

Manuel du kit *therascreen*[®] MGMT Pyro[®]



Version 1



Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*



REF 971061

HB 1061267FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R4 **MAT** 1061267FR



Technologies d'échantillonnage et de dosage QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillonnage et de dosage permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services avancés de haute qualité garantissent le succès, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines
- dosages d'acides nucléiques et de protéines
- recherche micro-ARN et ARNi
- automatisation des technologies d'échantillonnage et de dosage

Notre mission consiste à permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Contenu

Utilisation prévue	5
Résumé et explication	5
Principe de la procédure	6
Témoins	7
Matériel fourni	8
Contenu du kit	8
Matériel nécessaire mais non fourni	10
Agitateurs de plaques recommandés	11
Avertissements et précautions	11
Informations de sécurité	11
Précautions générales	12
Stockage et manipulation des réactifs	13
Stockage et manipulation des prélèvements	14
Procédure	15
Isolement de l'ADN et conversion au bisulfite	15
Protocoles	
■ 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24	16
■ 2 : PCR à l'aide des réactifs fournis avec le kit <i>therascreen MGMT Pyro</i>	19
■ 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouvertes de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)	22
■ 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24	24
■ 5 : Fonctionnement du système PyroMark Q24	28
■ 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24	31
Interprétation des résultats	32
Guide de dépannage	34
Contrôle qualité	37
Limitations	37
Caractéristiques des performances	38
Limite du blanc	38
Linéarité	39

Précision	40
Évaluation diagnostique	42
Références	45
Symboles	46
Coordonnées	46
Annexe A : Préparation du test MGMT	47
Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves	48
Pour commander	50

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* MGMT Pyro est un test *in vitro* de détection basé sur les séquences d'acide nucléique et s'appuyant sur la technologie de Pyrosequencing[®], ou pyroséquençage, pour la mesure quantitative de l'état de méthylation de l'exon 1 du gène MGMT humain dans l'ADN génomique provenant d'échantillons de tissu humain.

Le kit *therascreen* MGMT Pyro vise à compléter d'autres facteurs pronostiques et à fournir aux cliniciens des informations pour les aider à sélectionner les patients atteints de cancer les plus à même de bénéficier d'une chimiothérapie. Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*.

À utiliser uniquement sur le système PyroMark[®] Q24. Les systèmes PyroMark Q24 comprennent les appareils suivants :

- Les instruments PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx
- Les stations de travail sous vide PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx
- Les logiciels (version 2.0) PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx

Le produit est destiné à être utilisé par des professionnels, tels que des techniciens ou des médecins formés aux procédures de diagnostics *in vitro*, aux techniques de biologie moléculaire et au système PyroMark Q24.

Résumé et explication

Le kit *therascreen* MGMT Pyro est conçu pour mesurer quantitativement la méthylation dans quatre sites CpG de l'exon 1 du gène MGMT humain (séquence génomique sur le chromosome 10 de 131 265 519 à 131 265 537 : CGACGCCCGCAGGTCCTCG). L'ADN génomique converti par traitement au bisulfite est amplifié par PCR et séquencé dans la région définie dans le sens direct (figure 1). Les séquences entourant les positions définies servent de valeurs maximales de normalisation et de référence pour l'évaluation quantitative et qualitative de l'analyse.

Le produit contient un mélange d'amorce PCR et une amorce de séquence, à raison de deux flacons de chaque. Les amorces sont livrées en solution. Chaque flacon contient 24 µL d'amorce ou de mélange d'amorce. Le kit contient les amorces et les réactifs pour l'amplification des gènes, plus les tampons, amorces et réactifs pour la détection quantitative de la méthylation en temps réel à l'aide de la technologie Pyrosequencing (Pyroséquençage) sur le Système PyroMark Q24.

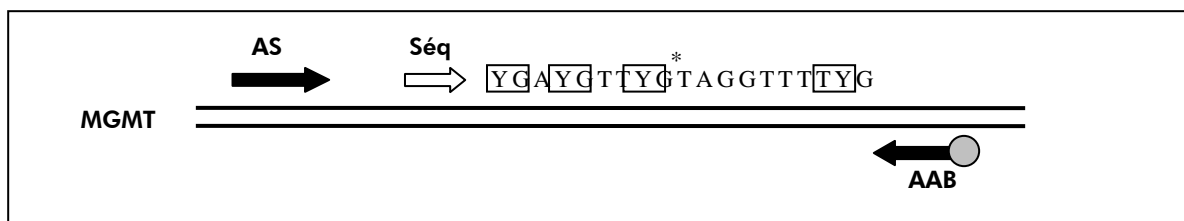


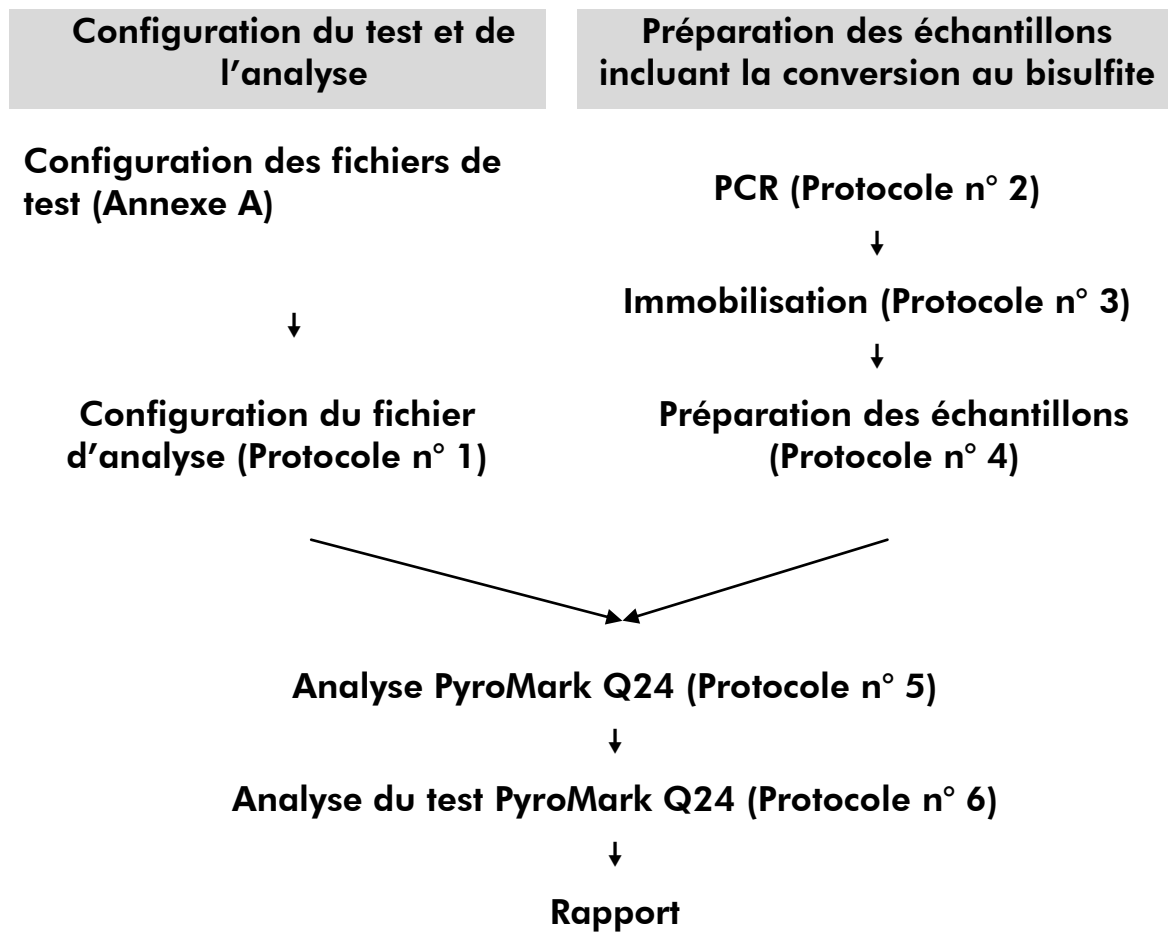
Figure 1. Illustration du test MGMT. La séquence indiquée est la séquence analysée après la conversion au bisulfite. Y indique les sites potentiellement méthylés et les rectangles indiquent les sites CpG analysés. L'astérisque indique le site de contrôle de la conversion au bisulfite. **AS**: amorces PCR sens ; **AAB**: amorces PCR antisens (**B** indique une biotinylation) ; **Séq**: amorces de séquence.

Principe de la procédure

Le déroulement des opérations ci-dessous illustre la procédure de test. Après la PCR à l'aide des amorces ciblant la région définie de l'exon 1, les amplicons sont immobilisés sur des billes de sépharose recouvertes de streptavidine (Streptavidin Sepharose® High Performance). L'ADN simple brin est préparé et les amorces de séquence sont hybridées avec l'ADN. Les échantillons sont ensuite analysés sur le système PyroMark Q24 à l'aide d'un fichier de configuration de test et d'un fichier d'analyse.

Remarque : le déroulement des opérations a été légèrement modifié comparé au *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24* (voir « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 24).

Déroulement de la procédure *therascreen* MGMT Pyro



Témoins

L'ADN de contrôle méthylé est inclus dans le kit en tant que témoin positif pour les réactions de PCR et de séquençage. Cet ADN témoin est fortement méthylé et converti au bisulfite. Il est également recommandé qu'un échantillon d'ADN dérivé du sang d'un donneur en bonne santé soit inclus dans chaque analyse de pyroséquençage pour comparaison. De plus, un témoin négatif (sans ADN matrice) doit toujours être inclus dans chaque configuration de la PCR.


