

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



Version 1



Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.



971530



1061828FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMAGNE

R3

MAT

1061828FR



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
Contrôles	8
Matériel fourni	9
Contenu du kit	9
Matériel nécessaire mais non fourni	11
Agitateurs de plaques recommandés	12
Avertissements et précautions	12
Informations de sécurité	12
Précautions générales	13
Stockage et manipulation des réactifs	14
Stockage et manipulation des prélèvements	14
Procédure	16
Isolement d'ADN	16
Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24	17
Protocole 2 : PCR à l'aide des réactifs fournis avec le kit <i>therascreen</i> NRAS Pyro	20
Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)	23
Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24	25
Protocole 5 : Mettez sous tension le PyroMark Q24	31
Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24	34
Interprétation des résultats	36
Interprétation des résultats d'analyse et détection des mutations de faible niveau	36
Guide de dépannage	40
Contrôle qualité	42
Limitations	43
Caractéristiques des performances	44
Limite du blanc et limite de détection	44

Linéarité	46
Précision	47
Évaluation diagnostique	47
Références	49
Symboles	50
Coordonnées	51
Annexe A : Préparation des tests <i>therascreen</i> NRAS Pyro	52
Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves	55
Pour commander	57

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* NRAS Pyro est un test in vitro de détection basée sur les séquences d'acide nucléique et s'appuyant sur la technologie du Pyrosequencing®, ou pyroséquençage, pour la détection quantitative des mutations au niveau des codons 12, 13 et 61 du gène NRAS humain dans l'ADN génomique provenant d'échantillons de tissu humain.

Le kit *therascreen* NRAS Pyro KBRAF 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 (version 2.0)

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* NRAS Pyro est utilisé pour les mesures quantitatives de mutations des codons 12, 13 et 61 du gène NRAS humain.

Le kit contient deux tests (figure 1) : le premier pour la détection des mutations des codons 12 et 13 et l'autre pour la détection des mutations du codon 61.

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.

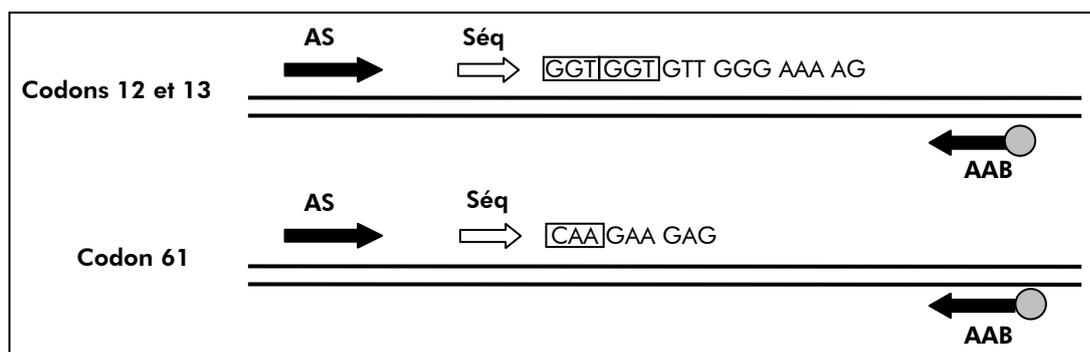


Figure 1. Illustration du test NRAS. La séquence indiquée est la séquence analysée pour un échantillon de type sauvage. **AS** : amorces PCR sens ; **AAB** : amorces PCR antisens (B indique une biotinylation) ; **Séq** : amorces de séquence.

Les deux tests sont séquencés dans le sens direct.

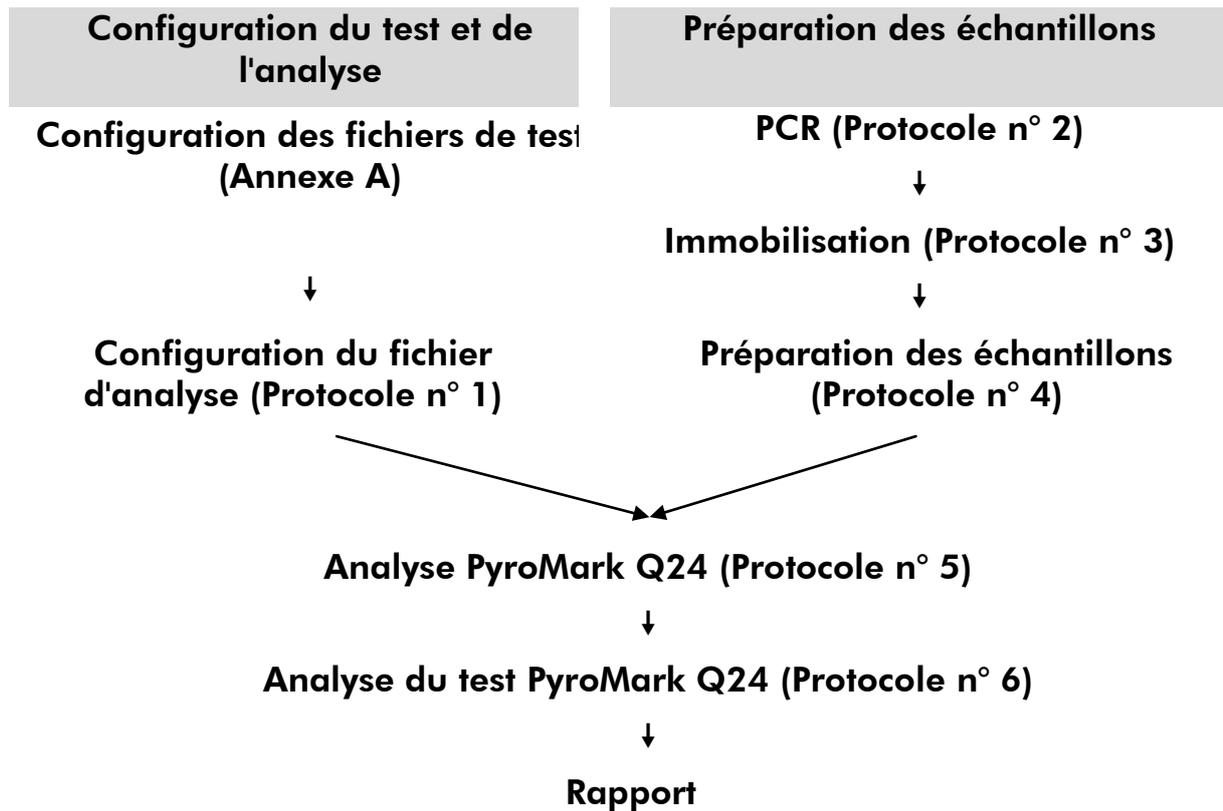
Le produit contient un mélange d'amorce PCR et une amorce de séquence pour chaque test. Les amorces sont livrées en solution. Chaque fiole contient 24 μ L de chaque amorce ou mélange d'amorce.

