

MANUEL TECHNIQUE

OncoMate™ 5C Matrix Standard

Mode d'emploi du produit
MD3850



MODES D'EMPLOI
DU PRODUIT

MD3850



Rév 0
TM597



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



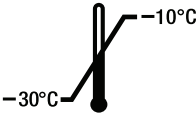












MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre, Allemagne

OncoMate™ 5C Matrix Standard

1. Nom du produit	3
2. Utilisation prévue.....	3
3. Résumé et explication.....	3
4. Principe du test	3
5. Composants du produit et conditions de stockage	4
5.1 Éléments fournis	4
5.2 Stockage et manutention	4
5.3 Éléments non fournis	5
6. Exigences relatives à l'appareil d'électrophorèse capillaire.....	6
7. Préparation de l'appareil d'électrophorèse capillaire	6
8. Analyse de la matrice étalon	6
9. Interprétation des résultats.....	8
10. Dépannage.....	9
11. Produits associés.....	11

Légende des symboles

Symbole	Explication	Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Numéro de lot
	Stocker entre -30 °C et -10 °C.		Fabricant
	Ne pas réutiliser		Irritant
	Référence de catalogue		Contenu suffisant pour <n> tests
	Utiliser avant le		Tenir à l'abri de la lumière
	Consulter le mode d'emploi		Représentant agréé
	Conformité européenne		

1. Nom du produit

OncoMate™ 5C Matrix Standard

Réf. MD3850

2. Utilisation prévue

La matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard est un accessoire pour dispositif médical de diagnostic in vitro à utiliser avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System (réf. cat. MD3140). La matrice étalon s'utilise pour la calibration spectrale des appareils d'électrophorèse capillaire avant l'analyse des produits d'amplification générés avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Ce produit est destiné à un usage professionnel uniquement.

3. Résumé et explication

Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System utilise la PCR multiplex (amplification en chaîne par polymérase) pour générer des fragments d'ADN marqués de trois fluorochromes différents : fluorescéine, JOE et TMR-ET. Pendant l'analyse par électrophorèse capillaire, les fragments d'ADN marqués par fluorescence sont séparés et détectés par l'appareil en même temps que l'étalon de taille Size Standard 500 marqué par le fluorochrome WEN. Avant l'analyse, il convient de calibrer l'appareil d'électrophorèse capillaire à l'aide de la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard afin de distinguer les signaux fluorescents des fluorochromes spécifiquement utilisés. La matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard^(a,b) se compose de fragments d'ADN marqués de cinq fluorochromes différents (fluorescéine, JOE, TMR-ET, CXR-ET et WEN) dans un même tube. La calibration spectrale s'effectue conformément aux consignes du fabricant de l'appareil.

Se reporter au Guide de l'utilisateur fourni par le fabricant pour connaître les procédures de maintenance de l'appareil. Par exemple, il faut procéder à une nouvelle calibration spectrale après chaque procédure de maintenance importante effectuée sur le système d'électrophorèse capillaire, comme après avoir changé la source d'excitation (laser, par ex.), étalonné ou remplacé la caméra CCD, ou modifié le type de polymère ou le réseau de capillaires. Il faut également procéder à une nouvelle calibration spectrale si l'on observe des pics d'infiltration qui interfèrent avec l'analyse des données.

4. Principe du test

Au cours de la phase de collecte des données d'un appareil d'électrophorèse capillaire, des fragments d'ADN marqués par des fluorochromes sont exposés à une source lumineuse et émettent de la lumière sur plusieurs longueurs d'onde. Ces émissions sont captées par une caméra intégrée afin d'effectuer une analyse plus poussée. Plusieurs fluorochromes sont utilisés pour permettre la détection simultanée de fragments d'ADN de taille similaire.

Les fluorochromes utilisés par le OncoMate™ MSI Dx Analysis System ont chacun une émission lumineuse maximale dont la longueur d'onde est unique, mais ils émettent de la lumière sur toute une gamme de longueurs d'onde. Lorsque les émissions spectrales de ces fluorochromes se chevauchent, cela entrave l'identification du fluorochrome qui est la source de l'émission et cela nuit à l'analyse des données. Par conséquent, pour analyser les données microsatellites résultant de l'utilisation de plusieurs fluorochromes, le logiciel d'analyse de l'appareil doit distinguer les spectres d'émission des fluorochromes.