Matériel fourni

Contenu du kit

Kit *therascreen* MGMT Pyro (boîte n° 1/2)

Kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro	(48)
N° de référence	971061
Nombre de réactions	48
PCR Primer Mix MGMT (Mélange d'amorce PCR MGMT)	2 x 24 μ L
Seq Primer MGMT (Amorce séq MGMT)	2 x 24 μ L
PyroMark PCR Master Mix (Master Mix PCR PyroMark), 2x	850 μ L
CoralLoad® Concentrate (CoralLoad® concentré), 10x	1,2 mL
H ₂ O	3 x 1,9 mL
Methylated Control DNA (ADN témoin méthylé), 10 ng/ μ L	100 μ L

therascreen Pyro buffers and reagents (boîte n° 2/2)

therascreen Pyro buffers and reagents		
PyroMark Binding Buffer (Tampon de liaison PyroMark)		10 mL
PyroMark Annealing Buffer (Tampon d'hybridation PyroMark)		10 mL
PyroMark Denaturation Solution (Solution de dénaturation PyroMark)*		250 mL
PyroMark Wash Buffer (Tampon de lavage PyroMark concentré), 10x		25 mL
Enzyme Mixture (Mélange d'enzymes)		1 fiole
Substrate Mixture (Mélange de substrats)		1 fiole
dATP α S		1180 μ L
dCTP		1180 μ L
dGTP		1180 μ L
dTTP		1180 μ L
Handbook (Manuel)		1

* Contient de l'hydroxyde de sodium.

Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées disponibles auprès du fournisseur du produit.

- Kit d'isolement d'ADN (voir « Isolement de l'ADN et conversion au bisulfite », page 15)
 - Réactifs pour la conversion de l'ADN au bisulfite (voir « Isolement de l'ADN et conversion au bisulfite », page 15).
 - Pipettes (adaptables)*
 - Pointes de pipettes stériles (avec des filtres pour la configuration PCR)
 - Microcentrifugeuse de paillasse*
 - Thermocycleur et tubes de PCR adéquats
 - Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n° réf. 17-5113-01 ; www.gelifesciences.com)
 - PyroMark Q24 (n° réf. 9001513 ou 9001514)*†
 - Logiciel PyroMark Q24 (n° réf. 9019062 ou 9019063)†
 - Plaque PyroMark Q24 (n° réf. 979201)†
 - Cartouche PyroMark Q24 (n° réf. 979202)†
 - Station de travail sous vide PyroMark Q24 (n° réf. 9001515 ou 9001517)*†
 - Agitateur de plaques* pour l'immobilisation sur les billes (voir « Agitateurs de plaques recommandés », page 11)
 - Bloc chauffant* capable d'atteindre les 80 °C
 - Plaques de PCR à 24 puits ou barrettes de PCR
 - Capuchons de barrette
 - Eau ultra-pure (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou équivalent)
- Remarque** : le produit contient de l'eau en quantité suffisante pour la PCR, pour l'immobilisation de l'ADN et pour dissoudre le mélange d'enzymes et le mélange de substrats ; une quantité supplémentaire d'eau ultra-pure est requise pour diluer le tampon de lavage PyroMark concentré 10x.
- Éthanol (70 %)[‡]

* Assurez-vous que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

† Certifié CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE. Tous les autres produits de la liste ne sont pas certifiés CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE.

‡ N'utilisez pas d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

Agitateurs de plaques recommandés

Les agitateurs de plaques répertoriés dans le tableau 1 sont recommandés avec le kit *therascreen* MGMT Pyro.

Tableau 1. Agitateurs de plaques recommandés pour l'utilisation avec le kit *therascreen* MGMT Pyro

Fabricant	Produit	Numéro de référence
Eppendorf	Thermomixer confort (appareil de base)	5355 000.011
	Thermobloc pour plaques MTP	5363 000.012
	Adaptateur pour tubes PCR 96 x 0,2 mL pour thermobloc à plaques MTP	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V=51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V=51110 U)

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

Informations de sécurité

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety où vous pouvez trouver, lire et imprimer les FDS pour chaque kit QIAGEN® et chaque composant.

Les mentions de danger et conseils de prudence suivants s'appliquent aux composants du kit *therascreen* MGMT Pyro.

PyroMark Denaturation Solution



Attention! Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut être corrosif pour les métaux. Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants. Conserver uniquement dans le récipient d'origine. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

PyroMark Enzyme Mixture



Contient: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Danger! Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. En cas d'exposition prouvée ou suspectée: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

PyroMark Substrate Mixture



Contient: acetic acid. Attention! Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants.

- Pour obtenir des résultats optimaux, veuillez vous conformer au manuel de l'utilisateur de manière rigoureuse. Il n'est pas recommandé d'effectuer la dilution des réactifs autrement que comme décrit dans ce manuel dans la mesure où cela entraînera une baisse des performances.
- Le déroulement des opérations a été légèrement modifié comparé au *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24* (voir « Protocole 4 : Préparation des

échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 24).

- Les composants de ce produit suffisent pour réaliser 48 réactions dans cinq analyses indépendantes maximum.
- Utilisez des pointes de pipettes stériles avec des filtres (pour la configuration PCR).
- Conservez le matériel positif (prélèvements, témoins positifs et amplicons) et procédez à son extraction séparément de tous les autres réactifs puis ajoutez-le au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Décongelez complètement tous les composants à température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant de commencer un test.
- Une fois qu'ils sont décongelés, mélangez les composants (en pipetant l'ensemble de manière répétée ou en les passant à l'agitateur à pulsations multiples) et passez-les brièvement à la centrifugeuse.
- La détermination de l'état de méthylation ne doit jamais être basée sur des résultats marqués « Failed » (échec).

Stockage et manipulation des réactifs

Le kit *therascreen* MGMT Pyro est expédié dans deux boîtes. Le kit *therascreen* MGMT Pyro (boîte 1/2) est expédié sur un lit de glace sèche. Le Master Mix PCR PyroMark, le concentré CoralLoad, l'ADN de contrôle méthylé et toutes les amorces doivent être stockés dès leur réception entre -30 et -15 °C.

Les tampons et réactifs *therascreen* Pyro (boîte 2/2) contenant les tampons, le mélange d'enzymes, le mélange de substrats, la dATP α S, la dCTP, la dGTP et la dTTP (les réactifs pour l'analyse de pyroséquençage) sont expédiés sur des pains de glace. Ces composants doivent être stockés dès leur réception entre 2 et 8 °C. Pour minimiser la perte d'activité, il est recommandé de garder les mélanges d'enzymes et de substrats dans les fioles fournies.

Les mélanges d'enzymes et de substrats reconstitués sont stables pendant au moins 10 jours s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C. Les mélanges d'enzymes et de substrats reconstitués peuvent être congelés et stockés dans leur flacon entre -30 et -15 °C. Les réactifs congelés ne doivent pas subir plus de 6 cycles de congélation/décongélation.

Remarque : les nucléotides ne doivent pas être congelés.

Le kit *therascreen* MGMT Pyro est stable jusqu'à la date de péremption du kit s'il est stocké conformément à ces conditions.

Stockage et manipulation des prélèvements

Tous les échantillons doivent être traités comme des substances présentant un risque potentiel d'infection.

Les prélèvements contiennent de l'ADN humain converti au bisulfite et extrait de sang ou d'échantillons fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE).

Les échantillons provenant de patients suivant un traitement à l'héparine ne doivent pas être utilisés. Les échantillons sanguins qui ont été collectés dans des tubes contenant de l'héparine agissant en tant qu'anticoagulant ne doivent pas être utilisés. L'héparine affecte la PCR.

Procédure

Isolement de l'ADN et conversion au bisulfite

Les performances du système ont été établies à l'aide du kit EZ1[®] DNA Tissue et du kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue pour l'extraction d'ADN humain provenant d'échantillons de tumeurs fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine. Pour le système QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, les performances ont été établies à l'aide d'échantillons de sang de donneur en bonne santé partiellement enrichis en cellules cancéreuses.

Les kits de QIAGEN apparaissant dans le tableau 2 sont recommandés pour la purification de l'ADN provenant des échantillons de type humain indiqués, destinés à être utilisés avec le kit *therascreen* MGMT Pyro. Effectuez la purification de l'ADN conformément aux instructions des manuels du kit.

Pour la conversion au bisulfite, le kit EpiTect[®] Bisulfite (n° réf. 59104), le kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite (n° réf. 59144) ou le kit EpiTect Plus DNA Bisulfite (n° réf. 59124) de QIAGEN sont recommandés.

Tableau 2. Kits de purification de l'ADN recommandés pour l'utilisation avec le kit *therascreen* MGMT Pyro

Substances des échantillons	Kit d'isolement de l'acide nucléique	Numéro de référence (QIAGEN)
Tissu inclus en paraffine	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sang	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit [†]	61104

* Suivez le protocole d'utilisation du tissu inclus en paraffine. Le kit de tissu ADN EZ1 doit être utilisé en combinant l'utilisation du EZ1 Advanced (n° réf. 9001410 ou 9001411) et du EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9018298), du EZ1 Advanced XL (n° réf. 9001492) et du EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9018700) ou du BioRobot[®] EZ1 (n° réf. 9000705, n'est plus disponible) et du EZ1 DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9015862).

[†] Certifié CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE.

Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24



Point important avant de commencer

- Si nécessaire, la LoB peut être confirmée à l'aide d'un échantillon de sang de donneur en bonne santé pour générer une plaque entière de résultats. Pour obtenir des détails, consultez le protocole EP17-A du CLSI « Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline ».

À effectuer avant de commencer

- Créez une configuration du test tel que décrit à l'Annexe A, page 47. Cette configuration ne doit être effectuée qu'une seule fois, avant le premier test *therascreen* MGMT Pyro.