Principe de la procédure

Le déroulement des opérations ci-dessous illustre la procédure de test. Après l'utilisation des amorces PCR ciblant les codons 12/13 et le codon 61, 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. 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 34).

Remarque : le déroulement des opérations a été légèrement modifié par rapport à la révision R1 du *Manuel du kit theascreen NRAS Pyro* (voir « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 25).

Déroulement de la procédure *therascreen* NRAS Pyro



Contrôles

L'ADN de contrôle non méthylé est inclus dans le kit en tant que témoin positif pour les réactions de PCR et de séquençage. Cet ADN de contrôle 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 36). Incluez un échantillon avec ADN de contrôle 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* NRAS Pyro (boîte 1/2)

Kit <i>therascreen</i> NRAS Pyro (24)	(24)
N° de référence	971530
Nombre de réactions	24
Amorce Séq NRAS 12/13	24 µL
Amorce Séq NRAS 61	24 µL
Amorce PCR NRAS 12/13	24 µL
Amorce PCR NRAS 61	24 µL
Master Mix PCR PyroMark, 2x	850 µL
CoralLoad® concentré, 10x	1,2 mL
H ₂ O	3 x 1,9 mL
ADN de contrôle non méthylé, 10 ng/µL	100 µL

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

Tampons et réactifs <i>therascreen</i>		
Tampon de liaison PyroMark		10 mL
Tampon d'hybridation PyroMark		10 mL
Solution de dénaturation PyroMark*		250 mL
Tampon de lavage PyroMark concentré 10x		25 mL
Mélange d'enzymes		1 fiole
Mélange de substrats		1 fiole
dATP α S		1180 μ L
dCTP		1180 μ L
dGTP		1180 μ L
dTTP		1180 μ L
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 d'ADN », page 16)
- 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. 175113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (n° réf. 9001513 or 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 %)‡

* 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* NRAS Pyro.

Tableau 1. Les agitateurs de plaques répertoriés dans le tableau 1 sont recommandés avec le kit *therascreen* NRAS 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* NRAS 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 (voir « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 25) par rapport à la révision R1 du *Manuel du kit theascreen NRAS Pyro*.
- Les composants de ce produit suffisent pour réaliser 24 réactions dans cinq analyses indépendantes maximum.
- Utilisez des pointes de pipettes stériles avec des filtres (pour la configuration PCR).

- Conservez et procédez à l'extraction du matériel positif (prélèvements, témoins positifs et amplicons) séparément de tous les autres réactifs puis ajoutez-les au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Décongelez complètement tous les composants à température ambiante (de 15 à 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 du statut mutationnel ne doit jamais être basée sur des résultats marqués « Failed » (échec).

Stockage et manipulation des réactifs

Le kit *therascreen* NRAS Pyro est expédié dans deux boîtes. Le kit *therascreen* NRAS Pyro (boîte 1/2) est expédié sur un lit de carboglace. Le Master Mix PCR PyroMark, le concentré CoralLoad, l'ADN de contrôle 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 ou Pyrosequencing) 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 3 cycles de congélation/décongélation.

Remarque : les nucléotides ne doivent pas être congelés.

Le kit *therascreen* NRAS 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 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 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. 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 destinés à être utilisés avec le kit *therascreen* NRAS Pyro. Effectuez la purification de l'ADN conformément aux instructions des manuels du kit.

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

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

* Suivez 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).

† 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 type sauvage 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 52. Cette configuration n'est nécessaire qu'une seule fois, avant le premier test *therascreen* NRAS 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 19).

3. Préparez la plaque en ajoutant des tests pour les codons 12/13 et le codon 61 aux puits correspondant aux échantillons à analyser.

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

Remarque : Incluez un échantillon avec ADN de contrôle non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage (voir « Contrôles », page 8).

4. Lorsque l'analyse est paramétrée et prête à être effectuée sur le système PyroMark Q24, imprimez une liste des volumes requis de mélange d'enzymes, mélange de substrats et nucléotides et une 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 recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 23).

Pour analyser la plaque sur le système PyroMark Q24, voir « Protocole 5 : Mettez sous tension le PyroMark Q24 », page 31.

