

# MANUEL D'UTILISATION

## BioExtract<sup>®</sup> SuperBall<sup>®</sup>

Cat. N° BES384 et BES384WO

**TOUTES ESPECES ANIMALES**

**Kit d'extraction et de purification d'acides nucléiques totaux  
(ARN / ADN viral ; ADN bactérien ; ADN parasitaire ;  
ADN /ARN génomique) pour la recherche d'agents pathogènes  
à partir d'échantillons d'origine animale ou de leur environnement  
par billes magnétiques à l'aide des automates  
KingFisher<sup>™</sup> Flex, 96, Duo, mL ou équivalent**

*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 du kit BioExtract® SuperBall® 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<br>Couleur de Surlignage            | Modifications mineures                                                        | Modifications majeures 1                                                 | Modifications majeures 2                                                 |
| Impact sur la révision/version                           | Changement de la date de révision du document<br>Pas de changement de version | Changement de la date de révision du document<br>+ changement de version | Changement de la date de révision du document<br>+ changement de version |
| Impact sur l'adoption de la méthode autorisée            | Aucun<br>(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

Le kit BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384 et BES384WO) comprend les réactifs en volume suffisant pour la réalisation de 384 extractions-purifications indépendantes.

Le kit BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384) comprend en plus, le consommable nécessaires pour effectuer quatre runs complets sur automates KingFisher Flex ou 96 (peignes, deep-well fond U pour les étapes de lavages et plaques d'élution). Pour les autres automates, utiliser les plastiques spécifiques recommandés par le fournisseur de l'appareil.

Le kit BioExtract® SuperBall® doit être conservé à température ambiante (15-25°C) et peut être utilisé jusqu'à la date indiquée sur la boîte et sur le certificat d'analyse.

**Tableau 1. Contenu du kit**

| Contenu                                                             | Volume et Nombre d'unités |                | Conditions de stockage                                       | Reconstitution Nécessaire ? |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                                                     | Cat N°BES384              | Cat N°BES384WO |                                                              |                             |
| Buffer LA                                                           | 2 x 30 ml                 | 2 x 30 ml      | 15°C à 25°C                                                  | NON                         |
| Buffer LB (concentré)                                               | 2 x 60 ml                 | 2 x 60 ml      | 15°C à 25°C                                                  | OUI                         |
| Protéinase K                                                        | 2 x 6 ml                  | 2 x 6 ml       | 15°C à 25°C, à l'abri de la lumière                          | NON                         |
| Carrier RNA (poly A)                                                | 2 x 310 µg                | 2 x 310 µg     | Lyophilisé : 15°C à 25°C<br>Reconstitué : aliquoté à ≤- 16°C | OUI                         |
| SuperBall® Magnetic Beads (SMB)                                     | 13 ml                     | 13 ml          | 15°C à 25°C                                                  | NON                         |
| Buffer W1 (concentré)                                               | 151 ml                    | 151 ml         | 15°C à 25°C                                                  | OUI                         |
| Buffer W2 (concentré)                                               | 108 ml                    | 108 ml         | 15°C à 25°C                                                  | OUI                         |
| Buffer EL                                                           | 125 ml                    | 125 ml         | 15°C à 25°C                                                  | NON                         |
| Peigne (Large 96-Rod Cover)                                         | 4                         | -              | -                                                            | -                           |
| Deep-well fond U (pour les étapes de lavages W1, W2 et Ethanol pur) | 20                        | -              | -                                                            | -                           |
| Microplaque d'élution                                               | 4                         | -              | -                                                            | -                           |
| Protocole                                                           | 1                         | 1              | -                                                            | -                           |

### Réactifs non fournis dans le kit

**Tableau 2. Réactifs non fournis dans le kit**

| Réactif                                          | Description                                                                                                                     | Fournisseur* | Cat. N°   |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------|
| Ethanol                                          | Ethanol absolu qualité biologie moléculaire <i>ou équivalent</i>                                                                | VWR          | 20821.296 |
| Isopropanol                                      | Isopropanol qualité biologie moléculaire <i>ou équivalent</i>                                                                   | VWR          | 437423R   |
| Solution concentrée pour coloration du tampon EL | Solution concentrée 40x pour coloration du tampon EL permettant de visualiser le dépôt des acides nucléiques dans le Master Mix | BioSella     | TPCOL     |