Procédure

1. Cliquez sur  dans la barre d'outils.
Un nouveau fichier d'analyse est créé.
2. Entrez les paramètres de l'analyse (voir « Paramètres de l'analyse », page 17).
3. Préparez la plaque en ajoutant le test aux puits correspondant aux échantillons à analyser.
Remarque : un témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration de la PCR.
Remarque : il est également recommandé d'inclure un échantillon témoin contenant de l'ADN provenant du sang d'un donneur en bonne santé dans chaque analyse de pyroséquençage pour comparaison. Un échantillon contenant de l'ADN témoin méthylé peut être inclus en tant que témoin positif pour la PCR et les réactions de séquençage (voir « Témoins », page 7).
4. Lorsque l'analyse est paramétrée et prête à être effectuée sur le système PyroMark Q24, imprimez la liste des volumes requis de mélange d'enzymes, de mélange de substrats et de nucléotides, ainsi que la liste du paramétrage de la plaque. Sélectionnez « Pre Run Information » (informations pré-analyse) dans le menu « Tools » (outils), puis, lorsque le rapport apparaît, cliquez sur .
5. Fermez le fichier d'analyse et copiez-le sur une clé USB (fournie avec le système) à l'aide de Windows® Explorer.

Les informations de pré-analyse imprimées peuvent être utilisées comme modèle pour le paramétrage des échantillons (voir « Protocole 3 :

Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouvertes de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 22).

Pour analyser la plaque sur PyroMark Q24, voir « Protocole 5 : Fonctionnement du système PyroMark Q24 », page 28.

Paramètres de l'analyse

« Run name » (nom de l'analyse) :	Le nom de l'analyse est donné lorsque le fichier est sauvegardé. Lorsque vous renommez le fichier, le nom de l'analyse change également.
« Instrument method » (méthode de l'instrument) :	Sélectionnez la méthode de l'instrument conformément à la cartouche qui sera utilisée pour l'analyse. Voir les instructions fournies avec les produits.
« Plate ID » (identifiant de plaque) :	Optionnel : entrez l'identifiant de la plaque PyroMark Q24.
« Bar code » (code-barres) :	Optionnel : entrez un numéro de code-barres pour la plaque ou, si vous avez un lecteur de code-barres connecté à votre ordinateur, placez le curseur de la souris dans la zone de texte « Barcode » (code-barres) et scannez le code-barres.
« Reagent ID » (identifiant du réactif) :	Optionnel : entrez le numéro de lot des boîtes 1 et 2 du kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro à utiliser. Le numéro de lot se trouve sur l'étiquette du produit. Remarque : nous recommandons d'entrer le numéro de lot afin de pouvoir remonter à la source de tout problème inattendu lié au kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro.
« Run note » (remarque à propos de l'analyse) :	Optionnel : entrez une remarque à propos des contenus ou des objectifs de l'analyse.

Ajouter des fichiers de test

Pour ajouter un test à un puits, vous avez deux solutions :

- Faites un clic droit sur le puits et sélectionnez « Load Assay » (charger le test) dans le menu contextuel.
- Sélectionnez le test dans le raccourci du navigateur puis cliquez sur le test et faites-le glisser jusqu'au puits.

Il existe un code de couleurs selon la nature du test chargé sur le puits.

Entrez les identifiants et les remarques liées à l'échantillon

Pour entrer un identifiant ou une remarque liée à l'échantillon, sélectionnez la cellule et saisissez le texte.

Pour modifier un identifiant ou une remarque liée à l'échantillon, sélectionnez la cellule (le contenu actuel sera sélectionné) ou double-cliquez dessus.

Protocole 2 : PCR à l'aide des réactifs fournis avec le kit *therascreen* MGMT Pyro

Ce protocole est utilisé pour l'amplification par PCR d'une région d'ADN converti au bisulfite à l'aide du kit *therascreen* MGMT Pyro.

Points importants avant de commencer

- La HotStarTaq[®] ADN polymérase contenue dans le Master Mix PyroMark PCR requiert une étape d'activation à **95 °C pendant 15 minutes**.
- Préparez tous les mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle utilisée pour la purification de l'ADN, l'ajout d'ADN matrice à la PCR, l'analyse du produit PCR ou la préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage.
- Utilisez des pointes jetables contenant des filtres hydrophobes pour minimiser la contamination croisée.
- L'ADN converti au bisulfite doit être utilisé en tant qu'ADN matrice. Le kit EpiTect[®] Bisulfite (n° réf. 59104), le kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite (n° réf. 59144) ou le kit EpiTect Plus DNA Bisulfite (n° réf. 59124) de QIAGEN sont recommandés.

À effectuer avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes contenant les amorces PCR, passez-les brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Si nécessaire, ajustez la concentration de l'ADN de l'échantillon entre 2 et 10 ng/μL.

Procédure

1. Décongelez tous les composants nécessaires.

Mélangez-les bien avant de les utiliser.

2. Préparez un mélange réactionnel conformément au tableau 3.

Le mélange réactionnel contient généralement tous les composants nécessaires à la PCR, excepté l'échantillon.

Préparez un volume de mélange réactionnel supérieur à ce qui est nécessaire pour le nombre total d'analyses de PCR à effectuer.

Tableau n°3. Préparation du mélange réactionnel

Composant	Volume/réaction (µL)
Master Mix PCR PyroMark, 2x	12,5
CoralLoad concentré 10x	2,5
Mélange d'amorce PCR MGMT	1,0
Eau (H ₂ O, fournie)	4,0
Volume total	20,0

3. Mélangez complètement le mélange réactionnel et versez-en 20 µL dans chaque tube de PCR.

Il n'est pas nécessaire de garder les tubes de PCR sur un lit de glace étant donné que la HotStarTaq ADN polymérase est inactive à température ambiante.

4. Ajoutez 5 µL d'ADN matrice converti au bisulfite (10 à 50 ng d'ADN génomique tel que mesuré avant la conversion au bisulfite) aux tubes de PCR individuels (tableau 4) et mélangez bien.

Remarque : un témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration de la PCR.

Remarque : il est également recommandé d'inclure un échantillon témoin contenant de l'ADN provenant du sang d'un donneur en bonne santé dans chaque analyse de pyroséquençage pour comparaison. Un échantillon contenant de l'ADN témoin méthylé peut être inclus en tant que témoin positif pour la PCR et les réactions de séquençage (voir « Témoins », page 7).

Tableau 4. Préparation de la PCR

Composant	Volume/réaction (µL)
Mélange réactionnel	20
ADN de l'échantillon	5
Volume total	25

5. **Programmez le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant à l'aide des conditions décrites dans le tableau 5.**

Tableau 5. Protocole de cycle optimisé

			Commentaires
Étape d'activation initiale :	15 minutes	95 °C	La HotStarTaq ADN polymérase est activée par cette étape de réchauffement.
Cycle en 3 étapes :			
Dénaturation	20 secondes	95 °C	
Hybridation	30 secondes	53 °C	
Extension	20 secondes	72 °C	
Nombre de cycles	42		
Extension finale :	5 minutes	72 °C	

6. **Placez les tubes de PCR dans le thermocycleur et démarrez le programme de cycle.**
7. **Après l'amplification, continuez avec le « Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouvertes de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 22.**

Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouvertes de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)

Ce protocole est utilisé pour l'immobilisation de l'ADN matrice sur la sépharose-streptavidine haute performance (GE Healthcare) avant l'analyse sur le système PyroMark Q24.

Points importants avant de commencer

- Laissez les réactifs et les solutions nécessaires atteindre la température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant de commencer.

Procédure

1. **Agitez doucement le flacon contenant la sépharose-streptavidine haute performance jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.**
2. **Préparez un master mix pour l'immobilisation de l'ADN conformément au tableau 6.** Préparez un volume de 10 % supérieur à ce qui est nécessaire pour le nombre total de réactions à effectuer.

Tableau 6. Master mix pour l'immobilisation de l'ADN

Composant	Volume/réaction (µL)
Sépharose streptavidine haute performance	2
Tampon de liaison PyroMark	40
Eau (H ₂ O, fournie)	28
Volume total	70

3. **Ajoutez 70 µL du master mix aux puits d'une plaque de PCR à 24 puits (ou de barrettes) tel que prédéfini dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 16).**
4. **Ajoutez 10 µL de produit PCR biotinyté provenant du Protocole n° 2 à chaque puits contenant le master mix tel que prédéfini dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 2 : PCR à l'aide des réactifs fournis avec le kit *therascreen* MGMT Pyro », page 19).**

Le volume total par puits doit être de 80 µL après l'ajout du master mix et du produit PCR.

5. Scellez la plaque (ou les barrettes) de PCR à l'aide des capuchons de barrette.

Assurez-vous qu'aucune fuite entre les puits n'est possible.

6. Agitez la plaque de PCR à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant 5 à 10 minutes à 1 400 tr/min.

Pendant ce temps, préparez la station de travail sous vide PyroMark Q24 pour la préparation des échantillons, tel que décrit dans le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*.

7. Continuez immédiatement avec le « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 24.

Remarque : les billes de sépharose se déposent rapidement. La capture des billes doit se faire immédiatement après l'agitation.

S'il s'est écoulé plus d'une minute depuis l'agitation de la plaque (ou des barrettes), agitez-la à nouveau pendant 1 minute avant de capturer les billes.

Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24

Ce protocole est utilisé pour la préparation de l'ADN simple brin et l'hybridation de l'amorce de séquence à l'ADN matrice avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24.

Points importants avant de commencer

- Ajoutez l'amorce de séquence de la même manière que ce qui est prédéfini dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 16).
- Le déroulement des opérations a été légèrement modifié par rapport au *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24* (étape 18). Ne raccourcissez pas le temps de refroidissement des échantillons après le réchauffement à 80 °C.
- Testez régulièrement le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*, et remplacez-les si cela est indiqué.

À effectuer avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes avec les amorces de séquence, passez-les brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Placez un portoir de plaque PyroMark Q24 sur un bloc chauffant préchauffé à 80 °C pour l'étape 17. Laissez un second portoir de plaque PyroMark Q24 à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pour l'étape 18.
- Le tampon de lavage PyroMark est fourni en tant que concentré 10x. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajoutez de l'eau ultra-pure à 25 mL de tampon de lavage PyroMark 10x afin d'obtenir un volume final de 250 mL pour obtenir une solution de travail concentrée 1x.

La solution de travail tampon de lavage PyroMark concentrée 1x est stable entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.

Procédure

1. Diluez une quantité suffisante de l'amorce de séquence Amorce séq MGMT dans du tampon d'hybridation PyroMark tel que décrit dans le tableau 7.

