



Plasma-SeqSensei™

Guide de préparation d'échantillon

Lignes directrices du manuel

Avril 2022

Glossaire des symboles







	Fabricant		Attention
	Consulter le mode d'emploi		Conserver au sec
	Limite de température		Limite d'humidité

Table des matières

1	Introduction	3
1.1	USAGE PREVU	3
1.2	PROTOCOLE	4
2	Réactifs, consommables et équipement	5
2.1	MATERIEL NON FOURNI	5
2.2	CONSOMMABLES	6
2.3	ÉQUIPEMENT	6
3	Stockage et manipulation	8
3.1	CONDITIONS D'EXPEDITION	8
3.2	PRECAUTIONS GENERALES DE MANIPULATION	8
3.3	AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS	8
3.3.1	MESURES SPECIFIQUES	9
3.3.2	MANIPULATION ET STOCKAGE	9
3.3.3	PRECAUTIONS POUR LA MANIPULATION DE REACTIFS	10
3.3.4	PRECAUTIONS DE SECURITE ET PREVENTION DES CONTAMINATIONS	10
4	Procédure	13
4.1	PRELEVEMENT SANGUIN ET TRAITEMENT DU SANG	13
4.1.1	INSTRUCTIONS DE PREPARATION DU PLASMA (SANG TOTAL)	13
4.2	PURIFICATION DE L'ADN CIRCULANT EXTRAIT DU PLASMA	15
4.3	QUANTIFICATION DE L'ECHANTILLON (QUBIT™)	22
5	Assistance technique	24
6	Glossaire et terminologie	25
7	Références	26
8	Copyrights et marques déposées	27

1 Introduction

Les cellules tumorales victimes d'une apoptose, d'une nécrose ou d'une sécrétion métabolique libèrent de petites quantités de leur ADN dans le flux sanguin. La fraction d'ADN libre circulant (cfDNA) spécifique à la tumeur s'appelle l'ADN tumoral circulant (ctDNA) et contient les informations génétiques de la tumeur primitive et même des métastases. Une multitude d'études de recherche et d'essais ont démontré l'application clinique du profilage de ctDNA à différents stades du traitement du cancer, notamment pour le choix de la thérapie, le pronostic et le suivi (1).

Diverses technologies basées sur le NGS sont disponibles pour la détection de ctDNA. Toutefois, en raison des biais et erreurs de PCR, la plupart d'entre elles sont inappropriées pour la détection des variants rares. Plasma-SeqSensei™ est une nouvelle technologie basée sur le NGS qui met en place des identifiants moléculaires uniques (IDU) dans le protocole de séquençage. Il en résulte une réduction considérable des erreurs, entraînant une sensibilité très élevée de la technologie PSS (2).

Pour obtenir une sensibilité élevée et les meilleurs résultats, la préparation du cfDNA à partir des échantillons sanguins doit être effectuée conformément à la procédure éprouvée décrite au ► chapitre 4 *Procédure*, page 13/30.

1.1 Usage prévu

L'objectif de ce guide de préparation d'échantillon est d'aider les utilisateurs des PSS *Assay-Specific Kits* lors de la préparation du cfDNA à partir d'échantillons sanguins. Ce guide décrit les procédures de purification du plasma, de purification du cfDNA, ainsi que de la quantification du cfDNA grâce à Qubit™. Le protocole démarre avec les prélèvements sanguins collectés dans les Streck Blood Collection Tubes® pour une utilisation dans les applications de biopsies liquides telles que les Plasma-SeqSensei™ *Assay-Specific Kits* et les technologies de séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing, NGS).

1.2 Protocole

Le protocole Plasma-SeqSensei™ est divisé en plusieurs étapes qui doivent être respectées ; la Figure 1 décrit cette procédure et les étapes pour la préparation de l'échantillon, et fournit un guide pour le mode d'emploi spécifique à suivre, du prélèvement sanguin aux résultats du séquençage.

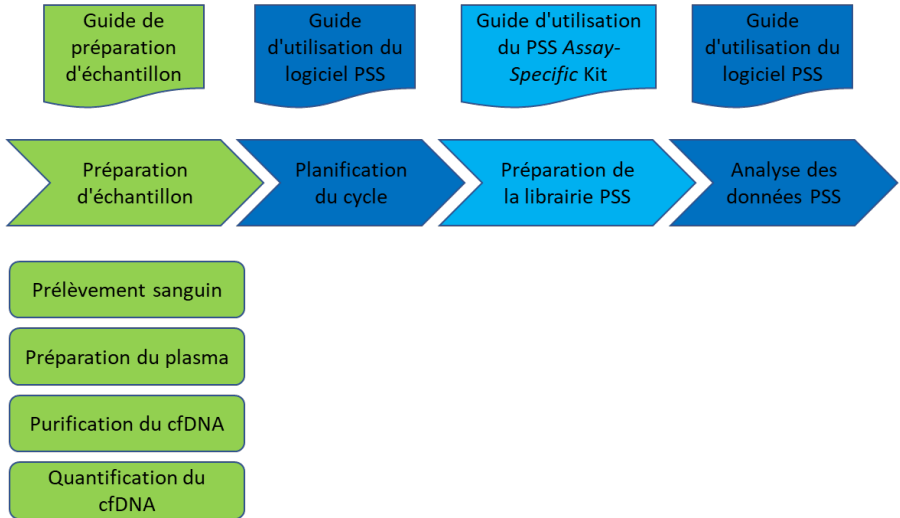


Figure 1 : Procédure Plasma-SeqSensei™, y compris les étapes du protocole décrites dans le guide de préparation d'échantillon et les autres documents exigés.

