
MANUEL D'UTILISATION

BioExtract® Column

Cat. N° BEC050 / BEC250

TOUTES ESPECES ANIMALES

**Kit d'extraction et de purification d'acides nucléiques totaux
(ARN / ADN viral ; ADN bactérien ; ADN parasitaire ;
ADN /ARN génomique) en colonnes de silice individuelles
pour la recherche d'agents pathogènes
à partir d'échantillons d'origine animale ou de leur environnement,**

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Les Bio-T kit® disposent de manuels techniques propres détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées par BioSella et les différentes étapes de préparation de la q(RT)-PCR. Les dernières versions en vigueur de ces documents figurent dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec le Bio-T kit®.

En plus de ces manuels, le manuel général d'utilisation des kits BioExtract® Column décrit la composition du kit, les étapes préliminaires de reconstitution de certains réactifs ainsi que le principe général et commun d'utilisation du kit.

GESTION DES REVISIONS

BioSella indique les modifications apportées à ce document en les surlignant selon les règles présentées dans le tableau ci-dessous :

| Gestion des révisions | | | |
|--|---|--|--|
| Type de modification Couleur de Surlignage | Modifications mineures | Modifications majeures 1 | Modifications majeures 2 |
| Impact sur la révision/version | Changement de la date de révision du document Pas de changement de version | Changement de la date de révision du document + changement de version | Changement de la date de révision du document + changement de version |
| Impact sur l'adoption de la méthode autorisée | Aucun (sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice) | Aucun | Nouvelle adoption nécessaire |
| Exemples de modifications pour le BioExtract® SuperBall® | Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme | Changement de référence d'un réactif ou consommable non critique | Modification de la composition d'un réactif critique |
| | Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction | Changement de volume de conditionnement d'un réactif critique | Modification du programme d'extraction validé |
| | Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole | | |
| | Ajout/Suppression d'informations optionnelles | | |

PRESENTATION

Réactifs et consommables contenus dans le kit

Les kits BioExtract® Column (Cat. N° BEC50 et BEC250) comprennent les réactifs en volume suffisant pour la réalisation de 50 ou 250 extractions-purifications indépendantes.

Les kits BioExtract® Column doivent être conservés à température ambiante (15-25°C) et peuvent être utilisés jusqu'à la date indiquée sur la boîte.

Tableau 1. Contenu du kit et Conditions de stockage

| BioExtract® Column Cat. N°/ Nombre d'extractions | (50) BEC050/50 | (250) BEC250/250 | Conditions de stockage |
|---|-------------------|---------------------|---|
| BioExtract® Mini Spin Column | 50 | 250 | - |
| Collection tubes | 200 | 1 000 | - |
| Buffer LA* | 6 ml | 30 ml | 15°C à 25°C |
| Buffer LB**† (concentré) | 12 ml | 60 ml | 15°C à 25°C |
| Protéinase K | 1.25 ml | 6 ml | 15°C à 25°C |
| Carrier RNA (poly A) | 310 µg | 310 µg | Lyophilisé : 15°C à 25°C Reconstitué : aliquoté à <-16°C |
| Buffer W1*‡ (concentré) | 19 ml | 98 ml | 15°C à 25°C |
| Buffer W2‡ (concentré) | 17 ml | 81 ml | 15°C à 25°C |
| Buffer EL§ | 20 ml | 2 x 20 ml | 15°C à 25°C |
| Protocole | 1 | 1 | - |

* ATTENTION : Contient un sel chaotropique. Prendre les mesures de sécurité appropriées et porter des gants pendant la manipulation. Non compatible avec les désinfectants contenant de l'Eau de Javel.

† Avant la première utilisation, ajouter de l'isopropanol comme indiqué sur la bouteille afin d'obtenir la solution de travail.

‡ Avant la première utilisation, ajouter l'éthanol (96-100%) comme indiqué sur la bouteille afin d'obtenir la solution de travail.

§ ATTENTION : Contient de l'azide de sodium comme conservateur.

Réactifs et consommables non fournis dans le kit

Tableau 2. Consommables et Réactifs non fournis dans le kit

| Consommable / Réactif | Description | Fournisseur* | Cat. N° |
|-----------------------|--|--------------|-----------|
| Tube 1.5 ml | microtube 1,5 ml pp safelock 3815 eppendorf | Dutscher | 033290 |
| Ethanol | Ethanol absolu AnalAR NORMAPUR pour analyses <i>ou équivalent</i> | VWR | 20821.296 |
| Isopropanol | Propanol molecular biology grade <i>ou équivalent</i> | VWR | 437423R |

* Liste de fournisseurs donnée à titre indicatif.

