

QX200™ Droplet Generator, IVD

Mode d'emploi

REF

12001049

Révision du manuel : B



Assistance technique Bio-Rad

Pour obtenir de l'aide et des conseils techniques, contactez le service d'assistance technique Bio-Rad. Aux États-Unis, le service d'assistance technique est ouvert du lundi au vendredi, de 5h00 à 17h00 (heure du Pacifique).

Téléphone : 1-800-424-6723

Fax : 1-510-741-5802

E-mail : LSG_TechServ_US@bio-rad.com (pour clients aux États-Unis et dans le reste du monde)

Assistance technique en ligne et coordonnées internationales disponibles sur www.consult.bio-rad.com.

Mentions légales

Toute reproduction ou transmission même partielles de cette publication sont interdites, sous quelque forme que ce soit et quel que soit le moyen, électronique ou mécanique, y compris par photocopie, enregistrement ou à l'aide de tout système de mémorisation ou de récupération d'informations, sans la permission écrite de Bio-Rad Laboratories.

Bio-Rad se réserve le droit de modifier ses produits et ses services à tout moment. Ce mode d'emploi est susceptible d'être modifié sans préavis. Bien que ces informations soient préparées en faisant appel à la plus grande précision, Bio-Rad ne saurait être tenu pour responsable d'erreurs ou de dégâts occasionnés par leur application ou leur utilisation.

FAM et VIC sont des marques commerciales de Life Technologies Corporation.

twin.tec est une marque commerciale d'Eppendorf, AG.

EvaGreen est une marque commerciale de Biotium, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. est sous licence de Biotium, Inc. pour la vente de réactifs contenant du colorant EvaGreen utilisé dans la PCR en temps réel, uniquement à des fins de recherche.

Les thermocycleurs et thermocycleurs en temps réel de Bio-Rad sont couverts par un ou plusieurs brevets américains parmi les suivants ou par leurs équivalents étrangers détenus par Eppendorf AG : numéros de brevets américains 6,767,512 et 7,074,367.

Ce produit ou son utilisation sont couverts par les revendications des brevets américains, ou les demandes de brevets américains ou étrangers en instance, détenus par Bio-rad ou sous licence de Bio-Rad Laboratories, Inc. L'achat de ce produit comprend un droit limité non transférable conformément à la présente propriété intellectuelle pour l'utilisation du produit à des fins de recherche interne uniquement. Aucun droit n'est accordé en cas d'usage diagnostique. Aucun droit n'est accordé en cas d'usage du produit pour des applications commerciales de quelque sorte, y compris mais sans s'y limiter pour la fabrication, le contrôle qualité ou les services commerciaux, comme les contrats de service ou les honoraires de service. Les informations concernant l'obtention d'une licence dans le cadre de ces utilisations sont disponibles auprès de Bio-Rad Laboratories. Il est de la responsabilité de l'acheteur ou de l'utilisateur final d'acquiescer les droits de propriété intellectuelle complémentaires pouvant lui être nécessaires.

Sécurité et conformité réglementaire

Cet appareil a été testé et déclaré conforme à toutes les exigences applicables des normes électromagnétiques et de sécurité suivantes :

- IEC 61010-1:2010 (3^e éd.), EN61010-1:2010 (3^e éd.). Règles de sécurité pour appareils électriques de mesurage, de régulation et de laboratoire - Partie 1 : exigences générales
- EN 61326-1:2006 (Catégorie A). Matériel électrique de mesure, de commande et de laboratoire — Exigences relatives à la CEM — Partie 1 : exigences générales
- UL 61010-1:2004, Laboratory equipment, Test & Measurement Equipment and Industrial Process Controls
- CAN/CSA 22.2 N° 61010-1-04. Règles de sécurité pour appareils électriques de mesurage, de régulation et de laboratoire - Partie 1 : prescriptions générales.

Cet appareil génère, utilise et peut émettre une énergie à radiofréquences et, s'il n'est pas installé et utilisé conformément à son mode d'emploi, peut provoquer des interférences néfastes avec les communications radio. Le fonctionnement de cet appareil dans une zone résidentielle est susceptible de provoquer des interférences néfastes, auquel cas l'utilisateur sera dans l'obligation de corriger ces interférences à ses propres frais.



Le marquage CE indique que le fabricant garantit la conformité de son produit avec les exigences essentielles de la directive européenne concernant les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro 98/79/CE.



Le marquage CSA indique que ce produit a été testé selon les normes canadiennes et américaines et qu'il répond aux exigences de ces normes applicables.

Cet appareil a été testé et déclaré conforme aux limites de la catégorie A pour les dispositifs numériques, selon la section 15 des règles de la FCC. Ces limites sont conçues pour assurer une protection raisonnable contre les interférences néfastes lorsque l'équipement fonctionne dans un environnement commercial.



Le symbole de la directive concernant les déchets des équipements électriques et électroniques indique que l'utilisateur final doit mettre ce produit au rebut dans des établissements de collecte spécifiques pour la récupération et le recyclage.

Cet appareil ne doit être utilisé que par des membres du personnel expérimentés.

Placez cet appareil de sorte que la prise d'alimentation soit facile à atteindre. Cette prise d'alimentation joue un rôle de sectionneur.

L'appareil ne renferme aucune pièce dont l'entretien revient à l'utilisateur.