2 Réactifs, consommables et équipement

Le protocole décrit dans ce guide nécessite uniquement du matériel non fourni pour préparer des échantillons sanguins pour l'utilisation des Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kits. Pour une description et un mode d'emploi des composants du Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kit, veuillez consulter le mode d'emploi du Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kit (www.sysmex-inostics.com).

2.1 Matériel non fourni

Les produits pour lesquels les détails concernant le fabricant/fournisseur et le numéro de commande sont indiqués dans le Tableau 1, Tableau 2 et Tableau 3 sont essentiels au test et ne doivent pas être interchangeables avec des produits ayant une qualité et/ou des propriétés comparables.

Tableau 1 : Matériel essentiel non fourni pour la préparation d'échantillon Plasma-SeqSensei™

Matériel	Produits
Réactifs et kits	* QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, n° 55114
	Éthanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	2-propanol ≥ 99,8 %, p.a.
	Solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate Buffered Saline, PBS) 1X, (pH 7,4 ± 0,2, sans Ca ²⁺ ni Mg ²⁺)
	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, n° Q33230 (100 réactions) ou n° Q33231 (500 réactions)
	* Tubes de test Qubit™, Thermo Fisher, n° Q32856

* Composants essentiels ; ne pas les interchanger avec des produits ayant une qualité et/ou des propriétés comparables.

2.2 Consommables

Tableau 2 : Consommables nécessaires à la préparation d'échantillon Plasma-SeqSensei™

Équipement de laboratoire	Produit
Dispositif de prélèvement sanguin	* Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes®, volume 10,0 mL, Streck n° 218996 pour un pack de 6 tubes, Streck n° 218997 pour une boîte de 100 tubes
Embouts de pipette/Pipettes sérologiques	Embouts de pipette stériles, résistants aux aérosols, munis de filtres de 10, 200, 1 000 µl
	Pipette sérologique, 5, 10, 25 mL, stérile
Tubes de réaction	Tubes de 50, 15, 2, 1,5 mL
	* Tubes d'ADN LoBind® de 1,5 mL, Eppendorf, n° 0030108051
	Flacon cryogénique de 5 mL
Équipement de protection	Lunettes de protection
	Blouses de protection, protège-bras, surchaussures jetables, gants
Divers	* Tubes d'extension de 3 mL pour distributeurs à vide QIAvac, Qiagen, n° 19587
	* VacConnectors (500) pour distributeurs à vide QIAvac, Qiagen, n° 19407

* Composants essentiels ; ne pas les interchanger avec des produits ayant une qualité et/ou des propriétés comparables.

2.3 Équipement

Tableau 3 : Équipement nécessaire à la préparation d'échantillon Plasma-SeqSensei™

Équipement de laboratoire	Produit
Instruments électroniques	Centrifugeuse pour tubes de 1,5/2 mL, capacité de 20 000 × g, rotor à angle fixe
	Centrifugeuse pour tubes de 15/50 mL, capacité de 7 197 × g, rotor à angle fixe
	Centrifugeuse pour préparation du plasma, capacité de 6 000 × g, rotor libre, avec décélération/accélération faible, avec adaptateurs pour les tubes de 15 mL.
	Adaptateurs pour rotors à angle fixe pour les flacons cryogéniques de 5 ml

2 Réactifs, consommables et équipement

Équipement de laboratoire	Produit
	Mini-centrifugeuse, capacité $\leq 2\ 000 \times g$
	Vortexer avec logements pour tubes et plaques à 96 puits
	Thermomètre
	Bloc chauffant avec logements pour tubes de 2 mL
	Congélateur, $-15\ ^\circ\text{C}$ à $-30\ ^\circ\text{C}$
	Réfrigérateur, $2\ ^\circ\text{C}$ à $8\ ^\circ\text{C}$
	Congélateur, $-70\ ^\circ\text{C}$ à $-100\ ^\circ\text{C}$
	Station de traitement de l'ADN / Cabine PCR
	Hotte (fortement recommandée)
	Enceintes de sécurité biologique de classe II (fortement recommandées)
	* Qiagen Connecting System
	* QIAvac 24 Plus System
	Pompe à vide (230 V, 50 Hz)
	* Fluorimètre Qubit™ 3 ou 4
Pipettes	Pipette de 1 000 μL , 200 μL , 10 μL
	Pipette de 5 à 100 mL
Portoirs	Portoir pour tubes de 50 ml, 15 mL, 1,5/2 mL
	Récipients de congélation
Divers	Seau à glace
	Chronomètre

* Composants essentiels ; ne pas les interchanger avec des produits ayant une qualité et/ou des propriétés comparables.

