

MACHEREY-NAGEL

Mode d'emploi



ADN génomique sanguin

■ NucleoSpin® Dx Blood

CE

IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

REF 740899.50,
740899.250

 MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
52355 Düren, Allemagne, Tél. : +49 24 21 969-0

 50 / 250 prép.

 Avril 2022/ Rév. 05

Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)
E-mail: info@mn-net.com

Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-270
E-mail: tech-bio@mn-net.com

USA

MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)
E-mail: sales-us@mn-net.com

France

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France
Tel.: +33 388 68 22 68
E-mail: sales-fr@mn-net.com

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

Switzerland



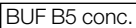




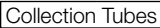
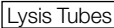
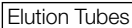

MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
E-mail: sales-ch@mn-net.com

Table des matières

1	Détail des composants	4
1.1	Contenu du kit	4
1.2	Réactifs, consommables et matériel à fournir par l'utilisateur	5
1.3	À propos de ce mode d'emploi	6
2	Description du produit	7
2.1	Usage prévu	7
2.2	Limites d'utilisation du produit	7
2.3	Contrôle qualité	7
2.4	Présentation du kit et de ses spécifications	8
2.5	Performances analytiques	9
2.6	Procédures d'éluion	10
3	Conditions de conservation et préparation des solutions de travail	11
4	Consignes de sécurité	12
4.1	Élimination	12
5	Purification d'ADN génomique avec le kit NucleoSpin® Dx Blood	13
5.1	Mode opératoire résumé	14
5.2	Mode opératoire détaillé	15
6	Annexe	17
6.1	Guide de résolution des problèmes	17
6.2	Exigence de notification	19
6.3	Bibliographie générale	19
6.4	Références	19
6.5	Explication des pictogrammes	19
6.6	Limites d'utilisation du produit et garantie	20

1 Détail des composants

1.1 Contenu du kit

NucleoSpin® Dx Blood			
RÉF		50 préparations 740899.50	250 préparations 740899.250
Buffer B3		15 mL	60 mL
Wash Buffer BW		30 mL	150 mL
Wash Buffer B5 (Concentrate)*		12 mL	50 mL
Elution Buffer BE**		13 mL	60 mL
Proteinase Buffer PB		1,8 mL	8 mL
Proteinase K (lyophilized)*		30 mg	2 × 75 mg
NucleoSpin® Dx Blood Columns (red rings -plus Collection Tubes)		50	250
Collection Tubes (2 mL)		3 × 50	3 × 250
Lysis Tubes (1.5 mL)		50	5 × 50
Elution Tubes (1.5 mL)		50	5 × 50
User manual		1	1

* Pour la préparation des solutions de travail et les conditions de stockage, consultez le paragraphe 3.

** Composition du tampon d'éluion BE : 5 mM Tris/HCl, pH 8,5

1.2 Réactifs, consommables et matériel à fournir par l'utilisateur

Réactifs

- Éthanol de 96 à 100 % (pour ajuster les conditions de fixation de l'ADN et préparer le tampon de lavage B5)

Consommables

- Embouts de pipette à usage unique (idéalement avec barrière contre les aérosols, pour éviter les contaminations inter-échantillons)

Matériel

- Pipeteurs manuels
- Dispositif de centrifugation pour tubes de microcentrifugation
- Mélangeur vortex
- Bloc chauffant ou bain-marie (pour la lyse des échantillons à 70 °C)
- Équipements de protection individuelle (par ex. : blouse de laboratoire, gants, lunettes de sécurité)

1.3 À propos de ce mode d'emploi

Il est fortement conseillé de lire les modes opératoires détaillés figurant dans le présent mode d'emploi. La version résumée du mode opératoire est uniquement destinée à servir d'aide-mémoire pendant la procédure de purification.

Les modes d'emploi MACHEREY-NAGEL sont disponibles sur notre site Internet, www.mn-net.com.

Veuillez contacter notre service d'assistance technique pour connaître les nouveautés du présent mode d'emploi par rapport aux versions antérieures.

Coordonnées de contact

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11
52355 Duren, Allemagne
Tél. : +49 24 21 969-0
Numéro vert : 0800 26 16 000 (depuis l'Allemagne uniquement)
E-mail : info@mn-net.com

Assistance technique Bioanalyse

Tél. : +49 24 21 969-270
E-mail : tech-bio@mn-net.com

Benutzerhandbücher in weiteren Sprachen sind im Download-Bereich auf der Produktseite verfügbar.

Les manuels d'utilisation dans d'autres langues sont disponibles dans la section Téléchargements de la page du produit.

Los manuales de usuario en otros idiomas están disponibles en la sección de descargas de la página del producto.