Mises en garde concernant l'appareil

Toute altération de cet appareil a pour effet d'invalider la garantie et le certificat de sécurité et crée un risque potentiel de sécurité. Cet appareil est destiné à un usage en laboratoire uniquement. Bio-Rad Laboratories ne saurait être tenu pour responsable de blessures ou de dégâts occasionnés par l'utilisation de cet appareil à des fins autres que celles pour lesquelles il est prévu, ou par des modifications de l'appareil non réalisées par Bio-Rad Laboratories ou l'un de ses agents autorisés. Respectez les indications de sécurité mentionnées ici et tout au long de ce mode d'emploi. Utilisez uniquement le cordon d'alimentation fourni avec cet appareil, et uniquement l'adaptateur de prise correspondant à l'équipement électrique de votre région. L'utilisation de mélanges réactionnels non autorisés peut abîmer l'appareil et invalider la garantie.

Instructions concernant l'EPI (équipement de protection individuelle)

L'usage de gants corrects est recommandé lors de l'emploi d'huiles et de plaques d'échantillons. Les exigences de l'OSHA concernant les EPI sont explicitées dans le Code of Federal Regulations (CFR) sous les sections 29 CFR 1910.132 (Exigences générales) ; 29 CFR 1910.138 (Protection des mains) ; 29 CFR 1926.95 (Critères d'équipement de protection individuelle standard). Tout gant présentant une capacité protectrice altérée doit être mis de côté et remplacé. Tenez compte de la toxicité des produits chimiques et de différents facteurs comme la durée d'exposition, la durée de stockage et la température lorsque vous décidez de réutiliser des gants qui ont été exposés à des produits chimiques. Considérations relatives au choix des gants pour la manipulation des machines, dosages, huiles et solvants de nettoyage :

- Les gants en butyle, composés de caoutchouc synthétique, assurent une protection contre le peroxyde, l'acide hydrofluorique, les bases fortes, les aldéhydes et les cétones.
- Les gants en caoutchouc naturel (latex) sont confortables à porter et présentent une résistance à la traction, une élasticité et une résistance thermique exceptionnelles.
- Les gants en néoprène sont constitués de caoutchouc synthétique et offrent un bon niveau de souplesse et de dextérité, une densité élevée et une bonne résistance à la déchirure ; ils protègent contre les alcools, les acides organiques et les alcalis.
- Les gants en nitrile sont constitués de copolymères et assurent une protection contre les solvants chlorés comme le trichloréthylène et le tétrachloroéthène ; ils protègent contre les huiles, les graisses, les acides et les substances caustiques.

Transport de l'appareil

Évitez de faire tomber l'appareil ou de lui administrer des chocs pendant le transport.

Table des matières

Chapitre 1 QX200™ Droplet Generator, IVD	1
1.1 Introduction	1
1.2 QX200 Droplet Generator, IVD.....	2
1.3 Installation et fonctionnement général.....	4
Chapitre 2 Production de gouttelettes	5
2.1 Préparation des échantillons.....	5
2.2 Fonctionnement du QX200™ Droplet Generator	6
2.3 Préparation à la PCR.....	10
2.4 Étapes suivantes	12
Chapitre 3 Caractéristiques techniques et maintenance	13
3.1 Caractéristiques techniques	13
3.2 Maintenance.....	14
Annexe A Informations pour les commandes	17

QX200™ Droplet Generator, IVD

1.1 Introduction

Le système de PCR QX200™ Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) System, IVD réalise une PCR digitale précise et exacte. Il se compose de deux appareils, le QX200 Droplet Generator, IVD et le QX200 Droplet Reader, IVD, ainsi que leurs différents consommables. Le QX200 Droplet Generator, IVD divise les échantillons en près de 20 000 gouttelettes de l'ordre du nanolitre puis, après réalisation de la PCR sur un thermocycleur, les gouttelettes de chaque échantillon sont analysées individuellement sur le QX200 Droplet Reader, IVD.

Les gouttelettes positives et négatives après PCR sont comptabilisées pour donner une quantification absolue de l'ADN cible. Il est également possible d'extraire des produits amplifiés des gouttelettes après la PCR pour d'autres applications, comme le séquençage ou le clonage.

Avec le système QX200 ddPCR System, IVD, vous pouvez :

- Détecter de rares copies de l'ADN cible avec une sensibilité n'ayant pas son pareil
- Déterminer le nombre de copies avec une exactitude inégalée
- Mesurer les niveaux d'expression des gènes avec précision

Ses applications et ses usages sont les suivants :

- | | |
|--|--|
| ▪ Détermination du nombre de copies | ▪ Quantification absolue |
| ▪ Détection de séquences rares | ▪ Détection de mutants rares |
| ▪ Analyse de l'expression des gènes | ▪ Analyse de miARN |
| ▪ Quantification de banques par next-generation sequencing (NGS) | ▪ Préparation des échantillons pour le NGS |
| ▪ Détermination de la charge virale | ▪ Détection des OGM |
| ▪ Analyse d'expression de gènes sur cellule unique | |

Ce mode d'emploi explique l'utilisation du système QX200 Droplet Generator, IVD et la préparation à la PCR. Pour obtenir des informations sur le QX200 Droplet Reader, IVD, reportez-vous au bulletin 10031906.

Utilisation prévue et indications

Le QX200 Droplet Digital PCR System, IVD est un système de PCR en émulsion destiné à mesurer et trier de multiples signaux générés lors d'une analyse diagnostique in vitro à partir d'un échantillon clinique. Cette instrumentation s'utilise avec un dosage spécifique pour mesurer plusieurs analytes similaires, permettant ainsi d'établir un indicateur unique contribuant au diagnostic.