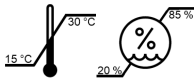
3 Stockage et manipulation

3.1 Conditions d'expédition

La préparation de l'échantillon sanguin pour l'utilisation des Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kits nécessite des produits tiers qui ne sont pas fournis. Pour des conditions d'expédition optimales, suivez les instructions du fabricant pour le matériel non fourni.

Important : Contrairement aux instructions du fabricant, les échantillons prélevés dans les tubes Streck Cell-Free DNA BCT® ne doivent pas être conservés plus de 6 jours.

3.2 Précautions générales de manipulation



Vérifiez que la température et l'humidité à l'intérieur du laboratoire restent comprises entre 15 °C et 30 °C et entre 20 % et 85 % respectivement (pour réduire le risque de condensation/d'évaporation).

Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de laboratoire. Entretenez l'équipement conformément aux instructions du fabricant.

Décontaminez et mettez au rebut l'ensemble des réactifs, échantillons et consommables associés dans le respect des réglementations gouvernementales locales. Il est indispensable d'éviter toute contamination par de l'ADN étranger, provenant notamment de produits de PCR restés sur des échantillons précédemment utilisés, afin que les résultats soient précis et reproductibles. Les produits amplifiés issus des précédentes expériences constituent la source la plus courante de contamination d'ADN.

3.3 Avertissements et précautions



Évitez tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. Pour plus d'avertissements, de précautions et de mesures spécifiques, consultez la fiche de données de sécurité (Safety Data Sheets, SDS) du fabricant.

3.3.1 Mesures spécifiques

Mesures de premiers secours :

- **Conseil général** : En cas d'effets persistants, consultez un médecin. Retirez immédiatement les chaussures et vêtements contaminés, puis lavez-les soigneusement avant de les réutiliser.
- **En cas d'inhalation** : Faites sortir la personne affectée de la pièce concernée. Veillez à aérer la pièce avec de l'air frais.
- **En cas de contact avec la peau** : Lavez la zone affectée avec du savon et beaucoup d'eau.
- **En cas de contact avec les yeux** : Retirez les lentilles de contact. Rincez l'œil abondamment à l'eau courante en gardant la paupière grande ouverte pendant au moins 10 à 15 minutes. Protégez l'œil non affecté.
- **En cas d'ingestion** : Appelez immédiatement un médecin. Ne provoquez pas de vomissement. Ne donnez jamais quelque chose à avaler à une personne inconsciente.

3.3.2 Manipulation et stockage

Mesures générales de protection et d'hygiène

Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans le laboratoire. Assurez-vous d'employer la bonne technique de lavage des mains avant de partir. N'inhalez pas de vapeurs. Évitez tout contact avec les yeux et la peau. Retirez immédiatement les vêtements salis ou imbibés.

Précautions de manipulation sûre

Les risques lors de la manipulation des produits doivent être minimisés en adoptant les mesures de protection et les actions de prévention appropriées. Le processus de travail doit être conçu pour écarter le plus possible tout risque de contact avec la peau ou de libération de substances dangereuses.

Conseils sur la protection contre l'incendie et l'explosion

Aucune mesure spéciale nécessaire.

Conditions de stockage sécurisé, incompatibilités incluses



Conservez le récipient fermé hermétiquement dans un endroit sec et bien aéré. Les récipients ouverts doivent être refermés soigneusement et conservés à la verticale pour éviter toute fuite.

3.3.3 Précautions pour la manipulation de réactifs



Pour garantir une utilisation et mise au rebut appropriées des réactifs et pour éviter de contaminer les réactifs, suivez les précautions répertoriées ci-dessous :

- N'utilisez pas de réactifs dont la date d'expiration est dépassée ou qui n'ont pas été correctement stockés.
- Préparez les réactifs selon les instructions fournies par le fabricant.
- Les réactifs ne doivent être utilisés qu'avec les réactifs fournis dans le même kit.
- Il ne faut pas mélanger ou interchanger des réactifs de kits ou lots différents.
- Notez la date d'ouverture et marquez les tubes après chaque utilisation pour vous assurer que les réactifs ne sont pas utilisés au-delà de la date d'expiration ou du nombre recommandé de cycles de congélation-décongélation.
- Changez fréquemment de gants pour éviter toute contamination des réactifs. Changez systématiquement de gants entre deux manipulations de réactifs et d'échantillons.
- Éliminez les réactifs non utilisés et les déchets selon les réglementations nationales, fédérales, régionales et locales en vigueur.

3.3.4 Précautions de sécurité et prévention des contaminations



Suivez les précautions répertoriées ci-dessous afin d'éviter toute contamination d'ADN dans l'environnement de laboratoire et d'assurer la sécurité de l'ensemble du personnel :

- Séparez les espaces de travail utilisés pour la pré-PCR et la post-PCR et respectez un protocole unidirectionnel en procédant des

3 Stockage et manipulation

zones « propres » (pré-amplification) vers les zones « sales » (post-amplification).

