

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



Version 2

IVD

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.



REF

971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALLEMAGNE

R2

MAT

1074213FR



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	4
Résumé et explication	4
Principe de la procédure	5
Matériel fourni	7
Contenu du kit	7
Matériel nécessaire mais non fourni	9
Avertissements et précautions	11
Informations de sécurité	11
Précautions générales	11
Stockage et manipulation des réactifs	13
Stockage et manipulation des prélèvements	13
Procédure	14
Isolement d'ADN	14
■ Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24	15
■ Protocole 2 : PCR à l'aide des réactifs fournis avec le kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro	18
■ Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)	21
■ Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24	23
■ Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24	28
■ Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24	31
Interprétation des résultats	34
Interprétation des résultats d'analyse et détection des mutations de faible niveau	34
Guide de dépannage	38
Contrôle qualité	42
Limitations	42
Caractéristiques des performances	43
Références	48
Symboles	49
Coordonnées	49
Annexe A : Préparation des tests <i>therascreen</i> BRAF Pyro	50
Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves	53
Pour commander	55

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* BRAF Pyro est un test in vitro de détection basé sur les séquences d'acide nucléique et s'appuyant sur le Pyrosequencing[®], ou pyroséquençage, pour la détection quantitative des mutations au niveau des codons 600 et 464 à 469 du gène BRAF humain dans l'ADN génomique provenant d'échantillons de tissu humain.

Le kit *therascreen* BRAF Pyro vise à fournir aux cliniciens des informations pour les aider à sélectionner les patients atteints de cancer les plus à même de bénéficier d'une thérapie anti-EGFR. Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.

À utiliser uniquement avec 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* BRAF Pyro est utilisé pour les mesures quantitatives de mutations des codons 600 dans l'exon 15 et 464 à 469 dans l'exon 11 du gène BRAF humain (figure 1).

Exon 15	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTC TAGCTACA GTG AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGT TGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
Exon 11	AAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCCTGAT GGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATT GGA TCT GGA TCATTT GGA ACA GTCTACAAGGGAAAGTGGCATG

Figure 1. Contexte génomique des régions séquencées du gène BRAF humain (Ensembl ID ENSG00000157764). Les codons 600, 464, 466 et 469 sont encadrés.

Le kit contient 2 tests : le premier pour la détection des mutations au niveau du codon 600 et le second pour la détection des mutations au niveau des codons 464 à 469 (figure 2). Les deux régions sont amplifiées séparément par PCR et séquencées dans la région définie. Les séquences entourant les positions définies servent de valeurs maximales de normalisation et de référence pour l'évaluation quantitative et qualitative de l'analyse.

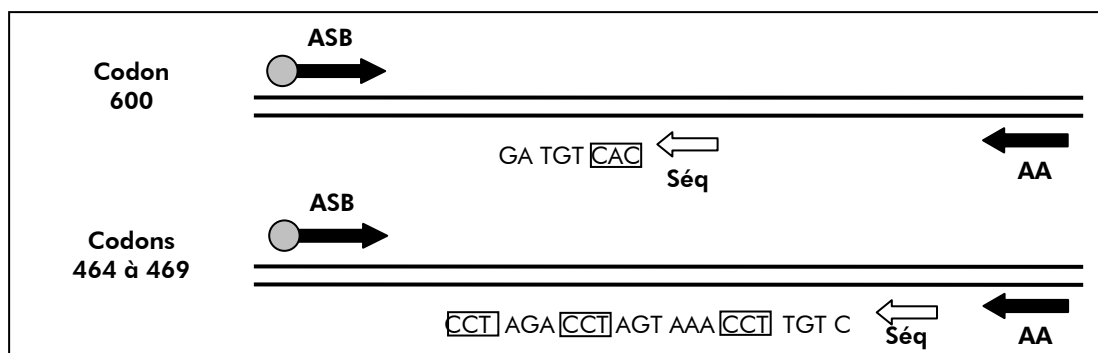


Figure 2. Illustration du test BRAF. La séquence indiquée est la séquence analysée pour un échantillon de type sauvage. ASB : amorces PCR sens (B indique une biotinylation) ; AA : amorces PCR antisens ; Séq : amorces de séquence.

Les deux tests sont séquencés dans la direction indirecte.

Le produit contient un mélange d'amorce PCR et une amorce de séquence pour chaque test. Les amorces sont livrées en solution. Chaque fiole contient 24 μ L de chaque amorce ou mélange d'amorce.

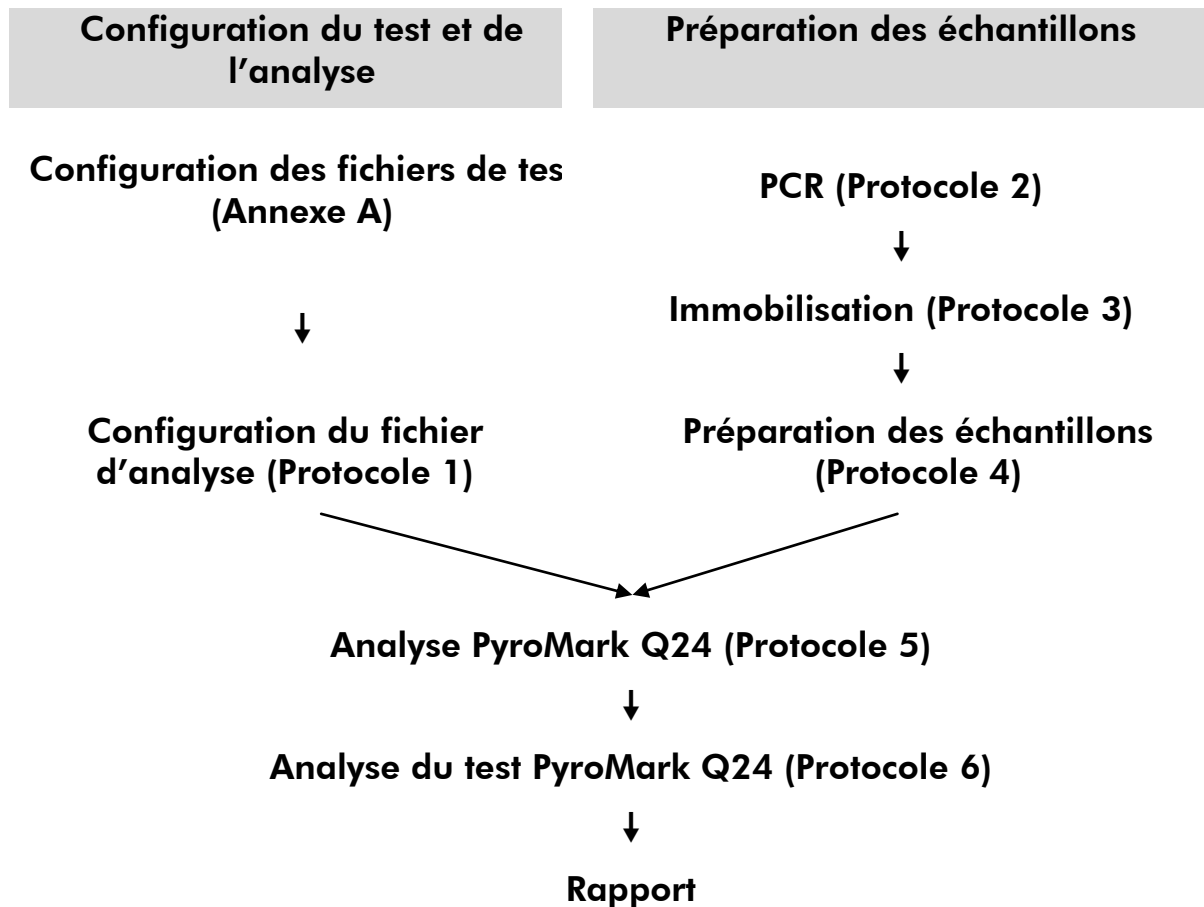
Principe de la procédure

Le déroulement des opérations à la page 6 illustre la procédure de test. Après la PCR à l'aide des amorces ciblant le codon 600 et les codons 464 à 469, 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 correspondantes s'hybrident avec l'ADN. Les échantillons sont ensuite analysés sur PyroMark Q24 à l'aide d'un fichier de configuration d'analyse et d'un fichier d'analyse.