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.
- « Kit and Reagent ID » (Identifiant du réactif et du kit) : **Optionnel** : entrez le numéro de lot du kit *therascreen* NRAS 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) : **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* NRAS Pyro

Ce protocole est utilisé pour les amplifications de PCR d'une région contenant le codon 12 et le codon 13 et pour l'amplification séparée d'une région contenant le codon 61 à l'aide du kit *therascreen* NRAS 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.

À effectuer avant de commencer

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

Procédure

- 1. Décongelez tous les composants nécessaires (voir tableau 3).**
Mélangez-les bien avant de les utiliser.
- 2. Préparez un mélange réactionnel pour chaque ensemble d'amorces PCR 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 3. 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 NRAS 12/13	1,0
ou	
amorce PCR NRAS 61	
Eau (H ₂ O, fournie)	4,0
Volume total	20,0

3. Mélangez complètement le mélange réactionnel et distribuez-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 (entre 2 et 10 ng d'ADN génomique) aux tubes de PCR individuels (voir le tableau 4) et mélangez bien.

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

Remarque : Incluez un échantillon avec ADN de contrôle non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage (voir « Contrôles », page 8).

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 recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 23.

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

- 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/échantillon (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 17).
4. Ajoutez 10 µL de produit PCR biotinylé 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* NRAS Pyro », page 20).

Le volume total par puits doit être de 80 μ L 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 1400 tr/min.

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

7. Commencez immédiatement le « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 25.

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

- Avant d'ouvrir les tubes avec les amorces de séquence, passez-les brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Ajoutez 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 17), selon la région de l'analyse (codons 13 et 13 ou codon 61).
- Le déroulement des opérations a été légèrement modifié par rapport à la révision R1 du *Manuel du kit thetascreen NRAS Pyro* (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 aux échéances indiquées.

À effectuer avant de commencer

- 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, diluez 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).

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 chaque amorce de séquence, amorce Séq NRAS 12/13 et amorce Séq NRAS 61, dans le 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/échantillon (μL)	Volume pour 9 + 1 réactions (μL)
Amorce Séq NRAS 12/13 ou amorce Séq NRAS 61	0,8	8
Tampon d'hybridation PyroMark	24,2	242
Volume total	25	250

- 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 17).**

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 la plaque PyroMark Q24 sur la station de travail sous vide.

4. Mettez l'outil sous vide en activant 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 à vide 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 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).
15. Fermez la commande de vide de l'outil (« Off ») et placez l'outil à vide 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 55.
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 : Mettez sous tension le PyroMark Q24 », page 31.

Protocole 5 : Mettez 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 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 17), 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 les mélanges d'enzyme et de substrat lyophilisés respectivement dans 620 μ L d'eau (H_2O , 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 (20–25 °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.

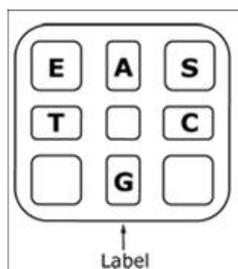


Figure 4. Illustration de la cartouche PyroMark Q24 vue du dessus. Les annotations correspondent à l'étiquette sur les flacons de réactifs. Ajoutez le mélange d'enzymes (**E**), le mélange de substrats (**S**) et les nucléotides (**A**, **T**, **C**, **G**) en fonction des informations de volume indiquées dans le rapport d'informations de pré-analyse, accessible dans le menu « Tools » 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 34.**

Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24

Ce protocole décrit l'analyse de la mutation d'un test NRAS 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 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. **Vérifiez que le facteur de réduction du pic A (onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) dans l'onglet « Analysis Setup » (configuration de l'analyse)) est défini sur 0,86 pour les tests du codon 61 du NRAS.**
5. **Pour analyser le test et obtenir un aperçu des résultats, cliquez 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.

6. **Pour générer un rapport, sélectionnez « 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).**

Les mutations les plus fréquentes pour chacun des trois codons analysés du NRAS se trouvent au niveau du nucléotide 35 (deuxième base du codon 12), du nucléotide 38 (deuxième base du codon 13) et du nucléotide 182 (deuxième base du codon 61). C'est pourquoi la fonction « Sequence to Analyze » standard définie dans la configuration d'analyse concerne les mutations dans ces positions (voir Annexe A, page 52). Si un échantillon contient une mutation au niveau du nucléotide 34, nucléotide 37, nucléotide 181 ou nucléotide 183, la fonction « Sequence to Analyze » peut être modifiée de manière à analyser aussi l'état mutationnel dans ces positions, comme décrit à l'Annexe A.

Les fréquences mutations mises à jour dans le gène NRAS humain au niveau des codons 12/13 et du codon 61 sont fournies en ligne par le Sanger Institute sur le site www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

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 *PyroMark Q24 User Manual*).

Remarque : le rapport « AQ Analysis Results » (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, 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.

Réanalyse des échantillons sans mutations détectées dans le nucléotide 35, 38 ou 182 avec évaluation de la qualité marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec).

Nous recommandons fortement de réanalyser tous les échantillons sans mutations détectées avec la fonction standard « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) dans le nucléotide 35, 38 ou 182, ainsi que les échantillons dont l'évaluation de la qualité a été marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec). Les évaluations de qualité « Check » (à vérifier) et « Failed » (échec) peuvent indiquer une mutation dans une position différente que sur le nucléotide 35, 38 ou 182, donnant lieu à des déviations de la hauteur de pic au niveau des distributions de référence. Par exemple, un pic dans l'une des 3 premières distributions du test des codons 12/13 montre qu'une mutation est présente au niveau du nucléotide 34 du codon 12.