Principales précautions

- Porter les Equipements de Protection Individuels appropriés (blouse, gants jetables et lunettes de protection).
- **⚠ ATTENTION : NE PAS** ajouter de l'Eau de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets. Les Buffers LA, LB et W1 contiennent un sel chaotropique pouvant former un composant hautement réactif en présence d'Eau de Javel.
- Utiliser des pointes à filtre.
- Jusqu'à la fin de l'étape de lyse des échantillons, il est recommandé de travailler sous PSM.

Points importants avant de commencer

- Il est obligatoire d'inclure un échantillon « contrôle négatif » (NCS) afin de valider l'absence d'intercontamination des échantillons lors de l'extraction. L'échantillon est remplacé par de l'eau (RNase/DNase free) et sera traité en parallèle des échantillons d'intérêt.
- En suivant les informations indiquées dans le Tableau 3 ci-dessous : Reconstituer le Carrier RNA et préparer les Buffers LB, W1 et W2 ou s'assurer qu'ils ont bien été préparés. Voir sur les étiquettes correspondantes des flacons pour un rappel des réactifs et des volumes exacts à ajouter.

| Tableau 3. Préparation des réactifs | | |
|-------------------------------------|--|---|
| Réactif | Préparation | |
| | BEC050 | BEC250 |
| Carrier RNA* | Ajouter 310 µl de Buffer EL dans le tube Carrier RNA | |
| Buffer LB† | Ajouter 8 ml d'isopropanol pur (100%) dans le flacon Buffer LB | Ajouter 40 ml d'isopropanol pur (100%) dans le flacon Buffer LB |
| Buffer W1† | Ajouter 25 ml d'éthanol pur (96-100%) dans le flacon Buffer W1 | Ajouter 130 ml d'éthanol pur (96-100%) dans le flacon Buffer W1 |
| Buffer W2† | Ajouter 40 ml d'éthanol pur (96-100%) dans le flacon Buffer W2 | Ajouter 190 ml d'éthanol pur (96-100%) dans le flacon Buffer W2 |

* Le Carrier RNA non utilisé dissout dans le Buffer EL doit être congelé en fractions aliquotées à $\leq -16^{\circ}\text{C}$. Les aliquotes de Carrier RNA ne doivent pas subir plus de 3 cycles de congélation- décongélation.

† Tous les tampons et réactifs reconstitués restent stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte du kit à température ambiante (15-25 °C) sans affecter les performances du kit.

PROCEDURE

1. Préparation des consommables et réactifs :

- Préparer les consommables : **deux tubes** de 1.5 ml par échantillon à extraire (non fourni dans le kit, voir Tableau 2) et une colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un tube collecteur. Les annoter sur le capuchon avec le nom de l'échantillon à extraire.
- Préparer la solution de lyse LA-carrier tel qu'indiqué dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4. Préparation de la solution de lyse LA-carrier

| Réactif | Nombre d'échantillons N* | | | | |
|-----------------------|--------------------------|--------|---------|---------|--------|
| | 1 | 6* | 12* | 24* | 30* |
| Buffer LA | 100 µl | 660 µl | 1.32 ml | 2.64 ml | 3.3 ml |
| Carrier RNA (1 µg/µl) | 1 µl | 6.6 µl | 13.2 µl | 26.4 µl | 33 µl |
| IPC exogène† | 5 µl | 33 µl | 66 µl | 132 µl | 165 µl |

* Afin d'assurer le volume de pipetage, le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis. Le volume de solution de lyse LA-carrier en excès doit être jeté.

† Volume d'IPC préconisé dans les Bio-T kits® (kits de détection par qPCR BioSella) concernés. Si besoin, se référer à la notice de chaque kit de détection pour plus d'informations ou contacter le Service Technique de BioSella (tech@biosella.com).

2. Lyse et Ajustement des conditions d'Adsorption

Dans un tube de 1.5 ml identifié (non fourni dans le kit, voir Tableau 2) :

- Ajouter **20 µl de protéinase K**.
- Ajouter **100 à 200 µl** d'échantillon, en fonction de la matrice à traiter.
- Ajouter **100 µl de solution de lyse LA-carrier**. cf. Tableau 4
- Vortexer.
- **Incuber 15 min à 15–25°C** (à température ambiante).
- Centrifuger brièvement (centri-boule) puis ajouter **350 µl de Buffer LB**.
- Vortexer puis centrifuger brièvement (centri-boule).