Il est recommandé d'utiliser le BRAF Plug-in Report pour analyser le test. Vous pouvez obtenir le BRAF Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com. Toutefois, le test peut également être analysé à l'aide de l'outil d'analyse intégré au système PyroMark Q24. La séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») peut être ajustée pour la détection des mutations rares après l'analyse (voir « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 31).

Remarque : le déroulement des opérations a été légèrement modifié par rapport à la révision précédente du *Manuel du kit theascreen BRAF Pyro* (version 1, juillet 2011). Voir « Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 21, « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 23 et « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 31.

Déroulement de la procédure *therascreen* BRAF Pyro



Témoins

L'ADN témoin non méthylé est inclus dans le kit en tant que témoin positif pour les réactions de PCR et de séquençage. Cet ADN témoin comporte un génotype sauvage dans les régions séquencées à l'aide de ce kit. Il est requis pour l'interprétation correcte des résultats et l'identification des mutations de faible niveau (voir « Interprétation des résultats », page 34). Inclure un échantillon avec ADN témoin non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage.

En outre, un témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.

Matériel fourni

Contenu du kit

Kit *therascreen* BRAF Pyro (boîte 1/2)

<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	(24)
N° de référence	971470
Nombre de réactions	24
Seq Primer BRAF 600 (amorce Séq BRAF 600)	24 µL
Seq Primer BRAF 464–469 (amorce Séq BRAF 464 à 469)	24 µL
PCR Primer BRAF 600 (amorce PCR BRAF 600)	24 µL
PCR Primer BRAF 464–469 (amorce PCR BRAF 464 à 469)	24 µL
PyroMark PCR Master Mix (Master Mix PCR PyroMark), 2x	850 µL
CoralLoad® Concentrate (CoralLoad® concentré), 10x	1,2 mL
H ₂ O	3 x 1,9 mL
Unmethylated Control DNA (ADN témoin non méthylé), 10 ng/µL	100 µL

Tampons et réactifs *therascreen* (boîte n° 2/2)

Tampons et réactifs	
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, 10x (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	1 180 μ L
dCTP	1 180 μ L
dGTP	1 180 μ L
dTTP	1 180 μ L
<i>therascreen BRAF Pyro Kit Handbook</i> (en anglais)	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 d'ADN », page 14)
 - 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. 9019063 ou 9019062)†
 - Plaque PyroMark Q24 (n° réf. 979301)†
 - Cartouche PyroMark Q24 (n° réf. 979302)†
 - Station de travail sous vide PyroMark Q24 (n° réf. 9001515 ou 9001517)*†
 - Agitateur de plaques* pour l'immobilisation des billes
 - 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 kit 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 %)‡

* S'assurer 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.

‡ Ne pas utiliser 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* BRAF Pyro.

Tableau 1. Agitateurs de plaques recommandés avec le kit *therascreen* BRAF Pyro

Fabricant	Produit	Numéro de référence
Eppendorf	Thermomixer comfort (appareil de base)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik Gmbh	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Plaques à 24 puits recommandées

Les plaques à 24 puits répertoriées dans le Tableau 2 sont recommandées avec le kit *therascreen* BRAF Pyro.

Tableau 2. Plaques à 24 puits recommandées pour une utilisation avec le kit *therascreen* BRAF Pyro

Fabricant	Produit	Numéro de référence
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Avertissements et précautions

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 répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

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

Remarque : l'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants.

- Pour obtenir des résultats optimaux, se conformer au manuel de l'utilisateur de manière rigoureuse. Il n'est pas recommandé de diluer les réactifs d'une autre manière que celle décrite dans ce manuel dans la mesure où les performances en seraient affectées.
- Le déroulement des opérations a été légèrement modifié (voir « Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 21, « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 23 et « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 31) par rapport à la révision R1 du *Manuel du kit theascreen BRAF Pyro*.
- Les composants de ce produit suffisent pour réaliser 24 réactions au cours de cinq analyses indépendantes maximum.
- Utiliser des pointes de pipettes stériles avec des filtres (pour la configuration PCR).
- Conserver et procéder à l'extraction du matériel positif (prélèvements, témoins positifs et amplicons) séparément de tous les autres réactifs puis les ajouter au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Décongeler complètement tous les composants à température ambiante (de 15 à 25 °C) avant de commencer un test.
- Une fois qu'ils sont décongelés, mélanger les composants (en pipetant l'ensemble de manière répétée ou en les passant à l'agitateur à pulsations multiples) et les passer brièvement à la centrifugeuse.
- La détermination du statut mutationnel ne doit jamais reposer sur des résultats marqués « Failed » (échec).

Stockage et manipulation des réactifs

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

Les tampons et réactifs *therascreen* (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 minimaliser 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 3 cycles de congélation/décongélation.

Remarque : les nucléotides ne doivent pas être congelés.

Le kit *therascreen* BRAF 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 extrait d'échantillons fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE).

Procédure

Isolement d'ADN

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.

Les kits de QIAGEN[®] apparaissant dans le tableau 3 sont recommandés pour la purification de l'ADN provenant des échantillons de type humain destinés à être utilisés avec le kit *therascreen* BRAF Pyro. Effectuer la purification de l'ADN conformément aux instructions des manuels du kit.

Tableau 3. Kits de purification de l'ADN recommandés pour l'utilisation avec le kit *therascreen* BRAF Pyro

Matériel d'échantillonnage	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

* Suivre le protocole d'utilisation du tissu inclus en paraffine. Le kit EZ1 DNA Tissue 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).

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 type sauvage pour générer une plaque entière de résultats. Pour obtenir des détails, consulter le protocole EP17-A du CLSI « Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline ».

À effectuer avant de commencer

- Si le BRAF Plug-In Report n'a pas été installé, créer une configuration de test (voir l'Annexe A : Préparation des tests *therascreen* BRAF Pyro, page 50). Cette configuration n'est nécessaire qu'une seule fois, avant le premier test *therascreen* BRAF Pyro. Si le BRAF Plug-in Report a été installé, des configurations de test prédéfinies sont disponibles dans le raccourci du navigateur du logiciel PyroMark Q24, sous « Example Files/PyroMark Setups/BRAF ». Vous pouvez obtenir le BRAF Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com.

Procédure

1. Cliquer sur dans la barre d'outils.

Un nouveau fichier d'analyse est créé.

2. Entrer les paramètres de l'analyse (voir « Paramètres de l'analyse », page 16).

3. Préparer la plaque en ajoutant des tests pour le codon 600 et les codons 464 à 469 aux puits correspondant aux échantillons à analyser.

Remarque : un échantillon négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.

Remarque : inclure un échantillon avec ADN témoin non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage (voir « Témoins », page 6).

4. Lorsque l'analyse est paramétrée et prête à être effectuée sur le système PyroMark Q24, imprimer 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. Sélectionner « Pre Run Information » (informations pré-analyse) dans le menu « Tools » (outils), puis, lorsque le rapport apparaît, cliquer sur .

5. Fermer le fichier d'analyse et le copier sur une clé USB (fournie avec le système) à l'aide de Windows® Explorer.

Remarque : 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 recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 21).

Pour analyser la plaque sur le système PyroMark Q24, voir « Protocole 5 : Mettre sous tension le 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 le fichier est renommé, le nom de l'analyse change également.
Méthode de l'instrument :	Sélectionner 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) :	Facultatif : entrer l'identifiant de la plaque PyroMark Q24.
« Barcode » (Code-barres) :	Facultatif : entrer un numéro de code-barres pour la plaque ou, si un lecteur de code-barres est connecté à l'ordinateur, placer le curseur de la souris dans la zone de texte « Barcode » (code-barres) et scanner le code-barres.
Kit and reagent ID (Identifiant du réactif et du kit) :	Facultatif : entrer le numéro de lot du kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro à utiliser. Le numéro de lot se trouve sur l'étiquette du produit. Remarque : nous recommandons d'entrer les identifiants du réactif et du kit pour pouvoir remonter à la source de tout problème inattendu lié aux réactifs.
Run note (Remarque à propos de l'analyse) :	Facultatif : entrer une remarque à propos des contenus ou des objectifs de l'analyse.