1.2 QX200 Droplet Generator, IVD

Le QX200 Droplet Generator, IVD utilise la microfluidique pour créer les gouttelettes nécessaires à l'analyse de ddPCR en réalisant une émulsion d'huile et d'eau (échantillon). Il produit des gouttelettes à partir d'un maximum de 8 échantillons à la fois en 2 minutes environ.

Après la préparation du mélange réactionnel à l'aide du mélange Supermix approprié à la ddPCR, 20 µl de chaque échantillon ou blanc préparé (8 au maximum) et l'huile de production de gouttelettes sont transférés dans la cartouche du générateur de gouttelettes (DG8™). La cartouche chargée est recouverte d'une couverture hermétique et placée dans le QX200 Droplet Generator, IVD. Les échantillons et l'huile sont alors combinés dans les microcanaux de la cartouche pour créer une émulsion d'environ 20 000 gouttelettes de l'ordre du nanolitre réparties une par une, pour chaque échantillon. Après leur production, les gouttelettes sont transférées dans une microplaque de PCR standard à 96 puits et amplifiées en point final à l'aide d'un thermocycleur standard.

Une fois le cycle terminé, la microplaque est chargée dans le QX200 Droplet Reader, IVD. Le lecteur de gouttelettes aspire chaque échantillon, isole les gouttelettes et les fait passer devant un détecteur à 2 couleurs. Le détecteur lit chaque gouttelette et détermine lesquelles contiennent la cible (+) et lesquelles ne la contiennent pas (-). Si la quantification des gouttelettes n'est pas requise, les produits de PCR peuvent être extraits des gouttelettes après thermocyclage pour d'autres applications, comme le séquençage ou le clonage.

Le QX200 Droplet Generator, IVD inclut les composants indiqués dans le tableau 1.1. Le matériel supplémentaire requis pour la production de gouttelettes et la PCR est indiqué dans le tableau 1.2. Pour connaître les conditions complètes de fonctionnement du système, reportez-vous au mode d'emploi du QX200 Droplet Reader, IVD (bulletin 10031906).

Tableau 1.1. Composants du QX200 Droplet Generator, IVD. La référence indique les articles de remplacement (les quantités peuvent varier).

Composant	Description	Référence
QX200 Droplet Generator, IVD	Appareil utilisé pour la production des gouttelettes	12001049
Cartouches et couvertures hermétiques DG8 de production de gouttelettes (24)	Cartouche de microfluidique utilisée pour l'émulsion de l'échantillon et de l'huile afin de produire les gouttelettes ; les couvertures hermétiques scellent la cartouche afin d'éviter l'évaporation et d'appliquer la pression requise pour la formation des gouttelettes	186-4007
Support de cartouche de production des gouttelettes	Positionne et maintient la cartouche de production des gouttelettes dans l'appareil pour la production des gouttelettes	186-3051
Cordon d'alimentation	Raccorde le QX200 Droplet Generator, IVD à la source d'alimentation	Voir avec l'assistance technique



QX200 Droplet Generator, IVD.

Tableau 1.2. Matériel supplémentaire requis pour la production de gouttelettes.

Composant	Produit recommandé	Référence
Réactifs pour détection de sonde		
Mélange réactionnel Supermix pour PCR	ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)	186-3023, 186-3024, 186-3025
	ddPCR Supermix for Probes	186-3010, 186-3026, 186-3027, 186-3028
	One-Step RT-ddPCR Supermix for Probes	186-3021, 186-3022
Huile de production de gouttelettes	Droplet Generation Oil for Probes	186-3005
Contrôle	ddPCR Buffer Control Kit for Probes	186-3052
Réactifs pour détection d'EvaGreen		
Mélange réactionnel Supermix pour PCR	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix	186-4033, 186-4034, 186-4035, 186-4036
Huile de production de gouttelettes	Droplet Generation Oil for EvaGreen	186-4005, 186-4006
Contrôle	QX200 Buffer Control Kit for EvaGreen	186-4052
Consommables et autre matériel		
Pipettes	Pipette de 20 µl pour chargement des échantillons	Rainin L-20
	Pipette de 50 µl pour le transfert des gouttelettes	Rainin L-50, L8-50
	Pipette 8 canaux, 200 µl pour huile	Rainin L8-200
Pointes de pipette	Filtrées	Rainin GP-L10F, GP-L200F
Microplaques de PCR à 96 puits	Microplaque twin.tec semi-jupée 96 puits	Eppendorf 951020362
Bac à réactif	Sans préférence	
Films d'étanchéité en aluminium	Pierceable foil plate seals	181-4040
Scelleuse de microplaques	PX1™ PCR Plate Sealer	181-4000
Barrettes de 8 capuchons	Sans préférence	

1.3 Installation et fonctionnement général

- Branchez le QX200 Droplet Generator, IVD à une source d'alimentation uniquement à l'aide du cordon d'alimentation et de l'adaptateur fournis. Assurez-vous que la terre est correctement raccordée avant de brancher l'appareil. Positionnez l'appareil de sorte qu'il puisse être facilement débranché de son alimentation le cas échéant pour son entretien.
- Prévoyez 10" (25,4 cm) d'espace à l'arrière et 5" (12,7 cm) d'espace à droite et à gauche pour une ventilation correcte.
- Branchez le générateur de gouttelettes pour le mettre sous tension. Le voyant d'état devient vert fixe pour indiquer que l'alimentation est active.
- Pour ouvrir et fermer l'appareil, appuyez sur le bouton en haut du couvercle vert.



