

Instructions d'utilisation



LymphoTrack[®] Dx IGK Assay – S5/PGM[™]

Destiné à l'identification et au suivi des réarrangements clonaux du gène de chaîne légère kappa de l'immunoglobuline (IGK) des lymphocytes B à l'aide du séquençage de nouvelle génération et du dispositif Thermo Fisher Scientific[®] Ion S5[™] et Ion PGM[™].

IVD Ce test est destiné au diagnostic *in vitro*.

Représentation schématique du locus du gène IGK :



Conditions de conservation : -85 °C à -65 °C

(Les ADN contrôles peuvent être séparés des kits de test et conservés entre 2 °C et 8 °C.)

N° de référence

REF 91220007

Produits

LymphoTrack Dx IGK Assay – S5/PGM

Quantité

12 index – 5 réactions chacun

Table des matières

1.	UTILISATION PREVUE	3
2.	RESUME ET EXPLICATION DU TEST	3
2.1.	Contexte	3
2.2.	Résumé	3
3.	PRINCIPES DE LA PROCEDURE	4
3.1.	Amplification en chaîne par polymérase (PCR).....	4
3.2.	Purification des amplicons.....	4
3.3.	Quantification des amplicons	4
3.4.	Séquençage de nouvelle génération (NGS)	4
3.5.	Multiplexage des amplicons	5
4.	REACTIFS	6
4.1.	Composants	6
4.2.	Mises en garde et précautions.....	7
4.3.	Conservation et manipulation	7
5.	INSTRUMENTS	8
6.	PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	9
6.1.	Précautions.....	9
6.2.	Substances interférentes	9
6.3.	Conditions de prélèvement et manipulation.....	9
6.4.	Conservation des échantillons	9
7.	PROCEDURE DE TEST	10
7.1.	Matériel fourni.....	10
7.2.	Matériel nécessaire (mais non fourni)	10
7.3.	Préparation des réactifs.....	11
7.4.	Amplification	12
7.5.	Purification avec AMPure XP	12
7.6.	Quantification des amplicons	13
7.7.	Groupement et quantification de la bibliothèque.....	15
7.8.	Dilution de la bibliothèque poolée	15
7.9.	Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion Chef et Ion S5.....	16
7.10.	Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion OT2 et Ion S5.....	16
7.11.	Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion OT2 et Ion PGM	16
7.12.	Créer une Planned Run (Réaction programmée).....	17
8.	ANALYSE DES DONNEES	19
9.	SPECIFICATIONS DU TEST	19
10.	LIMITES DE LA PROCEDURE	19
11.	INTERPRETATION ET RAPPORTS	19
12.	DONNEES DE L'ECHANTILLON	22
13.	CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	22
14.	GUIDE DE DEPANNAGE	23
15.	SUPPORT TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT	23
16.	BIBLIOGRAPHIE	23
17.	SYMBOLES	24
18.	INFORMATIONS LEGALES	24
19.	TEST LYMPHOTRACK DX IGK - ION S5 : RESUME EN UNE PAGE	25
20.	TEST LYMPHOTRACK DX IGK - ION PGM : RESUME EN UNE PAGE	26
21.	ANNEXE A : CONFIGURER LE PLUGIN FILEEXPORTER ET CHARGER LES CODES-BARRES PERSONNALISES	27
21.1.	Vérifier la configuration du plugin <i>FileExporter</i>	27
21.2.	Charger les codes-barres personnalisés.....	27

1. Utilisation prévue

Le test LymphoTrack Dx *IGK* est un produit de diagnostic *in vitro* destiné au séquençage de nouvelle génération (NGS) à l'aide du dispositif Thermo Fisher Scientific Ion S5 ou Ion PGM afin de déterminer la distribution des fréquences des réarrangements du gène *IGK* chez les patients présentant une suspicion de pathologie lymphoproliférative. Ce test facilite l'identification de syndromes lymphoprolifératifs.

2. Résumé et explication du test

2.1. Contexte

Le locus du gène de chaîne légère kappa de l'immunoglobuline humaine (*IGK*) sur le chromosome 2 (2p11.2) inclut de nombreux segments de gène $V\kappa$ distincts, regroupés en sept familles de gènes $V\kappa$ ainsi que cinq segments de gène $J\kappa$ en amont de la région $C\kappa$. Le kappa deleting element (K_{de}), situé à environ 24 kb en aval de la région $J\kappa$ - $C\kappa$, peut se réarranger non seulement avec des segments de gène $V\kappa$ ($V\kappa$ - K_{de}), mais également avec une séquence RSS isolée avec l'intron $J\kappa$ - $C\kappa$ (INTR). Les réarrangements $V\kappa$ - K_{de} et INTR- K_{de} qui en résultent sont le produit de réarrangements infructueux conservés par le lymphocyte B (JJM van Dongen *et al.*, 2003).

Les cellules lymphoïdes diffèrent des autres cellules somatiques de l'organisme ; au cours du développement, les gènes du récepteur antigénique des cellules lymphoïdes subissent des réarrangements somatiques (Tonegawa S., 1983). Ainsi, au cours du développement des lymphocytes B, les gènes codant pour le locus *IGK* sont assemblés à partir de plusieurs segments de gènes polymorphiques subissant des réarrangements et une sélection, entraînant la formation de combinaisons de longueur et de séquence uniques. Dans la mesure où les leucémies et les lymphomes sont dus à la transformation maligne de cellules lymphoïdes individuelles, les cellules leucémiques et les cellules lymphocytaires d'un individu partagent généralement un ou plusieurs réarrangements spécifiques des cellules, ou « clonaux », de gène du récepteur antigénique. Par conséquent, les tests détectant les réarrangements clonaux du gène *IGK* peuvent être utiles à l'étude des affections malignes à lymphocytes B.

À l'origine, les réarrangements clonaux ont été identifiés à l'aide des techniques de fragment de restriction et d'hybridation en Southern Blot (RF-SBH). Toutefois, ces tests se sont avérés fastidieux et laborieux, nécessitaient de grandes quantités d'ADN et n'étaient pas appropriés pour l'analyse de la plupart des loci moins diversifiés du récepteur antigénique.