- Assurez-vous que l'équipement dédié (notamment les pipettes), les consommables, les réactifs, les récipients pour déchets dangereux et les manuels de laboratoires sont présents dans chaque zone de travail. N'échangez jamais ce matériel entre les zones pré-PCR et post-PCR. Nous recommandons d'utiliser un code couleur ou un étiquetage des équipements, consommables et réactifs afin d'identifier leur appartenance à une zone spécifique.
- Portez un équipement de protection individuelle approprié tout au long de la procédure.
 - Portez une blouse de laboratoire (jetable de préférence) et des gants jetables non poudrés à chaque fois que vous travaillez dans les zones pré-PCR et post-PCR.
 - Pour éviter toute contamination, changez fréquemment de gants entre les manipulations d'échantillons et de réactifs et après tout contact de l'extérieur des gants avec la peau.
 - Portez des protections oculaires lors de la préparation du plasma et de la purification de l'ADN.
 - Portez des surchaussures jetables ou changez de chaussures entre les laboratoires pré-PCR et post-PCR, et portez des manchons de protection jetables pour les bras (nécessaires dans le laboratoire pré-PCR).
- Lorsque vous sortez des zones de laboratoire pré-PCR et post-PCR, retirez et mettez au rebut l'équipement de protection individuelle.
- Manipulez tous les échantillons comme du matériel potentiellement infectieux. Si un produit se renverse, il est recommandé de commencer par nettoyer la zone affectée avec un détergent/désinfectant et de l'eau, puis avec env. 0,5 % d'hypochlorite de sodium (eau de javel) préparé en utilisant de l'eau désionisée.

Remarque : *L'eau de javel ménagère vendue dans le commerce (par ex. de la marque Clorox) contient habituellement de l'hypochlorite de sodium à une concentration de 5,25 %. Diluer l'eau de javel domestique à un rapport de 1 : 10 vous donnera une solution d'hypochlorite de sodium à une concentration de 0,5 %.*

- Utilisez des cabines PCR dédiées pour les étapes de pipetage.

- Après utilisation, nettoyez les cabines PCR avec du désinfectant à base de composés quaternaires d'ammonium (comme du RHEOSEPT-WD Plus ou un équivalent), suivi d'un produit conçu pour éliminer les nucléases et acides nucléiques (comme du produit Roti® sans acides nucléiques ou un équivalent).
- Après utilisation, nettoyez les espaces de travail pour la PCR avec un produit conçu pour éliminer les nucléases et acides nucléiques (comme du produit Roti® sans acides nucléiques ou un équivalent).
- Décontaminez l'enceinte de sécurité, les espaces de travail pour la PCR et les matériels de laboratoire (pipettes, portoirs de tubes ou autre équipement) avec de la lumière ultraviolette (UV) après utilisation. Pour garantir l'efficacité des rayons UV, nettoyez régulièrement les résidus qui s'accumulent sur les ampoules UV.
- Utilisez exclusivement des embouts de pipette stériles, résistants aux aérosols, munis de filtres (sans ARNase, ADNase et apyrogènes, de lots certifiés).
- Utilisez exclusivement des réactifs et tubes adaptés à la PCR.
- N'ouvrez qu'un tube d'échantillon ou tube de réactif à la fois.
- Pour éviter la contamination des solutions de réactif à usage multiple, préparez des aliquots de travail conformément aux instructions et réduisez le pipetage direct.

4 Procédure

4.1 Prélèvement sanguin et traitement du sang

Les Plasma-SeqSensei™ Assay-Specific Kits ont été conçus à l'aide des tubes de prélèvement sanguin Streck Cell-Free DNA BCT®. Prélevez et manipulez le sang conformément aux instructions du fabricant. Les tubes Streck Cell-Free DNA BCT® peuvent être utilisés pour des échantillons qui sont expédiés pour être testés ou pour être testés en laboratoire interne.

Expédiez l'échantillon à température ambiante dans les 24 heures suivant le prélèvement sanguin. Évitez les températures inférieures à 6 °C et supérieures à 37 °C pendant l'expédition.

4.1.1 Instructions de préparation du plasma (sang total)

Démarrez la préparation du plasma dans les 6 jours suivant la date du prélèvement sanguin. Les étapes de la préparation du plasma doivent s'enchaîner rapidement, sans pause entre elles.

Tableau 4 : Matériel nécessaire à la préparation du plasma à partir du sang

Matériel	Produit
Dispositif de prélèvement sanguin	* Streck Cell-Free DNA Blood Collection Tubes®, volume 10,0 mL, Streck n° 218996 pour un pack de 6 tubes, Streck n° 218997 pour une boîte de 100 tubes
Embouts de pipette	Embouts de pipette stériles, résistants aux aérosols, munis de filtres de 200, 1 000 µl
Tubes de réaction	Tubes de 15 mL
	Flacon cryogénique de 5 mL

1. Centrifugez le tube sanguin à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) pendant 10 minutes à 1 600 x g à l'aide d'un rotor horizontal.

