recommandons l'utilisation d'un contrôle d'extraction interne par échantillon afin d'identifier un résultat faux négatif dans les méthodes de détection en aval, causé par des agents inhibiteurs potentiellement inconnus dans les échantillons de plasma de patients individuels.


La performance du kit a été établie avec des méthodes de détection en aval basées sur la réaction en chaîne par polymérase. Il incombe à l'utilisateur de valider les performances du dispositif lorsqu'il est utilisé avec d'autres méthodes de détection en aval.

Les résultats diagnostiques générés par l'utilisation du Clean Cell Free DNA Kit doivent être interprétés en association avec d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

Prélèvement et stockage des échantillons

Plasma

La procédure d'isolement des acides nucléiques doit commencer immédiatement après le don de sang et la séparation du plasma*. Si cela n'est pas possible, le plasma peut être conservé jusqu'à 24 heures à une température comprise entre 2 et 8 °C pour un stockage à court terme et, en cas de stockage plus long, le plasma peut être conservé jusqu'à 4 semaines à -20 °C ou -80 °C. Décongeler les échantillons de plasma à température ambiante avant de les utiliser pour l'extraction d'ADN acellulaire.

 **Remarque :** Les échantillons d'origine humaine sont potentiellement infectieux. Prendre les mesures appropriées lors de leur manipulation.

* Pour la préparation du plasma avant d'isoler des acides nucléiques acellulaires à partir d'échantillons de sang, nous recommandons la procédure suivante :

1. Centrifuger le ou les tubes de sang total pendant 10 minutes à 3 000 tpm (1 900 g) à 4 °C.
2. Aspirer délicatement le surnageant de plasma, sans perturber les cellules sanguines.
3. Transférer le surnageant de plasma dans un nouveau tube à centrifuger.
4. Pour s'assurer que le plasma est exempt de cellules sanguines nucléées, répéter les étapes 1 à 3 pour une deuxième séparation.
5. À ce stade, le plasma peut être utilisé pour l'extraction nucléique.

Effectuer les étapes 6 à 9 ci-dessous pour éliminer également du plasma la chromatine intacte des cellules sanguines rompues. Noter que cela peut également permettre d'éliminer une faible quantité d'ADNcf présent dans des véhicules extracellulaires plus importants. Sinon, passer à l'étape 10.

6. Centrifuger les échantillons de plasma à 16 000 g à 4 °C à l'aide d'un rotor à angle fixe.
7. Retirer avec précaution le surnageant de plasma, en veillant à ne pas perturber le culot.
8. Transférer le plasma dans un nouveau tube.
9. Le plasma peut maintenant être utilisé pour l'extraction nucléique.
10. Conserver le plasma conformément aux instructions ci-dessus.

Matériel et équipement que doit fournir l'utilisateur

Pour l'isolement en tubes simples

Matériel et réactifs que doit fournir l'utilisateur pour le protocole à tube pour un échantillon de 1 ml maximum :

- Éthanol frais absolu
- Séparateur magnétique pour tubes de 1,5/2,0 ml
- Vortexeur
- Agitateur ou bascule
- Incubateur pouvant être réglé à 60 °C
- Microtube(s) à centrifuger de 1,5 ml
- Tube(s) à centrifuger de 15 ml

Pour l'isolement à l'aide d'une plaque à 48 puits

Matériel et réactifs que doit fournir l'utilisateur pour le protocole à plaque pour un échantillon de 1 ml maximum :

- Éthanol frais absolu
- Plaque magnétique de 48 puits, par exemple Alpaqua réf. A000530
- Vortexeur
- Agitateur ou bascule
- Incubateur pouvant être réglé à 60 °C
- Plaque(s) à 48 puits profonds, 3,5 ml ; par exemple Wuxi NEST Biotechnology réf. 504102
- Plaque(s) à 96 puits profonds ou plaque(s) PCR à 96 puits

Préparation des réactifs

CCF Wash 2

Diluer le lavage CCF Wash 2 avec de l'éthanol absolu frais comme suit et conserver à température ambiante.