Au cours des dernières décennies, l'utilisation des tests RF-SBH a été remplacée par les tests de clonalité basés sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) développés par Alexander Morley (Trainor K.J. *et al.*, 1990), qui sont considérés comme la méthode de référence à l'heure actuelle. Ces tests identifient la clonalité sur la base de la surreprésentation des réarrangements de gènes V-D-J amplifiés (ou des produits D-J incomplets) suite à leur séparation par électrophorèse sur gel ou capillaire. Bien qu'ils soient sensibles et adaptés à l'analyse de petites quantités d'ADN, ces tests ne permettent pas de différencier aisément les populations clonales et les réarrangements multiples qui pourraient être à l'origine d'un pic unique, et ils ne sont pas conçus pour identifier la séquence d'ADN V-J spécifique, nécessaire au suivi des populations clonales dans les analyses ultérieures. Cette deuxième limitation peut être particulièrement importante, car une fois la séquence d'ADN unique spécifique du clone identifiée, elle peut être utilisée dans des tests ultérieurs pour suivre ces populations clonales.

2.2. Résumé

Le test LymphoTrack Dx *IGK* – S5/PGM représente une avancée considérable par rapport aux tests de clonalité existants ayant recours à l'analyse de fragments, dans la mesure où il détecte efficacement des réarrangements du gène *IGK* à l'aide d'un unique mélange mère (master mix) de multiplexes et identifie parallèlement la séquence d'ADN spécifique à chaque réarrangement de gène clonal. Par conséquent, ce test comporte deux utilisations importantes et complémentaires : il permet la détection des populations clonales initiales et identifie les informations de séquence requises pour suivre ces clones dans les échantillons ultérieurs. Le test LymphoTrack Dx *IGK* – S5/PGM fournit une preuve essentielle de l'existence de la clonalité et met en évidence les gènes *IGK* réarrangés spécifiques qui sont impliqués.

Chaque mélange mère (master mix) de multiplexes pour *IGK* cible les réarrangements de gènes $V\kappa$ - $J\kappa$, $V\kappa$ - K_{de} et INTR- K_{de} décrits dans les affections lymphoïdes malignes. Les amorces incluses dans les mélanges mères (master mixes) sont conçues avec des adaptateurs Thermo Fisher Scientific et 12 index différents. Ce test permet une réaction de PCR à étape unique et le regroupement d'amplicons de plusieurs échantillons et cibles différents (générés par d'autres tests LymphoTrack Dx pour l'instrument Ion S5 et Ion PGM, vendus séparément) sur une seule puce Ion S5 ou PGM, ce qui permet d'analyser jusqu'à 12 échantillons par cible en parallèle et en une seule session de séquençage.

Le logiciel LymphoTrack Dx – S5/PGM associé fournit une interprétation directe des données générées à partir des tests LymphoTrack Dx grâce à une méthode d'analyse et à une visualisation simples et rationnelles. En suivant les recommandations fournies à la section 11: *Interprétation et rapports*, il est possible d'interpréter facilement les résultats de l'échantillon résumés par le logiciel et de déterminer la présence ou l'absence d'une clonalité. **Veiller à toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.**

Les contrôles positifs et négatifs pour la clonalité sont inclus dans le kit.

Remarque : pour obtenir une explication plus détaillée du locus et de la stratégie de séquençage ciblé, se reporter à Miller JE., 2013).

3. Principes de la procédure

3.1. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les analyses par PCR sont utilisées en routine pour l'identification de populations clonales de lymphocytes B et T. Ces tests amplifient l'ADN entre les amorces qui ciblent les régions conservées V et J des gènes du récepteur antigénique. Ces amorces ciblent les régions conservées et s'étendent de part et d'autre d'une zone marquée par des réarrangements génétiques programmés se produisant au cours de la maturation de tous les lymphocytes B et T. Différentes populations de lymphocytes B et T naissent de ces réarrangements génétiques.

Les gènes codant pour le récepteur antigénique qui subissent un réarrangement sont les loci des chaînes lourdes (*IGH*) et légères (*IGK* et *IGL*) des immunoglobulines dans les lymphocytes B, ainsi que les loci des gènes du récepteur des lymphocytes T (*TRA*, *TRB*, *TRG* et *TRD*). Chaque lymphocyte B et T possède un ou deux réarrangements V–J fonctionnels, dont la longueur et la séquence sont uniques. Ainsi, quand l'ADN d'une population normale ou polyclonale est amplifié avec des amorces ADN qui flanquent la région V–J, des amplicons de séquence et de longueur uniques sont générés, lesquels reflètent la population hétérogène. Dans certains cas, en l'absence d'ADN de lymphocyte, aucun amplicon n'est généré. Pour les échantillons contenant des populations clonales d'*IGK*, jusqu'à quatre produits amplifiés (amplicons) majeurs, d'une longueur et d'une séquence identiques, sont détectés avec une fréquence significative, sur un fond polyclonal réduit.

3.2. Purification des amplicons

Les amplicons de PCR sont purifiés afin de retirer les amorces en excès, les nucléotides, les sels et les enzymes à l'aide de la technologie d'immobilisation réversible en phase solide (SPRI) au moyen de billes paramagnétiques pour la purification à haut débit d'amplicons de PCR. Grâce à un tampon optimisé, les amplicons de PCR supérieurs ou égaux à 100 paires de bases (pb) sont liés de manière sélective aux billes paramagnétiques, tandis que les contaminants tels que les amorces en excès, les dimères d'amorces, les sels et les dNTP non incorporés sont éliminés. Les amplicons peuvent alors être élués et séparés des billes paramagnétiques, ce qui permet d'obtenir un produit de PCR purifié pour l'analyse et la quantification d'amplicons en aval.

3.3. Quantification des amplicons

Les amplicons purifiés sont quantifiés par électrophorèse capillaire, qui utilise les principes de l'électrophorèse sur gel traditionnelle afin de séparer et de quantifier l'ADN sur une plateforme fonctionnant avec une puce. La quantification s'effectue en analysant un marqueur de concentration connue par rapport à des amplicons et en extrapolant la concentration des amplicons. Le calcul de la concentration de produits de PCR permet une représentation égale des amplicons dans la bibliothèque commune finale qui est chargée dans la cartouche Ion S5 ou la puce Ion PGM pour le séquençage.

3.4. Séquençage de nouvelle génération (NGS)

Les méthodes de séquençage de Sanger sont les plus populaires parmi les technologies de séquençage des acides nucléiques de « première génération ». Les méthodes plus récentes, qui tirent grandement parti des approches de séquençage en parallèle, sont souvent appelées « NGS ». Ces technologies peuvent utiliser diverses stratégies combinées de préparation de la séquence modèle (template), de séquençage, d'imagerie et de bio-informatique pour l'alignement et l'assemblage du génome.