Ajouter des fichiers de test

Il y a deux façons d'ajouter un test à un puits :

- Faire un clic droit sur le puits et sélectionner « Load Assay » (charger le test) dans le menu contextuel.
- Sélectionner le test dans le raccourci du navigateur puis cliquer sur le test et le faire glisser jusqu'au puits.

Les puits répondent à un code de couleurs selon les tests chargés.

Entrer les identifiants et les remarques liées à l'échantillon

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

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

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

Ce protocole est utilisé pour l'amplification par PCR d'une région contenant le codon 600 et pour l'amplification par PCR séparée d'une région contenant les codons 464 à 469 à l'aide du kit *therascreen* BRAF 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**.
- Préparer 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.
- Utiliser des pointes jetables contenant des filtres hydrophobes pour minimaliser la contamination croisée.

À effectuer avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes avec les amorces PCR, les passer brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Si nécessaire, régler la concentration de l'ADN témoin et de celui de l'échantillon entre 0,4 et 2 ng/μL.

Procédure

- 1. Décongeler tous les composants nécessaires (voir tableau 4).**
Bien les mélanger avant de les utiliser.
- 2. Préparer un mélange réactionnel pour chaque ensemble d'amorces PCR conformément au tableau 4.**

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

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

Tableau 4. Préparation du mélange réactionnel pour chaque mélange d'amorce PCR

Composant	Volume/réaction (µL)
Master Mix PCR PyroMark, 2x	12,5
CoralLoad concentré 10x	2,5
Amorce PCR BRAF codon 600 ou amorce PCR BRAF codons 464 à 469	1,0
Eau (H ₂ O, fournie)	4,0
Volume total	20,0

3. Mélanger complètement le mélange réactionnel et en verser 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. Ajouter 5 µL d'ADN matrice (entre 2 et 10 ng d'ADN génomique) aux tubes de PCR individuels (voir le tableau 5) et bien mélanger.

Remarque : un échantillon de témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.

Remarque : inclure un échantillon avec ADN témoin non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage (voir « Témoins », page 6).

Tableau 5. Préparation de la PCR

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

5. Programmer le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant à l'aide des conditions décrites dans le tableau 6.

Tableau 6. 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. Placer les tubes de PCR dans le thermocycleur et démarrer le programme de cycle.
7. Après l'amplification, continuer avec le « Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 21.

Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte 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.

À effectuer avant de commencer

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

Points importants avant de commencer

- Le déroulement des opérations a été légèrement modifié par rapport à la révision précédente du Manuel du kit *therascreen* BRAF Pyro (version 1, juillet 2011, étape 2).

Procédure

1. Agiter doucement le flacon contenant la sépharose-streptavidine haute performance jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
2. Préparer un master mix pour l'immobilisation de l'ADN conformément au tableau 7. Préparer un volume de 10 % supérieur à ce qui est nécessaire pour le nombre total de réactions à effectuer.

Tableau 7. Master mix pour l'immobilisation de l'ADN

Composant	Volume/échantillon (µL)
Sépharose streptavidine haute performance	1
Tampon de liaison PyroMark	40
Eau (H ₂ O, fournie)	29
Volume total	70

Remarque : ce protocole s'applique au Streptavidin Sepharose High Performance avec un numéro de lot 10057037 ou supérieur. En utilisant les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) avec un numéro de lot inférieur à 10057037, le volume des billes utilisées par échantillon doit être augmenté à 2 µL, tout en diminuant le volume d'eau de manière correspondante.

3. **Ajouter 70 μ L 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 15).**

4. **Ajouter 10 μ L de produit PCR biotinylé provenant du Protocole 2 à chaque puits contenant le master mix tel que prédéfini dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 15).**

Remarque : le volume total par puits doit être de 80 μ L après l'ajout du master mix et du produit PCR.

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

Remarque : vérifier qu'aucune fuite entre les puits n'est possible.

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

Remarque : pendant ce temps, préparer la station de travail sous vide PyroMark Q24 pour la préparation des échantillons, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

7. **Commencer immédiatement le « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 23.**

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), l'agiter 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

- Avant d'ouvrir les tubes avec les amorces de séquence, les passer brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Ajouter les 2 amorces de séquences différentes de la même manière que ce qui est prédéfini pour la plaque dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 15), selon la région de l'analyse (codons 600 ou codons 464 à 469).
- Le déroulement des opérations a été légèrement modifié par rapport à la révision précédente du *Manuel du kit thetascreen BRAF Pyro* (version 1, juillet 2011, étape 18). Ne pas raccourcir le temps de refroidissement des échantillons après le réchauffement à 80 °C.
- Tester régulièrement le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*), et les remplacer aux échéances indiquées.

À effectuer avant de commencer

- Placer un portoir de plaque PyroMark Q24 sur un bloc chauffant pré-chauffé à 80 °C pour l'étape 17. Laisser 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, diluer pour obtenir une solution de travail concentrée 1x en ajoutant 225 mL d'eau ultra-pure à 25 mL de tampon de lavage PyroMark concentré 10x (volume final de 250 mL).

Remarque : 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. **Diluer une quantité suffisante de chaque amorce de séquence, Amorce Séq BRAF 600 ou Amorce Séq BRAF 464 à 469, dans le tampon d'hybridation PyroMark tel que décrit dans le tableau 8.**

Préparer 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).

Ne pas diluer et ne pas stocker davantage d'amorce de séquence.

Tableau 8. Exemple de dilution pour les amorces de séquence

Composant	Volume/ échantillon (μL)	Volume pour 9 + 1 réactions (μL)
Amorce Séq BRAF 600 ou Amorce Séq BRAF 464 à 469	0,8	8
Tampon d'hybridation PyroMark	24,2	242
Volume total	25	250

2. **Ajouter 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 15).**

Remarque : garder 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 l'utiliser lors de la préparation et du déplacement de la plaque.

3. **Placer la plaque (ou les barrettes) de PCR du Protocole 3 et la plaque PyroMark Q24 sur la table de travail (figure 3).**

Inspecter la plaque de PCR et veiller à ce que les billes de sépharose soient dans la solution.

Remarque : s'assurer que la plaque est orientée de la même façon que lors du chargement des échantillons.



Figure 3. Placement de la plaque (ou des barrettes) de PCR et de la plaque PyroMark Q24 sur la station de travail sous vide

4. Mettre l'outil sous vide en activant la commande de vide.
5. Plonger 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 matriciel immobilisé. Maintenir les sondes en place pendant 15 secondes. Faire preuve de vigilance lors du retrait de l'outil à vide.

Remarque : les billes de sépharose se déposent rapidement. S'il s'est écoulé plus d'une minute depuis l'agitation de la plaque (ou des barrettes), l'agiter à nouveau pendant 1 minute avant de capturer les billes.

Inspecter la plaque de PCR pour vérifier que les échantillons ont été prélevés en totalité par l'outil à vide.

6. Transférer l'outil à vide dans la cuve contenant 40 mL d'éthanol à 70 % (figure 3). Purger les sondes à filtre pendant 5 secondes.
7. Transférer l'outil à vide dans la cuve contenant 40 mL de solution de dénaturation (figure 3). Purger les sondes à filtre pendant 5 secondes.
8. Transférer l'outil à vide dans la cuve contenant 50 mL de tampon de lavage (figure 3). Purger les sondes à filtre pendant 10 secondes.
9. Secouer 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 4).

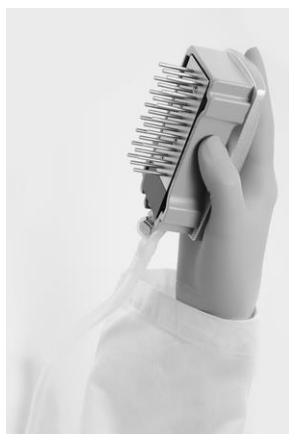


Figure 4. Illustration de l'outil à vide à plus de 90° par rapport à l'horizontale

10. Fermer la commande de vide de l'outil (« Off ») avec l'outil à vide maintenu au-dessus de la plaque PyroMark Q24.

11. Libérer 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.

Remarque : veiller à ne pas endommager la surface de la plaque PyroMark Q24 en l'éraflant avec les sondes à filtre.