Pour réanalyser et cibler les mutations sur les nucléotides 34 et 37, accédez à « Analysis Setup » (configuration de l'analyse) puis dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), remplacez **GNTGNTGTTGGGAAAAGC** par **NGTNGTGTTGGGAAAAGC**. Cliquez sur « Apply » (appliquer), puis sur « To All » (à tous) lorsque la fenêtre « Apply Analysis setup » (appliquer la configuration de l'analyse) apparaît.

Pour réanalyser et cibler les mutations sur le nucléotide 181, allez dans « Analysis Setup » (configuration de l'analyse) puis dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), remplacez **CNAGAAGAGTA** par **VAAGAAGAGTA**.

Pour réanalyser et cibler les mutations sur le nucléotide 183, remplacez la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») par **CANGAAGAGTA**. Cliquez

sur « Apply » (appliquer), puis sur « To All » (à tous) lorsque la fenêtre « Apply Analysis setup » (appliquer la configuration de l'analyse) apparaît.

Remarque : après avoir modifié la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), assurez-vous que le seuil de la hauteur de pic mononucléotidique est réglé sur 30 RLU. En outre, assurez-vous que le facteur de réduction du pic A est défini sur 0,86 pour l'analyse du codon 61 du NRAS.

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 de contrôle 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, voir le tableau 8) et interprétés comme suit.

- Fréquence de mutation $<$ LoD : Type sauvage
- Fréquence de mutation \geq LoD et \leq LoD + 3 unités % : mutation de faible niveau potentielle
- Fréquence de mutation $>$ LoD + 3 unités % : mutation

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 de contrôle non méthylé. Le résultat des deux duplicats doit être \geq LoD et différent du résultat de l'échantillon témoin. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être considéré comme de type sauvage.

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 8) 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 NRAS.

Tableau 8. LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V47)
Codon 12 (GGT)				
AGT	G12S	1,4	3,4	563
TGT	G12C	0,6	2,5	562
CGT	G12R	0,4	2,4	561
GAT	G12D	1,8	3,8	564
GTT	G12V	3,8	8,8	566
GCT	G12A	0,5	2,5	565
Codon 13 (GGT)				
AGT	G13S	1,2	3,2	571
TGT	G13C	1,2	3,2 (4) [†]	570
CGT	G13R	0,3	2,3	569
GAT	G13D	0,8	2,8	573
GTT	G13V	0,0	2,0 (5) [†]	574
GCT	G13A	0,8	2,8	575
Codon 61 (CAA)				
AAA	Q61K	4,1	6,7	580
CGA	Q61R	0,8	2,2	584
CTA	Q61L	0,7	2,1	583
CAT	Q61H	0,4	1,8	585
CAC	Q61H	5,4	8,0	586
CAG	Q61Q	2,1	5,8	587

* 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 pyrogramme sont présentés dans les figures 5 à 9.

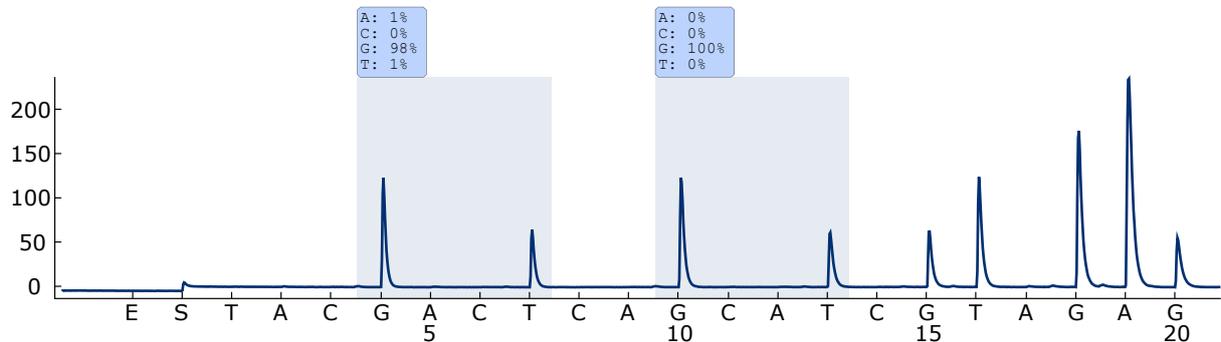


Figure 5. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype normal du codon 12–13.

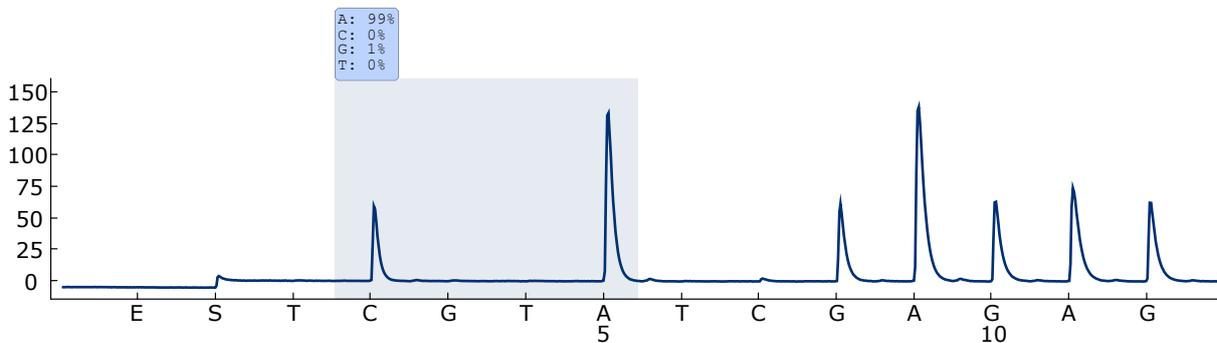


Figure 6. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage des codons 61.