Cordon d'alimentation standard pour États-Unis avec prise de terre (type 5-15P) et connecteur C5 (10 A/125 V)



Bloc d'alimentation pour prise d'entrée CC 5 mm

2

Production de gouttelettes

Le marquage IVD CE ne s'applique qu'au QX200 Droplet Reader, IVD, au QX200 Droplet Generator, IVD, et au QX200 Droplet Digital PCR System, IVD. Si vous utilisez des composants sans marquage IVD CE, y compris pour les réactifs ou accessoires, leur usage doit être uniquement à des fins de recherche.

2.1 Préparation des échantillons

Pour préparer le mélange réactionnel de PCR, combinez le Supermix 2x pour PCR, les amorces et la sonde 20x, et l'échantillon d'ADN. Mélangez au vortex par courtes impulsions, centrifugez brièvement.

- La concentration d'ADN génomique humain intact doit être <66 ng par 20 µl de mélange réactionnel. Si vous utilisez des concentrations plus élevées, fragmentez l'ADN à l'aide d'une endonucléase de restriction qui ne coupe pas les amplicons de référence ni les amplicons cibles.
- Servez-vous de l'un des mélanges réactionnels Supermix pour PCR recommandés dans le tableau 1.2, car ils contiennent des réactifs nécessaires pour la production des gouttelettes. Suivez les instructions des notices des produits pour préparer les échantillons à la production des gouttelettes.
- Vortexez les mélanges réactionnels Supermix soigneusement pour assurer leur homogénéité, car un gradient de densité peut se former pendant le stockage à -20 °C. Vous pouvez aussi pipeter et distribuer au moins 5 fois pour mélanger. Centrifugez brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube avant de le répartir.
- Faites décongeler les composants du mélange réactionnel et laissez-les atteindre la température ambiante. Si l'échantillon est sujet à une dégradation thermique, préparez le mélange réactionnel sur la glace, mais équilibrez-le tout de même à température ambiante (~3 min.) avant de le charger dans la cartouche DG8™ pour la formation des gouttelettes.
- Assemblez les mélanges réactionnels dans des tubes ou dans des microplaques de PCR à 96 puits. L'avantage de l'utilisation d'une microplaque est que les échantillons peuvent être chargés dans la cartouche DG8 avec une pipette à 8 canaux.
- Appliquez les précautions standard de laboratoire pour éviter la contamination du mélange réactionnel et de l'échantillon : portez des gants, travaillez en zone propre (par exemple sous hotte pour PCR) et utilisez des pipettes propres et des tubes à faible liaison de protéines.

2.2 Fonctionnement du QX200™ Droplet Generator

Le QX200 Droplet Generator, IVD peut préparer les gouttelettes pour un maximum de 8 échantillons à la fois. La production des gouttelettes dure ~2 minutes pour chaque série de 8 échantillons (~30 minutes pour une microplaque à 96 puits).

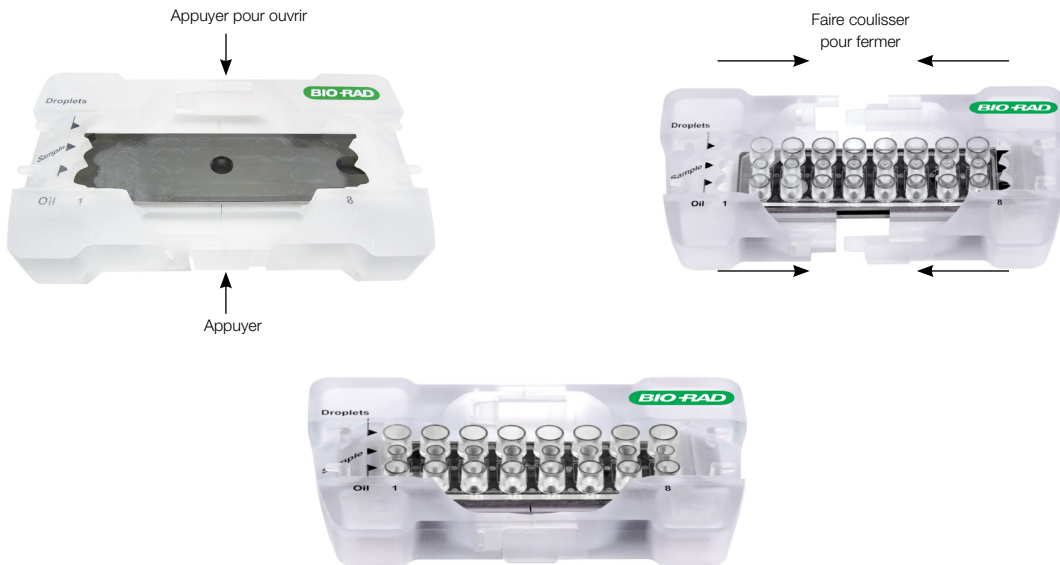


- Les 8 puits d'échantillons de la cartouche DG8 doivent contenir un échantillon (ou un tampon de contrôle) et les 8 puits d'huile doivent contenir l'huile de production des gouttelettes.
- Ne chargez pas l'échantillon ni l'huile dans la cartouche DG8 tant qu'elle n'est pas insérée dans son support.