12. Transférer l'outil à vide dans la cuve contenant l'eau ultra-pure (figure 3) et l'agiter pendant 10 secondes.

13. Laver les sondes à filtre en les plongeant dans l'eau ultra-pure (figure 3) et en y appliquant le vide. Purger les sondes avec 70 mL d'eau ultra-pure.

14. Secouer 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 4).

15. Fermer la commande de vide de l'outil (« Off ») et placer l'outil à vide en position de repos (« P »).

16. Éteindre la pompe à vide.

Remarque : à la fin de la journée de travail, les déchets liquides et les solutions restantes doivent être rejetés et il convient de 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 53).

17. Faire 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. Retirer la plaque PyroMark Q24 du portoir de plaque chaud et la placer 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. Continuer avec le « Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24 », page 28.**

Protocole 5 : Mettre sous tension le 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 d'utilisation du PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

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 15), 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

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

Procédure

1. **Dissoudre les mélanges d'enzyme et de substrat lyophilisés respectivement dans 620 µL d'eau (H₂O, fournie).**
2. **Mélanger le flacon doucement.**

Remarque : ne pas le passer à l'agitateur !

Remarque : pour garantir la dissolution complète du mélange, laisser à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant 5 à 10 minutes. S'assurer 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, placer les flacons de réactifs sur un lit de glace[§] ou dans un réfrigérateur.

3. **Laisser les réactifs et la cartouche PyroMark Q24 atteindre la température ambiante (20 à 25 °C).**
4. **Placer la cartouche PyroMark Q24 de façon que son étiquette soit orientée vers vous.**

[§] 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.

5. **Charger la cartouche PyroMark Q24 avec les volumes appropriés de nucléotides et de mélanges d'enzymes et de substrats, conformément à la figure 5.**

S'assurer qu'aucune bulle d'air n'est transférée de la pipette vers la cartouche.

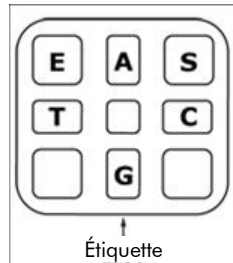


Figure 5. Illustration de la cartouche PyroMark Q24 vue du dessus. Les annotations correspondent à l'étiquette sur les flacons de réactifs. Ajouter le mélange d'enzymes (**E**), le mélange de substrats (**S**) et les nucléotides (**A**, **T**, **C**, **G**) en fonction des informations de volume indiquées dans le rapport d'informations de pré-analyse, accessible dans le menu « Tools » (outils) de la configuration de l'analyse.

6. **Ouvrir le support de cartouche et y insérer la cartouche remplie de réactifs avec l'étiquette vers l'extérieur. Pousser la cartouche entière à l'intérieur puis vers le bas.**
7. **S'assurer que la ligne est visible en face de la cartouche puis fermer la porte.**
8. **Ouvrir le dispositif porte-plaques et placer la plaque sur le bloc chauffant.**
9. **Fermer le dispositif porte-plaques et le couvercle de l'instrument.**
10. **Insérer la clé USB (contenant le fichier d'analyse) dans le port USB sur la face avant de l'instrument.**

Remarque : ne pas retirer la clé USB tant que l'analyse n'est pas terminée.

11. **Sélectionner « Run » (analyse) dans le menu principal (à l'aide des boutons ▲ et ▼ de l'écran) puis appuyer sur « OK ».**
12. **Sélectionner le fichier d'analyse à l'aide des boutons ▲ et ▼ à l'écran.**

Remarque : pour visualiser le contenu d'un dossier, sélectionner le dossier puis appuyer sur « Select » (sélectionner). Pour retourner à la page précédente, appuyer sur « Back » (retour).

13. **Lorsque le fichier d'analyse est sélectionné, appuyer 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, appuyer sur « Close » (fermer).**
15. **Retirer la clé USB.**
16. **Ouvrir le couvercle de l'instrument.**

- 17. Ouvrir la porte de la cartouche et sortir la cartouche de réactifs en la soulevant puis en la tirant vers l'extérieur.**
- 18. Fermer la porte.**
- 19. Ouvrir le dispositif porte-plaques et retirer la plaque du bloc chauffant.**
- 20. Fermer le dispositif porte-plaques et le couvercle de l'instrument.**
- 21. Jeter la plaque et nettoyer la cartouche conformément aux instructions de la fiche produit fournie avec la cartouche.**
- 22. Analyser 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 mutation d'un test BRAF terminé à l'aide du logiciel PyroMark Q24.

Procédure

1. **Insérer la clé USB contenant le fichier de l'analyse effectuée dans le port USB de l'ordinateur.**
2. **Déplacer le fichier d'analyse depuis la clé USB vers l'endroit souhaité sur l'ordinateur à l'aide de Windows Explorer.**
3. **Ouvrir le fichier d'analyse en mode quantification des allèles 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. **Il existe 2 méthodes pour analyser le test. Si vous utilisez le BRAF Plug-In Report, aller à l'étape 5. Si vous utilisez l'analyse de la quantification des allèles intégrée au système PyroMark Q24, aller à l'étape 6.**

Remarque : nous recommandons fortement d'utiliser le BRAF Plug-In Report pour l'interprétation des résultats. Vous pouvez obtenir le BRAF Plug-In Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com. Ce rapport garantit que les valeurs de LoD respectives (Tableau 9) et les différentes fonctions « Sequences to Analyze » (séquences à analyser) sont utilisées pour détecter automatiquement toutes les mutations.

Remarque : les mutations complexes des codons 600 et 469 de BRAF ne peuvent pas être analysées avec l'analyse de quantification des allèles dans le logiciel PyroMark Q24. Nous recommandons d'utiliser le BRAF Plug-in Report pour l'analyse des mutations complexes des codons 600 et 469.

Remarque : certaines mutations ciblées du codon 600 ainsi que les mutations G469A et G469S peuvent ne pas être distinguées précisément à des niveaux de mutation inférieurs à 10 %.

5. **Utilisation du BRAF Plug-In Report :**
pour générer un rapport, sélectionner « AQ Add On Reports/BRAF » (rapports de l'option quantification des allèles/BRAF) à partir de « Reports » (rapports) dans le menu (voir figure 6).

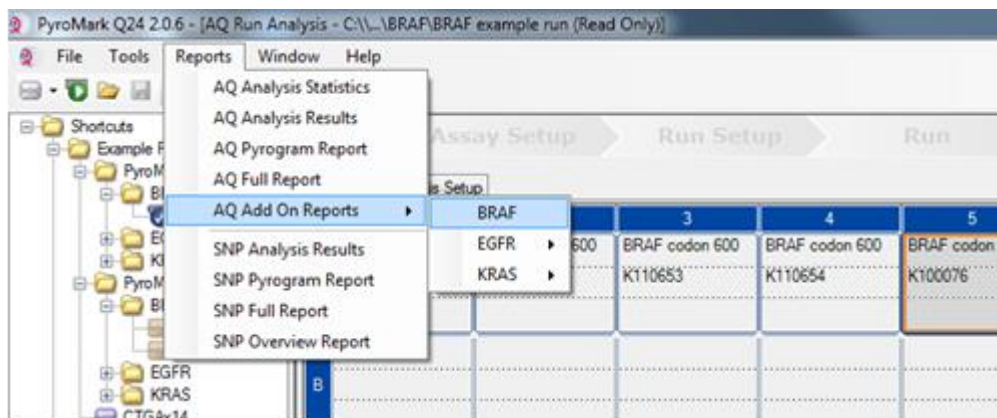


Figure 6. Menu BRAF Plug-in Report

Les puits seront automatiquement analysés pour toutes les mutations pour lesquelles la LoD est donnée dans le tableau 9. Les résultats seront présentés dans un tableau récapitulatif (figure 7), suivi des résultats détaillés, qui incluent les pyrogrammes et la qualité de l'analyse.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4,8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34,6	1798 1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26,4	1798 1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29,0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27,8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Figure 7. BRAF Plug-in Report

6. Utilisation de l'analyse de quantification des allèles : Pour analyser le test et obtenir un aperçu des résultats, cliquer sur l'un des boutons « Analyze ».



Analyser tous les puits.



