

MANUEL D'EXTRACTION

Méthodes d'extraction proposées pour l'utilisation des Bio-T kit® Covid-19, Bio-T kit® SRAS-CoV-2, Bio-T® kit TriStar Covid-19 et Bio-T® kit SARS- CoV-2 UK & N501Y variants

Bio-T kit® Covid-19	Cat. N° BIOTK115 100 réactions	Cat. N° BIOTK120 200 réactions
Bio-T kit® SRAS-CoV-2	Cat. N° BIOTK118 500 réactions	Cat. N° BIOTK119 1000 réactions
Bio-T kit® TriStar Covid-19	Cat. N° BIOTK121 500 réactions	Cat. N° BIOTK122 1000 réactions
Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y variants	Cat. N° BIOTK125 500 réactions	

HUMAIN

Types de prélèvements

- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP) ou oral
- Prélèvements des voies respiratoires basses (Lavage broncho alvéolaire (LBA), Crachats)
- Prélèvements Salivaires

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract® SuperBall® Cat. N° BES384, BioSella – BioExtract® Premium Mag Cat. N° BEPM96, BEPM1K, BEPM2K, BEPM5K) programme classique (34min) ou programme court (24min)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract® Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

Pour la recherche uniquement

GESTION DES DOCUMENTS

Les Bio-T kit® Covid-19, Bio-T kit® SRAS-CoV-2, Bio-T kit® TriStar Covid-19 et Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants appartiennent à la gamme HUMAN qui regroupe un ensemble de kits partageant des protocoles d'extraction commun. Le présent manuel d'extraction est donc associé à l'ensemble de ces kits. Chacun des Bio-T kit® Covid-19, Bio-T kit® SRAS-CoV-2, Bio-T kit® TriStar Covid-19 et Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants possède un manuel d'utilisation qui leur sont propres, détaillant les différentes étapes de préparation de la qRT-PCR.

Les dernières versions en vigueur de chacun des deux documents figurent dans les certificats d'analyse (CA) fournis avec les Bio-T kit®.

En plus de ces 2 manuels, les dossiers de validation ainsi que les manuels de vérification des performances sont disponibles sur demande, contacter BioSella (contact@biosellal.com).

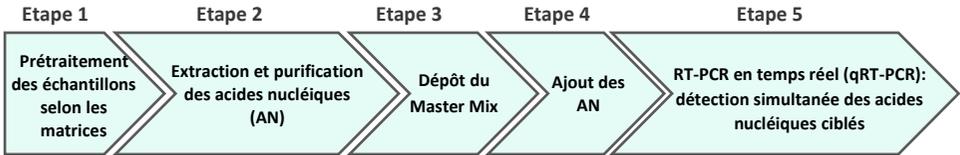
GESTION DES REVISIONS

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	Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme	Changement de référence d'un EPC	Modification de la recette du Master Mix
	Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction	Changement de référence d'un IPC exogène	Modification du protocole d'extraction validé
	Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole		
	Ajout/Suppression d'informations optionnelles		

PRESENTATION

Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qRT-PCR



Manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® Covid-19, Bio-T kit® SRAS-CoV-2, Bio-T® kit TriStar Covid-19 et Bio-T Kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variant		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® Covid-19, Bio-T kit® SRAS-CoV-2, Bio-T® kit TriStar Covid-19 et Bio-T Kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variant		
Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP) ou oral Lavage broncho alvéolaire (LBA) * Crachats* Prélèvement Salivaires*	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Premium Mag BioExtract® Column	Master Mix prêt à l'emploi	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC	Se référer au manuel d'utilisation du Bio-T kit®

*prétraitement possible

Les protocoles de la partie qRT-PCR sont détaillés dans les manuels d'utilisation des Bio-T kit® Covid-19, Bio-T kit® SRAS-CoV-2, Bio-T® kit TriStar Covid-19 et Bio-T Kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants.

Liste des consommables et réactifs recommandés pour l'extraction

Tableau 1. Consommables et réactifs non fournis dans le kit			
Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
Tampon ATL	Tampon de Lyse	BioSellal	ATL19076
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSellal	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSellal	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSellal	BES384
BioExtract® Premium Mag	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques	96	BEPM96
		1000	BEPM1K
		2000	BEPM2K
		5 000	BEPM5K
Saliva Collection Kit	Kit de prélèvement et de transport d'échantillons salivaires (x200)	BioSellal	CY-9800C

Pour les consommables liés au thermocycleur, se reporter au manuel d'utilisation de l'appareil.