Préparez un volume d'amorce de séquence diluée supérieur à ce qui est requis pour le nombre total d'échantillons à séquencer (pour le nombre d'échantillons + un supplémentaire).

Tableau 7. Exemple de dilution pour les amorces de séquence

Composant	Volume/réaction (μL)	Volume pour 9 + 1 réactions (μL)
Amorce séq MGMT	0,8	8,0
Tampon d'hybridation PyroMark	24,2	242,0
Volume total	25,0	250,0

- Ajoutez 25 μ L d'amorce de séquence diluée à chaque puits de la plaque PyroMark Q24 conformément à la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 16).**

Gardez l'un des portoirs de plaque PyroMark Q24 (fournis avec la station de travail sous vide PyroMark Q24) à température ambiante (entre 15 et 25 °C) et utilisez-le lors de la préparation et du déplacement de la plaque.

- Placez la plaque (ou les barrettes) de PCR du Protocole n° 3 et la plaque PyroMark Q24 sur la table de travail (figure 2).**

Assurez-vous que la plaque est orientée de la même façon que lors du chargement des échantillons.



Figure 2. Placement de la plaque (ou des barrettes) de PCR et de la plaque PyroMark Q24 sur la station de travail sous vide.

- Mettez l'outil sous vide en ouvrant la commande de vide.**

5. **Plongez minutieusement les sondes à filtre de l'outil à vide dans la plaque (ou les barrettes) de PCR pour capturer les billes contenant l'ADN matrice immobilisé. Maintenez les sondes en place pendant 15 secondes. Prenez garde lorsque vous retirez l'outil à vide.**

Remarque : les billes de sépharose se déposent rapidement. La capture des billes doit se faire immédiatement après l'agitation.

S'il s'est écoulé plus d'une minute depuis l'agitation de la plaque (ou des barrettes), agitez-la à nouveau pendant 1 minute avant de capturer les billes.

6. **Transférez l'outil à vide dans la cuve contenant 40 mL d'éthanol à 70 % (figure 2). Purgez les sondes à filtre pendant 5 secondes.**
7. **Transférez l'outil à vide dans la cuve contenant 40 mL de solution de dénaturation (figure 2). Purgez les sondes à filtre pendant 5 secondes.**
8. **Transférez l'outil dans la cuve contenant 50 mL de tampon de lavage (figure 2). Purgez les sondes à filtre pendant 10 secondes.**
9. **Secouez l'outil à vide de haut en bas à plus de 90° par rapport à l'horizontale pendant 5 secondes pour égoutter le liquide présent dans les sondes à filtre (figure 3).**



Figure 3. Illustration de l'outil à vide à plus de 90° par rapport à l'horizontale.

10. **Fermez la commande de vide de l'outil (« Off ») avec l'outil à vide maintenu au-dessus de la plaque PyroMark Q24.**
11. **Libérez les billes de la plaque PyroMark Q24 en plongeant les sondes à filtre dans l'amorce de séquence diluée et en secouant doucement l'outil latéralement.**
Veillez à ne pas endommager la surface de la plaque PyroMark Q24 en l'éraflant avec les sondes à filtre.
12. **Transférez l'outil à vide dans la cuve contenant l'eau ultra-pure (figure 2) et agitez-le pendant 10 secondes.**

13. Lavez les sondes à filtre en les plongeant dans l'eau ultra-pure (figure 2) et en y appliquant le vide. Purgez les sondes avec 70 mL d'eau ultra-pure.
14. Secouez l'outil de haut en bas à plus de 90° par rapport à l'horizontale pendant 5 secondes pour égoutter le liquide présent dans les sondes à filtre (figure 3).
15. Fermez la commande de vide de l'outil (« Off ») et placez ce dernier en position de repos (« P »).
16. Éteignez la pompe à vide.
Remarque : à la fin de votre journée de travail, les déchets liquides et les solutions restantes doivent être rejetés et vous devez vérifier qu'il n'y a pas de poussière et qu'aucun produit ne s'est répandu dans la station de travail sous vide PyroMark Q24 (voir Annexe B, page 48).
17. Faites chauffer la plaque PyroMark Q24 avec les échantillons à 80 °C pendant 2 minutes à l'aide du portoir de plaque PyroMark Q24 préchauffé.
18. Retirez la plaque PyroMark Q24 du portoir de plaque chaud et placez-la pendant 10 à 15 minutes sur un second portoir de plaque PyroMark Q24 laissé à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pour que les échantillons reviennent à température ambiante.
19. Continuez avec le « Protocole 5 : Fonctionnement du système PyroMark Q24 », page 28.

Protocole 5 : Fonctionnement du système PyroMark Q24

Ce protocole décrit la préparation et le chargement des réactifs PyroMark Gold Q24 dans la cartouche PyroMark Q24 ainsi que le démarrage et la fin d'une analyse sur le PyroMark Q24. Pour obtenir une description détaillée de la préparation d'une analyse, voir le *Manuel de l'utilisateur PyroMark Q24*.

Point important avant de commencer

- Le rapport d'informations de pré-analyse, qui se trouve dans le menu « Tools » (outils) de la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 16), fournit des informations relatives au volume des nucléotides et des tampons d'enzyme et de substrat nécessaire pour une analyse spécifique.

À effectuer avant de commencer

- Mettez sous tension le PyroMark Q24. L'interrupteur d'alimentation se trouve à l'arrière de l'instrument.

Procédure

- 1. Dissolvez chacun des mélanges d'enzymes et de substrats lyophilisés dans 620 µL d'eau (H₂O, fournie).**

- 2. Mélangez le flacon doucement.**

Ne le passez pas à l'agitateur !

Pour garantir la dissolution complète du mélange, laissez-le à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant 5 à 10 minutes. Assurez-vous que la solution n'est pas trouble avant de remplir la cartouche PyroMark Q24. S'il n'est pas prévu d'utiliser les réactifs dans l'immédiat, placez les flacons de réactifs sur un lit de glace* ou dans un réfrigérateur.

- 3. Laissez les réactifs et la cartouche PyroMark Q24 atteindre la température ambiante (entre 20 et 25 °C).**
- 4. Placez la cartouche PyroMark Q24 de manière à ce que son étiquette soit orientée vers vous.**
- 5. Chargez la cartouche PyroMark Q24 avec les volumes appropriés de nucléotides et de mélanges d'enzymes et de substrats, conformément à la figure 4.**

Assurez-vous qu'aucune bulle d'air n'est transférée de la pipette vers la cartouche.

* Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.



Figure 4. Illustration de la cartouche PyroMark Q24 vue du dessus. Les annotations correspondent à l'étiquette sur les flacons de réactifs. Ajoutez le mélange d'enzymes (**E**), le mélange de substrats (**S**) et les nucléotides (**A**, **T**, **C**, **G**) en fonction des informations de volume indiquées dans le rapport d'informations de pré-analyse, accessible dans le menu « Tools » (outils) de la configuration de l'analyse.

6. **Ouvrez le support de cartouche et insérez-y la cartouche remplie de réactifs avec l'étiquette vers l'extérieur. Poussez la cartouche entière à l'intérieur puis vers le bas.**
7. **Assurez-vous que la ligne est visible en face de la cartouche puis fermez la porte.**
8. **Ouvrez le dispositif porte-plaques et placez la plaque sur le bloc chauffant.**
9. **Fermez le dispositif porte-plaques et le couvercle de l'instrument.**
10. **Insérez la clé USB (contenant le fichier d'analyse) dans le port USB sur la face avant de l'instrument.**
Ne retirez pas la clé USB tant que l'analyse n'est pas terminée.
11. **Sélectionnez « Run » (analyse) dans le menu principal (à l'aide des boutons ▲ et ▼ de l'écran) puis appuyez sur « OK ».**
12. **Sélectionnez le fichier d'analyse à l'aide des boutons ▲ et ▼ à l'écran.**
Pour visualiser le contenu d'un dossier, sélectionnez le dossier puis appuyez sur « Select » (sélectionner). Pour retourner à la page précédente, appuyez sur « Back » (retour).
13. **Lorsque le fichier d'analyse est sélectionné, appuyez sur « Select » (sélectionner) pour démarrer l'analyse.**
14. **Lorsque l'analyse est terminée et que l'instrument confirme que le fichier d'analyse a été enregistré sur la clé USB, appuyez sur « Close » (fermer).**
15. **Retirez la clé USB.**
16. **Ouvrez le couvercle de l'instrument.**
17. **Ouvrez la porte de la cartouche et sortez la cartouche de réactifs en la soulevant puis en la tirant vers l'extérieur.**
18. **Fermez la porte.**
19. **Ouvrez le dispositif porte-plaques et retirez la plaque du bloc chauffant.**

- 20. Fermez le dispositif porte-plaques et le couvercle de l'instrument.**
- 21. Jetez la plaque et nettoyez la cartouche conformément aux instructions de la fiche produit fournie avec la cartouche.**
- 22. Analysez le test conformément au « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 31.**

Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24

Ce protocole décrit l'analyse de la méthylation d'un test *therascreen* MGMT terminé à l'aide du logiciel PyroMark Q24.

Procédure

1. Insérez la clé USB (contenant le fichier de l'analyse effectuée) dans le port USB de l'ordinateur.
2. Déplacez le fichier d'analyse depuis la clé USB vers l'endroit souhaité sur l'ordinateur à l'aide de Windows Explorer.
3. Ouvrez le fichier d'analyse en mode CpG sur le logiciel PyroMark Q24 soit en sélectionnant « Open » (ouvrir) dans le menu « File » (fichier), soit en double-cliquant sur le fichier (👉) dans le raccourci du navigateur.
4. Pour analyser le test et obtenir un aperçu des résultats, cliquez sur l'un des boutons « Analyze » (analyse).



Analyser tous les puits.



Analyser le puits sélectionné.

Les résultats de l'analyse (fréquences de méthylation) et l'évaluation de la qualité sont affichés au-dessus de la position de la variable sur le tracé du Pyrogram®. Pour plus d'informations concernant la façon d'analyser un test, voir le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*.