Remarque : *Pour éviter une rupture de la couche cellulaire, utilisez une décélération faible de la centrifugeuse.*

2. Après la centrifugation, retirez délicatement les tubes de la centrifugeuse (éviter les turbulences).

3. Contrôlez visuellement la fraction de plasma (surnageant).

Remarque : *Une fine couche cellulaire peut être observée pour les échantillons conservés à une température inférieure ou égale à 6 °C pendant une période prolongée (> 12 heures). Une hémolyse (plasma rose pâle ou brun rouge) peut être observée pour les échantillons conservés à une température supérieure ou égale à 37 °C pendant une période prolongée (> 24 heures).*

4. Sans perturber la couche cellulaire, transférez le plasma (surnageant) dans un nouveau tube conique de 15 mL en le pipettant le long de la paroi du tube à l'aide d'une pipette monocanal ou d'une poire à pipette jetable. Laissez au moins 500 µL de plasma résiduel sur la couche cellulaire pour éviter de la rompre.

Remarque : *Si une fine couche cellulaire est présente, transférez uniquement la fraction plasmatique transparente et laissez au moins 500 µL de plasma résiduel sur la couche cellulaire. Si l'échantillon ne présente pas de fraction plasmatique transparente, transférez au moins 2,5 mL de plasma à partir du haut.*

Important : Nous ne recommandons pas d'analyser les échantillons hémolytiques en raison d'un risque accru de bruit de fond de l'ADN génomique élevé.

5. Centrifugez le plasma dans un tube à centrifuger de 15 mL à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) pendant 10 minutes à 6 000 x g à l'aide d'un rotor horizontal ou à angle fixe pour éliminer toute cellule sanguine résiduelle.

Remarque : *Utilisez une décélération faible de la centrifugeuse.*

6. Après la centrifugation, retirez délicatement les tubes de la centrifugeuse (éviter les turbulences).
7. Sans perturber l'agrégat cellulaire, transférez le plasma (surnageant) dans un nouveau tube à centrifuger de 15 mL en le pipettant le long de la paroi du tube à l'aide d'une pipette monocanal ou d'une poire à pipette jetable. Laissez un volume résiduel d'environ 300 µL (~7 mm) au fond du tube afin d'éviter que des cellules viennent contaminer le plasma.
8. Mélangez doucement le plasma en pipettant 5 fois de haut en bas à l'aide d'une pipette monocanal réglée sur un volume de 1 mL.

4 Procédure

9. Transférez le plasma dans des flacons cryogéniques pré-étiquetés.
10. Si vous ne procédez pas directement aux étapes de purification de l'ADN circulant extrait du plasma, placez aussitôt les flacons cryogéniques de plasma en position verticale dans un congélateur à une température comprise entre -70 °C et -100 °C afin de les y stocker (pour un maximum de 24 mois).

Remarque : *Les échantillons de plasma congelés doivent être expédiés dans de la glace carbonique.*

4.2 Purification de l'ADN circulant extrait du plasma

Pour le PSS *Assay-Specific* Kit, la purification de l'ADN libre circulant (cfDNA) à partir du plasma doit être effectuée à l'aide du QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit n° 55114 (QIAGEN). Tout volume de plasma compris entre 2 et 4 mL par échantillon doit être traité.

Important : Si vous ne suivez pas le protocole QIAGEN, n'ajoutez pas d'ARN porteur pendant le protocole de purification de l'ADN. L'élution de l'ADN suit une procédure en deux étapes.

Tableau 5 : Matériel nécessaire à la purification du cfDNA à partir du plasma

Matériel	Produits
Réactifs et kits	* QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, n° 55114
	Éthanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	2-propanol ≥ 99,8 %, p.a.
	Solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate Buffered Saline, PBS) 1X, (pH 7,4 ± 0,2, sans Ca ²⁺ ni Mg ²⁺)
Embouts de pipette / Pipettes sérologiques	Embouts de pipette stériles, résistants aux aérosols, munis de filtres de 20, 200, 1 000 µl
	Pipette sérologique, 5, 10, 25 mL, stérile
Tubes de réaction	Tubes de 50, 15, 2, 1,5 mL
	* Tubes d'ADN LoBind® de 1,5 mL, Eppendorf, n° 0030108051
Divers	* Tubes d'extension de 3 mL pour distributeurs à vide QIAvac, Qiagen, n° 19587

Matériel	Produits
Réactifs et kits	* QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN, n° 55114
	Éthanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	2-propanol ≥ 99,8 %, p.a.
	Solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate Buffered Saline, PBS) 1X, (pH 7,4 ± 0,2, sans Ca ²⁺ ni Mg ²⁺)
	* VacConnectors (500) pour distributeurs à vide QIAvac, Qiagen, n° 19407

Préparation :

- Activez l'enceinte de sécurité et assurez-vous qu'elle fonctionne correctement.
- Nettoyez l'enceinte de sécurité et l'équipement à l'aide d'un agent d'élimination de l'ADN (p. ex., DNA away), ainsi qu'un agent désinfectant (p. ex., EtOH à 70 %).
- Réglez le bain-marie sur 60 °C (± 1 °C) et vérifiez la température de l'eau avec un thermomètre externe.
- Réglez le bloc chauffant sur 56 °C (± 1 °C) et vérifiez la température du bloc avec un thermomètre externe.
- Contrôlez le niveau de liquide dans la bouteille de déchets liquides du système de vide. Le niveau de liquide ne doit pas dépasser la ligne.
- Contrôlez le réservoir à déchets dangereux. Le réservoir à déchets solides dangereux ne doit pas être rempli à plus de ¾ de sa capacité.
- Avant de démarrer le travail, activez la pompe de vide pour tester sa capacité de pression par le vide requise (entre -800 et -900 mbar).