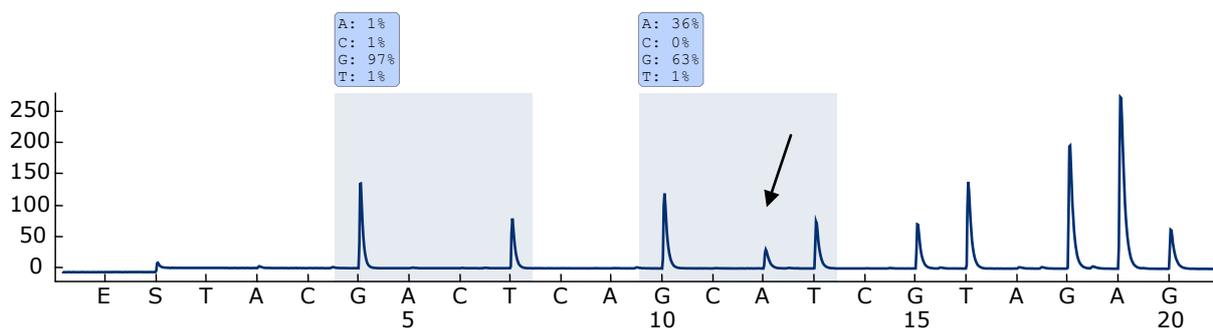


Figure 7. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse des échantillons présentant une mutation GGT → GAT au niveau de la base 2 du codon 13 (nucléotide 38, indiqué par une flèche) à l'aide de la fonction « Sequence to Analyse » (séquence à analyser) GNTGNTGTTGGGAAAAGC.

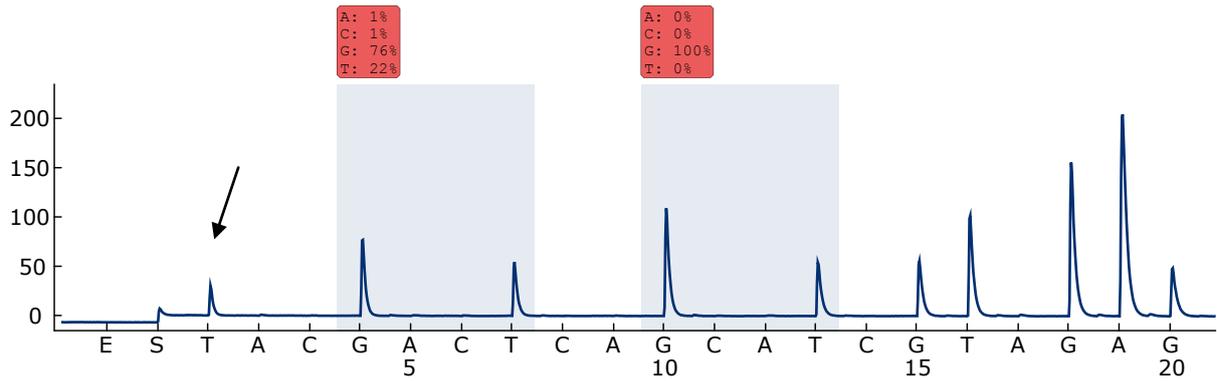


Figure 8. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse des échantillons présentant une mutation GGT → AGT au niveau de la base 1 du codon 12 (nucléotide 34, indiqué par une flèche) à l'aide de la fonction « Sequence to Analyse » (séquence à analyser) *GNTGNTGTTGGGAAAAGC* ciblant la base 2 du codon 12 (nucléotide 35). La couleur rouge indique que cette séquence est inattendue et qu'elle doit être vérifiée.

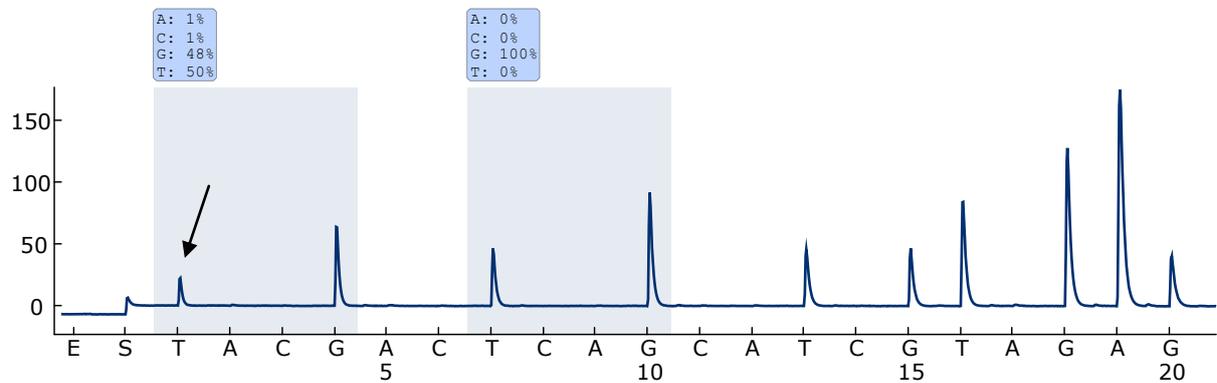


Figure 9. Tracé et résultat de Pyrogram obtenu après réanalyse de l'échantillon de la figure 8. La mutation GGT → AGT a été réanalysée à l'aide de la séquence à analyser (« Sequence to Analyse ») *NGTNGTGTGGGAAAAGC* ciblant la base 1 du codon 12 (nucléotide 34).