Liste des réactifs de vérification des performances

Pour les adoptions de qRT-PCR, les ARN transcrits du SRAS-CoV-2 (*Gène E* et ORF1ab, titrés en nombre de copies/RT-PCR) utilisés par BioSellal dans le dossier de validation sont requis. Pour les adoptions de méthode et/ou le suivi dans le temps des performances du process, un Matériaux de Référence Interne (MRI) ENP est également proposé. BioSellal commercialise ces réactifs sous les références suivantes :

Tableau 2. Réactifs en option*			
Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
ARN SRAS-CoV-2 <i>Gène E</i>	ARN <i>Gène E</i> SRAS-CoV-2 quantifié (6.10 ⁴ copies/RT-PCR)	BioSellal	cARN-ESRAS-001
ARN SRAS-CoV-2 ORF1ab	ARN ORF1ab SRAS-CoV-2 quantifié (3.10 ⁴ copies/ RT-PCR)	BioSellal	cARN-IPSRAS-001
MRI SRAS-CoV-2	ENP positif SRAS-CoV-2 inactivé	BioSellal	MRI-COVID-001

*Ces réactifs sont disponibles uniquement sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

Modalités de gestion du risque relatif à l'utilisation du kit et d'élimination des réactifs

La mise en œuvre des protocoles d'extraction associés aux Bio-T kit® Covid-19, Bio-T kit® SRAS-CoV-2, Bio-T® kit TriStar Covid-19 et Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants génère deux types de risque pour le manipulateur et l'environnement :

- Risque chimique lié au kit d'extraction utilisé : se référer aux fiches de sécurité des kits d'extraction utilisés pour la manipulation des réactifs et la gestion des déchets.
- Risque biologique lié aux échantillons manipulés : il est de la responsabilité de l'utilisateur de mettre en place des pratiques adaptées aux micro-organismes du groupe de risque N°3.

Pour rappel, le risque biologique prévaut sur le risque chimique, aussi tout déchet contenant potentiellement du virus SRAS-CoV-2 doit être éliminé en DASRI.

Principales précautions à appliquer

Le SRAS-CoV-2 est un pathogène humain. Se référer aux réglementations en vigueur pour la manipulation des échantillons. A réception des prélèvements, BioSella recommande de désinfecter l'extérieur des contenants à l'aide d'un virucide avant de stocker et/ou de manipuler sous le PSM. Lors de l'extraction, il est obligatoire de travailler sous PSM jusqu'à la fin de l'étape de lyse des échantillons.

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (a minima : blouse, gants jetables, lunettes de protection, masque FFP3...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des MM prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats, et des acides nucléiques extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- **Le génome du SRAS-CoV-2 est à ARN. Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN** (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), **il est recommandé d'appliquer les précautions ci-dessous**:
 - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
 - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
 - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
 - o Utiliser des consommables « RNases free ».
 - o Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ ou à défaut à $\leq -16^{\circ}\text{C}$.
 - o Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

METHODES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES (AN) VALIDEES

GENERALITES

Recommandations pour le prélèvement, l'envoi et la conservation des échantillons

La technique de qRT-PCR en temps réel permet de révéler la présence de très faibles quantités de génome du pathogène. Celui-ci peut être plus ou moins rapidement dégradé selon la nature du pathogène (bactérie/parasite, virus enveloppé ou non...), la nature de son génome (ADN/ARN) et le type de prélèvement (présence de DNase/RNase). Ainsi, BioSella recommande de suivre les préconisations suivantes pour garantir un diagnostic optimal.

Prélèvements

- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP) ou oral
- Prélèvements des voies respiratoires basses (Lavage broncho alvéolaire (LBA), Crachats)
- Prélèvements salivaires
- Analyses individuelles

Conformément à l'avis n° 2020.0020/AC/SEAP du 6 mars 2020 du collège de la Haute Autorité de Santé, les prélèvements nasopharyngés sont à réaliser le cas échéant au domicile du patient par un professionnel de santé autorisé (notamment médecin, biologiste médical, infirmière diplômée d'Etat) et portant les équipements de protection individuelle recommandés. Afin de prévenir les contaminations croisées entre échantillons pouvant conduire à un résultat faussement positif, il est important d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique et d'éviter un contact direct entre chaque prélèvement.