2 Description du produit

2.1 Usage prévu

NucleoSpin® Dx Blood est un kit destiné à l'extraction de l'ADN génomique à partir d'échantillons de sang total humain frais et congelés, stabilisés à l'EDTA, au citrate ou à l'héparine, recueillis avec les systèmes de prélèvement sanguin habituels, afin de procéder ensuite à leur analyse *in vitro*. Le produit permet d'obtenir de l'ADN génomique purifié qui peut être utilisé pour des applications aval telles que PCR, qPCR ou séquençage afin d'obtenir des informations sur l'ADN génomique dans l'échantillon. Le produit est réservé aux utilisateurs professionnels dans les laboratoires de diagnostic.

Le kit **NucleoSpin® Dx Blood** n'est pas destiné à être utilisé comme autotest ni pour les tests au chevet du patient. L'utilisateur doit avoir une certaine expérience des techniques de biologie moléculaire, notamment la manipulation d'échantillons de sang total, et d'autres échantillons d'origine humaine potentiellement infectieux.

Il est recommandé d'utiliser les contrôles appropriés tels que des contrôles internes, des témoins d'extraction, et des contrôles positifs/négatifs.

2.2 Limites d'utilisation du produit

Le kit **NucleoSpin® Dx Blood** ne doit pas être utilisé avec des échantillons de tissus ou de selles, ni avec des fluides corporels acellulaires tels que l'urine, le sérum, le plasma ou le liquide céphalorachidien. Les performances du kit n'ont pas été évaluées avec de la couche leucocytaire, des cellules cultivées ou isolées, des frottis, des tâches de sang séché et de l'ADN viral. Le kit n'est pas non plus indiqué pour isoler et purifier les acides nucléiques de bactéries, de champignons ou de parasites.

2.3 Contrôle qualité

Conformément au système d'assurance qualité en vigueur chez MACHEREY-NAGEL, chaque lot de kit **NucleoSpin® Dx Blood** est testé par rapport à des spécifications prédéfinies, afin d'assurer une qualité de produit constante.

2.4 Présentation du kit et de ses spécifications

Le kit **NucleoSpin® Dx Blood** s'appuie sur la technologie éprouvée des membranes en silice NucleoSpin®. Il permet d'isoler facilement l'ADN génomique à partir d'échantillons de sang total de 200 µL. L'ADN purifié obtenu est prêt à l'emploi pour être amplifié par PCR.

La procédure **NucleoSpin® Dx Blood** repose sur une séquence d'étapes simples :

En premier lieu, les échantillons de sang sont lysés en présence de sels chaotropiques et de protéinase K. L'ADN génomique contenu dans le lysat est ensuite piégé dans une colonne **NucleoSpin® Dx Blood**. La membrane à laquelle est lié l'ADN est ensuite lavée et l'ADN génomique de pureté élevé est alors récupéré par élution.

Échantillons

Ce kit peut être utilisé avec du sang total humain frais ou congelé, traité à l'EDTA, au citrate ou à l'héparine, provenant de systèmes de prélèvement sanguin habituels.

Un volume de 200 µL de sang total humain produira généralement de 3 à 5 µg d'ADN génomique, en fonction du nombre de leucocytes dans l'échantillon.

La liste ci-dessous présente des dispositifs de prélèvement sanguin appropriés :

Tableau 1: Liste de systèmes de prélèvement sanguin appropriés

Système de prélèvement	Fabricant
S-Monovette® Li-Heparin	Sarstedt
S-Monovette® EDTA	Sarstedt
S-Monovette® Citrat	Sarstedt
VACUETTE® EDTA	GREINER BIO-ONE
BD VACUTAINER® K2E	BD
K3 EDTA	DELTA LAB
K2 EDTA	APTACA

Limites liées à l'échantillon

Les cryoprécipités formés pendant la décongélation des échantillons congelés peuvent obstruer la colonne **NucleoSpin® Dx Blood**. Si des précipités sont visibles, évitez de les aspirer lors de l'introduction du lysat dans la colonne de fixation.

De plus, les échantillons hémolysés et hyperlipidiques peuvent évidemment influencer sur le rendement et la pureté de l'ADN.

Tableau 2: Résumé des spécifications du kit

Paramètre	NucleoSpin® Dx Blood
Matériau échantillonné	Sang total humain frais ou congelé, traité à l'EDTA, au citrate ou à l'héparine, recueilli avec les systèmes de prélèvement sanguin habituels.
Volume d'échantillon	200 µL
Rendement d'ADN généralement constaté	3 à 5 µg en fonction de la numération leucocytaire
Qualité d'ADN généralement constatée	Rapport A_{260}/A_{280} de 1,7 à 1,9 Rapport A_{260}/A_{230} de 1,8 à 2,3
Volume d'éluion	50 à 200 µL
Concentration d'ADN généralement constatée	40 à 60 ng/µL
Traitement	Centrifugation