Les technologies de NGS utilisées dans ce test reposent sur l'amplification de séquences génétiques utilisant une série d'amorces consensus, sens et antisens comprenant des adaptateurs et des marqueurs d'index. Les amplicons générés avec les

mélanges mères (master mixes) LymphoTrack Dx sont quantifiés, groupés et chargés dans une puce pour le séquençage avec l'instrument Thermo Fisher Scientific Ion S5 ou Ion PGM. Ces plateformes nécessitent que la bibliothèque poolée de fragments d'ADN soit liée à des billes individuelles avant le séquençage, avec une seule séquence par bille. Une fois liés aux billes, les fragments d'ADN sont amplifiés par PCR en émulsion jusqu'à ce qu'ils recouvrent la surface des billes. Les billes sont ensuite chargées dans une puce à semi-conducteur dans des puits individuels où se déroule le séquençage.

Le séquençage est réalisé en imprégnant la puce de chaque nucléotide non incorporé base par base (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), et les instruments de séquençage détectent l'ajout de nucléotides lorsque des ions hydrogène sont libérés lors de la polymérisation de l'ADN, entraînant une altération du pH des puits, qui peut être mesurée sous forme d'une modification de la tension. Cette modification de la tension est proportionnelle au nombre de nucléotides ajoutés. Une fois les nucléotides ajoutés, les nucléotides non incorporés sont lavés et le processus recommence avec un nouveau dNTP.

3.5. Multiplexage des amplicons

Ce test est conçu pour effectuer deux niveaux différents de multiplexage afin de permettre aux laboratoires de réduire les coûts et de gagner du temps. Le premier niveau de multiplexage provient des index multiples fournis avec les tests (jusqu'à 12). Chacun de ces 12 index peut être considéré comme un code-barre unique qui permet aux amplicons d'échantillons individuels d'être regroupés après l'amplification par PCR afin de générer une bibliothèque de séquençage. Les séquences obtenues sont triées par un logiciel de bio-informatique afin d'identifier celles qui proviennent d'un échantillon en particulier.

Le second niveau de multiplexage provient de la capacité du logiciel fourni à trier les données de séquençage par index et par cible. Cela permet aux amplicons générés avec les amorces cibles (même ceux comportant le même index) d'être regroupés en une seule bibliothèque et d'être séquencés sur une seule puce de séquençage. Il est notamment possible de séquencer les produits de différents tests Invivoscribe LymphoTrack Dx au cours de la même analyse. Toutefois, il est important d'obtenir un nombre de lectures (ou une profondeur de couverture) suffisant pour une interprétation valide de chaque échantillon.

En raison de la capacité de la puce Thermo Fisher Scientific Ion PGM Ion 316™ Chip v2 BC, qui peut générer 2 à 3 millions de lectures, il est recommandé de multiplexer conjointement un maximum de trois gènes cibles différents, tels que *IGH* FR1, *IGH* FR2 et *IGH* FR3. Les puces Ion PGM Ion 318™ Chip v2 B (4 à 5,5 millions de lecture), Ion S5 Ion 520™ Chip (3 à 6 millions de lectures) et Ion S5 Ion 530™ Chip (15 à 20 millions de lectures) permettent de multiplexer conjointement jusqu'à cinq gènes cibles différents. Il est important d'en tenir compte afin d'obtenir un nombre de lectures de chaque échantillon suffisant pour une interprétation valide.

Il est important d'utiliser la chimie de séquençage appropriée lors du multiplexage des amplicons de différents gènes cibles. Le nombre de cycles de séquençage doit être suffisant pour séquencer le plus grand amplicon au cours de l'analyse multiplexe. Deux ou plusieurs bibliothèques de séquençage générées à partir des mêmes mélanges mères (master mixes) de gène cible LymphoTrack Dx (*p. ex.*, deux bibliothèques de séquençage *IGK*, provenant de lots identiques ou différents) peuvent également être multiplexées ensemble dans une bibliothèque de séquençage unique à condition que chaque index pour ce mélange mère ne soit inclus qu'une fois par cycle de séquençage.

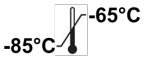


4. Réactifs

4.1. Composants

Tableau 1. Kits disponibles

N° de référence	Description	Nb de mélanges mères indexés	Nombre total de réactions
REF 91220007	Test LymphoTrack Dx IGK – S5/PGM	12 index – 5 séquençages chacun	60

Tableau 2. Composition du kit

Réactifs	Composants	Numéro de l'index	Quantité unitaire	91220007 Nb d'unités	Température de conservation	Remarques
Mélanges mères[‡]	IGK S5/PGM 01	IonXpress_001	250 µl	1		s.o. (sans objet)
	IGK S5/PGM 02	IonXpress_002		1		
	IGK S5/PGM 04	IonXpress_004		1		
	IGK S5/PGM 08	IonXpress_008		1		
	IGK S5/PGM 09	IonXpress_009		1		
	IGK S5/PGM 10	IonXpress_010		1		
	IGK S5/PGM 11	IonXpress_011		1		
	IGK S5/PGM 12	IonXpress_012		1		
	IGK S5/PGM 13	IonXpress_013		1		
	IGK S5/PGM 14	IonXpress_014		1		
	IGK S5/PGM 16	IonXpress_016		1		
	IGK S5/PGM 17	IonXpress_017		1		
ADN contrôle positif	IGK POS (+) REF 40880018)	s.o. (sans objet)	45 µl	2		ADN IGK V3D-20_01 / IGK DEL dans l'ADN d'amygdale
ADN contrôle négatif	NGS NÉG (-) REF 40920018)	s.o. (sans objet)	45 µl	2		ADN d'amygdale, la fréquence de séquence la plus élevée peut varier d'un lot à l'autre

Remarque : aucun conservateur n'est utilisé dans la fabrication de ces kits.

‡Remarque : les index IonXpress 3, 5, 6, 7, et 15 ne sont pas utilisés dans ce kit.

4.2. Mises en garde et précautions



Veillez lire attentivement les instructions d'utilisation avant de débiter la procédure de test et suivre attentivement chaque étape.