Concernant les prélèvements salivaires, conformément à l'avis du 29 septembre 2020 de la Société Française de Microbiologie (SFM) relatif à la réalisation des prélèvements salivaires pour la détection du SARS-CoV-2 par RT-PCR dans le cadre du diagnostic/dépistage de la COVID-19 (version 2 du 21/02/2021), le dispositif de prélèvement doit être hermétiquement fermé, décontaminé avec un traitement désinfectant usuel virucide et être clairement identifié (nom, prénom, date de naissance, date et heure du recueil du prélèvement).

Envoi

Les prélèvements sont à adresser au laboratoire de biologie médicale dans un conditionnement en triple emballage qui permet d'identifier les échantillons à risque SARS-CoV-2 et de sécuriser le transport conformément aux recommandations de la Société Française de Microbiologie.

L'envoi doit se faire sous couvert du froid positif en 12h maximum pour un rendu de résultats idéalement dans les 24 heures.

Conservation après réception

Les analyses doivent être effectuées à minima dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 (LSB2). Traitement des échantillons pour analyse, immédiatement après réception et conservation à 5±3°C 5 jours maximum (pour ré-analyse ultérieure si nécessaire) puis congélation à ≤ -16°C pour quelques mois et à ≤ -65°C au-delà de 1 an.

Kits d'extraction

BioSella propose plusieurs kits d'extraction :

- BioExtract® Column Cat. N° BEC050 ou BEC250 basé sur l'utilisation de colonnes de silice, préconisé pour l'extraction de 1 à 12-20 échantillons en parallèle.
- BioExtract® SuperBall® Cat. N° BES384 ou BioExtract® Premium Mag Cat. N° BEPM96, BEPM1K, BEPM2K, BEPM5K, basé sur l'utilisation de billes magnétiques et l'utilisation d'automates tels que le KingFisher™ Duo, mL, Flex, 96 ou équivalent, préconisée pour l'extraction en parallèle de 12 échantillons ou plus.

Un protocole simplifié pour chaque méthode vous est proposé ci-après. Pour plus d'informations, contacter notre support technique ou www.biosella.com.

Résumé des méthodes d'extraction des acides nucléiques

Prélèvements	Prétraitement		Méthode d'Extraction		Volume prise d'essai µl	Volume d'éluion µl
	OUI/NON	Page	Nom	Page		
Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP) ou oral	NON	11	BioExtract® Column	11	200	100
			BioExtract® SuperBall®	14		
			BioExtract® Premium Mag	17		
Lavage broncho alvéolaire (LBA)	OUI	9	BioExtract® Column	11	200	100
			BioExtract® SuperBall®	14		
			BioExtract® Premium Mag	17		
Crachats	OUI	9	BioExtract® Column	11	200	100
			BioExtract® SuperBall®	14		
			BioExtract® Premium Mag	17		
Prélèvements Salivaires	OUI/NON	9	BioExtract® Column	11	200	100
			BioExtract® SuperBall®	14		
			BioExtract® Premium Mag	17		

CONTROLES REQUIS

Témoin négatif de processus (NCS):

Pour chacune des méthodes d'extraction, il est **obligatoire** d'inclure au moins **un échantillon NCS**, afin de valider l'absence d'inter-contamination des échantillons sur l'ensemble du processus. Il est placé en dernière position, après les échantillons à extraire, et il est recommandé d'adapter le nombre de NCS au niveau de risque d'inter-contamination du laboratoire : par exemple, un NCS tous les 7-10 échantillons terrain.

Pour ce contrôle, la **prise d'essai de 200 µl** est remplacée par **200 µl de 1X PBS ou de l'eau (RNase/DNase free)** et est traitée en parallèle des échantillons terrain tout au long du processus d'extraction.

Si disponible, Témoin positif de processus « sentinelle », MRI

Pour chacune des méthodes d'extraction, il est **recommandé** d'inclure un échantillon POSITIF, de préférence **inactivé** faiblement chargé, à extraire en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après qRT-PCR, les valeurs de Ct de ce témoin d'extraction seront reportées et suivies dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qRT-PCR, des valeurs de Ct attendues pour les deux valences avec ce témoin positif valide l'ensemble de la méthode. BioSella propose également un MRI ENP prêt à l'emploi (Cat. N°MRI-COVID-001), pour plus d'informations, contacter BioSella.