- Insérez la cartouche DG8 dans son support, avec l'encoche placée en haut à gauche :
 - Ouvrez le support de la cartouche en appuyant sur les loquets au centre.
 - Faites glisser la cartouche DG8 dans la moitié droite du support, puis laissez-la tomber.
 - Rassemblez les deux moitiés du support et clipsez-les pour le fermer.



Cartouche DG8



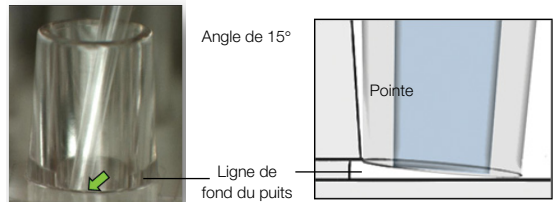
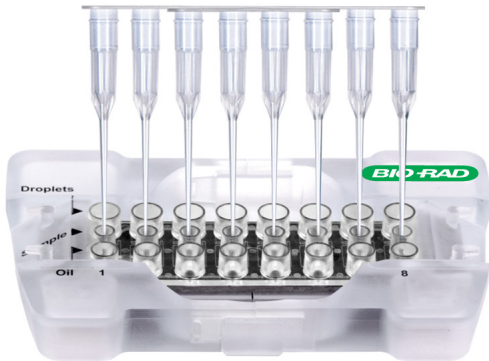
Insertion de la cartouche DG8 dans le support de cartouche.

2. Transférez 20 µl de chaque échantillon préparé dans les puits d'échantillons (rangée du milieu) de la cartouche DG8.



Des bulles d'air peuvent recouvrir le fond du puits et entraîner une perte de production de 2500 à 7000 gouttelettes, avec une mauvaise qualité des données. Ces bulles étant difficiles à observer, il convient d'éviter leur création à l'aide de la technique de pipetage suivante, qui assure en outre que les échantillons humectent le fond des puits et sont donc aspirés dans les microcanaux (impératif pour la production correcte des gouttelettes).

- Utilisez exclusivement des pointes de pipette 20 µl Rainin avec filtre barrière aux aérosols, et non des pointes de pipette de 200 µl (voir tableau 1.2).
- Faites glisser doucement la pointe de la pipette le long du bord du puits à un angle de 15° environ jusqu'à ce qu'elle passe en dessous de la ligne tracée près du fond. Tout en conservant l'angle, maintenez la pointe de la pipette contre le fond du puits pour distribuer lentement une petite partie de l'échantillon, sans le pipeter directement sur la paroi du puits.
- Après avoir libéré environ la moitié de l'échantillon, remontez lentement la pointe le long de la paroi tout en finissant de libérer le reste de l'échantillon. N'appuyez plus sur le piston de la pipette une fois que vous avez atteint la première butée.



Transfert de l'échantillon dans les puits d'échantillon (rangée du milieu) de la cartouche DG8. Maintenez la pointe de la pipette à un angle de 15° et au fond du puits (illustrations au milieu et à droite) ; ne délivrez pas l'échantillon sur la paroi ou le bord du puits.

3. Distribuez l'huile de production des gouttelettes (DG) dans le bac à réactif (voir tableau 2.1 pour les volumes requis ; voir tableau 1.2 pour la compatibilité entre le mélange réactionnel Supermix pour PCR et l'huile DG).



Bac à réactif et huile de production de gouttelettes.

Tableau 2.1. Quantité d'huile nécessaire pour la production de gouttelettes.

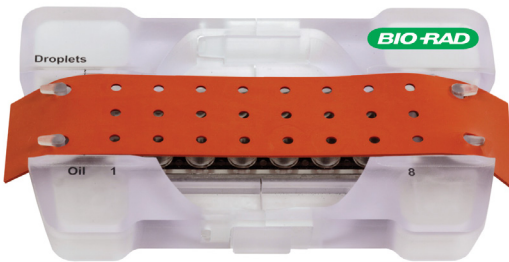
Nb puits	Volume d'huile
8	700 µl
24	1 820 µl
48	3 500 µl
96	6 860 µl

- À l'aide d'une pipette multicanaux, remplissez chaque puits d'huile (rangée inférieure) avec 70 µl d'huile de production des gouttelettes prélevée dans le bac à réactif.



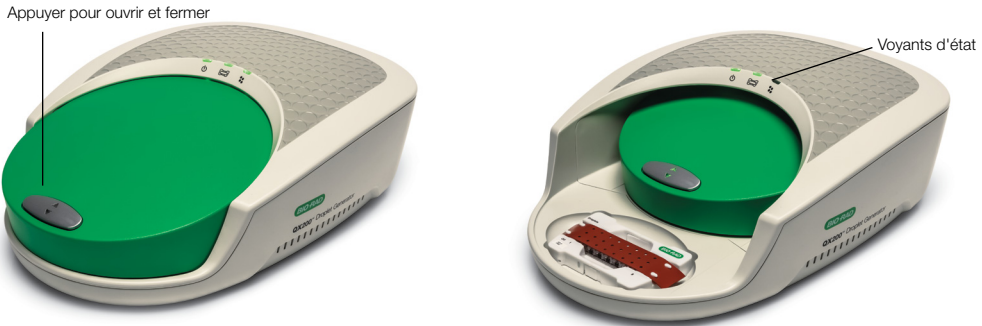
Remplissage des puits d'huile avec l'huile de production de gouttelettes.

- Crochetez la couverture hermétique sur le support de cartouche à l'aide des orifices placés de chaque côté. Elle doit être fermement crochétée à chaque extrémité du support, faute de quoi la pression obtenue ne sera pas suffisante pour produire les gouttelettes.