Kit	Éthanol absolu à ajouter
CCF-D0384	180 ml

Clean Cell Free DNA Kit – Protocole à tube simple

Avant de commencer :

- Régler l'incubateur à 60 °C.
- S'assurer que la lyse CCF Lysis est complètement dissoute. Si ce n'est pas le cas, préchauffer à 37 °C.
- Agiter ou mélanger au vortex les particules CleanNA Particles CCF pour remettre les particules en suspension avant utilisation.
- Préparer le lavage CCF Wash 2 selon les instructions de la section Préparation des réactifs à la page 13.

Protocole :

1. Ajouter jusqu'à 1 ml d'échantillon de plasma dans un tube à centrifuger de 15 ml (non fourni).

⚠ Remarque : Ne pas dépasser le volume maximal de l'échantillon, car cela réduirait l'efficacité de la procédure d'extraction.

2. Si le volume de l'échantillon est inférieur à 1 ml, porter le volume de l'échantillon à 1 ml avec le tampon d'éluion Elution Buffer (fourni avec ce kit).
3. Ajouter 15 µl de Proteinase K Solution.
4. Ajouter 67 µl de lyse CCF Lysis.
5. Mélanger au vortex à vitesse maximale ou remplir et vider la pipette plusieurs fois pour bien mélanger.
6. Incuber à 60 °C pendant 20 minutes. Mélanger en retournant ou en agitant le tube toutes les 10 minutes.
7. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

⚠ Remarque : Cette étape d'incubation est cruciale pour faire baisser la température de l'échantillon et obtenir la liaison la plus efficace de l'ADN aux particules CleanNA Particles CCF.

8. Ajouter 1 ml de solution de liaison CCF Binding. Mélanger au vortex à vitesse maximale pendant 30 secondes ou remplir et vider la pipette plusieurs fois pour bien mélanger.
9. Ajouter 10 µl de particules CleanNA Particles CCF. Retourner l'échantillon 10 fois ou remplir et vider la pipette plusieurs fois pour mélanger.

⚠ Remarque : Agiter ou mélanger au vortex les particules CleanNA Particles CCF pour remettre les particules en suspension avant utilisation.

10. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante en mélangeant de manière continue. L'échantillon doit être mélangé tout au long de la période d'incubation de 10 minutes en le secouant ou en l'agitant doucement.

Remarque : Ne pas mélanger au vortex à grande vitesse, car cela entraînerait la formation de mousse, ce qui réduirait le rendement. La vitesse de mélange doit être réglée de manière à maintenir continuellement les particules CleanNA Particles CCF en suspension dans la solution.

11. Transférer 1 ml du mélange dans un microtube à centrifuger de 1,5 ml (non fourni).
12. Placer le tube sur un séparateur magnétique pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.
13. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

14. Aspirer et jeter le surnageant nettoyé.

Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

15. Transférer le mélange restant de l'étape 11 dans le microtube à centrifuger de 1,5 ml utilisé dans les étapes précédentes.
16. Placer le tube sur un séparateur magnétique pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.
17. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

18. Aspirer et jeter le surnageant nettoyé.

Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

19. Retirer le tube contenant les particules CleanNA Particles CCF du séparateur magnétique.
20. Ajouter 500 µl de lavage CCF Wash 1.
21. Remettre en suspension les particules CleanNA Particles CCF en les mélangeant au vortex pendant 2 minutes ou en remplissant et vidant la pipette 20 fois.

Remarque : Pour obtenir une pureté adéquate, il est essentiel de remettre complètement en suspension les particules CleanNA Particles CCF.

22. Placer le tube sur le séparateur magnétique pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.
23. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

24. Aspirer et jeter le surnageant nettoyé.

Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

25. Répéter les étapes 19 à 24 pour une deuxième étape de lavage « CCF Wash 1 ».
26. Retirer le tube contenant les particules CleanNA Particles CCF du séparateur magnétique.

27. Ajouter 500 µl de lavage CCF Wash 2.

⚠ Remarque : Le lavage CCF Wash 2 doit être dilué avec de l'éthanol absolu avant utilisation. Voir page 13 pour les instructions.

28. Remettre en suspension les particules CleanNA Particles CCF en les mélangeant au vortex pendant 2 minutes ou en remplissant et vidant la pipette 20 fois.