2.5 Performances analytiques

La répétabilité intracycle a été calculée à partir de l'extraction parallèle de 12 aliquotes identiques. Le rendement moyen en ADN était de $5,2 \mu\text{g} \pm 0,3$, soit un CV de 6 %. La répétabilité inter-cycles a été testée lors de 2 analyses indépendantes. Dans chaque analyse, l'ADN a été isolé à partir d'un échantillon de sang, et chaque extrait a été répliqué 6 fois. La différence entre les rendements moyens des deux analyses était de $0,2 \mu\text{g}$ d'ADN, soit 6 %. Pour la répétabilité inter-lots, 3 Lots du kit NucleoSpin® Dx Blood ont été comparés côte à côte. Pour chaque lot, l'ADNg a été isolé et répliqué 6 fois. Tous les réplicats ont été extraits d'un seul échantillon de sang. Les rendements moyens en ADN des six préparations étaient de $5,2$, $4,8$ et $5,0 \mu\text{g}$, avec des écarts-types de $0,4$, $0,5$ et $0,5 \mu\text{g}$, respectivement. Le CV des rendements moyens des trois lots était de 4 %.

Pour l'évaluation de la reproductibilité, l'ADN a été extrait d'échantillons de sang total par deux opérateurs côte à côte. Le rendement moyen ($n = 6$) était de $2,9 \mu\text{g} \pm 0,3 \mu\text{g}$ et de $3,0 \mu\text{g} \pm 0,2 \mu\text{g}$, respectivement, ce qui correspond à un CV de 9 % et 7 % pour les six préparations. La différence entre les rendements moyens des deux opérateurs était de $0,1 \mu\text{g}$.

L'utilisation du kit **NucleoSpin® Dx® Blood** pour le diagnostic *in vitro* est illustrée dans les publications suivantes :

Hadzsiev, K. *et al.* (2019) Rubinstein-Taybi syndrome 2 with cerebellar abnormality and neural tube defect. *Clin Dysmorphol.*, 28(3), 137 – 141.

Komlósi, K. *et al.* (2015) Phenotypic variability in a Hungarian patient with the 4q21 microdeletion syndrome. *Mol Cytogenet.*, 8, 16.

Czakó, M. *et al.* (2019) Possible Phenotypic Consequences of Structural Differences in Idic(15) in a Small Cohort of Patients. *Int J Mol Sci.*, 20(19), 4935.

Szabo, A. *et al.* (2015) Partial tetrasomy of the proximal long arm of chromosome 15 in two patients : the significance of the gene dosage in terms of phenotype. *Mol Cytogenet.*, 8, 41.

2.6 Procédures d'élution

L'ADN est récupéré des **colonnes NucleoSpin® Dx Blood** par élution avec 50 à 200 μL de tampon d'élution BE. Le rendement total d'ADN augmente avec le volume d'élution, tandis que la concentration d'ADN diminue (voir la Figure 1).

Généralement, jusqu'à 10 μL d'éluat peuvent être utilisés à titre d'essai dans un mélange de 50 μL pour PCR, sans perte de performances de la réaction de PCR. Il est conseillé de conserver à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ l'ADN récupéré par élution. La répétition de cycles de congélation-décongélation est sans effet sur la plupart des applications aval.

Conservation des acides nucléiques

Recommandation : Conservation à court terme (jusqu'à 24 h) : 2 à $8\text{ }^{\circ}\text{C}$

Conservation à long terme (plus de 24 h) : $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

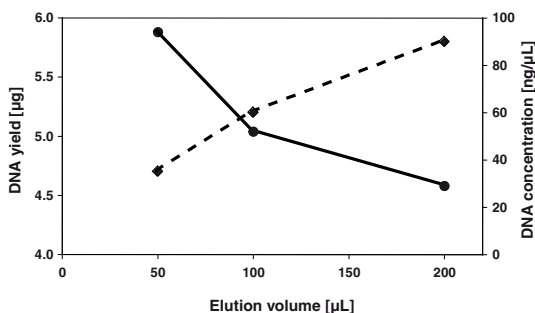


Figure 1 Effet du volume d'élution sur le rendement total d'ADN (pointillés) et la concentration (trait plein). L'élution a été effectuée avec 50, 100 et 200 μL .

3 Conditions de conservation et préparation des solutions de travail

Attention :

- Vérifiez l'état des différents composants du kit à la réception. Si les flacons de tampon ou les sachets blister sont endommagés, contactez l'assistance technique et le service client de MACHEREY-NAGEL, ou votre revendeur habituel.
- N'utilisez pas les composants du kit s'ils sont endommagés.
- À l'arrivée, le kit **NucleoSpin® Dx Blood** doit être conservé entre 18 et 25 °C. Il n'est PAS nécessaire d'ouvrir le kit dès réception et de retirer les différents composants pour les stocker séparément.
- Les colonnes **NucleoSpin® Dx Blood** peuvent être utilisées jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage du kit.