Note : **5µl d'IPC exogène** (tube à bouchon gris) fourni dans les **Bio-T kit® Covid-19**, **Bio-T kit® SRAS-CoV-2**, **Bio-T® kit TriStar Covid-19** et **Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants** doivent être utilisés lors de l'extraction pour chacun des échantillons et des contrôles d'extraction (NCS, sentinelle).

PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Pour les crachats, le protocole de prétraitement nécessite l'**utilisation du tampon « ATL »** (BioSella Cat. N° ATL19076).

A partir de lavage broncho alvéolaire (LBA)

- Après homogénéisation de l'échantillon (vortex puis centrifugation brève), prélever 500 µl d'échantillon et centrifuger 10 minutes à 5 000 x g.
- Éliminer le surnageant.
- Reprendre le culot dans 200 µL de PBS 1X.
- Poursuivre avec l'extraction et la purification des acides nucléiques à partir de **200 µl de culot re-suspendu** en suivant les protocoles BioExtract® SuperBall®, BioExtract® Premium Mag ou BioExtract® Column décrits ci-après.

Le culot obtenu peut être conservé 1 mois à ≤ -16°C ou plusieurs mois à ≤ -65°C

A partir de crachats

- Ajouter dans un micro-tube de 1.5 ml un mélange volume/volume de crachats et de mélange ATL/protéinase K. Par exemple :
 - 200 µl de crachats
 - 200 µl de tampon ATL/ PK (180 µl d'ATL + 20 µl de Protéinase K)
- Vortexer 15 secondes et incuber 15 minutes à 56°C ± 2
- Poursuivre avec l'extraction et la purification des acides nucléiques à partir de **200 µl du prélysats** en suivant les protocoles BioExtract® SuperBall®, BioExtract® Premium Mag ou BioExtract® Column décrits ci-après.

A partir de prélèvements Salivaires

En se référant à l'avis du 29 septembre 2020 de la Société Française de Microbiologie (SFM) relatif à la réalisation des prélèvements salivaires pour la détection du SARS-CoV-2 par RT-PCR dans le cadre du diagnostic/dépistage de la COVID-19 (version 2 du 21/02/2021), les recommandations de BioSella concernant les prélèvements salivaires sont les suivantes :

- En cas d'utilisation du Saliva Collection Kit (Cat. N°CY9800C, BioSella)

Afin de faciliter le prélèvement et le traitement et le stockage de la salive par le laboratoire d'analyse, BioSella propose un dispositif de prélèvement marqué CE-IVD composé d'un tube muni d'un entonnoir pour collecter la salive et d'un tube bouchonné contenant du milieu de transport inactivant.

- 1- Collecter la salive directement dans le tube muni de l'entonnoir.
- 2- Ajouter le milieu de transport présent dans le tube à bouchon rouge à raison d'un mélange volume/volume. Il est important de ne pas ajouter plus de milieu de transport que de salive afin de ne pas diluer de manière trop importante l'échantillon ce qui pourrait aboutir à un mauvais diagnostic du SRAS-CoV-2. Le bouchon rouge sert ensuite à fermer le tube contenant la salive mélangée au milieu de transport.
- 3- Poursuivre avec l'extraction et la purification des acides nucléiques à partir de **200 µl de salive diluée** en suivant les protocoles BioExtract® SuperBall®, BioExtract® Premium Mag ou BioExtract® Column décrits ci-après.

- En cas d'utilisation d'un prélèvement de salive pur

La salive peut être utilisée pure, mais en raison de l'effet négatif du pH potentiellement acide de la salive, la SFM (avis du 29/09/2020) recommande de réaliser une dilution allant de 1/2 à 1/10 dans du milieu de transport, du PBS ou directement dans un tampon de lyse. Une fois le prélèvement dilué, l'extraction et la purification des acides nucléiques en suivant les protocoles BioExtract® SuperBall®, BioExtract® Premium Mag ou BioExtract® Column décrits ci-après peut être réalisée sur 200 µl d'échantillon prétraité.

EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES AVEC PURIFICATION : EXTRACTION SUR COLONNE

Kit BioExtract® Column (BioSella)

Cat. N° BEC050 ou BEC250

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption

1. Dans un tube de 1.5 ml, ajouter :
 - 20 µl de Protéinase K[§]
 - 200 µl d'échantillon
 - 100 µl[§] de solution de lyse LA-carrier + IPC exogène, préalablement préparée selon Tableau 3:

Tableau 3. Solution de lyse LA-carrier + IPC exogène					
Réactif	Nombre d'échantillons				
	1	6*	12*	24*	30*
Tampon 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 (tube bouchon gris)	5 µl	33 µl	66 µl	132 µl	165 µl

* Afin de compenser les erreurs de pipetages, le volume préparé est de 10% supérieur au volume requis.

§ La protéinase K est fournie dans les kits BioExtract®

[§]Note : Au lieu de distribuer la Protéinase K dans chaque tube juste avant l'ajout de l'échantillon, il est possible de l'ajouter à la solution de lyse LA-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 LA-carrier + IPC exogène plus de 10 minutes (ajout extemporané, distribution dans les tubes, réalisation de la suite du protocole).

Le volume de la Protéinase K à ajouter à la solution de lyse suit la même règle de 10% de marge (ex : pour 6 échantillons, il faudra ajouter 132 µl de Protéinase K).

Procéder ensuite à la distribution de 120 µl de solution de lyse LA-carrier + IPC exogène-Protéinase K dans chaque tube d'intérêt. La solution en excès ne pourra être conservée.

2. Vortexer et **incuber 15 minutes à 15–25°C** (à température ambiante)
3. Centrifuger brièvement
4. Ajouter **350 µl de tampon LB**
5. Vortexer puis centrifuger brièvement.

2. Adsorption sur la membrane de silice

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

3. Lavages et Séchage de la membrane de silice

1. Ajouter **600 µl de tampon W1**
2. Centrifuger à **6 000 x g** pendant **1 minute**. Changer de tube collecteur
3. Ajouter **600 µl de tampon W2**
4. Centrifuger à **6 000 x g** pendant **1 minute**. Changer de tube collecteur
5. Centrifuger à **20 000 x g** pendant **2 minutes** (ou 16 000 x g 3 minutes) pour sécher la membrane.

4. Elution des acides nucléiques

1. Mettre la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un nouveau tube de 1.5 ml, et jeter le tube collecteur contenant le filtrat
2. Ajouter **100 µl de tampon EL** (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane
3. **Incuber à température ambiante** (15–25°C) pendant **1 minute**
4. Centrifuger à **20 000 x g** pendant **1 minute** (ou **16 000 x g 2 minutes**)
5. Conserver l'éluat contenu dans le tube de 1.5 ml et jeter la colonne.

5. Stockage après l'extraction

Les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à 5°C ± 3 si la qRT-PCR est réalisée dans les 4 heures qui suivent, au-delà, il est recommandé de les conserver à ≤ -16°C pendant 6 mois ou à ≤ -65°C pour une meilleure conservation.

Figure 1. Schéma Extraction avec le kit BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)

<p>1</p> <p>Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption</p>	 <p>20 µl de Protéinase K 200 µl d'échantillon 100 µl de solution de lyse LA-carrier + IPC exogène</p> <p>Température ambiante (TA) 15 min</p> <p>350 µl de tampon LB</p>
<p>2</p> <p>Adsorption sur la membrane de silice</p>	 <p>Charger la colonne BioExtract® Mini Spin Column délicatement</p> <p> 6 000 x g 1 min</p>
<p>3</p> <p>Lavages</p> <p>Séchage de la membrane de silice</p>	 <p>1^{er} Lavage 600 µl W1  6 000 x g 1 min</p> <p>2nd Lavage 600 µl W2  6 000 x g 1 min</p> <p>- -  20 000 x g 2 min ou 16 000 x g 3 min</p>
<p>4</p> <p>Elution des acides nucléiques</p>	 <p>100 µl de tampon EL (TA) délicatement</p> <p>TA 1 min</p> <p> 20 000 x g 1 min ou 16 000 x g 2 min</p>

EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES AVEC PURIFICATION: EXTRACTION AVEC BILLES MAGNETIQUES

Kit BioExtract® SuperBall® (BioSella)

Cat. N° BES384

Pour utilisation avec KingFisher™ Flex, 96, Duo, mL, PurePrep96 ou automate équivalent

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Préparation des plaques ou barrettes

1. Préparer les consommables pour la série d'extraction :

Flex ou 96 ou PurePrep96 : 4 plaques Deep-well et 2 microplates. Les annoter en fonction de l'élément à ajouter (voir Tableau 5).