5. Pour générer un rapport, sélectionnez « CpG Full Report » (rapport complet de CpG) ou « CpG Analysis Results » (résultats de l'analyse CpG) dans le menu « Reports » (rapports).

Remarque : pour des résultats fiables, nous recommandons des hauteurs de pics mononucléotidiques supérieures à 30 RLU. Le paramètre « required peak height for passed quality » (hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) doit être réglé sur 30 RLU dans la configuration du test (voir Annexe A, page 47 et le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*).

Remarque : le rapport des résultats de l'analyse CpG doit être utilisé pour documenter et interpréter la quantification de la méthylation. Les nombres apparaissant dans le pyrogramme sont arrondis et ne représentent pas la quantification exacte.

Remarque : le tracé de pyrogramme doit systématiquement être comparé à l'histogramme, que vous pouvez afficher en faisant un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (Pyrogramme). Les pics mesurés doivent avoir la même hauteur que les barres d'histogramme.

Interprétation des résultats

Il est recommandé qu'un échantillon d'ADN dérivé du sang d'un donneur en bonne santé soit inclus dans chaque analyse pour comparaison.

Le témoin de conversion au bisulfite (indiqué par une barre jaune dans la fenêtre Pyrogram) indique que la conversion au bisulfite est complète. Un signal dans le témoin de conversion au bisulfite peut indiquer une conversion au bisulfite incomplète, pouvant entraîner une quantification biaisée de la méthylation. Il génèrera un avertissement.

Les valeurs de LoB (Limit of Blank – limite du blanc) représentent les fréquences de méthylation des échantillons provenant de sang de donneur en bonne santé avec une probabilité de 95 % (voir le tableau 8 et « Caractéristiques des performances », page 38).

Tableau 8. LoB déterminée pour des sites de méthylation spécifiques en utilisant des échantillons provenant de sang de donneurs en bonne santé

Position	LoB (unités %)
Site 1 de CpG	1,5
Site 2 de CpG	1,8
Site 3 de CpG	3,2
Site 4 de CpG	3,4
Moyenne des sites de CpG 1 à 4	2,1

Remarque : ces valeurs sont tirées d'analyses pour lesquelles le signal était supérieur à 30 RLU (Relative Light Unit – unités relatives de luminescence), ce qui correspond aux valeurs obtenues habituellement pour 10 ng d'ADN isolé provenant de sang (mesuré avant la conversion au bisulfite). Il est recommandé que le laboratoire confirme les performances de la méthode.

Résultats représentatifs

Les résultats représentatifs de Pyrogram sont présentés dans les figures 5 à 7.

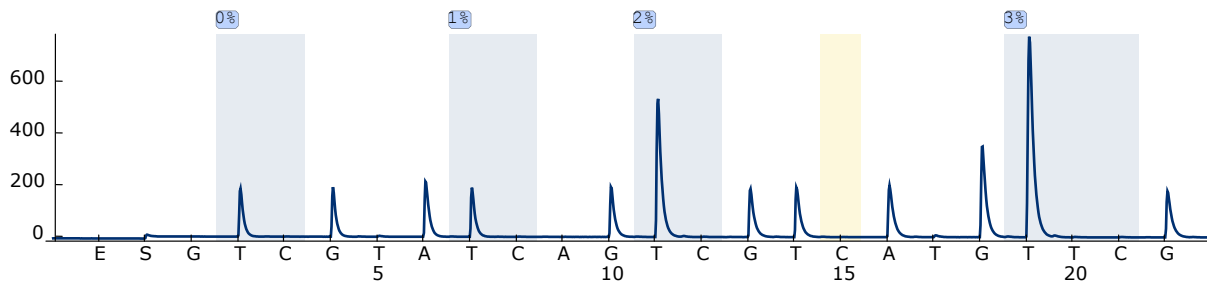


Figure 5. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'ADN non méthylé converti au bisulfite, provenant d'un échantillon de sang d'un donneur en bonne santé. La barre au niveau de la distribution 15 représente le témoin pour l'achèvement de la conversion au bisulfite.

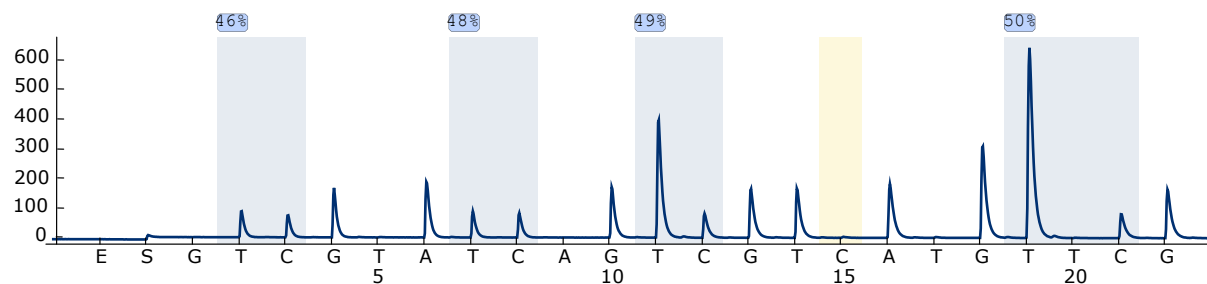


Figure 6. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'ADN méthylé converti au bisulfite. La barre au niveau de la distribution 15 représente le témoin pour l'achèvement de la conversion au bisulfite.

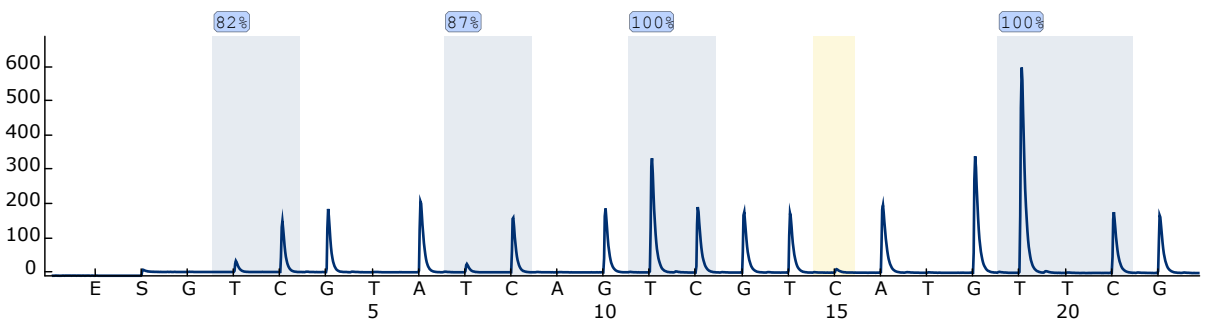


Figure 7. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'ADN fortement méthylé converti au bisulfite (ADN témoin méthylé, fourni). La barre au niveau de la distribution 15 représente le témoin pour l'achèvement de la conversion au bisulfite.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la page de foire aux questions dans notre Centre de support technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques du support technique de QIAGEN sont toujours heureux de répondre aux questions concernant les informations et les protocoles contenus dans ce manuel ou à propos des technologies d'échantillonnage et de dosage (pour les coordonnées, voir le quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Remarque : veuillez vous référer au *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24* pour des informations générales concernant le dépannage de l'instrument.

Commentaires et suggestions

Signaux du témoin négatif

- | | |
|---------------------------------|---|
| a) Interférence entre les puits | Le signal d'un puits est détecté par un puits voisin. Évitez de placer des échantillons présentant des intensités de signal élevées près de puits de témoin négatif. |
| b) Contamination PCR | Utilisez des pointes de pipette stériles avec filtres. Stockez et extrayez les substances telles que les prélèvements, les témoins et les amplicons séparément des réactifs de PCR. |

Séquence pauvre ou inattendue

- | | |
|--------------------------------------|--|
| a) ADN génomique de mauvaise qualité | L'ADN génomique de mauvaise qualité peut provoquer un échec de la PCR. Analysez les échantillons de PCR à l'aide d'une technique électrophorétique (par exemple, le système QIAxcel [®] ou l'électrophorèse sur gel d'agarose). |
|--------------------------------------|--|

Commentaires et suggestions

Résultat « Check » (à vérifier) ou « Failed » (échec)

- a) Faible hauteur de pic
- Des erreurs de manipulation lors de la configuration de la PCR ou de la préparation des échantillons avant le pyroséquençage peuvent entraîner de faibles pics.
- Il est important que les échantillons soient prélevés en totalité par l'outil à vide. Assurez-vous de plonger lentement l'outil à vide dans les échantillons et que la géométrie de la plaque (ou les barrettes) de PCR utilisée pour l'immobilisation permette de prélever la totalité des échantillons.
- Testez régulièrement le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*, et remplacez-les aux échéances indiquées.
- En cas d'avertissement marqué d'un « Check » (à vérifier), comparez attentivement le tracé de pyrogramme et l'histogramme, que vous pouvez afficher en faisant un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (Pyrogramme). Si les pics mesurés concordent avec la hauteur des barres d'histogramme, le résultat est valide. Dans le cas contraire, il est recommandé de réanalyser l'échantillon.

Commentaires et suggestions

- b) Le message d'avertissement « Uncertain/Failed bisulfite conversion at dispensation: 15 » (incertitude/échec de la conversion au bisulfite 15) apparaît

Assurez-vous que la valeur pour « Allowed percentage for passed quality » (pourcentage accepté pour la validation de la qualité) et « Allowed percentage for check quality » (pourcentage accepté pour la vérification de la qualité) sont définies respectivement sur 7,0 et 10,0.

Remarque : en cas d'évaluation de la qualité marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec), la conversion au bisulfite n'était pas achevée, ce qui peut affecter la quantification de la méthylation.

Il est recommandé d'utiliser le kit EpiTect® Bisulfite (n° réf. 59104), le kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite (n° réf. 59144) ou le kit EpiTect Plus DNA Bisulfite (n° réf. 59124) de QIAGEN pour la conversion au bisulfite, et de suivre strictement le protocole pour la conversion.