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 *PyroMark Q24 User Manual* (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. 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.
- b) Mutation non définie dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser)
- Ajustez la séquence à analyser dans la configuration du test (voir Annexe A, page 52) et effectuez 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 « Sequences to Analyze » (séquences à analyser) alternative en raison des mutations inattendues.
- d) Avertissement relatif à une déviation de la hauteur de pic maximal au niveau d'une distribution
- 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). 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.

Commentaires et suggestions

Bruit de fond élevé

- | | |
|---|--|
| a) Stockage des nucléotides incorrect | Stockez 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 pyroséquençage | 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. |
| c) Contamination de la cartouche | Nettoyez soigneusement la cartouche, tel que décrit dans la fiche produit. Conservez la cartouche à l'abri de la lumière et de la poussière. |

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

- | | |
|--|---|
| 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 : Mettez sous tension le PyroMark Q24 », page 31. |
| 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 le pyroséquençage peuvent entraîner une absence de signal. Testez le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24, 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* NRAS 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 9). 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 un positif pour la mutation correspondante.

Les mutations GGT → TGT et GGT → GTT dans le codon 13

Pour ces mutations, les mesures de blanc étaient presque égales à 0 unité %, entraînant une distribution non gaussienne. La LoD a donc été déterminée à l'aide d'une méthode différente, conformément aux recommandations du protocole EP17A 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 95ème centile des mesures de blanc. Lors de l'analyse d'un échantillon avec le niveau de mutation indiqué entre parenthèses au tableau 9, 95 % des résultats (n = 72) ont donné lieu à un signal pouvant être considéré comme positif (\geq LoD).

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* (V47)
Codon 12 (GGT)				
AGT	G12S	1,4	3,4	563
TGT	G12C	0,6	2,5	562
CGT	G12R	0,4	2,4	561
GAT	G12D	1,8	3,8	564
GTT	G12V	3,8	8,8	566
GCT	G12A	0,5	2,5	565
Codon 13 (GGT)				
AGT	G13S	1,2	3,2	571
TGT	G13C	1,2	3,2 (4) [†]	570
CGT	G13R	0,3	2,3	569
GAT	G13D	0,8	2,8	573
GTT	G13V	0,0	2,0 (5) [†]	574
GCT	G13A	0,8	2,8	575
Codon 61 (CAA)				
AAA	Q61K	4,1	6,7	580
CGA	Q61R	0,8	2,2	584
CTA	Q61L	0,7	2,1	583
CAT	Q61H	0,4	1,8	585
CAC	Q61H	5,4	8,0	586
CAG	Q61Q	2,1	5,8	587

* 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 étaient basées sur des analyses où des mélanges de plasmides porteurs du type sauvage ou de la séquence mutée respective avaient été utilisés comme matrice pour l'amplification PCR.

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 de la séquence sauvage ou mutante pour les mutations GGT > GAT au niveau des codons 12 et 13 et la mutation CAA > CGA au niveau du codon 61. 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* NRAS 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). Ces résultats sont illustrés dans la figure 10 pour la mutation GGT>GAT au niveau du codon 12.

Les résultats étaient linéaires, avec une non-linéarité autorisée de 5 unités % dans l'intervalle testé de 5 à 50 % de niveau de mutation. Des résultats similaires ont été obtenus pour les mutations GGT > GAT au niveau du codon 13 et CAA > CGA au niveau du codon 61.

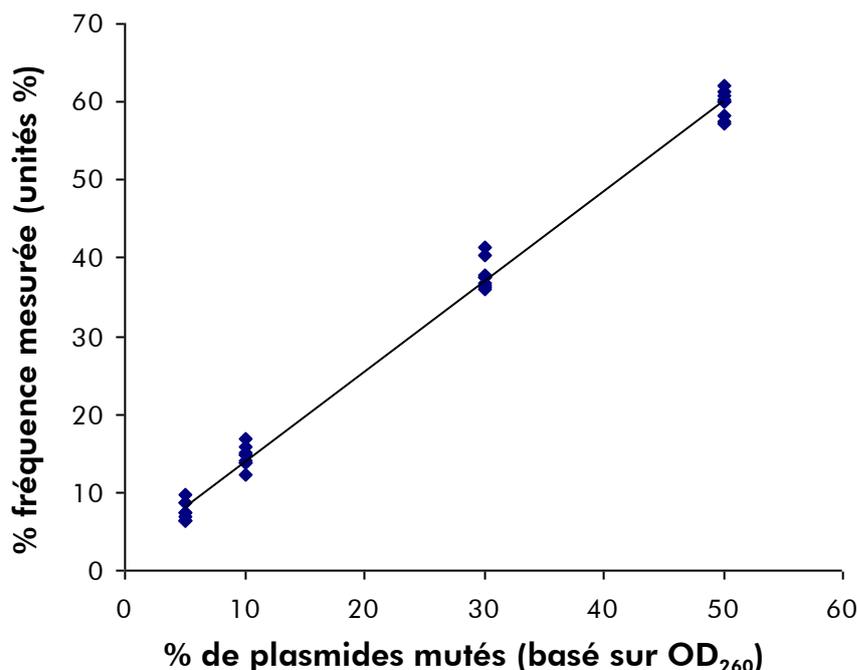


Figure 10. Linéarité de la mutation GGT → GAT au niveau du codon 12.