4. Principe du test (suite)

Un étalon – ou une *matrice étalon* – de calibration spectrale se compose de fragments d'ADN marqués par fluorescence et analysés pendant une calibration spectrale. Le logiciel collectant les données d'électrophorèse capillaire analyse les spectres d'émission de ces fragments marqués par fluorescence pour caractériser le chevauchement spectral et créer une matrice de déconvolution à plusieurs composants qui est spécifique à chaque capillaire du réseau calibré. La matrice de déconvolution est automatiquement appliquée aux données brutes de l'échantillon lors des analyses ultérieures, pour isoler et attribuer la fluorescence observée au niveau de chaque fluorochrome individuel.

5. Composants du produit et conditions de stockage

5.1 Éléments fournis





Ce produit contient suffisamment de réactifs pour effectuer cinq calibrations spectrales. Les éléments suivants sont fournis :

COMPOSANT	TAILLE	RÉF.
5C Matrix Mix	150 µl	MD430A





Sont inclus : Fragments d'ADN marqués par fluorescence

Conditions de stockage : Zone de post-amplification ;  avant utilisation ;  après la première utilisation.
Tenir à l'abri de la lumière

COMPOSANT	TAILLE	RÉF.
Matrix Dilution Buffer	5 × 200 µl	MD191A

Comprend : Tampon à base de Tris-EDTA

Conditions de stockage : Zone de post-amplification ;  avant utilisation ;  après la première utilisation.

5.2 Stockage et manutention

Stocker la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard avec les réactifs de post-amplification. Dès la réception, stocker tous les composants à une température comprise entre -30 °C et -10 °C dans un congélateur sans dégivrage automatique, à l'abri de la lumière. Ne pas entreposer les réactifs dans la porte du congélateur à cause des variations de température. Après la première utilisation, stocker les composants de la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard entre 2 et 10 °C, à l'abri de la lumière, jusqu'à 3 mois. La matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard est un produit photosensible ; diluer le 5C Matrix Mix dans le Matrix Dilution Buffer dans le tube ambre fourni. Stocker le mélange 5C dilué à une température entre 2 et 10 °C pendant 6 jours maximum.

Remarque : Ne pas recongeler les composants de la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard.

5.3 Éléments non fournis

Réactifs de laboratoire

- Formamide Hi-Di™ (par ex. Applied Biosystems, réf. cat. 4404307)

Il convient d'utiliser du formamide Hi-Di™ pour les calibrations spectrales effectuées avec la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard. Congeler le formamide en aliquots à -20 °C. Des cycles répétés de congélation-décongélation ou un stockage à long terme à 4 °C peuvent provoquer la dégradation du formamide.



Le formamide est un irritant et un tératogène. Éviter l'inhalation et le contact avec la peau. Lire l'étiquette d'avertissement et prendre les précautions appropriées lors de la manipulation de cette substance. Porter des gants, des vêtements de protection et des lunettes de sécurité lors de l'exécution des protocoles ci-dessous.

Le fait de ne pas respecter les protocoles recommandés pour le stockage des réactifs de calibration spectrale, l'exécution de la calibration spectrale ou l'acceptation/le rejet des résultats de la calibration spectrale peut entraîner des pics d'infiltration (« interférence spectrale ») pendant l'analyse de l'électrophorèse capillaire des produits d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Les pics d'infiltration peuvent obscurcir les résultats du test ou compliquer l'interprétation des données.