Lorsque vous utilisez un nouveau kit, préparez les solutions de la manière décrite ci-dessous.

Buffer ACB

- Avant l'utilisation, ajoutez 200 mL d'isopropanol (2-propanol ≥ 99,8 %, p.a.) dans 300 mL de concentré de Buffer ACB pour obtenir 500 mL de Buffer ACB. Mélangez bien.

4 Procédure

Buffer ACW1

- Avant l'utilisation, ajoutez 25 mL d'EtOH ($\geq 99,8$ %, p.a.) dans 19 mL de concentré de Buffer ACW1 pour obtenir 44 mL de Buffer ACW1. Mélangez bien.

Buffer ACW2

- Avant l'utilisation, ajoutez 30 mL d'EtOH ($\geq 99,8$ %, p.a.) dans 13 mL de concentré de Buffer ACW2 pour obtenir 43 mL de Buffer ACW2. Mélangez bien.

Purification de l'ADN :

Les étapes suivantes sont effectuées dans la zone de préparation d'échantillon du laboratoire pré-PCR.

Remarque : Lors des étapes suivantes, ▲ indique des volumes d'échantillons de plasma de 2,0 à 3,0 mL et ● indique des volumes d'échantillons de plasma de 3,1 à 4,0 mL.

1. Laissez l'échantillon de plasma décongeler à température ambiante pendant environ 15 à 20 minutes. Ne mélangez pas au vortex.

Remarque : La durée varie selon le volume d'échantillon et la température ambiante. Une fois les échantillons décongelés, c.-à-d. que la glace n'est plus visible dans le tube, procédez immédiatement aux étapes suivantes.

2. Lorsque l'échantillon est décongelé, évaluez le plasma pour l'hémolyse.

Important : Nous ne recommandons pas d'analyser les échantillons hémolytiques en raison d'un risque accru de bruit de fond de l'ADN génomique élevé.

3. Préparez tous les réactifs. Remplissez un tube de prélèvement (du QIAamp® Kit) avec environ 1 mL de PBS pour chaque échantillon (pour ajuster le volume d'aliquotes plasmatiques).

Remarque : Pour chaque aliquote d'échantillon, préparez un tube séparé de PBS.

4. Étiquetez le tube à bouchon vissé et un tube de 50 mL par échantillon.

5. Par échantillon de test : pipettez ▲ 300 µL ou ● 400 µL de QIAGEN Proteinase K dans des tubes de 50 mL et positionnez-les dans l'enceinte de sécurité.
6. Centrifugez les flacons cryogéniques contenant le plasma (ramenés à une température comprise entre 15 °C et 25 °C) à 1 000 x g à l'aide d'un rotor à angle fixe. Arrêtez la centrifugation une fois la vitesse atteinte.

Remarque : *Assurez-vous que les étapes 187 à 10 suivantes sont exécutées dans une enceinte de sécurité dans la zone pré-PCR.*

7. Si les volumes de surnageant plasmatique centrifugés sont inférieurs à ▲ 3,0 mL ou inférieurs à ● 4,0 mL, transférez-le surnageant dans un nouveau tube et ajustez les volumes avec une solution PBS jusqu'à ▲ 3,0 mL ou ● 4,0 mL.
8. Ajoutez ▲ 3,0 mL ou ● 4,0 mL de surnageant plasmatique par échantillon aux tubes respectifs contenant la protéinase K.

Remarque : *Lors du pipetage, évitez de rompre l'agrégat et laissez environ 30 µL de plasma au fond du tube. Lors du mélange de plusieurs aliquotes, ouvrez les tubes issus d'un seul sujet à tester à la fois, c.-à-d., les tubes d'où le plasma est prélevé et le tube contenant la protéinase K à laquelle est ajouté le plasma.*

9. Ajoutez ▲ 2,4 mL ou ● 3,2 mL de Buffer ACL (sans ARN porteur) et fermez le bouchon.
10. Mélangez les tubes au vortex à intervalles pendant 30 secondes.

Remarque : *Le mélange aux vortex à intervalles signifie à l'aide d'un vortex avec intervalles courts.*

11. Incubez à 60 °C (± 1 °C) au bain-marie pendant 60 minutes (± 2 min).
12. Pendant ce temps, remplissez le seau à glace de glace ou sortez le portoir refroidissant du congélateur à une température comprise entre -15 °C et -30 °C, et étiquetez manuellement les tubes nécessaires :

- a. Une colonne QIAamp® Mini par échantillon.
- b. Tube de 1,5 mL par échantillon.