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* NRAS 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* NRAS 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* NRAS Pyro.

Les estimations de la précision sont exprimées en tant qu'écart type des fréquences de mutation mesurées, en unités % (tableau 10). La répétabilité, la précision moyenne et la reproductibilité de la mutation GGT > GAT au niveau du codon 12 étaient respectivement de 1,2–1,9, 1,0–2,0 et 1,3–3,1 unités %, dans les limites mesurées d'un niveau de mutation compris entre 5 et 50 %. Des résultats similaires ont été obtenus pour les mutations GGT > GAT au niveau du codon 13 et CAA > CGA au niveau du codon 61.

Tableau 10. Précision pour la mutation GGT>GAT au niveau du codon 12*

% de plasmides mutés [†]	Répétabilité		Précision moyenne		Reproductibilité	
	Moy.	σ	Moy.	σ	Moy.	σ
5	7,5	1,2	7,3	1,0	6,7	1,3
10	14,6	1,3	13,5	1,1	13,7	1,3
30	37,8	1,9	37,9	1,5	36,1	2,9
50	59,8	1,7	60,4	2,0	57,5	3,1

* Toutes les valeurs sont exprimées en unités %.

[†] Basé sur la mesure OD₂₆₀, σ : écart type (n=9 pour répétabilité et précision moyenne, n=12 pour reproductibilité).

Évaluation diagnostique

Le kit *therascreen* NRAS Pyro a été évalué par comparaison au séquençage Sanger. L'ADN a été extrait de 100 échantillons de tumeurs de moelle osseuse

fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE) et analysé à la recherche de mutations au niveau des codons 12/13 et du codon 61.

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

Sur les 100 échantillons analysés par séquençage Sanger, le statut mutationnel a pu être déterminé dans 97 échantillons à la fois pour les codons 12/13 et le codon 61. Avec le kit *therascreen* NRAS Pyro il a été possible de déterminer le statut mutationnel dans 97 et 98 échantillons pour les codons 12/13 et pour le codon 61, respectivement.

Dans quatre des 100 échantillons, une mutation au niveau du codon 12 ou 13 a été détectée par séquençage Sanger. Dans deux de ces échantillons, le statut mutationnel a pu être reproduit avec le kit *therascreen* NRAS Pyro, alors qu'aucune mutation n'a été rapportée pour deux échantillons.. Les résultats sont illustrés dans les tableaux 11 et 12. Aucune mutation n'a été détectée au niveau du codon 61.

Si l'on exclut les échantillons dont l'analyse par l'une ou les deux méthodes a échoué, le kit *therascreen* NRAS Pyro et le séquençage Sanger ont donné des résultats concordants à 98 % et à 100 % pour les codons 12/13 et le codon 61, respectivement (tableaux 11 et 12).

Tableau 11. Résultats des échantillons de tumeurs cutanées analysés pour les codons 12/13

		Séquençage Sanger			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> NRAS Pyro	Mutant	2	0	0	2
	Type sauvage	2	90	3	95
	Inconnu	0	3	0	3
	Total	4	93	3	100

Tableau 12. Résultats des échantillons de moelle osseuse analysés pour le codon 61

		Séquençage Sanger			
		Mutant	Type sauvage	Inconnu	Total
Kit <i>therascreen</i> NRAS Pyro	Mutant	0	0	0	0
	Type sauvage	0	95	3	98
	Inconnu	0	2	0	2
	Total	0	97	3	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.

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

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

Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, veuillez consulter notre Centre du support 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* NRAS Pyro

Avant la première analyse du test *therascreen* NRAS Pyro, le fichier du test doit être configuré. Configurez le test des codons 12/13 et du codon 61 du NRAS à l'aide du logiciel PyroMark Q24, tel que décrit ci-dessous.

Procédure

Codons 12 et 13 du gène NRAS

- A1. Cliquez sur  dans la barre d'outils puis sélectionnez « New AQ Assay » (nouveau test de quantification des allèles).
- A2. Entrez la séquence suivante dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).

GNTGNTGTTGGGAAAAGC

Les mutations les plus fréquentes dans les codons 12 et 13 seront détectées dans les nucléotides 35 et 38 (deuxième position) à l'aide de la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).

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

Pour savoir si les mutations sont présentes dans le nucléotide 34 ou 37 (première position), remplacez la séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») par la suivante :

NGTNGTGTTGGGAAAAGC

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

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

TACGACTCAGCATCGTAGAG

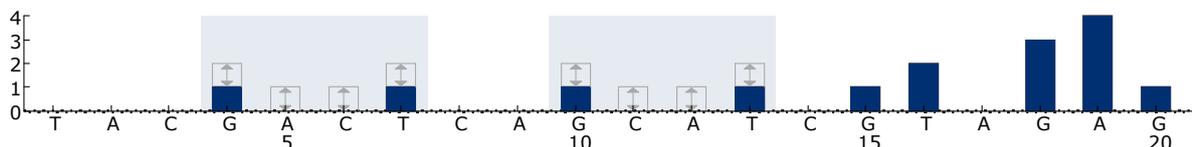


Figure 11. Histogramme des codons 12 (nucléotide 35) et 13 (nucléotide 38) avec la séquence à analyser (« Sequence to analyze ») **GNTGNTGTTGGGAAAAGC**.