Bruit de fond élevé

- a) Stockage des nucléotides incorrect
- b) Temps de refroidissement des échantillons trop court avant l'analyse de pyroséquençage
- c) Contamination de la cartouche

Stockez les nucléotides entre 2 et 8 °C. Le stockage entre -15 et -25 °C peut provoquer une augmentation du bruit de fond.

Laissez les échantillons sur un portoir de plaque PyroMark Q24 à température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Ne raccourcissez pas le temps de refroidissement.

Nettoyez soigneusement la cartouche, tel que décrit dans la fiche produit. Conservez la cartouche à l'abri de la lumière et de la poussière.

Commentaires et suggestions

Aucun signal pour le témoin positif

- | | |
|--|---|
| a) Mélange d'enzymes ou de substrats insuffisant pour tous les puits | Assurez-vous de bien remplir la cartouche PyroMark Q24 conformément aux « Pre Run Information » (informations de pré-analyse) du menu « Tools » (outils). |
| b) Réactifs stockés ou dilués de manière incorrecte | Préparez les réactifs <i>therascreen</i> conformément aux instructions fournies à la section « Protocole 5 : Fonctionnement du système PyroMark Q24 », page 28. |
| c) Échec de la PCR ou de la préparation de l'échantillon | Des erreurs de manipulation lors de la configuration de la PCR, de la programmation de l'instrument de PCR ou de la préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage peuvent entraîner une absence de signal. Testez le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le <i>Manuel d'utilisation du PyroMark Q24</i> , et remplacez-les si nécessaire. Recommencez la PCR et l'analyse de pyroséquençage. |

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de kit *therascreen* MGMT Pyro est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Limitations

Tous les résultats de diagnostic générés doivent être interprétés en tenant compte d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

L'utilisateur est responsable de la validation des performances du système pour toutes les procédures utilisées dans son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performances de QIAGEN.

Caractéristiques des performances

Limite du blanc

La LoB (Limit of Blank – limite du blanc, tableau 9) a été déterminée pour les quatre sites CpG analysés avec le kit *therascreen* MGMT Pyro sur des échantillons provenant de sang de donneurs en bonne santé conformément aux recommandations du protocole EP17-A du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) « Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline ». Les erreurs α et β (respectivement faux positif et faux négatif) ont été définies à 5 %.

Les valeurs de LoB représentent les fréquences de méthylation obtenues sur des échantillons de sang provenant de donneurs en bonne santé avec une probabilité de 95 %.

Tableau 9. LoB déterminée pour des sites de méthylation spécifiques en utilisant des échantillons provenant de sang de donneurs en bonne santé

Position	LoB (unités %)
Site 1 de CpG	1,5
Site 2 de CpG	1,8
Site 3 de CpG	3,2
Site 4 de CpG	3,4
Moyenne des sites de CpG 1 à 4	2,1

Remarque : il est recommandé que le laboratoire confirme les performances de la méthode.

Linéarité

La linéarité a été déterminée à l'aide de mélanges d'ADN génomique non méthylé et méthylé converti au bisulfite provenant de l'ensemble d'ADN témoin EpiTect PCR (n° réf. 59104) et en parallèle à l'aide de mélanges de plasmides porteurs de la séquence respective convertie au bisulfite d'un échantillon non méthylé ou méthylé (c.-à-d. respectivement porteurs des nucléotides C et T dans les sites CpG). Les ADN génomiques et les plasmides, respectivement, ont été mélangés dans des proportions permettant de donner douze niveaux de méthylation (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 %). Chaque mélange a été analysé avec trois lots différents du kit *therascreen* MGMT Pyro, lors de trois analyses de pyroséquençage portant chacune sur trois réplicats.

Les résultats ($n = 9$ pour chaque niveau de mutation) ont été analysés conformément au protocole EP6-A du CLSI « Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline », avec le logiciel Analyse-it® v2.21 (Analyse-it Software, Ltd., UK) et sont représentés dans les figures 8 et 9 pour la méthylation moyenne des sites 1 à 4 de CpG en utilisant de l'ADN génomique ou plasmidique en tant que matrice, respectivement.

Les résultats étaient linéaires, avec une non-linéarité autorisée de 5 points de pourcentage dans l'intervalle testé de 0 à 100 % de niveau de méthylation pour chaque site individuel de méthylation ou pour la moyenne des quatre sites de méthylation.

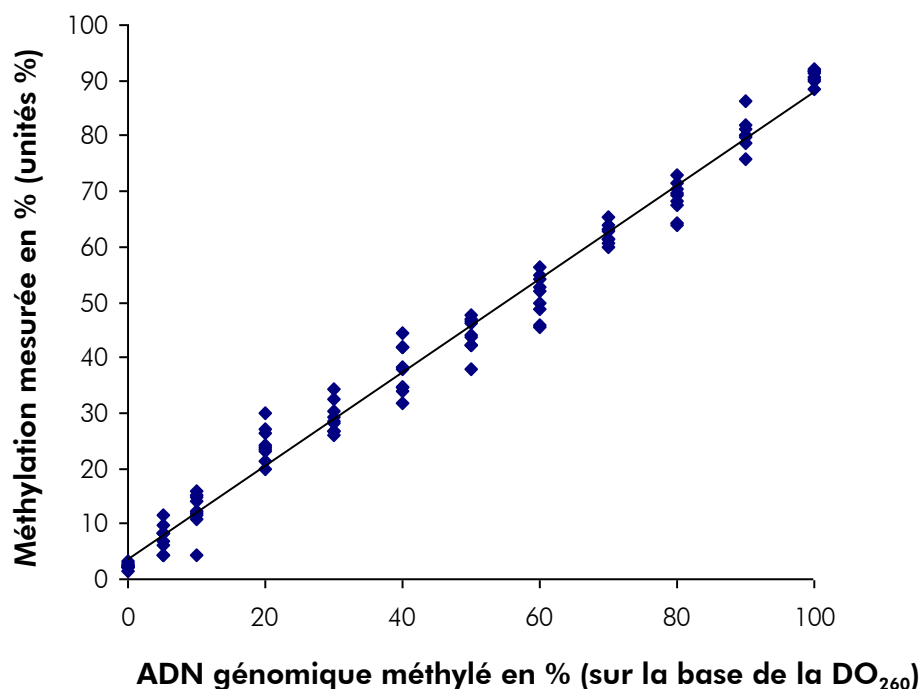


Figure 8. Linéarité de la méthylation moyenne des sites de CpG 1 à 4 à l'aide de mélanges d'ADN témoin EpiTect.

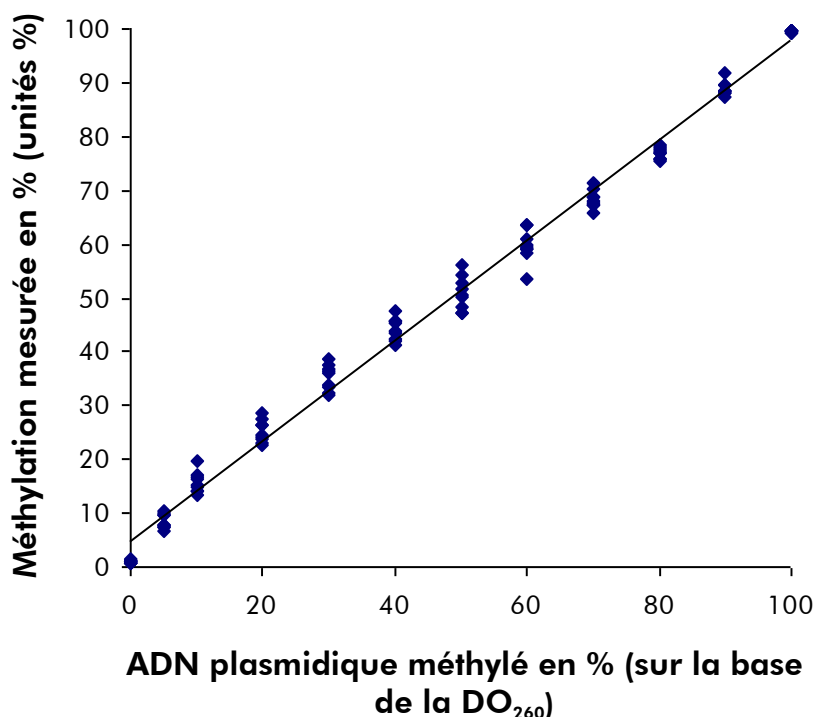


Figure 9. Linéarité de la méthylation moyenne des sites de CpG 1 à 4 à l'aide de mélanges d'ADN plasmidique.

Précision

Les données de précision permettent de déterminer la variabilité totale des tests. Elles ont été obtenues pour trois niveaux différents, par analyse des mélanges d'ADN génomique et plasmidique susmentionnés, avec trois réplicats chacune.

La répétabilité (variabilité intratest et interlot) a été calculée sur la base des données utilisées pour déterminer la linéarité (trois analyses réalisées le même jour avec divers lots du kit *therascreen* MGMT Pyro). La précision moyenne (variabilité intralaboratoire) a été déterminée lors de trois analyses réalisées dans un seul laboratoire, trois jours différents, par des opérateurs, sur des instruments PyroMark Q24 et avec des lots du kit *therascreen* MGMT Pyro variables. La reproductibilité (variabilité interlaboratoire) a été calculée à partir de deux analyses réalisées chacune dans un laboratoire interne et dans un laboratoire externe, avec divers lots du kit *therascreen* MGMT Pyro.

Les estimations de la précision sont exprimées en tant qu'écart type des fréquences de méthylation moyenne mesurées sur les sites CpG 1 à 4 en unités % (tableaux 10 et 11). La répétabilité, la précision moyenne et la reproductibilité sur les mélanges d'ADN génomique étaient comprises respectivement dans les intervalles 0,5–4,3 ; 0,4–4,0 et 0,4–4,4 unités %, dans les limites mesurées d'un niveau de méthylation compris entre 0 et 100 %. Des résultats similaires ont été obtenus avec des mélanges d'ADN plasmidique (voir le tableau 11).