- **IVD** Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*.
- Le kit d'analyse forme un système qui doit être utilisé tel quel. Ne pas remplacer les réactifs par ceux d'un autre fabricant. Une dilution, une réduction des réactions d'amplification ou tout autre écart par rapport à ce protocole peut affecter la performance de ce test et/ou annuler toute sous-licence limitée accordée avec l'achat de ce kit.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- Le respect du protocole garantit une performance optimale et une bonne reproductibilité. Veiller à utiliser les programmes de thermocycleur adéquats, les autres programmes pouvant donner des résultats imprécis/faussés, comme des faux positifs et des faux négatifs.
- Ne pas mélanger ou combiner les réactifs de kits comportant des numéros de lots différents.
- Éliminer les réactifs non utilisés et les déchets conformément à la réglementation en vigueur dans votre pays.
- Réaliser toutes les procédures de laboratoire avec un équipement de protection individuelle standard (gants, blouse et lunettes de protection). Suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les précautions universelles lors de la manipulation des échantillons. Ne pas pipetter à la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire. Se laver soigneusement les mains après manipulations des échantillons et des réactifs de test. Manipuler les échantillons dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées et ouvrir les récipients uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée. Utiliser de l'eau de qualité « biologie moléculaire » pour la préparation de l'échantillon d'ADN.
- En raison de la sensibilité analytique de ce test, prendre de très grandes précautions pour éviter la contamination des réactifs ou des mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des matériels amplifiés. Utiliser de nouvelles pointes de pipette à filtre entre les échantillons et entre chaque transfert de réactifs. Contrôler attentivement tous les réactifs pour détecter tout signe de contamination (*p. ex.*, contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs susceptibles d'être contaminés.
- Afin de minimiser la contamination, porter des gants propres lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et nettoyer fréquemment les plans de travail et les pipettes avant de réaliser la PCR.
- La progression du travail doit toujours se faire en sens unique entre des zones de travail séparées dans le laboratoire réalisant la PCR : commencer par la préparation des mélanges mères (master mixes), suivie de la préparation des échantillons, puis de l'amplification et terminer par la détection. L'autoclavage n'élimine pas l'ADN issu d'une contamination. Réaliser les étapes avant et après la PCR dans des zones distinctes. Éviter d'emporter du papier et d'autres matériels de la zone de PCR (post-PCR) vers la zone destinée aux étapes préparatoires de la PCR (pré-PCR).
- Réserver toutes les pipettes et les pointes de pipette, ainsi que tout le matériel utilisé dans une zone particulière à cette zone du laboratoire.
- Décontaminer les articles non jetables avec une solution contenant 10 % de javel et les rincer à l'eau distillée à deux reprises avant de les replacer dans les zones où ils sont initialement utilisés.
- Utiliser du matériel plastique jetable et stérile dans la mesure du possible pour éviter une contamination.

4.3. Conservation et manipulation

- Conserver le test entre **-85°C et -65°C** jusqu'à son utilisation.
- La température de conservation optimale des ADN contrôles est de 2°C à 8°C, mais l'ADN peut également être conservé entre -85°C et -65°C.
- Tous les réactifs et les contrôles doivent être décongelés et agités ou mélangés soigneusement avant utilisation pour une remise en suspension complète.
- En raison de la concentration élevée en sel, les mélanges mères (master mixes) de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Le nombre de cycles doit être limité à cinq maximum.

Pour toute question, veuillez contacter le personnel technique d'Invivoscribe. Nous vous aiderons volontiers à déterminer vos conditions de conservation optimales.

5. Instruments

L'utilisation des instruments indiqués dans le Tableau 3 est recommandée avec les combinaisons de plateforme validées suivantes pour la préparation de la bibliothèque et le séquençage avec le test LymphoTrack Dx *IGK* – S5/PGM :

- Ion Chef™ et Ion S5
- Ion OneTouch 2™ (OT2) et Ion S5
- Ion OT2 et Ion PGM

Tableau 3. Instruments recommandés

Fonction de l'instrument	Combinaison de plateforme validée et instruments/spécifications recommandés		
	Ion Chef et Ion S5	Ion OT2 et Ion S5	Ion OT2 et Ion PGM
Amplification des échantillons d'ADN	<p>Veriti™ Dx Thermal Cycler Plage de température minimale : 15°C à 96°C Vitesse minimale de montée de la température : 0,8°C/s Voir la section 7.4. <i>Amplification</i> pour le programme du thermocycleur.</p>		
Purification des produits de PCR	<p>Ambion® Magnetic Stand 96* (REF AM10027), Agencourt SPRiPlate® 96 Ring Super Magnet Plate* (REF A32782), Thermo Fisher Scientific DynaMag™-96 Side Skirted Magnet* (REF 12027) Voir la section 7.5. <i>Purification avec AMPure XP</i> pour les méthodes de purification des produits de PCR.</p>		
Quantification des produits de PCR purifiés	<p>Agilent 2100 Bioanalyzer* ou Perkin Elmer LabChip GX* Voir la section 7.6. <i>Quantification des amplicons</i> pour plus de détails.</p>		
Préparation du modèle	<p>Système Thermo Fisher Scientific Ion Chef* Voir la section 7.9. <i>Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion Chef et Ion S5</i> pour plus de détails.</p>	<p>Système Thermo Fisher Scientific Ion OT2* Voir la section 7.10. <i>Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion OT2 et Ion S5</i> pour plus de détails.</p>	<p>Système Thermo Fisher Scientific Ion OT2* Voir la section 7.11 <i>Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion OT2 et Ion PGM</i> pour plus de détails.</p>
Séquençage	<p>Instrument Thermo Fisher Scientific Ion S5* Voir les sections 7.9. <i>Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion Chef et Ion S5</i> et 7.10. <i>Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion OT2 et Ion S5</i> pour plus de détails.</p>		<p>Instrument Thermo Fisher Scientific Ion PGM* Voir la section 7.11 <i>Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion OT2 et Ion PGM</i> pour plus de détails.</p>

Remarque : suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.

*Mise en garde : ces produits ne comportent pas le marquage CE.

6. Prélèvement et préparation des échantillons

6.1. Précautions

Les échantillons biologiques humains peuvent contenir des matériels potentiellement infectieux. Manipuler tous les échantillons conformément au programme de contrôle des pathogènes transmissibles par le sang de votre établissement et/ou au Niveau 2 de sécurité biologique.

6.2. Substances interférentes

Les substances suivantes peuvent interférer avec la PCR :

- Chélateurs de cations divalents
- Pointes de pipette à faible rétention
- EDTA (non significatif à faible concentration)
- Héparine

6.3. Conditions de prélèvement et manipulation

- La quantité ajoutée minimale est de 50 ng d'ADN de haute qualité (5 µl d'échantillon d'ADN à la concentration minimale de 10 ng/µl).
- Ce test analyse l'ADN génomique extrait et purifié. L'ADN doit être quantifié au moyen d'une méthode spécifique à l'ADN double brin (ADNdb) et dépourvue d'inhibiteurs de l'amplification par PCR.
- Remettre en suspension l'ADN dans une solution appropriée telle qu'un tampon TE dilué au 1/10 (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, préparée dans de l'eau de qualité biologie moléculaire) ou dans de l'eau de qualité biologie moléculaire seule.

6.4. Conservation des échantillons

Conserver les échantillons à l'aide d'une méthode prévenant la dégradation de l'ADN.