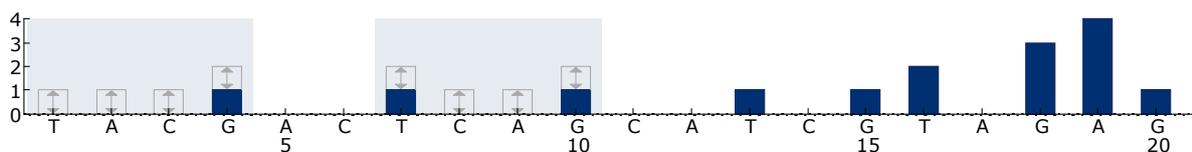


Figure 12. Histogramme des codons 12 (nucléotide 34) et 13 (nucléotide 37) avec la séquence à analyser (« Sequence to analyse ») *NGTNGTGTGGGAAAAGC*.

A4. 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.

A5. Cliquez sur  dans la barre d'outils et sauvegardez le test sous le nom « NRAScodons 12+13 »

Codon 61 du NRAS

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

A2. Entrez la séquence suivante dans « Sequence to Analyse » (séquence à analyser).

CNAGAAGAGTA

La mutation la plus fréquente dans le codon 61 sera détectée dans le nucléotide 182 (deuxième position) à l'aide de la fonction « Sequence to Analyse » (séquence à analyser).

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

Pour savoir si les mutations sont présentes dans le nucléotide 181 (première position), remplacez la séquence à analyser (« Sequence to Analyse ») par la suivante :

VAAGAAGAGTA

Pour savoir si les mutations sont présentes dans le nucléotide 183 (troisième position), remplacez la séquence à analyser (« Sequence to Analyse ») par la suivante :

CANGAAGAGTA

Remarque : assurez-vous que le seuil pour la hauteur de pic mononucléotidique est réglé sur 30 RLU. En outre, assurez-vous que le facteur de réduction du pic A est défini sur 0,86 pour l'analyse du codon 61 du NRAS.

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

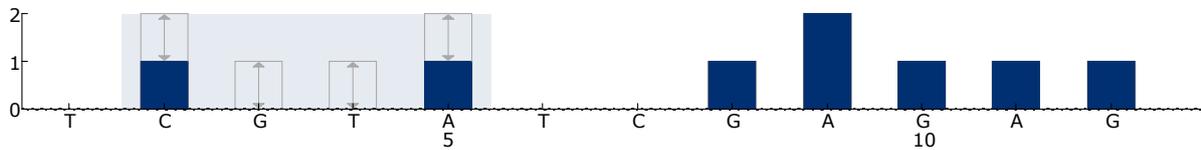


Figure 13. Histogramme du codon 61 (nucléotide 182) avec la séquence à analyser "Sequence to Analyze" CNAGAAGAGTA.

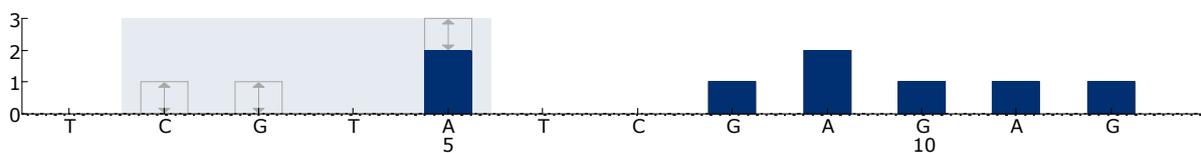


Figure 14. Histogramme du codon 61 (nucléotide 181) avec la séquence à analyser "Sequence to Analyze" VAAGAAGAGTA.

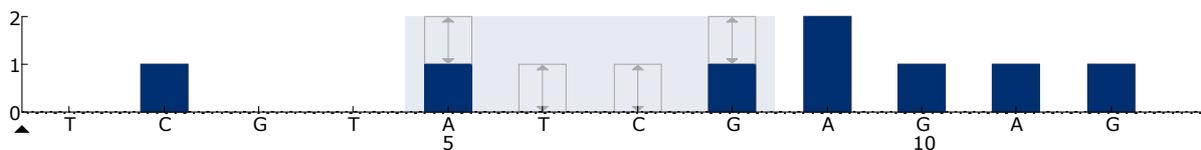


Figure 15. Histogramme du codon 61 (nucléotide 183) avec la séquence à analyser "Sequence to Analyze" CANGAAGAGTA.

A4. 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.

A5. Cliquez sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et diminuez « A-peak reduction factor : » (facteur de réduction du pic A) jusqu'à 0,86.

A6. Cliquez sur  dans la barre d'outils et sauvegardez le test sous le nom « NRAScodon 61 »

Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves

<p>AVERTISSEMENT</p> 	<p>Produits chimique dangereux</p> <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.

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), suivez les instructions du Manuel d'utilisation du PyroMark Q24.

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit (24)	Pour 24 réactions sur les systèmes PyroMark Q24 : Amorces Séq, amorces de PCR, ADN de contrôle 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.	971530
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
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
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Pour 50 préparations : Colonnes QIAamp Mini Spin, tampons, réactifs, tubes, VacConnectors	61104

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 Corporation); 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* NRAS Pyro accepte les conditions suivantes :

1. Le kit *therascreen* NRAS Pyro ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du kit theascreen NRAS 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* NRAS 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 ■ Orders 03-9840-9800 ■ 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 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325, 800-988-0327

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 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

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

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

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

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

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

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)