Avant de commencer le mode opératoire **NucleoSpin® Dx Blood**, préparez les éléments suivants :

- **Tampon de lavage B5** : Ajoutez le volume indiqué (dans le tableau ci-dessous ou sur le flacon) d'éthanol (96 à 100 %) au **tampon de lavage B5 concentré**. Indiquez sur l'étiquette du flacon que de l'éthanol a été ajouté. Conservez le tampon de lavage B5 entre 18 et 25 °C jusqu'à la date d'expiration.
- La **protéinase K** lyophilisée peut être conservée entre 18 et 25 °C jusqu'à la date d'expiration, sans perte de performances. Avant d'utiliser le kit pour la première fois, ajoutez le volume indiqué de **tampon protéinase PB** pour dissoudre la protéinase K lyophilisée. La protéinase K reconstituée doit être stockée à -20 °C et elle peut être conservée jusqu'à 6 mois, sans dépasser la date d'expiration.
- Pendant le stockage, en particulier à basse température, un précipité blanc peut se former dans les tampons B3 et BW. Ces précipités se dissolvent facilement par incubation du flacon à 70 °C pendant 5 minutes avant l'utilisation.

NucleoSpin® Dx Blood		
RÉF	50 préparations 740899.50	250 préparations 740899.250
Tampon de lavage B5 (concentré)	12 mL Ajouter 48 mL d'éthanol	50 mL Ajouter 200 mL d'éthanol
Protéinase K	30 mg Ajouter 1,35 mL de tampon protéinase	2 × 75 mg Ajouter 3,35 mL de tampon protéinase dans chaque flacon

4 Consignes de sécurité

Lors de l'utilisation du kit **NucleoSpin® Dx Blood**, portez des vêtements de protection appropriés (blouse de laboratoire, gants à usage unique et lunettes de sécurité, par exemple). Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) des produits utilisés qui sont disponibles en ligne (<http://www.mn-net.com/msds>).



Attention : le chlorhydrate de guanidine contenu dans le tampon B3 et le tampon BW peuvent former des composés fortement réactifs en présence d'eau de Javel. En conséquence, ne versez pas d'eau de Javel ou de solutions acides directement dans les déchets issus de la préparation des échantillons.

Les déchets produits lors de l'utilisation du kit **NucleoSpin® Dx Blood** n'ont pas été testés pour vérifier la présence de résidus de matières infectieuses. Une contamination des déchets liquides par des matières infectieuses est fortement improbable en raison de l'action puissante de dénaturation du tampon de lyse et du traitement par la protéinase K, mais on ne peut totalement l'exclure. Les déchets liquides doivent donc être considérés comme infectieux et ils doivent être manipulés et éliminés conformément aux règles de sécurité en vigueur localement.

4.1 Élimination

Éliminez les matériaux dangereux, infectieux ou contaminés par des agents biologiques d'une manière sûre et acceptable et conformément à toutes les exigences locales et réglementaires.

5 Purification d'ADN génomique avec le kit NucleoSpin® Dx Blood

La procédure suivante décrit les instructions pour un seul échantillon de sang. Il est cependant possible de traiter plusieurs échantillons simultanément ; le nombre dépend de la capacité de la microcentrifugeuse utilisée.








Avant de commencer la procédure :



- Vérifiez que le tampon B5 et la protéinase K ont été préparés conformément aux instructions de la section 3.
- Vérifiez que de l'éthanol de 96 à 100 %, dénaturé ou non dénaturé, est disponible pour ajuster les conditions de fixation de l'ADN.
- Réglez un incubateur (par exemple, le bloc chauffant) ou un bain-marie à 70 °C.
- Équilibrez les échantillons sanguins à la température ambiante. Assurez-vous de bien mélanger les échantillons.
- Si un précipité s'est formé dans le tampon de lyse B3 ou le tampon BW, incubez le tampon à 70 °C jusqu'à la dissolution du précipité.
- En règle générale, ne mélangez pas des réactifs et des colonnes de kits ou de lots différents.
- Équilibrez le tampon d'éluion BE à la température ambiante.
- N'ajoutez pas directement la solution de protéinase K au tampon de lyse B3. La protéinase K doit être mélangée à l'échantillon de sang avant l'ajout du tampon B3.
- Toutes les étapes de centrifugation doivent être effectuées à température ambiante.

5.1 Mode opératoire résumé

En complément du mode opératoire résumé :

lisez attentivement le mode opératoire détaillé (section 5.2) avant de commencer la procédure.