7. Procédure de test

7.1. Matériel fourni

Voir le Tableau 2 pour le matériel fourni.

7.2. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Tableau 4. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs nécessaires et/ou recommandés/fournisseurs	N° de référence	Remarques
ADN polymérase	Roche : <ul style="list-style-type: none"> ADN polymérase EagleTaq™ ou Invivoscribe, Inc. : <ul style="list-style-type: none"> FalconTaq DNA Polymerase ou équivalente 	05206944190 ou 60970130	5 U/μl
Eau de qualité biologie moléculaire	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)	Exempte de toute DNase et RNase
Eau 18 MΩ	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)	Nécessaire à l'analyse PGM
Pipettes étalonnées	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 0,2 à 1 000 μl.
Vortex	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)
Plaques ou tubes PCR	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)
Pointes de pipette à filtre	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)	Stériles, exempts de RNase/DNase/pyrogène
Tubes microcentrifuges	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)	Stériles
Kit de purification de produits de PCR	Beckman Coulter®, Inc : <ul style="list-style-type: none"> Agencourt AMPure XP 	A63880	s.o. (sans objet)
Quantification des amplicons et de la bibliothèque	Agilent® Technologies : <ul style="list-style-type: none"> Agilent DNA 1000 Kit ou Perkin Elmer : <ul style="list-style-type: none"> HT DNA 1K/12K/Hi Sens Labchip et HT DNA HiSens Reagents 	5067-1504 ou 760517 et CLS760672	s.o. (sans objet)
Séquençage Ion S5	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Ion 520 et Ion 530 Kit – OT2 ou Ion 510, Ion 520 et Ion 530 Kit – Chef 	A27751 ou A34019	s.o. (sans objet)
	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Ion 520 Chip Kit ou Ion 530 Chip Kit 	A27761 ou A27764	s.o. (sans objet)
Séquençage Ion PGM	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit 	A29900	s.o. (sans objet)
	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Ion PGM Enrichment Beads 	4478525	s.o. (sans objet)
	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit et Ion PGM Wash 2 Bottle Kit 	A30044 et A25591	s.o. (sans objet)
	Thermo Fisher Scientific : <ul style="list-style-type: none"> Ion 316 Chip v2 BC ou Ion 318 Chip Kit v2 BC 	4488149 ou 4488146	s.o. (sans objet)

Tableau 4. Matériel nécessaire (mais non fourni)

Réactif/Matériel	Réactifs nécessaires et/ou recommandés/fournisseurs	N° de référence	Remarques
Le logiciel Torrent Suite™ pour le système Ion PGM ou système Ion S5	Version 5.0.4 ou 5.2.2 pour PGM* ou Version 5.6 pour S5*	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)

*Remarque : ces versions du logiciel ont été utilisées dans le cadre de la validation sur les instruments spécifiés.

7.3. Préparation des réactifs

Afin de garantir que les échantillons d'ADN ne contiennent pas d'inhibiteur de la PCR et qu'ils sont de qualité adéquate et en quantité suffisante pour générer des résultats fiables, les échantillons peuvent être analysés avec le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder d'Invivoscribe (REF 20960021 pour la détection ABI ou REF 20960020 pour la détection sur gel). Le Specimen Control Size Ladder cible différents gènes et génère une série d'amplicons 100, 200, 300, 400 et 600 pb; la taille peut varier de +/- 5 points de base en raison des différences de norme de taille et/ou d'instrument. La vérification de l'intégrité de l'ADN est particulièrement importante pour les échantillons difficiles, p. ex. le tissu fixé au formol et inclus dans la paraffine (FFIP).

Toujours utiliser les contrôles positifs et négatifs pour vérifier que l'analyse a été réalisée correctement.

Toujours utiliser un contrôle négatif sans ADN (no template control, NTC) pour rechercher une éventuelle contamination au cours de la préparation de la PCR.

- 7.3.1. Enfiler des gants et retirer les mélanges mères (master mixes) du congélateur. Laisser les tubes décongeler complètement, puis vortexer doucement pour mélanger et terminer par une centrifugation très brève.
- 7.3.2. Sous une hotte de confinement ou de sécurité, pipetter 45 µl de chaque mélange mère (master mix) dans une plaque PCR propre (un puits pour chaque mélange mère (master mix) et un mélange mère (master mix) par échantillon).
 - Inclure deux contrôles dans chaque analyse (un positif et un négatif) ainsi qu'un NTC.
 - Pour le NTC, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire comme modèle à la place de l'ADN.
- 7.3.3. Ajouter 0,2 µl d'ADN polymérase Taq (à 5 U/µl) dans chaque puits contenant les mélanges mères (master mixes) aliquotés.
- 7.3.4. Ajouter 5 µl d'échantillon d'ADN (à la concentration minimale de 10 ng/µl), d'ADN contrôle ou d'eau de qualité biologie moléculaire (NTC) respectivement dans chacun des puits individuels contenant les réactions de mélange mère (master mix).
 - Aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger.
 - Sceller la plaque, la centrifuger brièvement et la placer dans le thermocycleur pour PCR.

Tableau 5. Mise au point de la réaction

Réactif	Volume
Mélange mère	45,0 µl
ADN polymérase Taq	0,2 µl
Échantillon ou ADN contrôle	5,0 µl
Total	50,2 µl

7.4. Amplification

- 7.4.1. Amplifier les échantillons en utilisant le programme PCR du Tableau 6.

Tableau 6 Programme PCR

Étape	Température	Durée	Cycle
1	95°C	7 minutes	1
2	95°C	45 secondes	29 x
3	60°C	45 secondes	
4	72°C	90 secondes	
5	72°C	10 minutes	1
6	15°C	∞	1

- 7.4.2. Une fois le programme d'amplification terminé, retirer la plaque de PCR amplifiée du thermocycleur. Si les étapes suivantes ne sont pas immédiatement effectuées, conserver les produits de PCR amplifiés à 4°C pendant 1 jour.

7.5. Purification avec AMPure XP

La purification des produits de PCR à partir des échantillons, des contrôles positifs et négatifs et des contrôles sans ADN a été réalisée au cours de la validation du test à l'aide du système de purification de produits de PCR Agencourt AMPure XP.

Préparation :

- 7.5.1. Retirer le réactif AMPure XP de son lieu de conservation et le laisser atteindre la température ambiante avant utilisation. Agiter doucement le flacon Agencourt AMPure XP pour remettre en suspension toutes les particules magnétiques ayant pu se déposer.
- 7.5.2. Transférer le volume approprié de réactif Agencourt AMPure XP nécessaire à la plaque dans un nouveau tube de 2 ml afin de minimiser le risque de contamination par les pointes de pipette.
- Le volume de réactif Agencourt AMPure XP est égal à $n \times 90 \mu\text{l}$ (n représente le nombre d'échantillons à purifier).
- 7.5.3. Préparer une solution extemporanée (0,5 ml pour chaque échantillon à purifier) d'éthanol à 70 % en utilisant de l'eau stérile.