13. Ajoutez ▲ 5,4 mL ou ● 7,2 mL de Buffer ACB au lysat dans le tube.

4 Procédure

14. Fermez le tube et mélangez-le soigneusement au vortex à intervalles pendant 15 à 30 secondes.

Remarque : *Les étapes suivantes ne dépendent pas du volume d'échantillon initial. Aucune différenciation entre 2 et 3 mL et 3,1 et 4 mL n'est indiquée.*

15. Incubez les échantillons dans la glace ou dans le portoir refroidissant pendant 5 minutes (± 1 min).
16. Pendant ce temps, préparez le système de vide QIAvac 24 Plus :
 - Positionnez les VacConnectors dans les emplacements.
 - Positionnez les colonnes QIAamp® Mini étiquetées dans les VacConnectors.
 - Positionnez l'extenseur de colonne (adaptateur extensible) dans les colonnes QIAamp® Mini.

17. Après l'incubation dans la glace, centrifugez le tube d'échantillon à 7 000 x g pendant 30 secondes pour éliminer la condensation du bouchon.

18. Avec la vanne d'aspiration principale encore fermée, activez la pompe de vide (réglez sur -800 à -900 mbar).

19. Transférez soigneusement le lysat dans l'extenseur de colonne (pipette sérologique). Jetez les tubes.

Remarque : *Pour éviter la contamination croisée, veillez à ne pas déplacer la pipette au-dessus des extenseurs de colonne d'autres colonnes QIAamp Mini.*

20. Assurez-vous que la pression de vide est comprise entre -800 et -900 mbar.
21. Ouvrez la vanne d'aspiration principale et laissez le lysat traverser la colonne en entier.
22. Fermez la vanne d'aspiration principale (le vide reste activé) et **maintenez la pression de vide** dans le système QIAvac 24 Plus.
23. Pipettez 600 μ L de Buffer ACW1 dans l'extenseur de colonne.

Remarque : *Pour éviter la contamination croisée, utilisez un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon et veillez à ne pas*

déplacer les embouts de pipette au-dessus de l'extenseur de colonne pour les autres échantillons.

24. Ouvrez la vanne d'aspiration principale et laissez le tampon circuler dans la colonne en entier.
25. Fermez la vanne d'aspiration principale (avec le vide activé) et **libérez le vide** du système QIAvac 24 Plus. Retirez l'extenseur de colonne et jetez-le.

Remarque : *Pour éviter la contamination croisée, veillez à ne pas retirer les extenseurs de colonne au-dessus d'autres échantillons/colonnes.*

26. Appliquez 750 µL de Buffer ACW2 à la colonne QIAamp® Mini.

Remarque : *Pour éviter la contamination croisée, utilisez un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon et veillez à ne pas travailler au-dessus des colonnes QIAamp® Mini contenant d'autres échantillons.*

27. Ouvrez la vanne d'aspiration principale et laissez le tampon circuler dans la colonne en entier.
28. Fermez la vanne d'aspiration principale (avec le vide activé) et **libérez le vide** du système QIAvac 24 Plus.
29. Appliquez 750 µL d'EtOH (≥ 99,8 %, p.a.) à la colonne QIAamp® Mini.

Remarque : *Pour éviter la contamination croisée, utilisez un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon et veillez à ne pas travailler au-dessus des colonnes QIAamp® Mini contenant d'autres échantillons.*

30. Ouvrez la vanne d'aspiration principale et laissez l'EtOH traverser la colonne en entier.
31. Fermez la vanne d'aspiration principale et désactivez la pompe à vide.
32. Fermez la colonne QIAamp® Mini, retirez-la du système QIAvac 24 Plus et positionnez-la dans un tube de prélèvement de 2 mL. Jetez les VacConnectors.

4 Procédure

33. Centrifugez les échantillons dans la centrifugeuse Eppendorf 5430 ou un équivalent à vitesse maximale (20 000 x g) pendant 3 minutes ($\pm 0,5$ min).
34. Placez les colonnes QIAamp® Mini dans un nouveau tube de prélèvement de 2 mL. Jetez le tube de 2 mL utilisé.
35. Ouvrez les couvercles et faites incuber l'ensemble dans un bloc chauffant à 56 °C (± 1 °C) pendant 10 minutes (± 1 min) afin de sécher complètement la membrane.
36. Placez les colonnes QIAamp® Mini dans un tube d'éluion propre de 1,5 mL et jetez les tubes de prélèvement de 2 mL.
37. Appliquez soigneusement 70 μ L de Buffer AVE au centre de la membrane sans la toucher.

Remarque : *Utilisez un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon.*

38. Fermez le couvercle et incubez à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) pendant 3 minutes ($\pm 0,5$ min).
39. Centrifugez dans la centrifugeuse Eppendorf 5430 ou un équivalent à vitesse maximale (20 000 x g) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.
40. Sans toucher la membrane, réappliquez soigneusement 70 μ L de Buffer AVE au centre de la membrane.