Lyse des échantillons de sang	1	25 µL de protéinase K	
	2	200 µL de sang	
	3	200 µL de B3, mélanger	
	4	Laisser reposer 5 min	
	5	70 °C, 10 min, mélanger	
	6	2000 x g, 1 s	
Ajustement des conditions de fixation de l'ADN	7	210 µL d'éthanol, mélanger	
	8	2000 x g, 1 s	
Fixation de l'ADN	9	Introduire le lysat	
	10	11 000 x g, 1 min	
	11	Transférer la colonne NucleoSpin® Dx Blood dans un nouveau tube de collecte	
Lavage de la membrane en silice	12	500 µL de tampon BW	
	13	11 000 x g, 1 min	
	14	Transférer la colonne NucleoSpin® Dx Blood dans un nouveau tube de collecte	
	15	600 µL de tampon B5	
	16	11 000 x g, 1 min	
	Séchage de la membrane en silice	17	Transférer la colonne NucleoSpin® Dx Blood dans un nouveau tube de collecte
18		11 000 x g, 1 min	

Élution de l'ADN	19	Transférer la colonne NucleoSpin® Dx Blood dans un tube d'élu­tion	
	20	50 à 200 µL de tampon BE	
	21	11 000 x g, 1 min	

5.2 Mode opératoire détaillé

- 1 Transférer à la pipette **25 µL de solution de protéinase K** dans un tube de lyse (1,5 mL, fourni).
- 2 Ajouter **200 µL d'échantillon de sang** au tube de lyse. Mélanger.
- 3 Ajouter **200 µL de tampon B3** au tube de lyse, fermer le couvercle et mélanger vigoureusement au vortex par impulsions successives pendant 10 s.
Ne pas mélanger à l'avance le tampon B3 et la protéine K !
- 4 Incuber à **température ambiante** pendant **5 min** (± 1 min).
- 5 Incuber le tube de lyse à **70 °C** (± 2 °C) pendant **10 min** (± 1 min). Après incubation, mélanger vigoureusement au **vortex** par impulsions successives pendant 5 s.
- 6 **Centrifuger brièvement** le tube de lyse (environ 1 s à 2000 x g) pour éliminer les gouttelettes du couvercle (cycle court uniquement).
- 7 Ajouter **210 µL d'éthanol** (96 à 100 %) à l'échantillon. Fermer le couvercle et mélanger au vortex par impulsions successives pendant 5 s.
Vérifier que l'éthanol et le lysat sont intimement mélangés.
- 8 **Centrifuger brièvement** le tube de lyse (environ 1 s à 2000 x g) pour éliminer les gouttelettes du couvercle (cycle court uniquement).
- 9 Introduire précautionneusement **la totalité du lysat** dans la colonne **NucleoSpin® Dx Blood** placée dans un tube de collecte et fermer le couvercle.
- 10 **Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g.**
Si le lysat n'est pas totalement aspiré à travers la membrane, répéter la centrifugation à une vitesse plus élevée : de 15 000 à 20 800 x g pendant 1 min. Si la totalité du lysat ne traverse toujours pas la membrane, éliminer l'échantillon et recommencer la procédure d'isolement avec un nouvel échantillon.
- 11 Placer la **colonne NucleoSpin® Dx Blood** dans un nouveau tube de collecte (2 mL, fourni) et éliminer le tube de collecte de l'étape précédente, avec le liquide qu'il contient.
- 12 Ouvrir la **colonne NucleoSpin® Dx Blood** et ajouter **500 µL de tampon BW** dans la colonne. Fermer le couvercle.
Note : vérifier que le lysat résiduel est éliminé par rinçage avec le tampon BW.

13 Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g.

14 Placer la **colonne NucleoSpin® Dx Blood** dans un nouveau tube de collecte (2 mL, fourni) et éliminer le tube de collecte de l'étape précédente, avec le liquide qu'il contient.

15 Ouvrir la **colonne NucleoSpin® Dx Blood** et ajouter **600 µL de tampon B5** dans la colonne. Fermer le couvercle.

Note : Vérifier que le tampon de lavage résiduel de l'étape précédente est éliminé par rinçage avec le tampon B5.

16 Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g.

17 Placer la **colonne NucleoSpin® Dx Blood** dans un nouveau tube de collecte (2 mL, fourni) et éliminer le tube de collecte de l'étape précédente, avec le liquide qu'il contient.

18 Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g.

L'éthanol résiduel est éliminé pendant cette étape.

19 Placer la **colonne NucleoSpin® Dx Blood** dans un tube d'élution propre (1,5 mL, fourni) et éliminer le tube de collecte de l'étape précédente.

20 Ouvrir la **colonne NucleoSpin® Dx Blood** et ajouter **50 à 200 µL de tampon BE** directement sur le centre de la membrane.

21 Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g pour récupérer l'ADN de la colonne par élution.