Tableau 10. Précision de la méthylation moyenne des sites de CpG 1 à 4 à l'aide de mélanges d'ADN témoin EpiTect*

% ADN témoin méthylé EpiTect [†]	Répétabilité		Précision moyenne		Reproductibilité	
	Moy.	ET [‡]	Moy.	ET	Moy.	ET
0	2,4	0,5	2,2	0,4	2,6	0,7
5	7,1	2,7	7,7	2,5	9,3	3,9
10	12,8	2,2	12,9	2,3	15,3	3,3
20	23,7	2,3	23,6	2,2	24,2	2,6
30	29,8	2,6	31,0	2,6	30,4	3,0
40	36,7	3,3	37,0	3,6	38,1	3,7
50	44,1	2,9	44,8	3,6	44,2	2,7
60	51,3	3,6	52,4	3,5	51,2	3,3
70	62,3	1,9	62,8	2,1	61,2	2,9
80	68,6	3,1	69,4	3,1	66,9	3,4
90	80,6	3,3	79,5	2,2	77,0	4,3
100	90,8	1,2	91,7	2,1	90,0	1,9

* Toutes les valeurs sont données en unités %.

[†] Basé sur la mesure DO₂₆₀.

[‡] ET : écart type (n=9 pour la répétabilité et la précision moyenne, n=12 pour la reproductibilité).

Tableau 11. Précision de la méthylation moyenne des sites de CpG 1 à 4 à l'aide de mélanges d'ADN plasmidique*

Mélange d'ADN plasmidique (%) [†]	Répétabilité		Précision moyenne		Reproductibilité	
	Moy.	ET [‡]	Moy.	ET	Moy.	ET
0	1,1	0,2	1,0	0,1	1,1	0,3
5	8,6	1,4	8,3	1,1	10,2	3,0
10	15,7	1,9	15,1	2,8	18,8	3,2
20	25,3	2,1	25,5	3,1	28,4	3,6
30	35,2	2,3	34,3	3,2	36,2	2,5
40	44,1	2,0	43,7	3,3	42,8	2,4
50	50,3	3,2	51,8	2,9	52,1	2,5
60	60,2	2,2	60,9	2,8	59,3	2,3
70	68,4	1,7	68,7	1,5	66,9	2,7
80	76,9	1,1	77,4	0,8	75,7	2,1
90	88,9	1,3	88,8	1,7	85,1	4,6
100	99,5	0,1	99,5	0,2	99,0	0,8

* Toutes les valeurs sont données en unités %.

[†] Basé sur la mesure DO₂₆₀. Les valeurs entre 0 et 100 % indiquent la proportion de nucléotides C porteurs de plasmide dans les sites CpG (représentant les nucléotides C méthylés) dans un mélange avec des nucléotides T porteurs de plasmide dans les sites CpG (représentant les nucléotides C non méthylés).

[‡] ET : écart type (n=9 pour la répétabilité et la précision moyenne, n=12 pour la reproductibilité).

Évaluation diagnostique

Le kit *therascreen* MGMT Pyro a été évalué par comparaison au séquençage Sanger. L'ADN a été extrait à partir d'échantillons de glioblastome fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE) et analysé à la recherche de méthylation dans les quatre sites CpG analysés à l'aide du kit *therascreen* MGMT Pyro.

L'ADN a été isolé à l'aide du kit QIAamp DNA FFPE Tissue et converti au bisulfite à l'aide du kit Epitect Bisulfite. L'analyse de pyroséquençage a été réalisée avec le kit *therascreen* MGMT Pyro sur le PyroMark Q24 et le séquençage Sanger a été effectué sur l'ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Sur les 100 échantillons analysés par séquençage Sanger, l'état de méthylation a pu être déterminé pour 49 échantillons, alors qu'avec le kit *therascreen* MGMT Pyro il a été possible de déterminer le niveau de méthylation pour tous les échantillons. Les niveaux moyens de méthylation entre 1 et 74 unités % ont été détectés dans les 100 échantillons par analyse de pyroséquençage (figure 10). La distribution des niveaux de méthylation pour les sites individuels est illustrée à la figure 11.

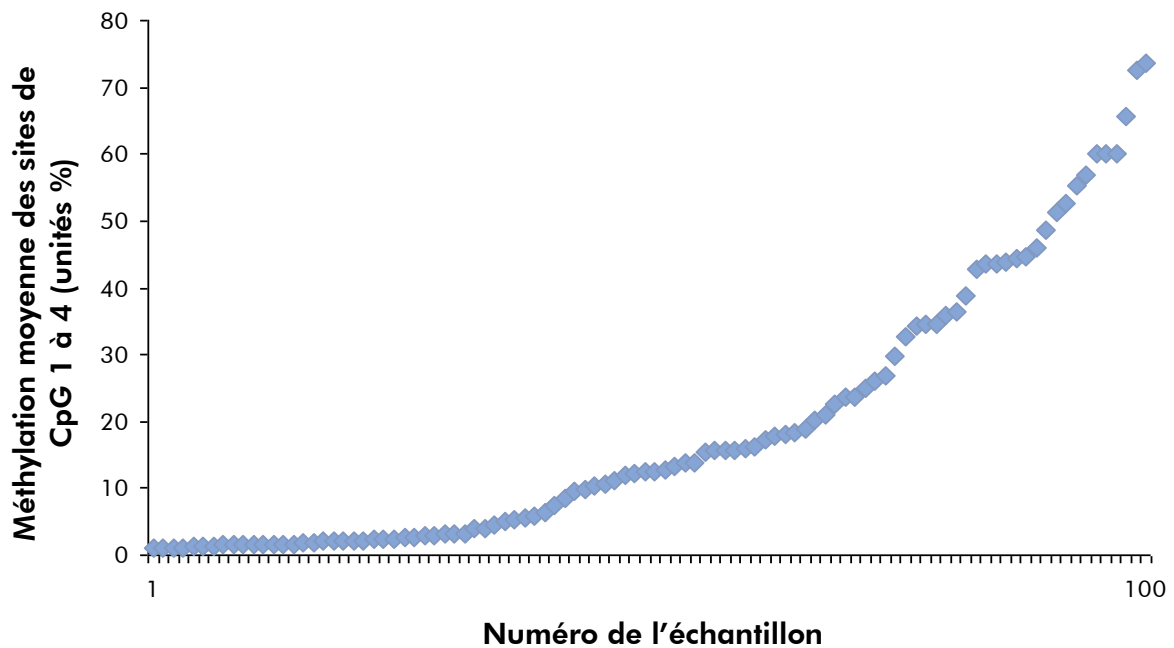


Figure 10. Méthylation moyenne des sites de CpG site 1 à 4 obtenue pour 100 échantillons de glioblastome à l'aide du kit *therascreen* MGMT Pyro. Les échantillons sont classés par niveau de méthylation croissant.

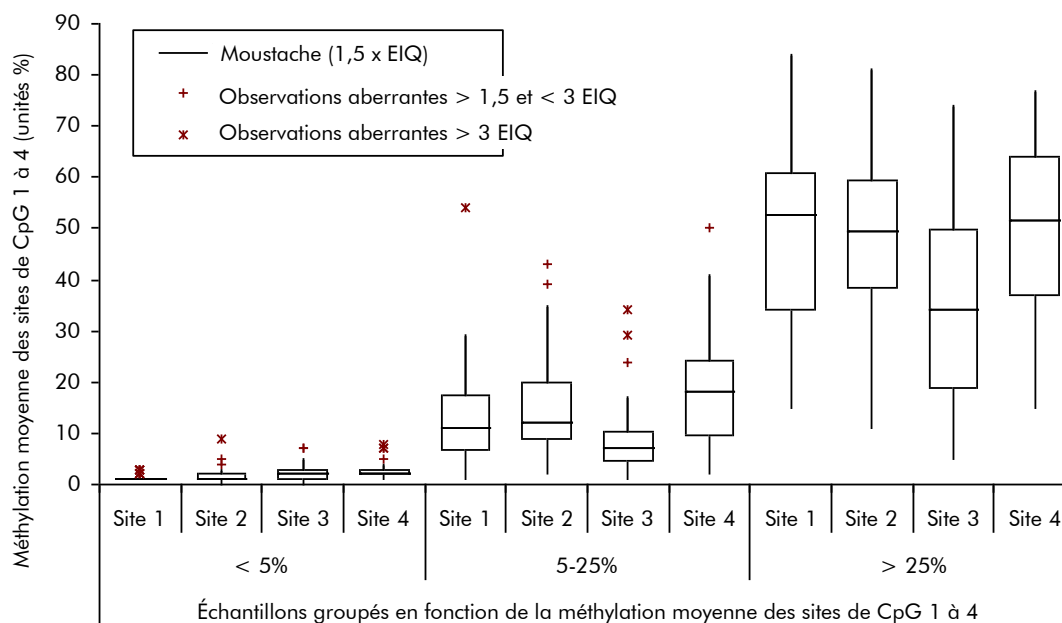


Figure 11. Distribution de la méthylation des sites CpG dans 100 échantillons de glioblastome à l'aide du kit *therascreen* MGMT Pyro. Les échantillons sont groupés en fonction de la méthylation moyenne des sites de CpG 1 à 4. Les rectangles représentent les quartiles inférieur et supérieur (25ème et 75ème percentiles) séparés par la médiane (50ème percentile, indiqué par une ligne horizontale). Les données qui tombent en dehors de cet intervalle sont indiquées comme étant limites ou aberrantes, comme indiqué dans la légende du diagramme à deux dimensions. EIQ : écart interquartile.

Pour la comparaison des méthodes, un état non méthylé ou méthylé a été attribué aux résultats de l'analyse par pyroséquençage en utilisant une méthylation moyenne de 5 unités % des sites de CpG 1 à 4 comme valeur seuil, alors que les résultats de séquençage selon la méthode Sanger ont été affectés manuellement à un état non méthylé ou méthylé.