29. Placer le tube sur le séparateur magnétique pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.

30. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

⚠ Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

31. Aspirer et jeter le surnageant nettoyé.

⚠ Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

32. Répéter les étapes 26 à 31 pour une deuxième étape de lavage « CCF Wash 2 ».

33. Retirer le tube du séparateur magnétique pendant environ 30 secondes.

34. Placer le tube sur le séparateur magnétique pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.

⚠ Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

35. Aspirer et jeter le lavage CCF Wash 2 résiduel.

⚠ Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

36. Laisser le tube ouvert sur le séparateur magnétique pendant 25 minutes pour sécher les particules CleanNA Particles CCF.

37. Retirer le tube contenant les particules CleanNA Particles CCF du séparateur magnétique.

38. Ajouter 30 à 60 µl de tampon d'élution Elution Buffer. Remettre en suspension les particules CleanNA Particles CCF en les mélangeant au vortex ou en remplissant et vidant la pipette 20 fois.

⚠ Remarque : S'assurer que le tampon d'élution recouvre les particules CleanNA Particles CCF. Des volumes d'élution trop faibles peuvent réduire le rendement. Des volumes trop élevés réduisent la concentration d'ADN dans l'éluat.

39. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes, tout en mélangeant constamment au vortex.

40. Placer le tube sur le séparateur magnétique pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.

41. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

⚠ Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la contamination croisée des microbilles peut entraîner une inhibition durant la PCR en aval.

42. Transférer le surnageant nettoyé contenant l'ADN purifié dans un microtube à centrifuger propre de 1,5 ml (non fourni).

43. Conserver les acides nucléiques acellulaires extraits à -20 °C.

Clean Cell Free DNA Kit – Protocole à plaque de 48 puits

Avant de commencer :

- Régler l'incubateur à 60 °C.
- S'assurer que la lyse CCF Lysis est complètement dissoute. Si ce n'est pas le cas, préchauffer à 37 °C.
- Agiter ou mélanger au vortex les particules CleanNA Particles CCF pour remettre les particules en suspension avant utilisation.
- Préparer le lavage CCF Wash 2 selon les instructions de la section Préparation des réactifs à la page 13.

Protocole :

1. Ajouter jusqu'à 1 ml d'échantillons de plasma/sérum dans une plaque de 48 puits profonds (non fourni).

Remarque : Ne pas dépasser le volume maximal de l'échantillon, car cela réduirait l'efficacité de la procédure d'extraction.

2. Si le volume de l'échantillon est inférieur à 1 ml, porter le volume de l'échantillon à 1 ml avec le tampon d'éluion Elution Buffer (fourni avec ce kit).
3. Ajouter 15 µl de Proteinase K Solution.
4. Ajouter 67 µl de lyse CCF Lysis et sceller la plaque.
5. Mélanger au vortex à vitesse maximale ou remplir et vider la pipette plusieurs fois pour bien mélanger.
6. Incuber à 60 °C pendant 20 minutes. Mélanger en retournant ou en agitant le tube toutes les 10 minutes.
7. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

Remarque : Cette étape d'incubation est cruciale pour faire baisser la température de l'échantillon et obtenir la liaison la plus efficace de l'ADN aux particules CleanNA Particles CCF.

8. Ajouter 1 ml de solution de liaison CCF Binding. Mélanger au vortex à vitesse maximale pendant 30 secondes ou remplir et vider la pipette plusieurs fois pour bien mélanger.
9. Ajouter 10 µl de particules CleanNA Particles CCF. Retourner les échantillons 10 fois ou remplir et vider la pipette plusieurs fois pour mélanger.

Remarque : Agiter ou mélanger au vortex les particules CleanNA Particles CCF pour remettre les particules en suspension avant utilisation.

10. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante en mélangeant de manière continue. Les échantillons doivent être mélangés tout au long de la période d'incubation de 10 minutes en les secouant ou en les agitant doucement.

Remarque : Ne pas mélanger au vortex à grande vitesse, car cela entraînerait la formation de mousse, ce qui réduirait le rendement. La vitesse de mélange doit être réglée de manière à maintenir continuellement les particules CleanNA Particles CCF en suspension dans la solution.