6 Annexe

6.1 Guide de résolution des problèmes

Problème	Cause possible et suggestions
	<p><i>La concentration en leucocytes de l'échantillon est faible.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> La quantité d'ADN récupérée dépend du nombre de leucocytes dans l'échantillon. Les échantillons contenant un nombre réduit de leucocytes produisent de faibles quantités d'ADN. <p><i>La lyse de l'échantillon est incomplète.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> L'échantillon n'est pas homogène ou il contient des caillots sanguins. Assurez-vous que les échantillons sont prélevés suivant les instructions du fabricant du tube de prélèvement. Veillez à n'utiliser que du sang qui peut être facilement transféré à la pipette. Homogénéisez si besoin l'échantillon sanguin avant utilisation. L'échantillon n'est pas mélangé de façon homogène avec la protéinase K et le tampon de lyse. Le mélange doit être mélangé vigoureusement au vortex immédiatement après l'ajout du tampon de lyse B3. La digestion par la protéinase K n'est pas optimale. N'ajoutez jamais directement la protéinase K au tampon de lyse B3. <p><i>Les réactifs ne sont pas utilisés correctement.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Préparez les tampons et la solution de protéinase K conformément aux instructions de la section 3. Ajoutez de l'éthanol au lysat avant d'introduire le lysat dans la colonne. <p><i>La centrifugation n'est pas correcte.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> N'augmentez pas la vitesse et la durée de centrifugation indiquées aux étapes 6 et 8. Utilisez un cycle court pour éliminer les gouttelettes du couvercle. <p><i>L'élution de l'ADN hors de la colonne n'est pas optimale.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> L'efficacité d'élution dépend du volume de tampon d'élution. Pour une efficacité d'élution maximale, utilisez 200 µL de tampon d'élution ; pour une concentration d'ADN maximale, utilisez 50 µL de tampon d'élution.
La quantité d'ADN récupérée est faible ou nulle.	
La colonne de fixation d'ADN est obstruée.	<p><i>L'échantillon de sang n'est pas homogène.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Les cryoprécipités formés pendant la décongélation des échantillons congelés peuvent obstruer la colonne NucleoSpin® Dx Blood. Si des précipités sont visibles, évitez de les aspirer lors de l'introduction du lysat dans la colonne de fixation. Des précipités peuvent également se former dans les échantillons de sang frais. Assurez-vous de bien mélanger les échantillons. Si la colonne se bouche pendant l'étape de fixation de l'ADN, répétez la centrifugation à une vitesse plus élevée : de 15 000 à 20 800 x g pendant 1 minute.

Problème **Cause possible et suggestions**

L'ADN est de mauvaise qualité.	<p><i>Les réactifs ne sont pas utilisés correctement.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Préparez les tampons et la solution de protéinase K conformément aux instructions de la section 3. Ajoutez de l'éthanol au lysat et mélangez avant de l'introduire dans la colonne. <p><i>La lyse de l'échantillon est incomplète.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• L'échantillon n'est pas mélangé de façon homogène avec la solution de protéinase K et le tampon de lyse. Le mélange doit être mélangé vigoureusement au vortex immédiatement après l'ajout du tampon de lyse.• La digestion par la protéinase K n'est pas optimale. N'ajoutez pas directement la protéinase K au tampon de lyse B3. <p><i>L'échantillon sanguin utilisé est ancien ou il contient des caillots.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Veillez à n'utiliser que du sang qui peut être facilement transféré à la pipette. Homogénéisez si besoin l'échantillon sanguin avant utilisation.
L'ADN génomique ne donne pas les résultats escomptés lors des réactions enzymatiques.	<p><i>Contamination par l'éthanol.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Assurez-vous d'avoir éliminé la totalité de tampon éthanolique B5 avant l'éluat de l'ADN. Si le niveau de remplissage du tampon de lavage B5 extrait de la colonne après le second lavage atteint la sortie de la colonne, éliminez le tampon de lavage, remettez la colonne dans le tube de collecte et centrifugez-la de nouveau.• Les éluats d'ADN peuvent contenir des traces d'éthanol. Toutefois, aucune baisse des performances de PCR n'a été observée avec un éluat d'ADN représentant jusqu'à 20 % du volume final de PCR comme quantité d'essai (par exemple : utilisation de 4 µL d'un éluat de 100 µL comme quantité d'essai dans une PCR de 20 µL). Le pourcentage maximal de volume de modèle dans une amplification PCR peut varier en fonction de la robustesse du système de PCR et il doit être déterminé par l'utilisateur. <p><i>L'ADN est contaminé par des substances inhibitrices.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Si vous devez isoler l'ADN à partir d'échantillons sanguins anciens ou contenant des caillots, veillez à n'utiliser que du sang qui peut être facilement transféré à la pipette. Homogénéisez si besoin l'échantillon sanguin avant utilisation.