Mise en place correcte de la couverture hermétique sur le support de cartouche.

- Ouvrez le QX200 Droplet Generator, IVD en appuyant sur le bouton placé sur le couvercle vert et positionnez le support de cartouche dans l'appareil. Une fois le support correctement placé, les deux voyants, l'un pour l'alimentation (à gauche) et l'autre pour le support (au milieu), sont verts (voir tableau 2.2).
- Appuyez à nouveau sur le bouton du couvercle pour fermer le capot, ce qui a pour effet de démarrer la production des gouttelettes : un collecteur se positionne au-dessus des puits de sortie, aspirant l'huile et l'échantillon via des canaux microfluidiques, où sont créées les gouttelettes. Les gouttelettes s'écoulent dans les puits qui leur sont dédiés, où elles s'accumulent. Le voyant de gouttelettes (à droite) clignote en vert au bout de 10 secondes pour indiquer que la production des gouttelettes est en cours.






QX200 Droplet Generator, IVD avec cartouche DG8 installée.

8. Lorsqu'elle est terminée, les trois voyants restent allumés en vert. Appuyez alors sur le bouton pour ouvrir le capot et retirez le support (avec la cartouche DG8 toujours en place) de l'appareil. Enlevez la couverture hermétique jetable du support et éliminez-la. Les puits de la rangée supérieure de la cartouche contiennent les gouttelettes, tandis que les puits des rangées du milieu et du bas sont presque vides, ne comportant qu'un léger résidu d'huile.

Laissez la cartouche DG8 dans son support.

Tableau 2.2. Voyants d'état du QX200 Droplet Generator, IVD. Si le voyant du milieu clignote en orange, la couverture hermétique n'est pas placée correctement sur le support ou est absente et l'étanchéité n'est pas assurée. Si le voyant de droite clignote en orange, une erreur de procédure s'est produite en raison d'un volume trop faible dans au moins un puits.

			
Vert fixe	Sous tension	Support de cartouche DG8 en place	Exécution terminée
Vert clignotant	—	—	Exécution en cours
Orange clignotant	—	Absence d'étanchéité ; couverture hermétique absente ou puits vide	Faible volume dans un puits
Éteint	Hors tension	Support de cartouche DG8 absent	En veille

2.3 Préparation à la PCR

1. Pipetez 40 µl du contenu des puits de la rangée supérieure (gouttelettes) dans une seule colonne d'une microplaque de PCR à 96 puits.



Utilisez les techniques de pipetage suivantes pour éviter de perdre ou fusionner des gouttelettes :

Pour aspirer les gouttelettes de la cartouche DG8 :

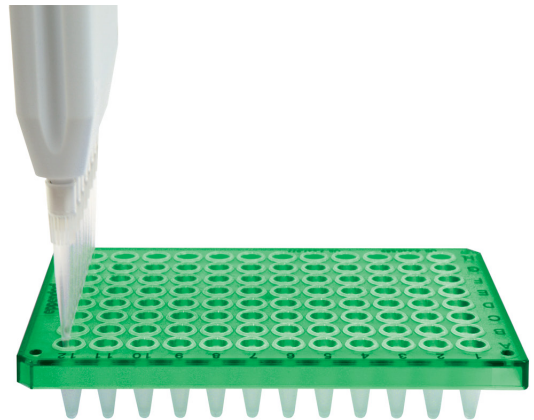
- Utilisez une pipette L-50 manuelle à 8 canaux avec des pointes de 200 µl. Ne pas utiliser ni de P 20µl ni de P1000µl.
- Placez le support de cartouche sur une surface plane et positionnez les pointes de pipette au-dessus de chacun des 8 puits de la rangée supérieure selon un angle de 30 à 45° environ, à la verticale de la jonction entre la paroi latérale du puits et son fond. Ne placez pas la pointe de la pipette à la verticale (90°) ou contre une surface plane du puits, ne laissez pas non plus les pointes des pipettes à plat au fond des puits.
- Aspirez lentement 40 µl de gouttelettes (temps requis d'environ 5 s, et environ 5 µl d'air attendus) ; n'aspirez pas plus de 40 µl car l'air pourrait alors s'infiltrer dans les gouttelettes.
- Pipetez lentement. Appliquez une force de résistance stable sur le piston pour pousser et aspirer les gouttelettes en douceur.

Pour injecter les gouttelettes dans la microplaque à 96 puits, placez la pointe de la pipette le long du bord du puits (à proximité du fond mais sans le toucher) et libérez lentement les gouttelettes (~5 s).

Pour éviter l'évaporation et la contamination par des particules, couvrez la plaque (par exemple à l'aide de barrettes de 8 capuchons ou du couvercle de la boîte de pointes de pipette) pendant que vous travaillez.



Aspiration des gouttelettes de la cartouche DG8.



Injection des gouttelettes dans une microplaque de PCR à 96 puits.