- Placer la plaque à 48 puits profonds sur la plaque magnétique à 48 puits pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF. Les particules de chaque puits seront collectées par les aimants au fond.
- Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

⚠ Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

- Aspirer et jeter le surnageant nettoyé.

⚠ Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

- Retirer la plaque à 48 puits contenant les particules CleanNA Particles CCF du séparateur magnétique.
- Ajouter 500 µl de lavage CCF Wash 1.
- Remettre en suspension les particules CleanNA Particles CCF en les mélangeant au vortex pendant 2 minutes ou en remplissant et vidant la pipette 20 fois.

⚠ Remarque : Pour obtenir une pureté adéquate, il est essentiel de remettre complètement en suspension les particules CleanNA Particles CCF.

- Transférer les particules CleanNA Particles CCF remises en suspension dans une nouvelle plaque à 48 puits profonds (non fournie).

⚠ Remarque : Continuer à travailler au format à 48 puits pour le reste de la procédure.

- Placer la plaque à 48 puits profonds sur la plaque magnétique à 48 puits pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.
- Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

⚠ Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

- Aspirer et jeter le surnageant nettoyé.

⚠ Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

- Retirer la plaque à 48 puits contenant les particules CleanNA Particles CCF du séparateur magnétique.
- Ajouter 500 µl de lavage CCF Wash 1.
- Remettre en suspension les particules CleanNA Particles CCF en les mélangeant au vortex pendant 2 minutes ou en remplissant et vidant la pipette 20 fois.

⚠ Remarque : Pour obtenir une pureté adéquate, il est essentiel de remettre complètement en suspension les particules CleanNA Particles CCF.

- Placer la plaque à 48 puits profonds sur la plaque magnétique à 48 puits pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.
- Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

⚠ Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

26. Aspirer et jeter le surnageant nettoyé.

⚠ Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

27. Retirer la plaque à 48 puits contenant les particules CleanNA Particles CCF du séparateur magnétique.

28. Ajouter 500 µl de lavage CCF Wash 2.

⚠ Remarque : Le lavage CCF Wash 2 doit être dilué avec de l'éthanol absolu avant utilisation. Voir page 13 pour les instructions.

29. Remettre en suspension les particules CleanNA Particles CCF en les mélangeant au vortex pendant 2 minutes ou en remplissant et vidant la pipette 20 fois.

30. Placer la plaque à 48 puits profonds sur la plaque magnétique à 48 puits pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.

31. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

⚠ Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

32. Aspirer et jeter le surnageant nettoyé.

⚠ Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

33. Répéter les étapes 28 à 32 pour une deuxième étape de lavage « CCF Wash 2 ».

34. Retirer la plaque à 48 puits contenant les particules CleanNA Particles CCF du séparateur magnétique.

35. Placer la plaque à 48 puits profonds sur la plaque magnétique à 48 puits pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.

⚠ Remarque : Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la perte de microbilles peut réduire le rendement.

36. Aspirer et jeter le lavage CCF Wash 2 résiduel.

⚠ Remarque : Ne pas perturber ou pipetter les particules CleanNA Particles CCF. Cela peut réduire le rendement.

37. Laisser le tube sur le séparateur magnétique pendant 25 minutes pour sécher les particules CleanNA Particles CCF.


38. Retirer la plaque à 48 puits contenant les particules CleanNA Particles CCF du séparateur magnétique.

39. Ajouter 30 à 60 µl de tampon d'éluion Elution Buffer. Remettre en suspension les particules CleanNA Particles CCF en les mélangeant au vortex ou en remplissant et vidant la pipette 20 fois.

⚠ Remarque : S'assurer que le tampon d'éluion recouvre les particules CleanNA Particles CCF. Des volumes d'éluion trop faibles peuvent réduire le rendement. Des volumes trop élevés réduisent la concentration d'ADN dans l'éluat.

40. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes, tout en mélangeant constamment en remplissant et en vidant la pipette ou à l'aide de l'agitateur ou du vortex.

41. Placer la plaque à 48 puits profonds sur la plaque magnétique à 48 puits pour magnétiser les particules CleanNA Particles CCF.
42. Incuber à température ambiante jusqu'à ce que les particules CleanNA Particles CCF soient complètement éliminées de la solution.