\* le nom du fournisseur est donné à titre indicatif

# Principales précautions

**⚠ ATTENTION : NE PAS ajouter d'Eau de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets liquides. En effet, les tampons LA, LB et W1 contiennent un sel chaotrope pouvant former un composant hautement réactif en présence d'Eau de Javel ou d'acide.**

- Porter les Equipements de Protection Individuels appropriés et adaptés au risque pathogène associé aux échantillons manipulés (à minima blouse, gants jetables non poudrés et éventuellement lunettes de protection, masques....).
- Utiliser des pointes à filtre.
- Jusqu'à la fin de l'étape de lyse des échantillons, il est recommandé de travailler sous PSM en cas de risque zoonotique ou de présence de pathogène hautement aérogène

## Points importants avant de commencer

- S'assurer que les programmes BioExtract\_KF\_Flex, « BioExtract\_KF\_96 », BioExtract\_KF\_Duo ou BioExtract\_KF\_mL sont bien installés sur votre automate KingFisher™. Pour tous les Bio-T kit®, un programme classique d'extraction de 38 minutes a été validé. Certains Bio-T kit® et/ou certains types de matrice, ont également été validés sur un programme court de 19 minutes. Contactez notre Support technique pour tout renseignement.
- Il est obligatoire d'inclure un échantillon « contrôle négatif de processus » (NCS) afin de valider l'absence d'inter-contamination des échantillons lors de l'extraction. L'échantillon est remplacé par de l'eau (RNase/DNase free) fournie dans les Bio-T kit® et sera traité en parallèle des échantillons d'intérêt.
- Reconstituer certains réactifs (Carrier RNA et tampons LB, W1 et W2) en suivant les indications du Tableau 3 ci-dessous, ou s'assurer qu'ils ont bien été préparés. Se référer également aux étiquettes des flacons pour un rappel des réactifs et des volumes exacts à ajouter.

| Tableau 3. Préparation des réactifs |                                                                 |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Réactif                             | Préparation                                                     |
| Carrier RNA*                        | Ajouter 310 µl de Buffer EL dans le tube Carrier RNA            |
| Buffer LB†                          | Ajouter 40 ml d'isopropanol pur (100%) dans le flacon Buffer LB |
| Buffer W1†                          | Ajouter 200 ml d'éthanol pur (96-100%) dans le flacon Buffer W1 |
| Buffer W2†                          | Ajouter 252 ml d'éthanol pur (96-100%) dans le flacon Buffer W2 |

\* Le Carrier RNA repris dans le Buffer EL doit être congelé en fractions aliquotes à -20°C. Les fractions 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.

- Pour le KingFisher™ Flex ou 96, les peignes de protection des barreaux aimantés (Large 96-Rod-Cover) sont fournis en deux sachets de 2 unités. Après ouverture du sachet, il est recommandé de conserver le second peigne (Large 96-Rod-Cover) sur une Deep-well afin d'éviter de plier les tiges du peigne.

# PROCEDURE

1. Préparer les consommables pour la série d'extraction et les annoter en fonction des réactifs à ajouter (voir Tableau 5).
  - **KingFisher™ Flex** ou 96 :
    - 4 plaques Deep-well (fond V pour l'étape de lyse et fond U ou V pour les étapes de lavage)
    - 1 microplaque d'élution (fournie dans le kit BES384)
    - 1 peigne déposé dans une plaque d'élution réutilisable pour plusieurs runs
  - **KingFisher™ Duo** :
    - 1 plaque Deep-well (attention, pour le Duo, les plaques Deep-well fond U du kit BES384 ne sont pas compatibles)
    - 1 barrette d'élution (non fournie dans le kit BES384)
  - **KingFisher™ mL**:
    - 1 barrette par échantillon (non fournie dans le kit). Sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes dessus.
2. Préparer la solution de lyse LAB-SMB-carrier (voir Tableau 4 ci-dessous ou le Tableau complet fourni en ANNEXE).

Avant de commencer, assurez-vous que la solution SMB est totalement en suspension : la vortexer pendant 3 minutes avant la première utilisation puis 1 minute avant chaque utilisation suivante.

Il est possible de préparer un volume excédant de solution de lyse LAB-SMB-carrier et de le conserver à température ambiante en vue d'une utilisation sous 8 jours.