Trente-deux échantillons ont été détectés comme étant méthylés selon le séquençage Sanger. Dans tous les cas, l'état de méthylation a pu être reproduit avec le kit *therascreen* MGMT Pyro. Deux échantillons supplémentaires ont été indiqués comme étant méthylés par le pyroséquençage, alors que la méthylation n'avait pas été détectée pour ces échantillons par le séquençage Sanger. Sur les 19 échantillons détectés par le séquençage Sanger comme étant non méthylés, les mêmes résultats ont été rapportés pour 17 échantillons à l'aide du kit *therascreen* MGMT Pyro. Les résultats sont illustrés dans le tableau 12.

En excluant les échantillons pour lesquels l'analyse par séquençage Sanger a échoué, la concordance entre les résultats du kit *therascreen* MGMT Pyro et du séquençage Sanger est de 96 % (tableau 12).

Table 12. Résultats de l'analyse des échantillons méthylés dans les sites CpG site 1 à 4 pour les échantillons de glioblastome analysés

		Séquençage Sanger			
		Non méthylé	Méthylé	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro	Non méthylé	17	0	18	35
	Méthylé	2	32	31	65
	Inconnu	0	0	0	0
	Total	19	32	49	100















Remarque : lors de toutes les analyses utilisées pour obtenir des informations sur les performances, le signal était supérieur à 30 RLU, comme cela est systématiquement le cas pour l'analyse de 10 ng d'ADN isolé provenant d'échantillons de sang (mesuré avant la conversion au bisulfite).

Références

QIAGEN tient à jour une grande base de données en ligne de publications scientifiques utilisant les produits QIAGEN. Des critères de sélection de recherche vous aident à trouver les articles dont vous avez besoin à l'aide d'un simple mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

Pour une liste complète des références, visiter la base de données de référence QIAGEN à l'adresse www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou bien contacter les services techniques de QIAGEN ou votre distributeur local.

Symboles

	Contient des réactifs pour <N> tests
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Numéro de la substance
	Composants
	Contient
	Nombre
	Hydroxyde de sodium
	Code article international (GTIN)
	Limite de température
	Fabricant
	Consulter les instructions d'utilisation



Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, prière de consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou d'appeler l'un des services techniques de QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Annexe A : Préparation du test MGMT

Avant la première analyse du test MGMT, le fichier du test doit être configuré. Préparez le test MGMT à l'aide du logiciel PyroMark Q24, comme décrit ci-dessous.

Procédure

1. Cliquez sur  dans la barre d'outils puis sélectionnez « New CpG Assay » (nouveau test CpG).
2. Entrez la séquence dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).
YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT
3. Saisissez manuellement l'ordre de distribution (« Dispensation Order ») suivant :
GTCGTATCAGTCGTCATGTTCCG
4. Cliquez sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et augmentez la valeur du champ « Peak Height Threshold - Required peak height for Passed Quality: » (seuil de hauteur de pic – hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) jusqu'à 30.
5. Dans l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse), définissez les paramètres « Allowed percentage for passed quality » (pourcentage accepté pour la validation de la qualité) et « Allowed percentage for check quality » (pourcentage accepté pour la vérification de la qualité) sur 7,0 et 10,0, respectivement.
6. Cliquez sur  dans la barre d'outils et sauvegardez le test sous le nom « MGMT ».

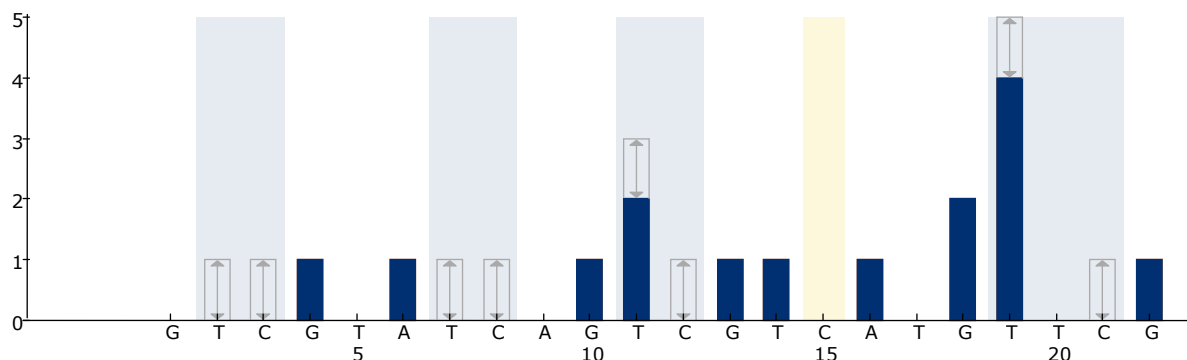



Figure 12. Histogramme du test MGMT La barre au niveau de la distribution 15 indique le témoin pour l'achèvement de la conversion au bisulfite.

Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves

AVERTISSEMENT 	Produits chimique dangereux <p>La solution de dénaturation utilisée avec la station de travail sous vide contient de l'hydroxyde de sodium qui peut irriter les yeux et la peau.</p> <p>Portez toujours des lunettes de sécurité, des gants et une blouse de laboratoire.</p> <p>La personne responsable (p. ex. le chef de laboratoire) doit prendre les précautions nécessaires pour s'assurer que l'espace de travail environnant est sûr et que les opérateurs travaillant sur l'instrument ne sont pas exposés à des niveaux dangereux de substances toxiques (chimiques ou biologiques) comme décrit dans les fiches de données de sécurité (FDS) ou dans les documents de l'OSHA*, de l'ACGIH† ou du COSHH‡.</p> <p>La ventilation pour évacuer les fumées et l'élimination des déchets doivent être conformes à toutes les réglementations et lois de sécurité sanitaire nationales, régionales et locales.</p>
---	---

* OSHA : Occupational Safety and Health Administration (Administration de la sécurité et de la santé au travail, États-Unis)

† ACGIH : American Conference of Government Industrial Hygienists (Conférence américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux, États-Unis)

‡ COSHH : Control of Substances Hazardous to Health (contrôle des substances présentant des dangers pour la santé, Royaume-Uni)

Assurez-vous de respecter les réglementations environnementales nationales, régionales et locales concernant l'élimination des déchets de laboratoire.

Point important avant de commencer

- Ce protocole requiert l'utilisation d'eau ultra-pure.

Procédure

- B1. Assurez-vous qu'aucun vide n'est appliqué à l'outil de vide. Assurez-vous que l'interrupteur à vide est fermé (Off) et que la pompe à vide est éteinte.**
- B2. Jetez toutes les solutions versées dans les cuves.**
- B3. Rincez les cuves avec de l'eau ultra-pure ou remplacez-les si nécessaire.**

- B4. Videz le conteneur à déchets.**
- B5. Le couvercle peut être retiré sans déconnecter le tubage.**
- B6. Si la station de travail sous vide doit être nettoyée (par exemple à cause de la poussière ou de déversements), suivez les instructions du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*.**

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit (48)	Pour 48 réactions sur les systèmes PyroMark Q24 : Amorces Séq, amorces de PCR, ADN de contrôle méthylé, Master Mix PCR PyroMark, CoralLoad concentré, tampon de liaison PyroMark, tampon d'hybridation PyroMark, solution de dénaturation PyroMark, tampon de lavage PyroMark, mélange d'enzymes, mélange de substrat, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP et H ₂ O	971061
Accessoires		
PyroMark Q24 Plate (100)	Plaque de réaction de séquençage à 24 puits	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartouches pour la distribution des nucléotides et des réactifs	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondes à filtre réutilisables pour les postes de travail sous vide PyroMark Q96 et Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Pour la vérification de l'installation du système	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Pour la confirmation des performances du système	979304
Produits connexes		
PyroMark Q24 MDx	Plateforme de détection basée sur la séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001513
PyroMark Q24	Plateforme de détection basée sur la séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001514

Produit	Contenu	N° réf.
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Station de travail sous vide (220 V) pour la préparation de 24 échantillons en parallèle, du produit PCR à la matrice simple brin	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Station de travail sous vide (220 V) pour la préparation de 24 échantillons en parallèle, du produit PCR à la matrice simple brin	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Logiciel d'application	9019063
PyroMark Q24 Software	Logiciel d'analyse	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons, tubes de prélèvement (2 mL)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Pour 48 préparations : Cartouches de réactifs (tissu), embouts à filtre jetables, portoirs d'embouts jetables, tubes d'échantillon (2 mL), tube d'élution (1,5 mL), tampon G2, protéinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Pour 50 préparations : Colonnes QIAamp Mini Spin, tampons, réactifs, tubes, VacConnectors	61104
EpiTect Bisulfite Kit	Pour 48 préparations : Colonnes EpiTect Bisulfite Spin, mélange réactionnel, tampon de protection de l'ADN, ARN porteur, tampons	59104

* Royaume-Uni uniquement.

† Reste du monde.

Produit	Contenu	N° réf.
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit	Pour 48 préparations : Colonnes MinElute DNA spin, mélange bisulfite, tampon de protection de l'ADN, ARN porteur, tampons, solution de déparaffinisation, tampon de lyse FTB	59144
EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit	Pour 48 préparations : Colonnes MinElute DNA spin, mélange bisulfite, tampon de protection de l'ADN, ARN porteur, tampons	59124
EpiTect PCR Control DNA Set (100)	Ensemble d'ADN humain témoin (contenant de l'ADN converti au bisulfite méthylé et non méthylé et de l'ADN non méthylé non converti) pour la PCR de 100 témoins	59695

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Marques déposées : QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EpiTect®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ABI™ (Life Technologies); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd., UK); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Florida Scientific services, Inc.); Windows® (Microsoft Corporation).

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *therascreen* MGMT Pyro accepte les conditions suivantes :

1. Le kit *therascreen* MGMT Pyro ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du kit therascreen MGMT Pyro* et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans le *Manuel du kit therascreen MGMT Pyro* et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont octroyés sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN est susceptible de faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application du présent Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

© 2015 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

