
MANUEL D'UTILISATION

BioExtract® Premium Mag

Cat. N° BEPM96 – 96 extractions

Cat. N° BEPM1K – 1 000 extractions

Cat. N° BEPM2K – 2 000 extractions

Cat. N° BEPM5K – 5 000 extractions

TOUTES ESPECES

**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 de toutes espèces ou de leur environnement
par billes magnétiques à l'aide des automates
KingFisher™ Flex, 96, Duo, mL ou équivalent**

Utilisable à des fins de recherche uniquement

GESTION DES DOCUMENTS

Le manuel du BioExtract® Premium Mag décrit la composition du kit, les différentes étapes de la reconstitution du tampon et le principe général d'utilisation du kit. La dernière version utilisée est indiquée sur le certificat d'analyse (CA) fourni avec le kit BioExtract® Premium Mag.

Outre ce manuel, chaque Bio-T kit® dispose de manuels techniques propres :

- Le manuel d'extraction, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validés / ou recommandés par BioSella.
- Le manuel qPCR, présentant les différentes étapes de préparation de la q(RT)-PCR.

Se référer au manuel d'extraction spécifique de votre Bio-T kit® pour obtenir le protocole détaillé en fonction de la matrice (prétraitement, volume de prise d'essai et volume d'éluion).

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

Pour le BEPM96 :

Le BioExtract® Premium Mag BEPM96 comprend les réactifs en volume suffisant pour la réalisation de 96 extractions indépendantes.

Il 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. Seule la protéinase K et le Poly-A-RNA doivent être conservés à ≤-16°C.

Tableau 1. Contenu du kit BEPM96

Type de réception	Contenu	Volume et Nombre d'unités	Conditions de stockage	Reconstitution Nécessaire ?
Colis envoyé à température ambiante	Lysis Buffer	20 ml	15°C à 25°C	NON
	Binding Buffer	40 ml	15°C à 25°C	NON
	Wash Buffer I	80 ml	15°C à 25°C	NON
	Wash Buffer II	80 ml	15°C à 25°C	NON
	Wash Buffer III	80 ml	15°C à 25°C	NON
	Elution Buffer	20 ml	15°C à 25°C	NON
	Premium Beads	2 ml	15°C à 25°C	NON
Colis reçu sous neige carbonique	Protéinase K	1 ml	≤- 16°C	NON
	Poly-A-RNA	120 µl	≤- 16°C	NON

Si des précipités apparaissent dans les tampons, chauffer ces derniers à 25-37°C pour les dissoudre avant utilisation.

Pour le BEPM1K, BEPM2K et BEPM5K :

Les BioExtract® Premium Mag BEPM1K, BEPM2K et BEPM5K comprennent respectivement les réactifs en volume suffisant pour la réalisation de 1000, 2000 et 5000 extractions indépendantes.

Le BioExtract® Premium Mag 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. **Le Poly-A-RNA et la protéinase K lyophilisés doivent être conservés à 5°C ± 3 avant la resuspension.**

Tableau 2. Contenu des kits BEPM1K, BEPM2K et BEPM5K

Contenu	Volume et Nombre d'unités			Conditions de stockage	Reconstitution Nécessaire ?
	BEPM1K	BEPM2K	BEPM5K		
Lysis Buffer	200 ml	2x 200 ml	1000 ml	15°C à 25°C	NON
Binding Buffer	400 ml	2x 400 ml	2 x 1000 ml	15°C à 25°C	NON
Wash Buffer I	800 ml	2x 800 ml	4 x 1000 ml	15°C à 25°C	NON
Wash Buffer II	800 ml	2x 800 ml	4 x 1000 ml	15°C à 25°C	NON
Wash Buffer III	800 ml	2x 800 ml	4 x 1000 ml	15°C à 25°C	NON
Elution Buffer	200 ml	2x 200 ml	1000 ml	15°C à 25°C	NON
Protéinase K	1 x 200 mg (pour 1 x 10 ml de solution reconstituée)	2 x 200 mg (pour 2 x 10 ml de solution reconstituée)	5 x 200 mg (pour 5 x 10 ml de solution reconstituée)	Lyophilisée : 5°C ± 3 Reconstitué : aliquoté à ≤ -16°C	OUI
Poly-A-RNA	3 mg	2x 3 mg	15 mg	Lyophilisé : 5°C ± 3 Reconstitué : aliquoté à ≤ -16°C	OUI
Poly-A-RNA Buffer	5 ml	2x 5 ml	20 ml	15°C à 25°C	NON
Premium Beads	20 ml	2x 20 ml	100 ml	15°C à 25°C	NON

Si des précipités apparaissent dans les tampons, chauffer ces derniers à 25-37°C pour les dissoudre avant utilisation.

Lors de la première utilisation, reconstituer certains réactifs (Protéinase K et Poly-A-RNA) en suivant les indications du Tableau 3 ci-dessous. Se référer également aux étiquettes des flacons pour un rappel des réactifs et des volumes exacts à ajouter.