3. Adsorption sur la membrane de silice

- Transférer délicatement la totalité du volume dans la colonne BioExtract® Mini Spin Column (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml).
- Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**.
- Changer de tube collecteur (Placer la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).

4. Lavages et Séchage de la membrane de silice

- Ajouter **600 µl de Buffer W1**.
- Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**. Changer de tube collecteur.
- Ajouter **600 µl de Buffer W2**.
- Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**. Changer de tube collecteur.

- Centrifuger à **20 000 x g pendant 2 min** (ou à 16 000g pendant 3 minutes) pour sécher la membrane.

5. Elution

- Placer la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un nouveau tube de 1.5 ml identifié (non fourni dans le kit, voir Tableau 2), et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.
- Ajouter **50–100 µl* de Buffer EL** (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane.
- **Incuber à température ambiante (15–25°C) pendant 1 min.**
- Centrifuger à **20 000 x g pendant 1 min** (ou à 16 000g pendant 2 minutes).
- Jeter la colonne.
- Conserver le tube de 1.5 ml contenant l'extrait d'Acides nucléiques total purifié

* Pour le volume d'élution, se référer à la notice de chaque Bio-T kit® (kit de détection par qPCR BioSellal) ou contacter le Service Technique de BioSellal (tech@biosellal.com).

PROTOCOLE SIMPLIFIE

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|---|---|--------------------|------------------------|-----------|---|--------------------|---|---|---|---|
| <p>1</p> <p>Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption</p> |  <p style="text-align: center;">20 µl de protéinase K 100-200 µl d'échantillon*</p> <p style="text-align: center;">100 µl de solution de lyse LA-carrier (Pour 1 : 100 µl Buffer LA / 1 µl carrier RNA / 5 µl IPC exogène)</p> <p style="text-align: center;">Température ambiante (TA) 15 min</p> <p style="text-align: center;">350 µl de Buffer LB</p> | | | | | | | | | | | | |
| <p>2</p> <p>Adsorption sur la membrane de silice</p> |  <p style="text-align: center;">Charger la colonne BioExtract® Mini Spin Column délicatement</p> <p style="text-align: center;"> 6 000 x g 1 min</p> | | | | | | | | | | | | |
| <p>3</p> <p>Lavages</p> <p>Séchage de la membrane de silice</p> |  <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="width: 15%;">1^{er} Lavage</td> <td style="width: 25%;">600 µl W1</td> <td style="width: 15%; text-align: center;"></td> <td style="width: 45%; text-align: right;">6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>2nd Lavage</td> <td>600 µl W2</td> <td style="text-align: center;"></td> <td style="text-align: right;">6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>-</td> <td style="text-align: center;"></td> <td style="text-align: right;">20 000 x g 2 min (ou 16 000xg 3 min)</td> </tr> </tbody> </table> | 1 ^{er} Lavage | 600 µl W1 |  | 6 000 x g 1 min | 2 nd Lavage | 600 µl W2 |  | 6 000 x g 1 min | - | - |  | 20 000 x g 2 min (ou 16 000xg 3 min) |
| 1 ^{er} Lavage | 600 µl W1 |  | 6 000 x g 1 min | | | | | | | | | | |
| 2 nd Lavage | 600 µl W2 |  | 6 000 x g 1 min | | | | | | | | | | |
| - | - |  | 20 000 x g 2 min (ou 16 000xg 3 min) | | | | | | | | | | |
| <p>4</p> <p>Elution des acides nucléiques</p> |  <p style="text-align: center;">50-100 µl de Buffer EL* (TA) délicatement</p> <p style="text-align: center;">TA 1 min</p> <p style="text-align: center;"> 20 000 x g 1 min (ou 16 000xg 2 min)</p> | | | | | | | | | | | | |

*Pour les volumes de prise d'essai et d'éluion, se référer à la notice de chaque Bio-T kit® (kit de détection par qPCR BioSella) ou contacter le Service Technique de BioSella.

Pour toute information supplémentaire, contacter le Service Technique de BioSella (tech@biosella.com ou 04.26.78.47.62).



www.biosellal.com

Support Technique

tech@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 62

Renseignements et commandes

contact@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 60