Analyser le puits sélectionné.

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

7. **Pour générer un rapport, sélectionner « AQ Full Report » (rapport complet de quantification des allèles) ou « AQ Analysis Results » (résultats de l'analyse de quantification des allèles) 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 et le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 [PyroMark Q24 User Manual]).

Remarque : le rapport des résultats de l'analyse de quantification des allèles doit être utilisé pour documenter et interpréter la quantification des allèles. 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, qui peut être affiché par un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Les pics mesurés doivent avoir la même hauteur que les barres d'histogramme.

Réanalyses d'échantillons sans mutation GTG → GAG détectée ou présentant une évaluation de la qualité marquée d'un « Check » (à vérifier) ou « Failed » (échec)

La mutation la plus fréquente dans le gène BRAF est GTG → GAG, au niveau du nucléotide 1799 (deuxième base du codon 600). C'est pourquoi la fonction « Sequence to Analyze » standard définie dans la configuration de test concerne cette mutation (Voir « Annexe A : Préparation des tests theascreen BRAF Pyro », page 50).

Nous recommandons fortement de réanalyser tous les échantillons sans mutations détectées avec la fonction standard « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), ainsi que les échantillons dont l'évaluation de la qualité a été marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec), ou dont les pics ne concordent pas avec la hauteur des barres d'histogramme. Les évaluations de qualité « Check » (à vérifier) et « Failed » (échec) peuvent indiquer une mutation rare qui n'est pas analysée par la fonction « Sequence to Analyze » standard, donnant lieu à des déviations de la hauteur de pic.

Pour réanalyser et cibler les mutation du nucléotide 1798 ou 1799 du codon 600, accéder à « Analysis Setup » (configuration d'analyse) et modifier la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) par l'une des fonctions supplémentaires « Sequence to Analyze » listées dans « Annexe A : Préparation des tests theascreen BRAF Pyro », page 50. Cliquer sur « Apply » (appliquer), puis sur « To All » (à tous) lorsque la

fenêtre « Apply Analysis setup » (appliquer la configuration de l'analyse) s'affiche.

Les fréquences de mutations mises à jour dans le gène BRAF humain au niveau du codon 600 et des codons 464 à 469 sont fournies en ligne par le Sanger Institute sur le site www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Remarque : après avoir modifié la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), s'assurer que le seuil de la hauteur de pic mononucléotidique est réglé sur 30 RLU.

Remarque : des mutations rares ou inattendues peuvent être présentes dans la région séquencée et peuvent être analysées à l'aide d'une autre fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) en prenant en compte les mutations inattendues.

Remarque : si les pics mesurés ne concordent pas avec la hauteur des barres d'histogramme et qu'une mutation rare ou inattendue ne permet pas d'expliquer ce phénomène, il est recommandé de réanalyser l'échantillon.

Interprétation des résultats

Interprétation des résultats d'analyse et détection des mutations de faible niveau

Il est fortement recommandé d'inclure un ADN témoin non méthylé dans chaque analyse à des fins de comparaison et en tant que témoin pour le bruit de fond. La fréquence mesurée pour l'échantillon témoin doit être inférieure ou égale à la limite du blanc (LoB).

Tous les échantillons doivent être examinés par rapport à la limite de détection (LoD, Tableau 9) et interprétés comme suit.

- Fréquence de mutation $< \text{LoD}$: mutation non détectée
- Fréquence de mutation $\geq \text{LoD}$ et $\leq \text{LoD} + 3$ unités % : mutation de faible niveau potentielle

Remarque : si vous utilisez le BRAF Plug-In Report (voir l'étape 5 de la section « Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24 », page 28), un avertissement sera diffusé si cela se produit.

Les échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle a été rapportée ne doivent être considérés positifs pour cette mutation que si ce résultat est confirmé lors d'une nouvelle analyse en duplicat avec un échantillon contenant de l'ADN témoin non méthylé. Le résultat des deux duplicats doit être $\geq \text{LoD}$ et différent du résultat de l'échantillon témoin. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être considéré comme « Pas de mutation détectée ».

■ Fréquence de mutation $>$ LoD + 3 unités % : mutation

Si vous utilisez le BRAF Plug-In Report, cela sera effectué automatiquement.

Remarque : il est recommandé d'utiliser le BRAF Plug-In Report pour l'interprétation des résultats. Pour un examen plus approfondi des échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle est rapportée, nous recommandons d'analyser également l'échantillon manuellement dans le logiciel de l'application (p. ex., pour comparaison avec la fréquence mutationnelle de l'échantillon témoin).

Remarque : certaines mutations ciblées du codon 600 ainsi que les mutations G469A et G469S peuvent ne pas être distinguées précisément à des niveaux de mutation inférieurs à 10 %.

Remarque : une fréquence mesurée supérieure à la LoB dans l'échantillon témoin indique un bruit de fond supérieur à la normale lors de l'analyse concernée, susceptible d'influer sur la quantification des allèles, en particulier pour les faibles niveaux mutationnels. Dans ce cas, les fréquences mesurées incluses dans l'intervalle entre la LoD (Tableau 9) et la LoD + 3 unités % ne doivent pas servir de base à l'estimation du statut mutationnel. Il est recommandé de réanalyser les échantillons contenant une mutation de niveau faible potentielle.

Remarque : une décision relative au traitement des patients atteints de cancer ne doit pas s'appuyer uniquement sur le statut mutationnel du gène BRAF.

Tableau 9. LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V46)
Codon 600 (GTG), tel que testé en orientation antisens (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Codon 469 (GGA), tel que testé en orientation antisens (TCC)				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
Codon 466 (GGA), tel que testé en orientation antisens (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Codon 464 (GGA), tel que testé en orientation antisens (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* Catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), disponible en ligne sur le site du Sanger Institute à l'adresse www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Niveau de mutation le plus bas pour un échantillon donnant lieu à une fréquence mesurée \geq LoD.

Résultats représentatifs

Les résultats représentatifs de Pyrogram sont présentés dans les figures 8 à 10.

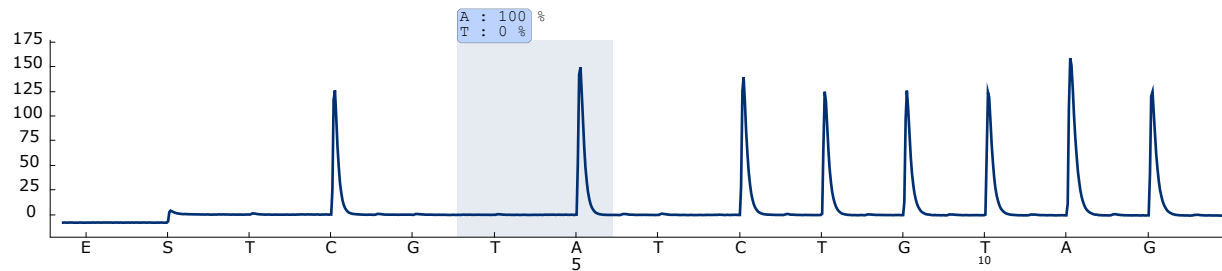


Figure 8. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau du codon 600 avec la fonction « Sequence to analyze » (séquence à analyser) CWCTGTAGC

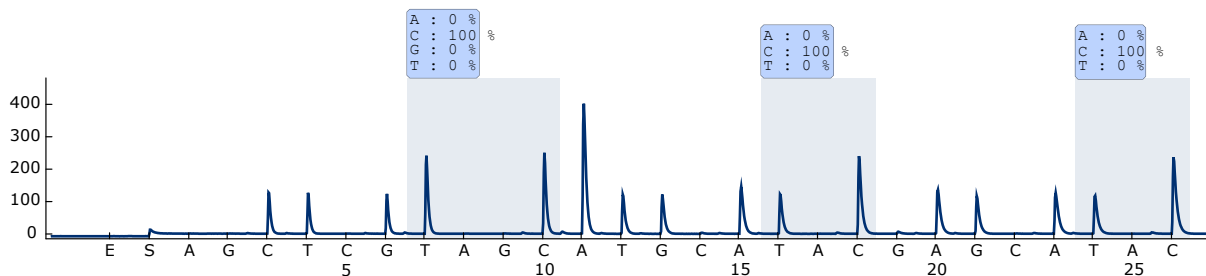


Figure 9. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau des codons 464 à 469 avec la fonction « Sequence to analyze » (séquence à analyser) CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA

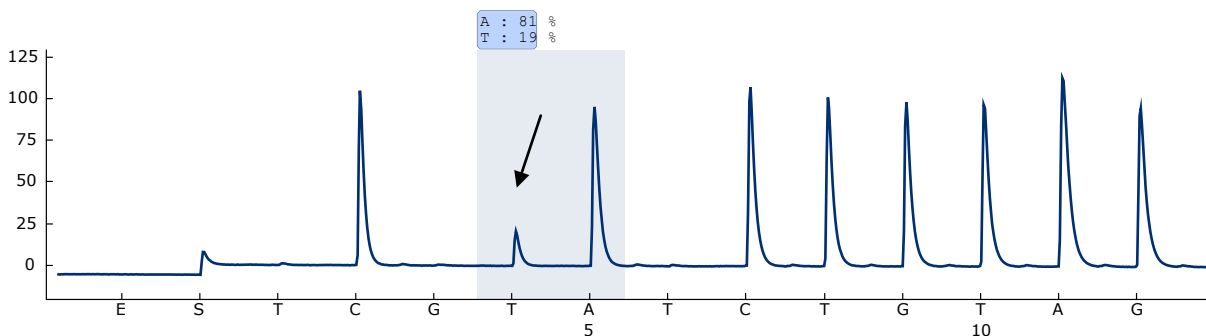


Figure 10. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse des échantillons présentant une mutation GTG → GAG (V600E) au niveau de la base 2 du codon 600 (nucléotide 1799, indiqué par une flèche) à l'aide de la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) CWCTGTAGC

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 d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les techniciens 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 la quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Remarque : se reporter au Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) 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. Éviter de placer des échantillons présentant des intensités de signal élevées près de puits de témoin négatif. |
| b) Contamination PCR | Utiliser des pointes de pipette stériles avec filtres. Stocker et extraire 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. Analyser les échantillons de PCR à l'aide d'une technique électrophorétique (par exemple, le système avancé 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. Veiller à plonger lentement l'outil à vide dans les échantillons et s'assurer que la géométrie de la plaque (ou les barrettes) de PCR utilisée pour l'immobilisation permette de prélever la totalité des échantillons.
- Tester régulièrement le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*), et les remplacer aux échéances indiquées.
- En cas d'avertissement marqué d'un « Check » (à vérifier), comparer attentivement le tracé de pyrogramme et l'histogramme, affichables à l'aide d'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.
- b) Mutation non définie dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser)
- Ajuster la séquence à analyser dans la configuration du test (voir « Annexe A : Préparation des tests *therascreen* BRAF Pyro », page 50) et effectuer une réanalyse.
- c) Mutation inattendue rare
- Une évaluation de la qualité marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec) peut être provoquée par un modèle de pics inattendu. Cela peut indiquer une mutation inattendue qui n'est pas analysée par la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) fournie. Ces échantillons doivent être analysés à l'aide de la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) alternative en raison des mutations inattendues.

Commentaires et suggestions

- d) Avertissement relatif à une déviation de la hauteur de pic maximal au niveau d'une distribution
- Le tracé de pyrogramme doit être comparé attentivement à l'histogramme, affichable à l'aide d'un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Si les pics mesurés ne concordent pas avec la hauteur des barres d'histogramme et qu'une mutation rare ne permet pas d'expliquer ce phénomène, il est recommandé de réanalyser l'échantillon.
- e) Message d'avertissement « High peak height deviation » (déviation de la hauteur de pic maximale) au niveau d'une distribution 6 avec l'analyse du codon 600 avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze »)
CAYCTGTAGC
- Le tracé de pyrogramme doit être comparé attentivement à l'histogramme, affichable à l'aide d'un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Si le bruit de fond au niveau de la distribution T6 est en deçà du niveau attendu et que les pics mesurés restants concordent avec la hauteur des barres d'histogramme, l'avertissement et l'évaluation de qualité « Check » (à vérifier) ou « Failed » (échec) peuvent être ignorés.
- f) Message d'avertissement « High peak height deviation » (déviation de la hauteur de pic maximale) au niveau d'une distribution 3 ou 4 avec l'analyse du codon 600 avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze »)
CVCTGTAGC
- Le tracé de pyrogramme doit être comparé attentivement à l'histogramme, affichable à l'aide d'un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Si le bruit de fond au niveau de la distribution G3 ou T4 est en deçà du niveau attendu et que les pics mesurés restants concordent avec la hauteur des barres d'histogramme, l'avertissement et l'évaluation de qualité « Check » (à vérifier) ou « Failed » (échec) peuvent être ignorés.

Commentaires et suggestions

- g) Le message d'avertissement « The sequence contains less reference peaks than required » (la séquence contient un nombre de pics de référence insuffisant) apparaît dans l'analyse du codon 600 avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze »)
CVCTGTAGC
- Si les pics mesurés concordent avec la hauteur des barres d'histogramme, l'avertissement et l'évaluation de qualité « Check » (à vérifier) peuvent être ignorés.

Bruit de fond élevé

- a) Stockage des nucléotides incorrect
- Stocker les nucléotides entre 2 et 8 °C. Le stockage entre -15 et -25 °C peut provoquer une augmentation du bruit de fond.
- b) Temps de refroidissement des échantillons trop court avant l'analyse de pyro-séquençage
- Laisser les échantillons sur un portoir de plaque PyroMark Q24 à température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Ne pas raccourcir le temps de refroidissement.
- c) Contamination de la cartouche
- Nettoyer soigneusement la cartouche, comme indiqué dans la fiche produit. Conserver la cartouche à l'abri de la lumière et de la poussière.

Aucun signal pour le témoin positif (ADN témoin non méthylé)

- a) Mélange d'enzymes ou de substrats insuffisant pour tous les puits
- Veiller à 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
- Préparer les réactifs *therascreen* conformément aux instructions fournies à la section « Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24 », page 28.

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|---|
| 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. Tester le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 (<i>PyroMark Q24 User Manual</i>), et les remplacer si nécessaire. Recommencer 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* BRAF 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 et limite de détection

La limite du blanc (LoB) et la limite de détection (LoD) ont été déterminées pour un certain nombre de mutations à l'aide de mélanges de plasmides (tableau 10). LoB et LoD ont été déterminées 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 la LoB représentent la fréquence mesurée obtenue avec un échantillon de type sauvage. Les valeurs de la LoD représentent le signal le plus bas (fréquence mesurée) qui peut être considéré comme positif pour la mutation correspondante.

Mutations (GTG → GGG) et (GTG → GCG) au niveau du codon 600 et (GGA → GAA) au niveau du codon 464

Pour ces mutations, soit les mesures de blanc (LoB) étaient constamment proches de 0 unité % ($n = 72$), donnant lieu à une distribution non gaussienne, soit les mesures d'échantillons avec faibles taux de mutation avaient une distribution non gaussienne. La LoD a donc été déterminée à l'aide de différentes méthodes, conformément aux recommandations du protocole EP17-A du CLSI. Le signal le plus faible indiquant la présence d'une mutation (LOD) à ces positions a été défini sur 2 unités % au-dessus du niveau de ligne de base respective définie par le 95^{ème} centile des mesures de blanc. Lors de l'analyse d'un échantillon avec le niveau de mutation indiqué entre parenthèses au tableau 10, 95 % des résultats ($n = 72$) ont donné lieu à un signal pouvant être considéré comme positif (\geq LoD).

Tableau 10. LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V46)
Codon 600 (GTG), tel que testé en orientation antisens (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Codon 469 (GGA), tel que testé en orientation antisens (TCC)				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
Codon 466 (GGA), tel que testé en orientation antisens (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Codon 464 (GGA), tel que testé en orientation antisens (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* Catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), disponible en ligne sur le site du Sanger Institute à l'adresse www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Niveau de mutation le plus bas pour un échantillon donnant lieu à une fréquence mesurée \geq LoD.

Remarque : ces valeurs s'appuient sur des analyses où des mélanges de plasmides porteurs du type sauvage ou de la séquence mutée respective ont été utilisés comme matrice pour l'amplification PCR.