Liaison des amplicons aux particules magnétiques :

- 7.5.4. Ajouter 90 μl de réactif Agencourt AMPure XP, aliquoté et à **température ambiante**, à chaque échantillon à purifier.
- Mélanger en aspirant et en expulsant 10 fois avec la pipette.
 - La couleur doit être homogène après le mélange.
 - Incuber 5 minutes à température ambiante.
- 7.5.5. Placer les échantillons mélangés sur un support Ambion Magnetic Stand 96 et incuber à température ambiante pendant 5 minutes afin de séparer les particules magnétiques de la solution.
- Conserver la plaque sur le support magnétique en permanence au cours de cette procédure, jusqu'à l'étape 7.5.10 ci-dessous.
- 7.5.6. À l'aide d'une pipette P200 (ou d'une pipette multicanaux équivalente) réglée sur 135 μl , aspirer le surnageant limpide et le jeter.
- Utiliser une pipette P10 (ou une pipette multicanaux équivalente) réglée sur 10 μl afin de retirer l'éventuel excès de surnageant.
 - Éviter de retirer les particules magnétiques.

Lavage :

- 7.5.7. Tout en conservant la plaque sur le support magnétique, ajouter 200 µl d'éthanol à 70 % à chaque échantillon. Incuber pendant 30 secondes à température ambiante.
- À l'aide d'une pipette P200 (ou d'une pipette multicanaux équivalente) réglée sur 195 µl, aspirer l'éthanol et le jeter.
 - Utiliser une pipette P10 (ou une pipette multicanaux) réglée sur 10 µl afin de retirer l'éventuel excès d'éthanol.
 - Éviter de retirer les particules magnétiques.
- 7.5.8. Répéter l'étape 7.5.7 pour obtenir deux lavages au total.
- 7.5.9. Avec la plaque toujours sur le support magnétique, laisser les particules magnétiques sécher à l'air libre pendant 5 minutes.

Élution :

- 7.5.10. Retirer la plaque du support magnétique. Ajouter 40 µl de tampon TE 1X.
- Mélanger en pipettant jusqu'à ce que la solution soit homogène.
 - Vérifier que toutes les particules magnétiques sont présentes dans la solution.
- 7.5.11. Incuber 2 minutes à température ambiante.
- 7.5.12. Placer la plaque sur le support magnétique pendant au moins 5 minutes ou jusqu'à la clarification du surnageant.
- 7.5.13. Transférer 35 µl d'éluat dans une nouvelle plaque et sceller avec des bouchons en bande. Étiqueter la plaque et centrifuger brièvement afin de garantir que le surnageant soit bien déposé au fond du puits.
- Conserver à -20°C ou passer à l'étape suivante.

L'image du gel de la Figure 1 illustre l'efficacité d'une purification type.

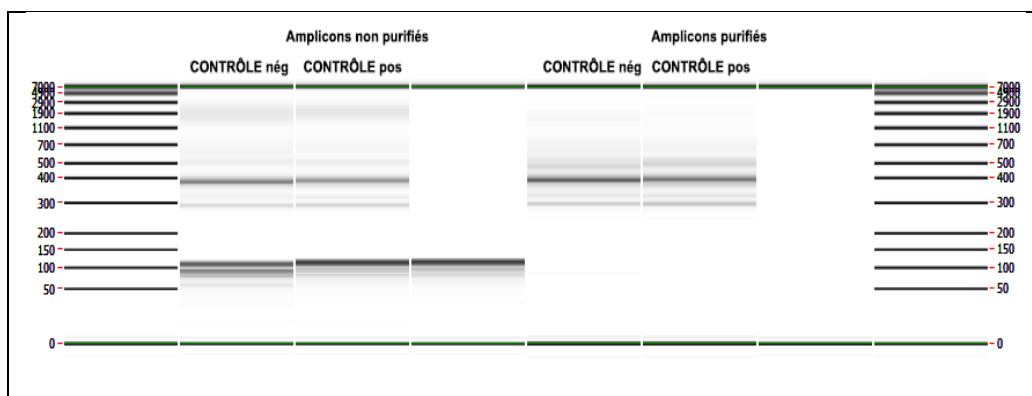


Figure 1 : exemple de résultat d'une purification des amplicons des mélanges mères (master mixes) LymphoTrack Dx *IGK*. L'image a été générée en analysant les produits non purifiés et purifiés avec l'instrument LabChip GX.

7.6. Quantification des amplicons

Les étapes suivantes ont été réalisées au cours de la validation du test afin d'analyser les données à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 Bioanalyzer, à partir de l'étape 7.6.1 ou du dispositif Perkin Elmer LabChip GX, à partir de l'étape 7.6.3, afin de quantifier les amplicons de PCR purifiés générés à partir des échantillons, des contrôles et du contrôle négatif sans ADN (NTC).

En cas de quantification d'amplicons de PCR purifiés à partir d'autres tests LymphoTrack Dx, veiller à analyser chaque cible séparément (en particulier les différentes régions structurales) en raison des plages de taille différentes de chaque cible de test.

Quantification à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 Bioanalyzer

Préparer une puce Agilent DNA 1000 (veuillez consulter les instructions du kit Agilent DNA 1000 pour plus de détails).

Interprétation des résultats :

7.6.1. L'électrophérogramme du puits de l'échelle doit être semblable à l'électrophérogramme de la Figure 2. Les caractéristiques principales d'une analyse réussie sont les suivantes :

- 13 pics pour l'échelle ADN 1000
- Pics tous bien définis
- Ligne de base plate
- Identification correcte des deux marqueurs

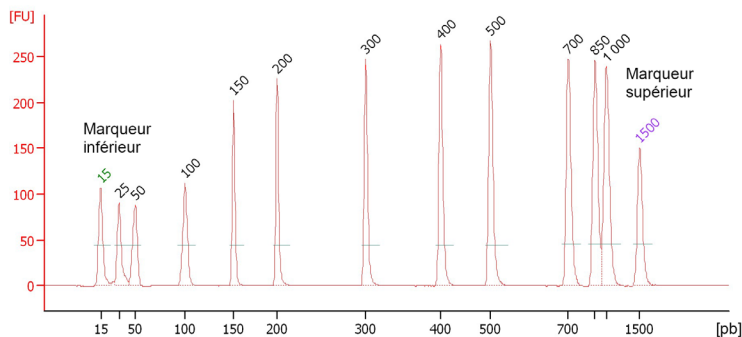


Figure 2 : exemple d'électrophérogramme du puits de l'échelle montrant l'ensemble des 13 pics.