2. Après avoir retiré les gouttelettes de la cartouche, appuyez sur les loquets du support de cartouche DG8 pour l'ouvrir. Enlevez la cartouche DG8 vide et jetez-la.
3. Scellez la microplaque de PCR avec un film immédiatement après le transfert des gouttelettes pour éviter leur évaporation. Utilisez des films perçables en aluminium (compatibles avec la scelleuse PX1™ PCR Plate Sealer et les aiguilles du QX200 Droplet Reader, IVD, par exemple : référence 181-4040). Suivez les instructions du mode d'emploi de la scelleuse PX1 PCR Plate Sealer (bulletin 10023997).
 - a. Réglez la température de la scelleuse sur 180 °C et la durée sur 5 secondes.
 - b. Effleurez la flèche pour ouvrir la porte du plateau de la scelleuse PX1. Positionnez le portoir sur le plateau, avec la surface des 96 puits dirigée vers le haut. Placez la microplaque à 96 puits sur le portoir et assurez-vous que tous les puits de la plaque sont alignés avec le portoir.
 - c. Couvrez la microplaque à 96 puits avec une feuille du film perçable en aluminium. (Bio-Rad identifie la surface à sceller par une étiquette jaune sur le sachet de thermosoudage.) N'essayez pas de placer le cadre par-dessus la microplaque recouverte du film. Il n'est destiné qu'à d'autres systèmes de fermeture.
 - d. Une fois que la microplaque à 96 puits est sécurisée sur le portoir et recouverte du film perçable en aluminium, effleurez le bouton de soudage. Le plateau se ferme et le thermosoudage commence.
 - e. La porte de la scelleuse PX1 s'ouvre automatiquement lorsque le thermosoudage est terminé. Sortez la microplaque de son portoir pour la placer dans le thermocycleur. Sortez le portoir de la scelleuse PX1 Plate Sealer.
 - f. Vérifiez si tous les puits de la microplaque sont scellés, les creux des puits doivent être visibles sur le film. Une fois thermosoudée, la microplaque est prête pour le thermocyclage.

Commencez le thermocyclage (PCR) dans les 30 minutes suivant le soudage de la plaque ou stockez la plaque au maximum 4 heures avant le thermocyclage à 4 °C. Reportez-vous aux notices du mélange réactionnel Supermix pour connaître les conditions de thermocyclage.



Scelleuse PX1 PCR Plate Sealer (à gauche) et microplaque à 96 puits scellée (à droite).

2.4 Étapes suivantes

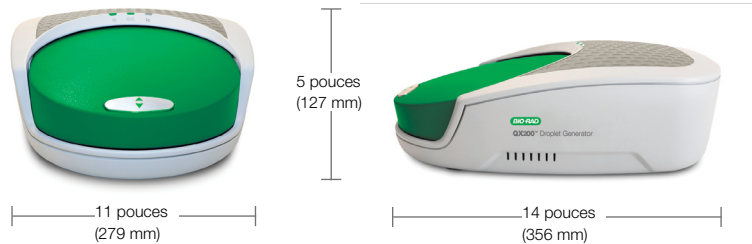
Après avoir scellé la plaque à 96 puits contenant les gouttelettes, placez-la dans le thermocycleur pour l'amplification par PCR. Reportez-vous aux notices du mélange réactionnel Supermix pour connaître les conditions de thermocyclage. Lorsque l'amplification par PCR est terminée, sortez la microplaque à 96 puits du thermocycleur et lisez les gouttelettes à l'aide du QX200 Droplet Reader, IVD (suivez les instructions du mode d'emploi du QX200 Droplet Reader, IVD, bulletin 10031906).

Si votre objectif est de lire ou quantifier les gouttelettes et, parallèlement, de récupérer du matériel à partir des gouttelettes, préparez 2 séries de mélanges réactionnels, une pour chaque application. Par exemple, vous pouvez produire une série de 8 puits dans une seule cartouche DG8 : 4 d'entre eux seront lus après le thermocyclage, et 4 seront mis de côté. Reportez-vous au mode d'emploi du QX200 Droplet Reader, IVD (bulletin 10031906) pour obtenir de plus amples détails.

3

Caractéristiques techniques et maintenance

3.1 Caractéristiques techniques



Poids	10 lb. (4,5 kg)
Dimensions (L x P x H)	11 x 14 x 5" (28 x 36 x 13 cm)
Installation électrique	100–240 V, 50/60 Hz, 60 W ; fluctuations de tension ne devant pas dépasser +10 % des valeurs nominales (pour alimentation externe fournie)
Température	18–30 °C
Altitude	0–6 560 pieds (0–2 000 m)
Humidité	85 % max (sans condensation)
Niveau de pollution	2 (usage intérieur)
Catégorie d'installation	II (branchement de l'alimentation externe dans une prise CA standard)
Ventilation requise	Des espaces non obstrués de 5" (12 cm) à gauche et à droite de l'appareil et 10" (25 cm) à l'arrière doivent être prévus pour une ventilation correcte

Caractéristiques de performance

Taille d'échantillon de départ, µl	20
Capacité du QX200 Droplet Generator, IVD	1–8 échantillons/cartouche
Gouttelettes par 20 µl d'échantillon	20 000
Capacité du QX200 Droplet Reader, IVD	1–96 échantillons
Éclairage des échantillons	Diodes électroluminescentes
Détection des échantillons	Compteur de photons multipixels
Canaux de détection	FAM (EvaGreen), HEX (VIC)
Plage dynamique linéaire	5 ordres de grandeur
Précision	±10 %
Gouttelettes par microplaque de 96 puits, million	~1,5

3.2 Maintenance

Bio-Rad vérifie que le QX200 Droplet Generator, IVD fonctionne selon les caractéristiques techniques du fabricant lors de son installation. La maintenance préventive annuelle proposée par Bio-Rad est recommandée pour s'assurer que le QX200 Droplet Generator, IVD continue à fonctionner selon ces mêmes spécifications.