Remarque : il est recommandé que le laboratoire confirme la méthode à utiliser.

Linéarité

La linéarité a été déterminée à l'aide de mélanges de plasmides porteurs du type sauvage ou de la séquence mutante pour la mutation V600E (GTG → GAG) au niveau du codon 600 du gène BRAF. Les plasmides ont été mélangés dans des proportions permettant d'obtenir quatre niveaux de mutation (5, 10, 30 et 50 %). Chaque mélange a été analysé avec trois lots différents du kit *therascreen* BRAF 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. Ces résultats sont illustrés dans la figure 11 pour la mutation V600E (GTG → GAG) au niveau du codon 600.

Les résultats étaient linéaires, avec une non-linéarité autorisée de 5 unités % dans l'intervalle testé de 5 à 50 % de niveau de mutation.

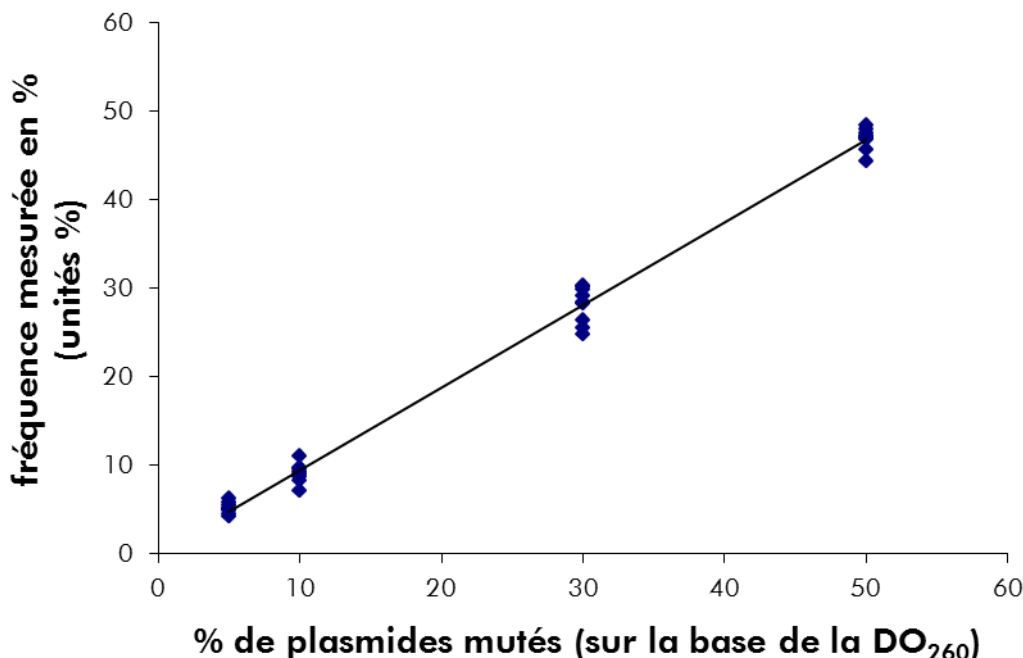


Figure 11. Linéarité pour la mutation V600E (GTG → GAG) au niveau du codon 600

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 de plasmides 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* BRAF 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 systèmes PyroMark Q24 et avec des lots du kit *therascreen* BRAF 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* BRAF Pyro.

Les estimations de la précision sont exprimées en tant qu'écart type des fréquences de mutation mesurées, en unités % (tableau 11). La répétabilité, la précision moyenne et la reproductibilité de la mutation V600E (GTG → GAG) au niveau du codon 600 étaient respectivement de 0,6-2,1, 0,7-1,8 et 0,8-2,1 unités %, dans les limites mesurées d'un niveau de mutation compris entre 5 et 50 %.

Tableau 11. Précision pour la mutation V600E (GTG → GAG) au niveau du codon 600*

% de plasmides mutés [†]	Répétabilité		Précision moyenne		Reproductibilité	
	Moy.	É.T.	Moy.	É.T.	Moy.	É.T.
5	5,2	0,6	4,4	0,7	5,1	0,8
10	9,1	1,0	9,6	1,0	9,6	1,3
30	28,1	2,1	27,9	1,8	28,3	2,1
50	46,9	1,2	46,3	1,5	47,9	1,7

* Toutes les valeurs sont exprimées en unités %. É.T. : écart type (n = 9).

[†] Fondé sur la mesure DO₂₆₀.

Évaluation diagnostique

Le kit *therascreen* BRAF Pyro a été évalué par comparaison au séquençage Sanger. L'ADN a été extrait de 100 échantillons de tumeurs cutanées fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE) et analysé à la recherche de mutations au niveau du codon 600 et des codons 464 à 469.

L'ADN a été isolé à l'aide du kit QIAamp DNA FFPE Tissue. L'analyse de pyro-séquençage a été réalisée avec le kit *therascreen* BRAF Pyro, sur le système PyroMark Q24 et le séquençage Sanger a été effectué sur l'ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Sur les 100 échantillons analysés, le statut mutationnel du codon 600 et des codons 464 à 469 a pu être déterminé dans tous les échantillons et dans 99 échantillons avec le séquençage Sanger et le kit *therascreen* BRAF Pyro, respectivement (tableaux 12 et 13).

Dans quatre des 100 échantillons, une mutation V600E (GTG → GAG) a été détectée par séquençage Sanger. Trois d'entre eux donnaient des résultats identiques avec le kit *therascreen* BRAF Pyro alors que l'analyse de pyro-séquençage a échoué pour seulement un échantillon pour le codon 600 en raison de faibles pics. Pour l'analyse des codons 464 à 469, cet échantillon présentait des pics suffisants mais considérablement plus faibles que les autres échantillons, ce qui indique que l'ADN était de mauvaise qualité. Aucune des mutations rares au niveau des codons 464 à 469 n'a été détectée, quelle que soit la méthode.

Si l'on excepte l'échantillon dont l'analyse par l'une des méthodes a échoué, le kit *therascreen* BRAF Pyro et le séquençage Sanger ont donné des résultats concordant à 100 % pour le codon 600 et les codons 464 à 469 (tableaux 12 et 13).

Tableau 12. Résultats des échantillons de tumeurs cutanées analysés pour le codon 600

		Séquençage Sanger			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro	Mutant	3	0	0	3
	Type sauvage	0	96	0	96
	Inconnu	1	0	0	1
	Total	4	96	0	100

Tableau 13. Résultats des échantillons de tumeurs cutanées analysés pour les codons 464 à 469

		Séquençage Sanger			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit therascreen BRAF Pyro	Mutant	0	0	0	0
	Type sauvage	0	99	0	99
	Inconnu	0	1	0	1
	Total	0	99	0	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 de tissus fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE). Les données de pyroséquençage ont été analysées à l'aide du BRAF Plug-in Report.






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, visitez notre base de données en ligne « QIAGEN Reference Database » à l'adresse www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou bien contactez les services techniques de QIAGEN ou votre distributeur local.

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage :

	Contient des réactifs pour <N> tests
<N>	
	À utiliser avant
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Numéro de référence
LOT	Numéro de lot
MAT	Numéro de matériel
COMP	Composants
CONT	Contient
NUM	Nombre
NaOH	Hydroxyde de sodium
GTIN	Code article international (GTIN)
	Limite de température
	Fabricant
	Consulter les instructions d'utilisation

Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou 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 des tests *therascreen* BRAF Pyro

Si le BRAF Plug-in Report a été installé, des configurations de test prédéfinies pour les codons 600 et 464 à 469 sont disponibles dans le raccourci du navigateur du logiciel PyroMark Q24, sous « Example Files/PyroMark Setups/BRAF ». Les étapes suivantes n'ont pas besoin d'être effectuées. Vous pouvez obtenir le BRAF Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com.

Nous recommandons vivement l'utilisation du BRAF Plug-In Report plutôt que de l'analyse manuelle. Les mutations complexes ne peuvent pas être ajoutées manuellement à une fonction « Sequence to Analyze ». Elles doivent être analysées à l'aide du plug-in. Après installation du plug-in ou à chaque fois qu'un nouveau logiciel est installé ou mis à niveau sur l'ordinateur, la fonction correcte du plug-in doit être vérifiée, comme indiqué dans le Guide rapide du BRAF Plug-In.