Matériel de laboratoire

- Jeu de pipettes de précision calibrées pouvant distribuer entre 1 µl et 1,000 µl
- Pointes de pipette anti-aérosols (10 µl–1,000 µl)
- Microtubes à centrifuger de 1,5 ml
- Centrifugeuse compatible avec plaque de 96 puits (« mini-centrifugeuse », par ex.)
- Supports pour microtubes à centrifuger
- Agitateur vortex
- Congélateur sans dégivrage automatique (entre -30 °C et -10 °C)
- Réfrigérateur (entre 2 °C et 10 °C)

Appareils et accessoires

- Appareil d'électrophorèse capillaire et fournitures connexes, y compris polymère, réseau, tampons, eau et articles d'entretien recommandés par le fabricant de l'appareil.
- Plaque de réaction optique MicroAmp® à 96 puits (par ex., ThermoFisher, réf. cat. 4306737)

6. Exigences relatives à l'appareil d'électrophorèse capillaire

Les produits d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System sont séparés et analysés par électrophorèse capillaire après calibration spectrale avec la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard. La performance de la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard et du OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été évaluée à l'aide de l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx réglé sur les paramètres d'analyse de fragments et configuré avec un polymère POP-7® et un réseau de capillaires de 50 cm. Les appareils compatibles avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System et la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard auront les caractéristiques suivantes :

Nombre de fluorochromes détectés : ≥ 5

Longueur du réseau de capillaires : des longueurs de réseau adaptées à une résolution de base unique, y compris 50 cm.

Matrice de séparation : Polymère POP-7® ou un équivalent.

Longueur d'onde d'excitation (approximative) : De 480 nm à 520 nm

Optique de détection : Les fluorochromes Promega exigent un captage des émissions entre 500 nm à 630 nm, approximativement.

Plage de résolution : Résolution 1bp de 60bp à ≥ 300 bp

Précision du calibrage (répétabilité, exprimée en écart-type) : $\leq 0,15$ bp sur une plage de 60 bp à ≥ 300 bp

7. Préparation de l'appareil d'électrophorèse capillaire

Suivre les consignes du fabricant relatives au fonctionnement et à l'entretien de l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné. Il convient d'effectuer la calibration spectrale avec le même type de polymère d'électrophorèse capillaire et de réseau qui seront utilisés pour l'analyse des produits d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

1. S'assurer que le polymère et les tampons de l'appareil ne sont pas périmés et qu'un nombre suffisant d'échantillons ou d'injections sont disponibles pour effectuer la calibration.
2. Le cas échéant, préchauffer le four du système d'électrophorèse capillaire conformément aux consignes du fabricant pendant au moins 30 minutes avant de démarrer un cycle.
3. Il peut être exigé d'effectuer la calibration spatiale de l'appareil avant de procéder à la calibration spectrale. Pour plus d'informations, consulter le mode d'emploi de l'appareil sélectionné. Si l'appareil d'électrophorèse capillaire nécessite une calibration spatiale et qu'elle n'a pas encore été effectuée, il faut la faire dès maintenant.

Remarque : Nous vous recommandons d'utiliser un nouveau réseau de capillaires ainsi qu'un polymère et un tampon frais pour obtenir de meilleurs résultats.

8. Analyse de la matrice étalon

1. Lors de la première utilisation, décongeler complètement le 5C Matrix Mix et le Matrix Dilution Buffer. Après la première utilisation, stocker les réactifs entre 2 et 10 °C, à l'abri de la lumière.
2. Agiter le 5C Matrix Mix dans l'agitateur vortex pendant 10 à 15 secondes à vitesse maximale. Ajouter 10 μ l de 5C Matrix Mix à un tube de Matrix Dilution Buffer. Agiter dans l'agitateur vortex pendant 10 à 15 secondes, à vitesse maximale. Inscrivez la date de dilution sur le tube.

Remarque : Le 5C Matrix Mix dilué peut être stocké à une température comprise entre 2 et 10 °C pendant 6 jours maximum.

3. Ajouter 10 µl de 5C Matrix Mix dilué (préparé pendant l'étape 2) à 500 µl de formamide Hi-Di™. Agiter dans l'agitateur vortex pendant 10 à 15 secondes, à vitesse maximale.
4. Ajouter 15 µl de mélange formamide-Matrix (préparé à l'étape 3) dans chacun des puits que le réseau de capillaires échantillonnera pendant la calibration spectrale. Le nombre de puits nécessaires pour la calibration spectrale dépend de l'appareil et du réseau spécifiquement sélectionnés pour l'analyse en aval des produits d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.
5. Couvrir la plaque conformément aux consignes du fabricant et centrifuger brièvement la plaque pour attirer le mélange au fond de chaque puits et éliminer les bulles d'air.