Veillez contacter :

MACHEREY-NAGEL Allemagne
Tél. : +49 (0) 24 21 969 270
e-mail : TECH-BIO@mn-net.com

6.2 Exigence de notification

Veillez noter que le fabricant et l'autorité compétente de l'État membre européen dans lequel un incident sérieux en rapport avec le produit est survenu doivent en être avisés immédiatement. Agences en charge de la matériovigilance en Europe : https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_en

6.3 Bibliographie générale

Thiemann F. *et al.* (2006) Leitfaden Molekulare Diagnostik -Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks, WILEY-VCH, ISBN 3-527-31471-7.

Orzińska A. *et al.* (2015) 14 Years of Polish Experience in Non-Invasive Prenatal Blood Group Diagnosis. *Transfus Med Hemother*, 42, 361 – 364.

Papadopoulou A. *et al.* (2014) Calcium sensing receptor in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 35, 632e638.











Bleda S. *et al.* (2012) Vascular endothelial growth factor polymorphisms are involved in the late vascular complications in Type II diabetic patients. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 9(1), 68 – 74.

6.4 Références

Produit	RÉF	Quantité
NucleoSpin® Dx Blood	740899.50/.250	50/250
NucleoSpin® Dx Virus	740895.50	50
NucleoMag® Dx Pathogen	744215.4	384

Pour des informations plus détaillées sur les produits, rendez-vous sur www.mn-net.com.

6.5 Explication des pictogrammes

 REF	Référence		Limites de température autorisées pour le stockage
 LOT	Identification du lot		Utiliser avant
	Fabricant		Attention : pour plus d'informations, se reporter au mode d'emploi.
 IVD	Produits de diagnostic <i>in vitro</i>		Ne pas réutiliser
	Consulter le mode d'emploi		
	Quantité suffisante pour < n > tests		

6.6 Limites d'utilisation du produit et garantie

Le kit **NucleoSpin® Dx Blood** est un système générique pour l'extraction et la purification d'ADN génomique à partir d'échantillons de sang total humain, à des fins de diagnostic *in vitro*.

Le kit est conçu pour être utilisé avec toute application d'amplification enzymatique et de détection d'ADN, par exemple l'amplification PCR. Les éventuels résultats diagnostiques obtenus à partir des acides nucléiques isolés à l'aide du kit **NucleoSpin® Dx Blood** en association avec une autre technique de dosage *in vitro* doivent être interprétés en tenant compte des autres résultats cliniques ou de laboratoire. Le kit **NucleoSpin® Dx Blood** ne produit pas de résultats diagnostiques. Il incombe à l'utilisateur d'utiliser et de valider le kit utilisé en association avec un test de diagnostic *in vitro* en aval. SEULS les produits MACHEREY-NAGEL spécifiquement marqués IVD peuvent être employés pour un usage de diagnostic *in vitro*.

Pour plus d'informations sur la sécurité, consultez la section adéquate du présent mode d'emploi. Le kit **NucleoSpin® Dx Blood** doit être utilisé exclusivement dans un environnement de test approprié, par exemple un laboratoire prévu à cet effet.

L'utilisateur est responsable de tous les dommages résultant de l'emploi du kit **NucleoSpin® Dx Blood** à des fins différentes de l'usage prévu décrit dans le présent mode d'emploi.

Ce produit MACHEREY-NAGEL est livré avec une documentation précisant les spécifications et d'autres informations techniques. MACHEREY-NAGEL garantit la conformité du produit aux spécifications déclarées. La seule obligation de MACHEREY-NAGEL et le seul recours du client se limitent au remplacement gratuit des produits qui n'offriraient pas les performances garanties. Il est également fait référence aux conditions générales de MACHEREY-NAGEL, qui sont imprimées sur la liste tarifaire, et dont un exemplaire sera remis sur simple demande.

MACHEREY-NAGEL ne saurait être tenue pour responsable des dommages ou des défauts se produisant pendant le transport et la manipulation (hors assurance expédition au bénéfice du client), ou par suite d'un accident ou d'une utilisation impropre ou anormale du présent produit, ni des défauts des produits ou des composants non fabriqués par MACHEREY-NAGEL, ni des dommages résultant de tels produits et composants de fabricants autres que MACHEREY-NAGEL.

MACHEREY-NAGEL n'accorde aucune autre garantie d'aucune sorte, et DÉCLINE ET EXCLUT SPÉCIFIQUEMENT TOUTE AUTRE GARANTIE DE TOUTE SORTE OU NATURE QUE CE SOIT, DIRECTEMENT OU INDIRECTEMENT, EXPLICITE OU IMPLICITE, Y COMPRIS, SANS S'Y LIMITER, RELATIVE AU CARACTÈRE APPROPRIÉ, À LA REPRODUCTIBILITÉ, LA DURABILITÉ, L'ADAPTATION À UN BUT OU UN USAGE PARTICULIER, LA QUALITÉ MARCHANDE, L'ÉTAT OU TOUT AUTRE SUJET EN CE QUI CONCERNE LES PRODUITS MACHEREY-NAGEL.