Si le BRAF Plug-In Report n'a pas été installé, le fichier du test doit être configuré manuellement avant la première analyse du test *therascreen* BRAF Pyro. Configurer le test du codon 600 et des codons 464 à 469 du BRAF à l'aide du logiciel PyroMark Q24, tel que décrit ci-dessous.

Procédure

Codon 600 de BRAF

A1. Cliquer sur  dans la barre d'outils puis sélectionner « New AQ Assay » (nouveau test de quantification des allèles).

**A2. Entrer la séquence suivante dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).
CWCTGTAGC**

Remarque : la mutation la plus fréquente au niveau du codon 600 est GTG → GAG dans le nucléotide 1799 (deuxième position).

La fonction « Sequence to Analyze » peut aussi être modifiée après l'analyse des mutations dans d'autres positions.

Pour savoir si les mutations sont présentes dans le nucléotide 1798 (première position), remplacer la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») par la suivante.

CAYTGTAGC

Pour d'autres mutations rares du nucléotide 1799, la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») **CVCTGTAGC** doit aussi être analysée.

Remarque : vérifier que le seuil pour la hauteur de pic mononucléotidique est réglé sur 30 RLU.

Remarque : les mutations complexes du codon 600 de BRAF ne peuvent pas être analysées avec l'analyse de quantification des allèles dans le logiciel PyroMark Q24 à l'aide de la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser). Nous recommandons d'utiliser le BRAF Plug-in Report pour l'analyse des mutations complexes du codon 600.

A3. Saisir manuellement l'ordre de distribution (« Dispensation Order ») suivant :
TCGTATCTGTAG

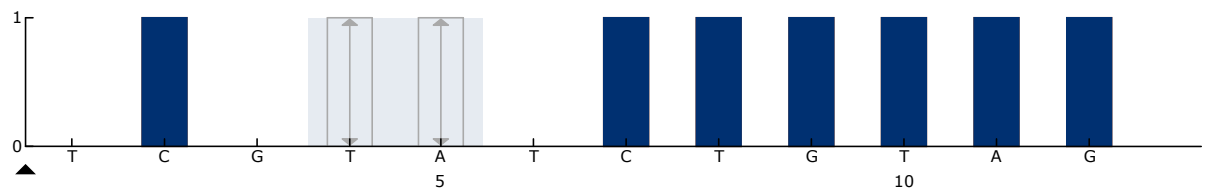


Figure 12. Histogramme du codon 600 (nucléotide 1799) avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») CWCTGTAGC

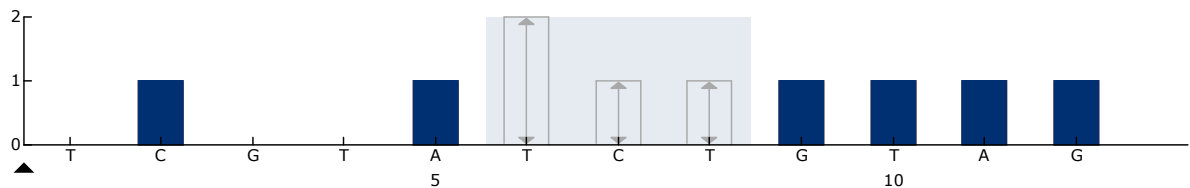


Figure 13. Histogramme du codon 600 (nucléotide 1798) avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») CAYTGTAGC

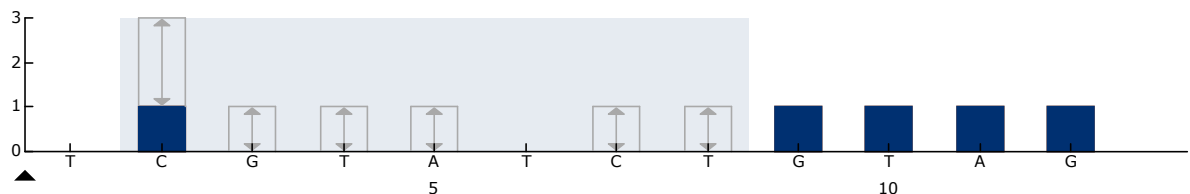


Figure 14. Histogramme du codon 600 (nucléotide 1799) avec la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») CVCTGTAGC

A4. Cliquer sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et augmenter 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.

A5. Cliquer sur  dans la barre d'outils et sauvegarder le test sous le nom « BRAFcodon 600 ».

Codons 464 à 469 du BRAF

A1. Cliquer sur  dans la barre d'outils puis sélectionner « **New AQ Assay** » (nouveau test de quantification des allèles).

A2. Entrer la séquence suivante dans « **Sequence to Analyze** » (séquence à analyser).

CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA

Remarque : la mutation complexe du codon 469 de BRAF ne peut pas être analysée avec l'analyse de quantification des allèles dans le logiciel PyroMark Q24 à l'aide de la fonction « **Sequence to Analyze** » (séquence à analyser). Nous recommandons d'utiliser le BRAF Plug-in Report pour l'analyse de la mutation complexe du codon 469.

A3. Ajouter manuellement l'ordre de distribution (« **Dispensation Order** ») suivant.

AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATAAC

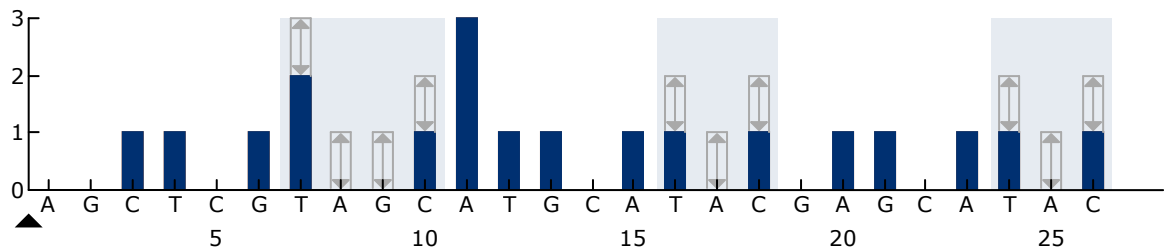



Figure 15. Histogramme des codons 464 à 469 (nucléotides 1391 [codon 464], 1397 [codon 466] et 1406 [codon 469])

A4. Cliquer sur l'onglet « **Analysis Parameters** » (paramètres de l'analyse) et augmenter 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.

A5. Cliquer sur  dans la barre d'outils et sauvegarder le test sous le nom « **BRAFcodons 464-469** »

Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves

AVERTISSEMENT 	Produits chimiques 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>Toujours porter 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)

Veiller à 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. Vérifier qu'aucun vide n'est appliqué à l'outil de vide. Vérifier que l'interrupteur à vide est fermé (Off) et que la pompe à vide est éteinte.**
- B2. Jeter toutes les solutions versées dans les cuves.**
- B3. Rincer les cuves avec de l'eau ultra-pure ou les remplacer si nécessaire.**

B4. Vider le conteneur à déchets.

Remarque : le couvercle peut être retiré sans déconnecter le tubage.

B5. Si la station de travail sous vide doit être nettoyée (par exemple à cause de poussière ou de déversements), suivre les instructions du Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	Pour 24 réactions sur les systèmes PyroMark Q24 : amorces Séq, amorces de PCR, ADN témoin non 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'enzyme, mélange de substrat, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP et H ₂ O	971470
PyroMark Q24 MDx	Plate-forme de détection fondée sur la séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001513
PyroMark Q24	Plate-forme de détection fondée sur la séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001514
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
Accessoires		
PyroMark Q24 Plate (100)	Plaquette de réaction de séquençage à 24 puits	979301

* Royaume-Uni uniquement

† Reste du monde

Produit	Contenu	N° réf.
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		
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

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 les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

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

Les noms déposés, marques déposées etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement indiqués comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Limitation de responsabilité

Ne doit pas être utilisé pour déterminer le risque de développer une endométriose.

Accord de licence limitée

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

1. Le kit *therascreen* BRAF Pyro ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du kit theascreen BRAF 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 theascreen BRAF 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 ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont 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 conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com