2

Remarque : Ne pas dénaturer (à la chaleur) la plaque à 96 puits qui contient le mélange formamide-Matrix. Jeter le mélange formamide-Matrix non utilisé.

6. Charger la plaque sur l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné et procéder à la calibration spectrale conformément aux consignes du mode d'emploi de l'appareil. Le tableau 1 indique les réglages à utiliser pour effectuer la calibration spectrale avec la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard. Certains des réglages décrits dans le tableau 1 peuvent ne pas s'appliquer à toutes les plates-formes d'appareils d'électrophorèse capillaire. Consulter le mode d'emploi de l'appareil d'électrophorèse capillaire ou contacter la filiale ou le distributeur local(e) de Promega, ou envoyer un courriel à : genetic@promega.com pour plus d'informations.

Remarque : Il faudra créer un nouveau jeu de fluorochromes avant d'effectuer la première calibration spectrale avec la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard. Utiliser soit un jeu de fluorochromes spécifiques à ceux utilisés dans la matrice étalon (fluorescéine, JOE, TMR-ET, CXR-ET et WEN) soit un jeu de fluorochromes génériques (« AnyDye » ou un équivalent, par ex.) comme modèle. L'utilisation d'un jeu de fluorochromes inadapté à la calibration spectrale peut entraîner une diminution de l'équilibre fluorochromes-signaux chez les fragments détectés pendant l'analyse.

Tableau 1. Réglages à utiliser pour la calibration spectrale avec la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard.

Catégorie	Réglages
Nombre de fluorochromes (c.-à-d. de couleurs)	5
Jeu de fluorochromes	Jeu de fluorochromes spécifiques ¹ , AnyDye ou équivalent
Ordre des fluorochromes	1, orange ; 2, rouge ; 3, jaune ; 4, vert ; 5, bleu
Valeur de qualité minimale	0,95
Valeur de chevauchement maximale	8,0
Sensibilité	0,4
Localiser le point de départ après analyse	300
Localiser le point de départ avant analyse	5000
Limiter les analyses à	6500

¹Jeu de fluorochromes spécifiquement conçu pour fluorescéine, JOE, TMR-ET, CXR-ET et WEN

9. Interprétation des résultats

- Une fois la calibration spectrale terminée, examiner ses résultats. Pour chaque capillaire, vérifier la valeur de qualité et la valeur de chevauchement de la calibration spectrale et examiner les données d'émission spectrale affichées. Les capillaires acceptables auront une valeur de qualité de $\geq 0,95$ et une valeur de chevauchement $\leq 8,0$. S'assurer que l'ordre (de gauche à droite) des pics de fragment dans l'affichage Intensité vs. Nbre d'analyses est : orange, rouge, jaune, vert et bleu (schéma 1, panel A). S'assurer que l'ordre (de gauche à droite) des signaux de fluorochromes dans l'affichage des spectres d'émission est : bleu, vert, jaune, rouge et orange (schéma 1, panel B).

Remarque : La valeur de qualité de chaque capillaire d'une calibration spectrale acceptée est typiquement $\geq 0,98$.

- Accepter la calibration spectrale si tous les capillaires ont été acceptés et que les données d'émission correspondantes se sont affichées correctement. Autrement, rejeter la calibration spectrale et se reporter à la section 10, Dépannage.

Remarque : Si l'on a utilisé une option « d'emprunt » pendant la calibration spectrale, consulter le mode d'emploi de l'appareil d'électrophorèse capillaire pour connaître le nombre requis de capillaires acceptés.