MACHEREY-NAGEL ne saurait en aucun cas être tenue pour responsable en cas de réclamations pour tout autre dommage, qu'il soit direct, indirect, fortuit, compensatoire, prévisible, consécutif ou particulier (y compris, mais sans s'y limiter, la perte d'utilisation, de revenus ou de profits), que ce soit sur la base d'une garantie, d'un contrat, d'un délit civil (y compris la négligence) ou d'une responsabilité stricte découlant de la vente ou de la non-conformité d'un produit MACHEREY-NAGEL aux spécifications énoncées. La garantie est exclusive et MACHEREY-NAGEL n'accorde aucune autre garantie explicite ou implicite.

La garantie fournie dans le présent document et les données, spécifications et descriptions de ce produit MACHEREY-NAGEL figurant dans les catalogues publiés et la documentation sur le produit de MACHEREY-NAGEL constituent les seuls engagements de MACHEREY-NAGEL concernant le produit et la garantie. Aucun autre engagement ou déclaration, écrit ou oral, par des employés, agents ou représentants de MACHEREY-NAGEL, à l'exception des déclarations

écrites signées par un agent dûment agréé par MACHEREY-NAGEL, n'est autorisé ; le client ne doit pas se fier à de tels engagements ou déclarations, qui ne font pas partie du contrat de vente ou de la présente garantie.

Les allégations relatives au produit sont susceptibles d'être modifiées. Nous vous invitons par conséquent à contacter notre service d'assistance technique pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits MACHEREY-NAGEL. Vous pouvez également contacter votre revendeur habituel, pour obtenir des informations scientifiques à caractère général. Les applications mentionnées dans la documentation fournie par MACHEREY-NAGEL le sont uniquement à titre informatif. MACHEREY-NAGEL ne garantit pas que toutes les applications ont été testées dans les laboratoires de MACHEREY-NAGEL, avec des produits MACHEREY-NAGEL. MACHEREY-NAGEL ne garantit en aucun cas l'exactitude de ces applications.

Dernière mise à jour : Avril 2022 / Rév. 05

Motif de la révision :

Ajout de données analytiques et cliniques sur le rendement au paragraphe 2.5. Référence aux nouvelles langues du manuel d'utilisation (paragraphe 1.3).

Marques :

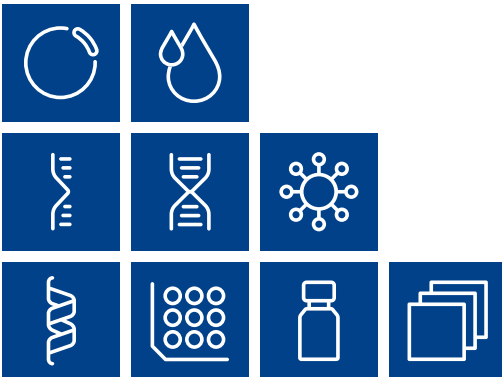
BD VACUETTE est une marque de BD.

NucleoSpin® est une marque de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG.

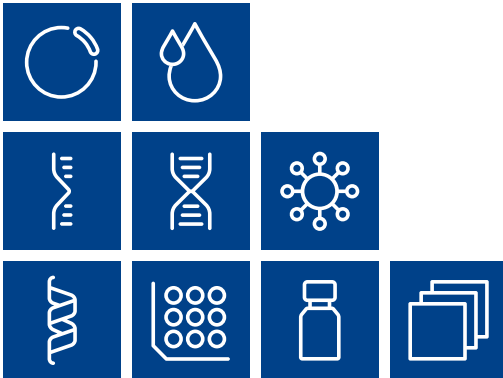
S-Monovette est une marque déposée de Sarstedt.

Vacurette est une marque de GREINER BIO-ONE.

Tous les noms et toutes les appellations employés peuvent être des marques, des noms commerciaux ou des marques déposées appartenant à leurs propriétaires respectifs – y compris en l'absence d'une dénotation particulière. Les produits et les marques cités le sont uniquement à titre informatif (c'est-à-dire sans volonté de nuire à la marque ou à la marque déposée, ni intention de la recommander ou de l'évaluer). Nous n'accordons aucune garantie de sélection, d'efficacité ou de fonctionnement de ces produits ou services.



Plasmid DNA
Clean up
RNA
DNA
Viral RNA and DNA
Protein
High throughput
Accessories
Auxiliary tools



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennener Str. 11
52355 Düren · Germany

DE	Tel.: +49 24 21 969-0	info@mn-net.com
CH	Tel.: +41 62 388 55 00	sales-ch@mn-net.com
FR	Tel.: +33 388 68 22 68	sales-fr@mn-net.com
US	Tel.: +1 888 321 62 24	sales-us@mn-net.com