En cas de dysfonctionnement ou d'altération des performances d'analyse de l'appareil, adressez-vous à l'assistance technique Bio-Rad (1-800-424-6723).

Les surfaces de l'appareil peuvent avoir besoin d'un nettoyage complet. Utilisez de l'eau distillée ou déionisée pour l'essuyer dans son ensemble à l'aide d'un chiffon légèrement humide. Pour la décontamination, vous pouvez utiliser de l'eau de Javel à 10 % suivie d'éthanol à 70 % ou d'eau distillée ou déionisée. N'utilisez pas d'acétone ni d'eau du robinet.

Observez régulièrement l'appareil pour repérer d'éventuels dégâts sur les câbles ou composants externes. N'utilisez pas l'appareil s'il est endommagé.

Appliquez des pratiques standard recommandées par les fiches de données de sécurité et la norme OSHA pour manipuler et mettre au rebut les déchets générés.

Les liquides des appareils de production de gouttelettes et de lecture Bio-Rad sont fabriqués à partir de la chimie des hydrocarbures fluorés et doivent être éliminés en conséquence conformément aux réglementations locales, nationales et institutionnelles. Ces liquides ininflammables sont inertes et présentent un faible impact environnemental et une faible toxicité. Recueillez les déchets dans un conteneur en polyéthylène et jetez-les dans le mois qui suit.

Les gouttelettes constituées à partir du mélange réactionnel Bio-Rad présentent des propriétés antimicrobiennes, mais la prolifération microbienne reste possible.

Les déchets peuvent intégrer les éléments suivants : hydrocarbures fluorés, eau, colorant fluorescent (des sondes), colorant intercalant, protéines et acides nucléiques. Le générateur de gouttelettes n'est pas prévu pour être utilisé avec des matériaux à risque biologique.

Ne remplacez pas le cordon d'alimentation amovible par un cordon non certifié ou non adapté.

186-3028	ddPCR Supermix for Probes , 50 ml (10 x 5 ml), 2x supermix
186-3021	One-Step RT-ddPCR Kit for Probes , 2 ml (2 x 1 ml), 200 x 20 µl mélanges réactionnels, 2x mix RT-ddPCR, comprend 1 tube d'acétate de manganèse
186-3022	One-Step RT-ddPCR Kit for Probes , 5 ml (5 x 1 ml), 500 x 20 µl mélanges réactionnels, 2x mix RT-ddPCR, comprend 2 tubes d'acétate de manganèse
186-4033	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix , 2 ml (2 x 1 ml), 200 x 20 µl mélanges réactionnels
186-4034	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix , 5 ml (5 x 1 ml), 500 x 20 µl mélanges réactionnels
186-4035	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix , 25 ml (5 x 5 ml), 2 500 x 20 µl mélanges réactionnels
186-4036	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix , 50 ml (10 x 5 ml), 5 000 x 20 µl mélanges réactionnels
186-3052	ddPCR Buffer Control Kit for Probes , 2 flacons de 4,5 ml, 2 tampons
186-4052	ddPCR Buffer Control Kit for EvaGreen , 2 flacons de 4,5 ml, 2 tampons

Thermocycleur et scelleuse de plaques

184-1000-IVD	C1000™ Thermal Cyclers, IVD
185-1196	Thermocycleur C1000 Touch™ avec module 96-Well Fast Reaction , comprend le châssis du thermocycleur C1000 Touch, le module réactionnel à 96 puits, un lecteur flash USB
185-1197	Thermocycleur C1000 Touch avec module 96-Deep Well Fast Reaction , comprend le châssis du thermocycleur C1000 Touch, le module réactionnel à 96 puits profonds, un lecteur flash USB
181-4000	PX1™ Plate Sealer , comprend l'appareil de thermosoudage, un portoir de microplaques à 96 ou 384 puits, un cadre de soudage, un cordon d'alimentation
181-4040	Film de thermosoudage en aluminium perçable , paquet de 100



Bio-Rad Laboratories, Inc.

5731 W. Las Positas Blvd
Pleasanton, CA 94588



Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette, France

Tél. : +33 (0)1 47 95 60 00

Fax : +33 (0)1 47 41 91 33

www.bio-rad.com



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Site Web www.bio-rad.com **États-Unis** 800 424 6723 **Afrique du Sud** 27 (0) 861 246 723
Allemagne 49 89 31 884 0 **Australie** 61 2 9914 2800 **Autriche** 43 1 877 89 01 **Belgique** 03 710 53 00
Brésil 55 11 3065 7550 **Canada** 905 364 3435 **Chine** 86 21 6169 8500 **Corée** 82 2 3473 4460
Danemark 44 52 10 00 **Espagne** 34 91 590 5200 **Finlande** 09 804 22 00 **France** 01 47 95 69 65
Grèce 30 210 9532 220 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hongrie** 36 1 459 6100 **Inde** 91 124 4029300
Israël 03 963 6050 **Italie** 39 02 216091 **Japon** 81 3 6361 7000 **Mexique** 52 555 488 7670 **Norvège** 23 38 41 30
Nouvelle-Zélande 64 9 415 2280 **Pays-Bas** 0318 540666 **Pologne** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700
République tchèque 420 241 430 532 **Royaume-Uni** 020 8328 2000 **Russie** 7 495 721 14 04
Singapour 65 6415 3188 **Suède** 08 555 12700 **Suisse** 026 674 55 05 **Taiwan** 886 2 2578 7189
Thaïlande 1800 88 22 88