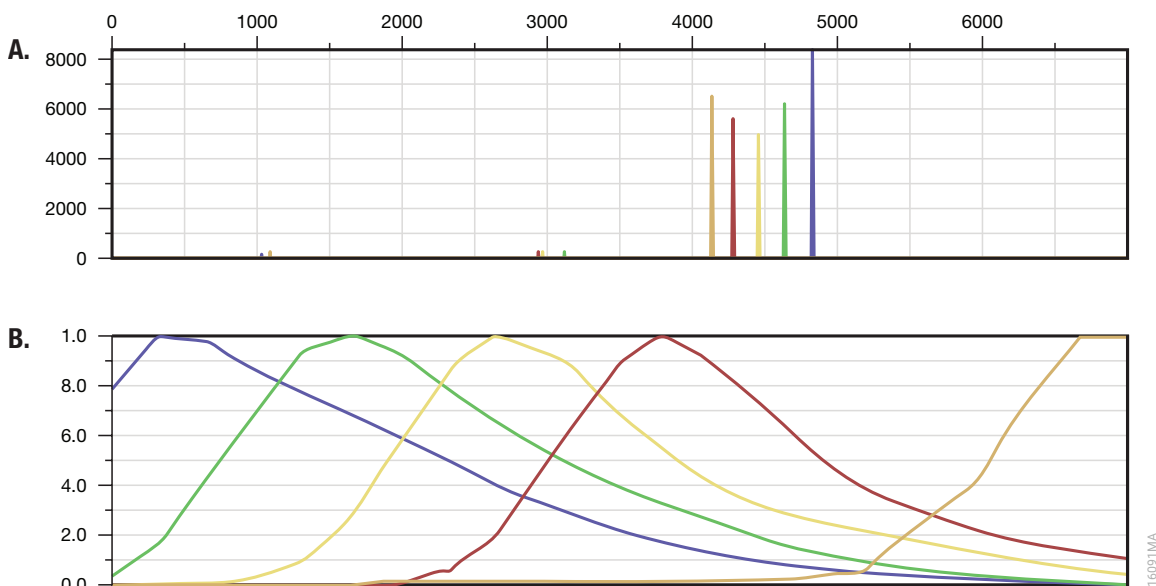


Schéma 1. Données représentatives pour la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard. Panel A. Pics de fragments résolus. **Panel B.** Spectres d'émission des fluorochromes.

10. Dépannage

Pour toute question qui n'est pas abordée ici, consulter le mode d'emploi de l'appareil d'électrophorèse capillaire ou contacter la filiale ou le distributeur local(e) de Promega : Coordonnées consultables sur : www.promega.com ; courriel : genetic@promega.com.

Symptômes	Causes et commentaires
Détection d'une pointe du signal d'électrophorèse capillaire ou d'une erreur dans l'ordre des fluorochromes.	<p>Présence de contaminants ou de dépôts cristallins dans le polymère. S'assurer que le polymère nouvellement ajouté est porté à température ambiante conformément aux consignes du fabricant. Refaire la calibration spectrale. Si nécessaire, remplacer le polymère.</p> <p>Présence de bulles dans le système fluïdique. Consulter le manuel de l'appareil d'électrophorèse capillaire pour identifier comment éliminer les bulles dans le fluide de l'appareil, puis refaire la calibration spectrale.</p>
Échec de la calibration spectrale ou de détection d'un signal.	<p>Une erreur s'est produite au niveau de l'ordinateur. Redémarrer l'appareil d'électrophorèse capillaire et son ordinateur conformément aux consignes du fabricant. Refaire la calibration spectrale.</p> <p>L'appareil n'a pas été préchauffé adéquatement. Si nécessaire, s'assurer que le four de l'appareil a été préchauffé à 60 °C pendant au moins 30 minutes avant l'étalonnage. Refaire la calibration spectrale.</p> <p>Les consommables de l'appareil étaient périmés ou leur qualité a été compromise. Pour obtenir les meilleurs résultats de calibration spectrale, utiliser du polymère et des tampons frais et un réseau de capillaires ayant subi moins de 100 injections.</p> <p>Un mauvais jeu de fluorochromes a été sélectionné pour la calibration spectrale ou bien les réglages de calibration spectrale pour ce jeu de fluorochromes ont été mal paramétrés. S'assurer qu'un jeu de 5 fluorochromes est utilisé et que ses réglages d'analyse sont correctement paramétrés (voir le tableau 1).</p> <p>Les pics de fragments détectés pendant la calibration spectrale étaient soit en trop faible quantité soit incorrects. Présence de résidus provenant de la ou des injections précédentes, ou réactifs de la matrice périmés ou mal conservés. Le cas échéant, refaire la calibration spectrale en utilisant des réactifs correctement stockés ou non périmés. Il peut être nécessaire d'effectuer une injection à blanc (formamide Hi-Di™ uniquement) avant de refaire la calibration spectrale.</p> <p>La matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard a été mal préparée. Préparer du 5C Matrix Mix fraîchement dilué selon les consignes de la section 8, puis refaire une nouvelle calibration spectrale.</p>