Tableau 3. Préparation des réactifs

Réactifs	Préparation
Protéinase K	Ajouter 10 ml d'eau (RNase/DNase free) dans chaque flacon, vortexer et stocker les aliquotes à ≤ -16°C.
Poly-A-RNA	BEPM1K et BEPM2K : Ajouter 1.2 ml de Poly-A-RNA Buffer par tube de 3mg , vortexer et stocker les aliquotes à ≤ -16°C.
	BEPM5K : Ajouter 6 ml de Poly-A-RNA Buffer , vortexer et stocker les aliquotes à ≤ -16°C.

Consommables pour le KingFisher™

Produit	Description	Fournisseur	Cat. N°
Deepwell 2ml	60 pieces/ carton	BioSella	KF96DW-002
Plaque élution	60 pieces/ carton	BioSella	KF96MP-001
Peigne	60 pieces/ carton	BioSella	KF96RC-003

Principales précautions

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

⚠ Certains échantillons peuvent présenter des risques pathogènes pour les animaux et/ou l'environnement et/ou pour l'Homme. Se référer aux réglementations en vigueur pour la manipulation en fonction des pathogènes et/ou des échantillons.

- 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 FFP2 ou FFP3...).
- 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
- Le potentiel infectieux des déchets liquides restants après l'utilisation du kit n'a pas été testé. Même si la contamination des déchets par des matières infectieuses résiduelles est peu probable, elle ne peut pas être complètement exclue. Par conséquent, les déchets liquides doivent être manipulés comme potentiellement infectieux et jetés conformément aux réglementations de sécurité locales.

Points importants avant de commencer

- S'assurer que le programme « Premium-Mag-KF » et/ou « Premium-Mag-Fast-KF » est bien installé sur votre automate KingFisher™.
- 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.

PROCEDURE

1. Préparation des plaques ou barrettes

1. Préparer les consommables pour la série d'extraction (voir Tableau 6) :

- **KingFisher™ Flex ou 96 :**
 - 4 plaques Deep-well
 - 1 microplaque d'éluotion
 - 1 peigne déposé dans une plaque d'éluotion
- **KingFisher™ Duo :**
 - 1 plaque Deep-well
 - 1 barrette d'éluotion
- **KingFisher™ mL:**
 - 1 barrette par échantillon.

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 (si le volume est plus faible, compléter avec du PBS 1X)
- 630 µl de solution de Lyse ± IPC préalablement vortexée. Voir Tableau 5 ou Tableau 6.

L'ajout d'IPC exogène est fonction de chaque Bio-T kit®. Se référer à la notice d'extraction du Bio-T kit®. Se reporter au Tableau 5 en cas d'absence d'IPC endogène et au Tableau 6 en cas d'utilisation d'un IPC exogène. Avant de commencer, assurez-vous que la solution de Premium Beads est totalement en suspension : la vortexer pendant 3 minutes avant la première utilisation puis 1 minute avant chaque utilisation suivante.

En absence d'IPC exogène :

Tableau 5. Préparation de la solution de lyse							
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

* Afin d'assurer le volume de pipetage, le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis.

En cas d'utilisation d'un IPC exogène :

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†	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.

† 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).

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

Volume des réactifs et Configuration des automates KingFisher™ Flex, 96, Duo et mL

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	60 à 200‡
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.

‡ Les volumes d'éluion dépendent du Bio-T kit® 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). En absence d'indications, BioSella recommande un volume d'éluion de 100 µl

2. Lancement du KingFisher™

1. Allumer le KingFisher™ Flex, Duo, mL ou équivalent.
2. Placer les plaques dans l'automate en ayant sélectionné le programme « Premium-Mag-KF » ou « Premium-Mag-Fast-KF † » et démarrer.
3. Suivre les messages de chargement de l'appareil. Assurez-vous que toutes les plaques sont insérées dans la même orientation (en particulier lorsque vous utilisez des plaques partiellement remplies).

† Le programme court 24 minutes (Premium-Mag-Fast-KF) est utilisable pour des applications particulières. Se référer aux notices d'utilisation des Bio-T kit® pour connaître la compatibilité de ce programme.

3. Stockage après l'extraction

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™ Flex ou 96	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Élément à ajouter
1 Préparation des plaques ou barrettes	Deep-well Sample plate 	Ligne A 	Position A 	200 µl d'échantillon (ou échantillon complété à 200µl avec du PBS1X) + 630 µl de Solution de Lyse ± IPC exogène
	Deep-well Wash 1 	Ligne E 	Position B 	
	Deep-well Wash 2 	Ligne F 	Position C 	800 µl de Wash Buffer I
	Deep-well Wash 3 	Ligne G 	Position D 	800 µl de Wash Buffer II
	microplaque Elution 	Elution strip 	Position E 	800 µl de Wash Buffer III
	microplaque Peigne 	Ligne B  (Lignes C, D et H vides)	Le peigne est placé manuellement 	60-200 µl de Elution Buffer
				Peigne (Rod Cover)
	2 KingFisher™	<ul style="list-style-type: none"> • Allumer le KingFisher™ Flex, 96, Duo ou mL. • 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. 		

Le programme court 24 minutes (Premium-Mag-Fast-KF) est utilisable pour des applications particulières. Pour toute information supplémentaire, contacter le Service Technique de BioSellaal (tech@biosellaal.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