 **Remarque :** Veiller à incuber jusqu'à ce que toutes les particules soient éliminées de la solution, car la contamination croisée des microbilles peut entraîner une inhibition durant la PCR en aval.

43. Transférer le surnageant nettoyé contenant l'ADN purifié dans une plaque à 96 puits propre ou dans des tubes individuels propres (non fournis).
44. Conserver les acides nucléiques acellulaires extraits à -20 °C.

Guide de dépannage









Veillez utiliser ce guide pour résoudre les problèmes qui pourraient survenir. Pour toute assistance supplémentaire, veuillez contacter votre distributeur local.

Problèmes possibles et suggestions

Problème	Cause	Suggestion
Faible rendement en ADN	Remise en suspension incomplète des particules CleanNA Particles CCF.	Remettre en suspension les particules CleanNA Particles CCF en les mélangeant au vortex vigoureusement avant utilisation.
	Liaison inefficace de l'ADN aux particules CleanNA Particles CCF.	Veiller à laisser l'échantillon refroidir à température ambiante pendant 10 minutes avant d'ajouter la solution de liaison CCF Binding.
		Veiller à mélanger chaque échantillon de manière continue pendant toute la durée de l'incubation de la solution de liaison.
	Perte de particules CleanNA Particles CCF pendant l'opération.	Éviter de perturber les particules CleanNA Particles CCF pendant l'aspiration.
	L'ADN reste lié aux particules CleanNA Particles CCF.	Diluer le lavage CCF Wash 2 en ajoutant un volume approprié d'éthanol absolu avant utilisation (voir page 13 pour les instructions).
		S'assurer que le tampon d'éluion couvre toutes les particules CleanNA Particles CCF.
Transfert d'éthanol.	Sécher les particules CleanNA Particles CCF à température ambiante pendant 25 minutes avant l'éluion.	
Les particules CleanNA Particles CCF ne s'éliminent pas complètement de la solution	Temps de magnétisation trop court.	Augmenter le temps de collecte sur le séparateur magnétique.
Co-purification de poids moléculaire élevé	Deux étapes de lavage CCF Wash 1 doivent être effectuées.	Effectuer deux étapes de lavage CCF Wash 1 comme indiqué dans le mode d'emploi. Augmenter le volume du tampon de lavage si nécessaire.
Problèmes dans les applications en aval	Transfert de sel.	Le lavage CCF Wash 2 doit être à température ambiante.

Données anormales du bioanalyseur	Le bioanalyseur présente plusieurs pics aigus pendant l'analyse.	Veiller à éliminer toute trace du surnageant nettoyé après chaque étape de lavage.
		Veiller à incuber le tube/la plaque pendant 25 minutes pour sécher les particules CleanNA Particles CCF.
	Le bioanalyseur montre un référentiel qui augmente vers la fin.	Vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air sur la puce du bioanalyseur. Charger les échantillons sur une nouvelle puce fraîchement préparée.
	Le bioanalyseur montre une grosse tache au début de la trace.	S'assurer que l'échantillon purifié ne contient pas de traces de particules CleanNA Particles CCF.

Symboles

	Diagnostic in vitro
	Marque CE. Ce produit répond aux exigences CE du règlement de l'UE relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (2017/746).
	Numéro de commande
	Fabricant
	Attention
	Limite de température
	Date de péremption
	Numéro de lot

Informations relatives aux commandes

Contactez votre distributeur local pour commander.

Produit	Numéro de pièce
Clean Cell Free DNA Kit (384 préparations)	CCF-D0384

Historique des révisions du document

Version du manuel	Date de révision	Chapitre révisé	Explication de la révision
1	2023/OCT/02	S/O	Version initiale
2	2024/FEV/08	Première page et aperçu schématique.	Mise à jour du lien vers le site web et aperçu schématique.

Notes

Notes

Notes

Nous contacter

Coenecoop 75 | 2741 PH Waddinxveen | Pays-Bas

T : +31 (0) 182 22 33 50 | F : +31 (0) 182 22 33 98 | info@cleanna.com

www.cleanna.com