7.6.2. Déterminer la concentration molaire (nmol/l) de chaque échantillon à l'aide du logiciel du bioanalyseur. Si nécessaire, utiliser l'intégration manuelle pour placer la totalité de la plage de fragments de la bibliothèque dans un seul pic.

Quantification à l'aide du dispositif Perkin Elmer LabChip GX

Préparer la puce LabChip GX (consulter les instructions du dispositif Perkin Elmer LabChip GX pour plus de détails).

Analyse des données :

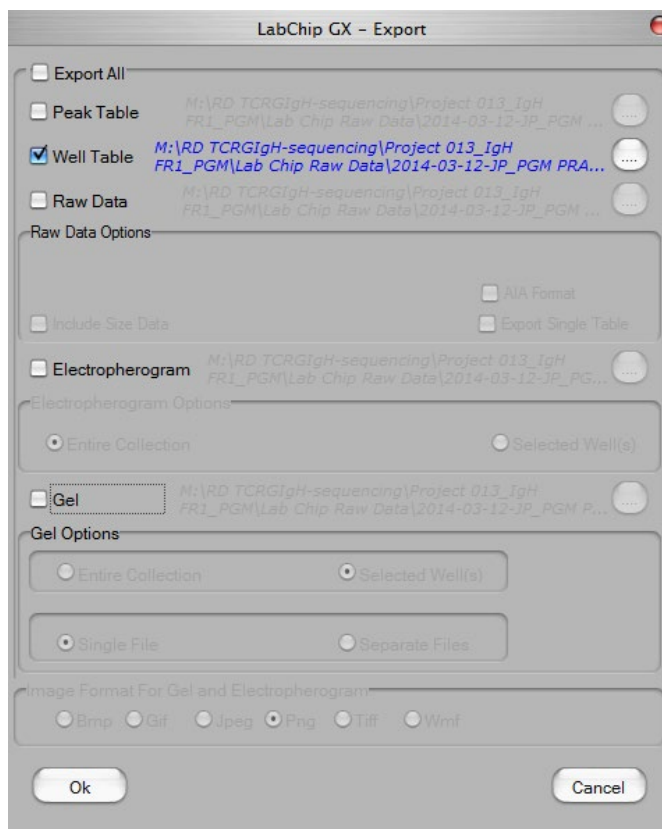
- 7.6.3. Par défaut, à chaque fois qu'un échantillon est analysé, le fichier de données (*.gxd) est enregistré dans un nouveau dossier (comportant la date actuelle) qui peut être ouvert depuis le raccourci vers le dossier **Data (Données)** sur le bureau.
- 7.6.4. Transférer le dossier contenant le fichier de données (*.gxd) sur l'ordinateur pour l'analyse.
- 7.6.5. Ouvrir le logiciel LabChip GX, aller dans la barre de menu et sélectionner **File → Import Data file (Fichier → Importer un fichier de données)** afin d'ouvrir le fichier de données transférées (*.gxd).
- 7.6.6. Dans le coin supérieur gauche de l'écran se trouve un diagramme de plaque. Sélectionner les puits utilisés lors de la réaction pour afficher les données associées dans les tableaux de données ci-dessous. Les puits apparaissent en bleu une fois sélectionnés.
- 7.6.7. Dans la barre de menu, sélectionner **Analysis → Analysis Settings (Analyse → Paramètres d'analyse)**.
- Sélectionner l'onglet *Smear Analysis (Analyse de la traînée)* et ajouter les informations du Tableau 6.
 - Une fois les informations modifiées, cliquer sur le bouton **Apply (Appliquer)**.

Tableau 6. Paramètres de l'analyse de la traînée

Taille de départ (PB)	Taille d'arrivée (PB)	Couleur	Nom	Propriété affichée dans le tableau du puits	Appliquer aux puits
200	1 600	Rouge	Région [200-1 600]	Région [200-1 600] Taille [BP]	<tous>
200	1 600	Rouge	Région [200-1 600]	Concentration molaire (nmol/l)	<tous>

- 7.6.8. De retour sur l'écran principal, aller dans la barre de menu et sélectionner **File → Export (Fichier → Exporter)**.
- 7.6.9. Vérifier la partie *Well Table (Tableau du puits)* dans la fenêtre contextuelle (intitulée LabChip GX – Export).
- 7.6.10. Cliquer sur **OK** pour exporter un fichier *.csv.
- 7.6.11. Calculer la concentration d'amplicons non dilués en multipliant le facteur de dilution (50) par la concentration donnée par l'instrument LabChip GX (nmol/l).

Figure 3 : exemple de la fenêtre contextuelle LabChip GX – Export.



7.7. Groupement et quantification de la bibliothèque

La quantité d'ADN de la bibliothèque chargée dans la PCR en émulsion de l'instrument Ion S5 ou Ion PGM est essentielle pour générer des données de haute qualité lors du séquençage.

Les amplicons générés à partir d'un ou de plusieurs tests LymphoTrack Dx peuvent être regroupés en une seule bibliothèque pour le séquençage en suivant les instructions figurant ci-après.

7.7.1. Sur la base de la concentration d'amplicon calculée par le bioanalyseur ou l'instrument LabChip GX, ajouter une **quantité égale d'amplicons** (à l'exception de l'échantillon NTC).

- *p.ex.*, ajouter 10 µl d'amplicons à 4 nM chacun dans un tube ; utiliser le tampon TE 1X comme diluant.
- Vortexer le tube de bibliothèque pendant 5 à 15 secondes, puis centrifuger pendant 3 à 5 secondes.

Si la concentration de certains échantillons est bien plus faible ou plus élevée que 4 nM, ajuster les volumes d'échantillon/de tampon TE ajoutés à la bibliothèque, en veillant à pipetter une quantité d'amplicons égale par échantillon.

7.8. Dilution de la bibliothèque poolée

7.8.1. Déterminer le facteur de dilution de la matrice pour obtenir une concentration finale égale à ~20 pM (~12 x 10⁶ molécules par µl) à l'aide de la formule suivante :

Facteur de dilution de la matrice = (Concentration de la bibliothèque en pM) / 20 pM

Exemple :

La concentration de la bibliothèque est égale à 4 nM (4 000 pM)

Facteur de dilution de la matrice = 4 000 pM / 20 pM = 200

Ainsi, 1 µl de la bibliothèque mélangé à 199 µl de tampon TE 1X ou d'eau sans nucléase fournie dans le kit Ion PGM Hi-Q View OT2 (dilution au 1/200) donne environ 20 pM (~12 x 10⁶ molécules par µl).