L'ajout d'IPC exogène est fonction de chaque Bio-T kit®. Se référer à la notice d'extraction du Bio-T kit®.

**Tableau 4. Préparation de la solution de lyse LAB-SMB-carrier**

| Réactif                                  | Nombre d'échantillons* |          |        |         |          |          |          |
|------------------------------------------|------------------------|----------|--------|---------|----------|----------|----------|
|                                          | 1                      | 5        | 10     | 12      | 15       | 48       | 96       |
| <b>Buffer LA</b>                         | 100 µl                 | 550 µl   | 1.1 ml | 1.32 ml | 1.65 ml  | 5.28 ml  | 10.56 ml |
| <b>Buffer LB</b>                         | 400 µl                 | 2.2 ml   | 4.4 ml | 5.28 ml | 6.6 ml   | 21.12 ml | 42.24 ml |
| <b>SMB (SuperBall Magnetic Beads)†</b>   | 25 µl                  | 137.5 µl | 275 µl | 330 µl  | 412.5 µl | 1.32 ml  | 2.64 ml  |
| <b>Carrier RNA reconstitué (1 µg/µl)</b> | 1 µl                   | 5.5 µl   | 11 µl  | 13.2 µl | 16.5 µl  | 52.8 µl  | 105.6 µl |
| <b>IPC exogène‡</b>                      | 5 µl                   | 27.5 µl  | 55 µl  | 66 µl   | 82.5 µl  | 264 µl   | 528 µl   |

\* Afin d'assurer le volume de pipetage, le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis. Le volume solution de lyse en excès peut être conservé en vue d'une utilisation sous 8 jours ; au-delà de cette durée, il 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).

‡ Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes avant la première utilisation ou 1 minute pour les utilisations suivantes.

3. Au fond des puits de la « Deep-well Lysat » pour le KingFisher™ Flex ou 96, des puits de la ligne A pour le KingFisher™ Duo ou des puits en position A des barrettes pour le KingFisher™ mL :
  - Déposer **20 µl de protéinase K<sup>‡</sup>**.
  - Ajouter **100 à 200 µl d'échantillon**, en fonction du Bio-T kit® et de la matrice à traiter.
  - Vortexer vigoureusement la solution LAB-SMB-carrier pendant 30 secondes puis ajouter **500 µl de solution LAB-SMB-carrier à chaque échantillon**.

‡Note : Au lieu de distribuer la Protéinase K dans chaque puits juste avant le dépôt de l'échantillon, il est possible de l'ajouter à la solution de lyse LAB-SMB-carrier (± IPC exogène). Dans ce cas, il faut veiller à ce que la Protéinase K ne reste pas en contact avec la solution de lyse LAB-SMB-carrier (± IPC exogène) plus de 10 minutes (ajout extemporané, distribution dans les puits, lancement du programme) afin d'éviter l'auto-dégradation de l'enzyme.

Le volume de la Protéinase K à ajouter à la solution de lyse suit la même règle de 10% de marge (ex : pour 5 échantillons, il faudra ajouter 110 µl de Protéinase K).

Procéder ensuite à la distribution de **520 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier+ IPC exogène-Protéinase K** dans chaque puits d'intérêt. Le volume de solution en excès ne pourra être conservé.

#### 4. Distribuer les autres réactifs, selon le Tableau 5 ci-dessous.

Il est possible de préparer des plaques de réactifs Buffers W1, W2, W3 et EL à l'avance en vue d'une utilisation sous 8 jours. Bien sceller les plaques remplies pour éviter toute évaporation.

**Tableau 5. Configuration des automates KingFisher™ Flex, Duo et mL et volume des réactifs**

| Position sur la barrette ou la plaque   |               |                                   | Elément à ajouter | Volume par puits (µl) |
|-----------------------------------------|---------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------|
| Flex                                    | Duo*          | mL                                |                   |                       |
| Deep-well Lysat                         | Ligne A       | Position A                        | Lysat†            | 720                   |
| Deep-well Wash 1                        | Ligne E       | Position B                        | Buffer W1         | 700                   |
| Deep-well Wash 2                        | Ligne F       | Position C                        | Buffer W2         | 700                   |
| Deep-well Wash 3                        | Ligne G       | Position D                        | Ethanol (96–100%) | 750                   |
| Microplaque Elution                     | Elution strip | Position E                        | Buffer EL         | 50-100 ‡              |
| Microplaque Peigne (Large 96-Rod Cover) | Ligne B       | <i>A positionner manuellement</i> | Peigne §          | —                     |

\* Les lignes C, D et H sont vides

† Le lysat comprend 20 µl de Protéinase K, 100-200 µl d'échantillon et 500 µl de solution lyse LAB-SMB-carrier (±IPC exogène).