10. Dépannage (suite)

Symptômes

Échec de la calibration spectrale ou de détection d'un signal. (suite)

Causes et commentaires

La matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard était périmée ou s'est détériorée en raison d'un stockage inadéquat. Vérifier la date de péremption et les conditions de stockage de la matrice étalon. Si nécessaire, refaire la calibration spectrale avec des réactifs non périmés et adéquatement conservés.

Un ou plusieurs capillaires étaient bloqués. Remplir à nouveau le réseau de capillaires et refaire la calibration spectrale. Installer un nouveau réseau de capillaires, si nécessaire.

La matrice étalon était surdilué. Une matrice étalon surdilué provoquera des pics de calibration spectrale bas pouvant entraîner l'échec de la calibration. Refaire la calibration spectrale en s'assurant que le 5C Matrix Mix a suffisamment été agité avant utilisation et que le 5C Matrix Mix et le formamide Hi-Di™ sont en proportions adéquates. Si nécessaire, augmenter le volume du 5C Matrix Mix ajouté au formamide pendant la préparation de l'échantillon.

La matrice étalon était surconcentrée. Une matrice étalon surconcentrée provoquera des pics de calibration spectrale excessivement élevés. Des pics excessivement élevés peuvent entraîner une infiltration ou une soustraction excessive au niveau des autres fluorochromes et l'échec de la calibration spectrale. Si nécessaire, diminuer le volume du 5C Matrix Mix ajouté au formamide pendant la préparation de l'échantillon. Refaire la calibration spectrale en s'assurant que le 5C Matrix Mix a suffisamment été agité avant utilisation et que le 5C Matrix Mix et le formamide Hi-Di™ sont en proportions adéquates.

Du formamide de mauvaise qualité a été utilisé. La qualité du formamide est extrêmement importante. Utiliser uniquement du formamide Hi-Di™ avec la matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix Standard. Après la première utilisation, congeler le formamide en aliquots à -20 °C. Des cycles répétés de congélation-décongélation ou un stockage à long terme à 4 °C peuvent provoquer la dégradation du formamide. Un formamide de mauvaise qualité ou exposé à des cycles répétés de congélation-décongélation contient des ions qui entrent en compétition avec l'ADN pendant l'injection. Cela se traduit par une diminution de la hauteur des pics et une sensibilité réduite lors de l'électrophorèse capillaire.

Les extrémités des capillaires n'étaient pas en contact avec la matrice étalon. S'assurer que chacun des 96 puits de la plaque contient 15 µl de mélange formamide-Matrix et que la plaque a été centrifugée assez longtemps avant de démarrer la calibration spectrale.

11. Produits associés

Produit	Conditionnement	Réf.
OncoMate™ MSI Dx Analysis System	100 réactions	MD3140

^(a)U.S. Pat. No. 9,139,868, European Pat. No. 2972229, and other patents pending.

^(b)TMR-ET, CXR-ET and WEN dyes are proprietary.

© 2019 Promega Corporation. Tous droits réservés.

OncoMate est une marque de commerce de Promega Corporation.

Applied Biosystems est une marque déposée de Applied Biosystems. Hi-Di est une marque de commerce de Applera Corporation. MicroAmp et POP-7 sont des marques déposées de Thermo Fisher Scientific.

Les produits peuvent être protégés par des brevets en instance ou déposés, ou peuvent faire l'objet de certaines restrictions. Rendez-vous sur notre site Internet pour un complément d'informations. Tous les prix et toutes les caractéristiques peuvent faire l'objet de modifications sans avis préalable.

Les déclarations relatives aux produits sont sujettes à modification. Veuillez contacter le service technique de Promega ou consulter le catalogue en ligne de Promega pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits Promega.