Duo : 1 plaque Deep-well et 1 barrette d'élution.

mL : 1 barrette par échantillon. Sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes dessus.

2. Au fond des puits de la « Deep-well Lysat » (Flex ou 96), des puits de la ligne A (Duo) ou des puits en position A des barrettes (mL), ajouter :

- 20 µl de Protéinase K[§]
- 200 µl d'échantillon
- 500 µl* de solution de lyse LAB-SMB-carrier + IPC exogène (bouchon gris) préalablement vortexée vigoureusement 30 secondes. Voir Tableau 4 :

Tableau 4. Solution de lyse LAB-SMB-carrier + IPC exogène

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

* Afin de compenser les erreurs de pipetages, le volume préparé est de 10% supérieur au volume requis. La solution en excès peut être conservée en vue d'une utilisation sous 8 jours ; au-delà de cette durée, elle doit être jetée.

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

‡ Note : Au lieu de distribuer la Protéinase K dans chaque puits juste avant l'ajout 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).

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. La solution en excès ne pourra être conservée.

3. Distribuer les autres réactifs, selon le Tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5. Volume des réactifs et Configuration des automates KingFisher™ Flex, 96, Duo et mL ou PurPrep96				
Position sur la barrette ou la plaque			Élément à ajouter	Volume par puits (µl)
Flex ou 96	Duo*	mL		
Deep-well Lysat	Ligne A	Position A	Lysat†	720†
Deep-well Wash 1	Ligne E	Position B	Tampon W1	700
Deep-well Wash 2	Ligne F	Position C	Tampon W2	700
Deep-well Wash 3	Ligne G	Position D	Ethanol (96-100%)	750
Microplate Elution	Elution strip	Position E	Tampon EL	100
Microplaque Peigne (Large 96-Rod Cover)	Ligne B	<i>A positionner manuellement</i>	Peigne	—

* Les lignes C, D et H sont vides

† Inclus 20 µl de Protéinase K, l'échantillon et 500 µl de solution lyse LAB-SMB-carrier + IPC exogène.

2. Lancement du KingFisher™

- Placer les plaques dans l'automate en ayant sélectionné le programme « BioExtract_KF_Flex », « BioExtract_KF_96 », « BioExtract_KF_Duo », « BioExtract_KF_mL » ou « BioExtract_PP_96 » (sur PurePrep96) et démarrer
- En fin de programme, récupérer les éluats.

3. Stockage après l'extraction

Les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à 5°C ± 3 si la qRT-PCR est réalisée dans les 4 heures qui suivent, au-delà, il est recommandé de les conserver à ≤ -16°C pendant 6 mois ou à ≤ -65°C pour une meilleure conservation.

Figure 2. Extraction avec le kit BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)

	KingFisher™ Flex ou 96 ou PurePrep96	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Élément à ajouter
1 Préparation des plaques ou barrettes	Deep-well Lysat 	Ligne A 	Position A 	<u>Lysat</u> 20 µl de Protéinase K + 200 µl d'échantillon + 500 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier+ IPC exogène
	Deep-well Wash 1 	Ligne E 	Position B 	700 µl de tampon W1
	Deep-well Wash 2 	Ligne F 	Position C 	700 µl de tampon W2
	Deep-well Wash 3 	Ligne G 	Position D 	750 µl d'éthanol (96-100%)
	microplaque Elution 	Elution strip 	Position E 	100 µl de tampon EL
	microplaque Peigne 	Ligne R  (Lignes C, D et H vides)	Le peigne est placé manuellement	Peigne (Rod Cover)
2 KingFisher™	<ul style="list-style-type: none"> • Allumer le KingFisher™ Flex, 96, Duo ou mL ou PurePrep96. • Ouvrir la porte du couvercle protecteur. • Sélectionner le programme BioExtract® SuperBall® souhaité à l'aide des touches fléchées. • Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages pour charger l'appareil. 			

Kit BioExtract® Premium Mag (BioSella)

Cat. N° **BEPM96, BEPM1K, BEPM2K, BEPM5K**

Pour utilisation avec KingFisher™ Flex, 96, Duo, mL, **PurePrep96** ou automate équivalent

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Préparation des plaques ou barrettes

1. Préparer les consommables pour la série d'extraction :

Flex ou 96 ou PurePrep96 : 4 plaques Deep-well et 2 micro-plates. Les annoter en fonction de l'élément à ajouter (voir Tableau 7).