Remarque : *Utilisez un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon.*

41. Fermez le couvercle et incubez à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) pendant 3 minutes ($\pm 0,5$ min).
42. Centrifugez dans la centrifugeuse Eppendorf 5430 ou un équivalent à vitesse maximale (20 000 x g) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.
43. Jetez la colonne QIAamp® Mini.
44. Conservez le cfDNA dans un laboratoire de pré-PCR à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant 24 heures maximum, ou entre -15 °C et -30 °C pour une durée de conservation plus longue. L'ADN purifié est stable pendant au moins 1 an.

4.3 Quantification de l'échantillon (Qubit™)

Le dosage Qubit™ Assay est utilisé pour quantifier le cfDNA extrait des échantillons de plasma. Les quantités d'ADN sont indiquées en ng/μL.

Remarque : La mesure Qubit des échantillons représente une estimation grossière de l'ADN entrant afin de déterminer la charge de l'échantillon. La quantification finale et probablement différente des échantillons se produira pendant le séquençage de la bibliothèque à l'aide d'un quantificateur interne (Quantispike).

Les PSS Assay-Specific Kits ont été créés à l'aide du dosage Qubit™ 1X dsDNA HS Assay (plage de dosage : 10 pg/μL à 100 ng/μL).

Tableau 6 : Matériel nécessaire à la quantification de l'échantillon avec Qubit™

Matériel	Produits
Réactifs et kits	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, n° Q33230 (100 réactions) ou n° Q33231 (500 réactions)
	* Tubes de test Qubit™, Thermo Fisher, n° Q32856
Embouts de pipette	Embouts de pipette stériles, résistants aux aérosols, munis de filtres de 2, 10, 20, 200 μl

Les étapes suivantes sont effectuées dans la zone de préparation d'échantillon du laboratoire pré-PCR.

Mesure Qubit™ :

Effectuez le protocole tel que décrit dans le manuel fourni par le fabricant avec 5 μL d'échantillon (consultez Tableau 7).

Tableau 7 : Détermination de la concentration d'ADN avec Qubit™

	Entrée d'ADN	Solution de travail Qubit™ 1X dsDNA HS (composant A)
Étalon	10 μL	190 μL
Échantillon	5 μL	195 μL

4 Procédure

Calculez l'entrée d'ADN total :

$$\text{Entrée d'ADN par échantillon} = \text{concentration mesurée en } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} * 116 \mu\text{L}$$

Entrée d'ADN total

$$= \sum \text{concentrations mesurées de tous les échantillons}$$

Remarque : Chaque **témoin positif contient 4,3 ng d'ADN**, qui doivent être pris en compte dans l'entrée d'ADN total pour chaque cycle de séquençage. L'ADN du témoin positif sera automatiquement inclus dans le calcul par le module « Run Planning » (Planification du cycle) du logiciel PSS Software.

Le cfDNA purifié peut être conservé dans un laboratoire de pré-PCR à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant 24 heures maximum, ou entre -15 °C et -30 °C pour une durée de conservation plus longue. L'ADN purifié est stable pendant au moins 1 an.

Étapes suivantes :

Consultez le guide d'utilisation du logiciel PSS pour la planification de cycles et le mode d'emploi du PSS Assay-Specific Kit pour la préparation de la bibliothèque de séquençage (voir Figure 1).

5 Assistance technique

Si des problèmes se produisent pendant la préparation de l'échantillon, veuillez consulter le guide de résolution des problèmes du fabricant s'il est mis à disposition, ou contactez le fabricant du produit pour demander de l'aide.

6 Glossaire et terminologie

Terme	Définition
BCT	Tubes de prélèvement sanguin
cfDNA	ADN libre circulant
ctDNA	ADN tumoral circulant
ADN	Acide désoxyribonucléique
EtOH	Éthanol
IFU	Mode d'emploi
NGS	Séquençage de nouvelle génération
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR	Polymérisation en chaîne
PSS	Plasma-SeqSensei™
ARN	Acide ribonucléique
SDS	Fiche de données de sécurité
IDU	Identifiant unique
UV	Ultraviolet

7 Références

- 1) Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, Zehir A, Weigelt B, Dawson SJ, Arcila ME, Berger MF, Tsui DW. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627. doi: 10.1002/path.5048. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29380875; PMCID: PMC6656375.
- 2) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.

8 Copyrights et marques déposées

La reproduction non autorisée du contenu du présent manuel, en totalité ou en partie, est interdite sans autorisation préalable écrite de Sysmex Corporation, Japon.

Plasma-SeqSensei™ est une marque déposée de Sysmex Corporation, Japon.

Toutes les autres marques, tous les noms et produits sont, même lorsqu'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, sont des marques de commerce ou des marques déposées de leurs propriétaires respectifs.





Sysmex Inostics GmbH
Falkenried 88
20251 Hamburg, Allemagne
www.sysmex-inostics.com

© 2022 Sysmex Inostics

Avril 2022

SPIFU.R1