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

§ Seul le peigne pour l'automate Flex ou 96 est fourni dans le kit BES384

#### **Note:**

Afin de faciliter la visualisation des acides nucléiques lors de leur dépôt dans le Master Mix, la solution colorée (TPCOL) peut être ajoutée dans le tampon EL avant l'étape d'élution.

Cette solution est fournie concentrée à 40X et doit être utilisée à une concentration finale de 1X dans le tampon EL. Par exemple, ajoutez 1 mL de solution jaune concentrée (TPCOL) dans 39 mL de tampon EL. Vortexer la solution obtenue avant le dépôt dans la plaque d'élution.

5. Allumer le KingFisher™ Flex, Duo ou mL.
6. Sélectionner le programme BioExtract\_KF\_Flex, BioExtract\_KF\_Duo ou BioExtract\_KF\_mL à l'aide des touches fléchées.
7. Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages de chargement de l'appareil.

En fin de programme, récupérer les éluats des automates KingFisher™ Duo ou mL ou récupérer la plaque d'élution des automates KingFisher Flex ou 96. Se référer aux notices d'utilisation des Bio-T kit® pour les modalités d'utilisation et de stockage des extraits.

# PROTOCOLE SIMPLIFIE

|                                                     | KingFisher™<br>Flex ou 96                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | KingFisher™<br>Duo                                                                                 | KingFisher™<br>mL                                                                               | Élément à ajouter                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1<br><br>Préparation des<br>plaques<br>ou barrettes | Deep-well Lysat<br>                                                                                                                                                                                                                                            | Ligne A<br>       | Position A<br> | <u>Lysat</u><br><br>20 µl de Protéinase K<br>+<br>100-200 µl d'échantillon prétraité*<br>+<br>500 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier± IPC exogène |
|                                                     | Deep-well Wash 1<br>                                                                                                                                                                                                                                           | Ligne E<br>       | Position B<br> | 700 µl de tampon W1                                                                                                                                   |
|                                                     | Deep-well Wash 2<br>                                                                                                                                                                                                                                           | Ligne F<br>       | Position C<br> | 700 µl de tampon W2                                                                                                                                   |
|                                                     | Deep-well Wash 3<br>                                                                                                                                                                                                                                           | Ligne G<br>       | Position D<br> | 750 µl d'éthanol (96-100%)                                                                                                                            |
|                                                     | microplaque Elution<br>                                                                                                                                                                                                                                        | Elution strip<br> | Position E<br> | 50- <del>200</del> µl de tampon EL*                                                                                                                   |
|                                                     | microplaque Peigne<br>                                                                                                                                                                                                                                        | Ligne B<br>      | Le peigne est<br>placé<br>manuellement                                                          | Peigne (Rod Cover)                                                                                                                                    |
|                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | (Lignes C, D et H<br>vides)                                                                        |                                                                                                 |                                                                                                                                                       |
| 2<br><br>KingFisher™                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Allumer le KingFisher™ Flex, 96, Duo ou mL.</li> <li>• Ouvrir la porte du couvercle protecteur.</li> <li>• Sélectionner le programme BioExtract® SuperBall® souhaité à l'aide des touches fléchées.</li> <li>• Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages pour charger l'appareil.</li> </ul> |                                                                                                    |                                                                                                 |                                                                                                                                                       |

\*Pour les volumes de prise d'essai et d'éluion, se référer à la notice d'extraction de chaque Bio-T kit® (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](http://www.biosellal.com)

## Support Technique

[tech@biosellal.com](mailto:tech@biosellal.com)

+33 (0) 4 26 78 47 62

## Renseignements et commandes

[contact@biosellal.com](mailto:contact@biosellal.com)

+33 (0) 4 26 78 47 60