Duo : 1 plaque Deep-well et 1 barrette d'éluion.

mL : 1 barrette par échantillon. Sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes dessus.

2. Au fond des puits de la « Deep-well Sample plate» (Flex ou 96), des puits de la ligne A (Duo) ou des puits en position A des barrettes (mL), ajouter :

- **200 µl d'échantillon**
- **630 µl de solution de Lyse + IPC** préalablement vortexée. Voir Tableau 6.

Tableau 6. Préparation de la solution de lyse + IPC exogène

Réactifs	Nombre d'échantillons*						
	1	5	10	12	15	48	96
Lysis Buffer	200 µl	1.1 ml	2.2 ml	2.64 ml	3.3 ml	10.56 ml	21.12 ml
Poly-A-RNA reconstitué	1 µl	5.5 µl	11 µl	13.2 µl	16.5 µl	52.8 µl	105.6 µl
Protéinase K reconstitué	10 µl	55 µl	110 µl	132 µl	165 µl	528 µl	1.06 ml
Premium Beads	20 µl	110 µl	220 µl	264 µl	330 µl	1056 µl	2.12 ml
Binding Buffer	400 µl	2.2 ml	4.4 ml	5.28 ml	6.6 ml	21.12 ml	42.24 ml
IPC exogène (tube bouchon gris)	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.

3. Distribuer les autres réactifs, selon le Tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7. Volume des réactifs et Configuration des automates KingFisher™ Flex, 96, Duo et mL ou PurePrep96				
Position sur la barrette ou la plaque			Élément à ajouter	Volume par puits (µl)
Flex ou 96	Duo*	mL		
Deep-well Sample plate	Ligne A	Position A	Lysat†	830†
Deep-well Wash 1	Ligne E	Position B	Wash Buffer I	800
Deep-well Wash 2	Ligne F	Position C	Wash Buffer II	800
Deep-well Wash 3	Ligne G	Position D	Wash Buffer III	800
Microplate Elution	Elution strip	Position E	Elution Buffer	100
Microplaque Peigne (Large 96-Rod Cover)	Ligne B	<i>A positionner manuellement</i>	Peigne	—

* Les lignes C, D et H sont vides

† Inclus l'échantillon et 630 µl de solution lyse + IPC exogène.

2. Lancement du KingFisher™

3. Placer les plaques dans l'automate en ayant sélectionné soit :
 - a. Le programme classique « Premium-Mag-KF» (34min) et démarrer.
 - b. Le programme court « Premium-Mag-Fast-KF» (24min) et démarrer.
4. En fin de programme, récupérer les éluats.

3. Stockage après l'extraction

Les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à 5°C ± 3 si la qRT-PCR est réalisée dans les 4 heures qui suivent, au-delà, il est recommandé de les conserver à ≤ -16°C pendant 6 mois ou à ≤ -65°C pour une meilleure conservation.

Figure 3. Extraction avec le kit BioExtract® Premium Mag

	KingFisher™ Flex ou 96 ou PurePrep96	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Élément à ajouter
1 Préparation des plaques ou barrettes	Deep-well Sample plat 	Ligne A 	Position A 	200 µl d'échantillon + 630 µl de solution de lyse + IPC exogène
	Deep-well Wash 1 	Ligne F 	Position B 	800 µl de Wash Buffer I
	Deep-well Wash 2 	Ligne F 	Position C 	800 µl de Wash Buffer II
	Deep-well Wash 3 	Ligne G 	Position D 	800 µl de Wash Buffer III
	microplaque Elution 	Elution strip 	Position E 	100 µl de Elution Buffer
	microplaque Peigne 	Ligne B  (Lignes C, D et H vides)	Le peigne est placé manuellement	Peigne (Rod Cover)
3 KingFisher™	<ul style="list-style-type: none"> • Allumer le KingFisher™ Flex, 96, Duo ou mL ou PurePrep96 • Ouvrir la porte du couvercle protecteur. • Sélectionner le programme «Premium-Mag-KF» ou «Premium-Mag-Fast-KF» à l'aide des touches fléchées. • Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages pour charger l'appareil. 			

Pour obtenir le programme KingFisher™ correspondant à la version de l'automate, veuillez contacter notre service technique (tech@biosellal.com).



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