Utiliser la bibliothèque diluée dans les 48 heures qui suivent la préparation.

7.9. Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion Chef et Ion S5

Préparer et enrichir des particules Ion Sphere matrice brin sens puis effectuer un séquençage avec l'instrument Ion S5 conformément aux instructions des Guides de l'utilisateur de Thermo Fisher Scientific suivants :

- Ion 510, Ion 520 et Ion 530 Kit – Chef ([REF](#) MAN0016854)

7.9.1. Créer une réaction programmée conformément à la section 7.12.

Toutes les étapes, notamment les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage, de nettoyage et de maintenance sont réalisées conformément aux instructions du fabricant.

7.10. Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion OT2 et Ion S5

Préparer et enrichir des particules Ion Sphere matrice brin sens à l'aide du kit OT2 puis effectuer un séquençage avec l'instrument Ion S5 conformément aux instructions du Guide de l'utilisateur de Thermo Fisher Scientific suivant :

- Ion 520 et Ion 530 Kit – OT2 ([REF](#) MAN0010844)

7.10.1. Créer une réaction programmée conformément à la section 7.12.

Toutes les étapes, notamment les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage, de nettoyage et de maintenance sont réalisées conformément aux instructions du fabricant.

7.11. Préparation du modèle et séquençage avec les instruments Ion OT2 et Ion PGM

Préparer et enrichir des particules Ion Sphere matrice brin sens à l'aide du kit OT2 puis effectuer un séquençage avec l'instrument Ion PGM conformément aux instructions des Guides de l'utilisateur de Thermo Fisher Scientific suivants :

- Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit ([REF](#) MAN0014579)
- Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit ([REF](#) MAN0014583)

Toutes les étapes, notamment les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage, de nettoyage et de maintenance sont réalisées conformément aux instructions du fabricant sauf indication contraire.

Remarque : ne pas utiliser l'étalon Ion PGM Calibration Standard.

7.11.1. Préparer le modèle à l'aide de l'instrument Ion OT2

- Sélectionner **PGM : Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit - 400** dans le menu déroulant.

7.11.2. Séquencer la bibliothèque à l'aide de l'instrument Ion PGM

- Suivre les instructions de chargement de la puce à la section 7.11.3.
- Créer une réaction programmée conformément à la section 7.12.

7.11.3. Chargement de la puce Ion PGM

Suivre les instructions de chargement de la puce ci-après pour un chargement optimal.

7.11.3.1 Après *Chip Check (Vérification de la puce)*, préparer la puce pour le chargement conformément aux instructions du fabricant.

7.11.3.2 Après avoir chargé les ISP au moyen d'une technique de pipetage inverse (~30 µl) dans la puce à une vitesse d'environ 1 µl par seconde, transférer la puce dans le godet de la mini-centrifugeuse avec la languette de la puce orientée vers l'intérieur (c'est-à-dire vers le centre de la mini-centrifugeuse).

- Utiliser la mini-centrifugeuse pendant 30 secondes avec la languette de la puce orientée vers l'intérieur, puis orientée vers l'extérieur.

7.11.3.3 Taper fermement l'extrémité de la languette de la puce sur la paille 2 à 3 fois. Pour éviter la formation de bulles d'air, ne pas aspirer et expulser à nouveau l'échantillon dans la puce.

- 7.11.3.4. Orienter la puce à 45° et retirer doucement autant de liquide que possible du port de chargement en remontant la pipette. Jeter le liquide.
- 7.11.3.5. Si du liquide reste dans la puce, centrifuger rapidement pendant 5 secondes avec la languette de la puce orientée vers l'extérieur puis retirer et jeter tout excédent de liquide. Ne pas centrifuger la puce à l'envers.
- 7.11.3.6. Si du liquide reste encore dans la puce après la centrifugation rapide, tapoter légèrement et rapidement l'extrémité de la languette de la puce contre la paillasse à plusieurs reprises, puis retirer et jeter tout liquide collecté. Ne pas rincer la puce. Continuer immédiatement en sélectionnant *Planned Run* (Réaction programmée) et *Performing the Run* (Effectuer l'analyse) (section 7.12).

Remarque : les validations ont été réalisées conformément aux guides de l'utilisateur Thermo Fisher Scientific figurant dans la section 16 : *Bibliographie* tout en suivant la procédure de chargement de la puce dans les godets remplis. Après l'étape de liaison des amorces de séquençage, les réactions sont restées dans le thermocycleur à 15°C au lieu d'être à température ambiante.

En cas d'utilisation du logiciel Torrent Suite v5.2.2 ou v5.6, suivre la procédure détaillée dans l'Annexe A afin de vérifier la configuration du plugin *FileExporter* et de charger les codes-barres personnalisés à l'aide du fichier *LymphoTrack_IonXpress.csv* inclus dans le CD fourni (REF 95000007). En cas d'utilisation de la version v5.0.4 du logiciel Torrent Suite, veuillez passer à l'étape.

7.12. Créer une Planned Run (Réaction programmée).

- 7.12.1. Créer une réaction programmée pour **Ion S5** ou **PGM**. Se connecter au *Torrent Browser* (*Navigateur Torrent*) afin d'accéder au serveur Torrent connecté au système.
- 7.12.2. Cliquer sur l'onglet **Plan (Programmer)** puis cliquer sur **Generic Sequencing (Séquençage générique)** sous *Templates (Modèles)* puis sélectionner **Plan New Run (Programmer une nouvelle réaction)** en haut à droite.
- 7.12.3. Dans *Plan Run Wizard (Assistant de programmation de la réaction)*, passer en revue chaque écran et sélectionner les paramètres appropriés d'après le Tableau 7.
- 7.12.4. Sélectionner la *Planned Run (Réaction programmée)* et lancer la réaction.

AVERTISSEMENT ! En cas d'utilisation de la version v5.2.2 de TSS, contacter le support technique de Thermo Fisher afin d'obtenir de l'aide concernant le chargement des codes-barres.

Caractères du nom du fichier :

Attribuer un nom ou un identifiant unique à chaque échantillon lorsque vous les nommez. En cas d'analyse d'échantillons en double, il est possible d'utiliser un nom similaire (*c.-à-d.*, Échantillon1a et Échantillon1b).

Si des noms uniques ne sont pas attribués aux échantillons analysés ensemble dans la même puce, plusieurs résultats d'échantillons sont combinés par le logiciel LymphoTrack Dx – S5/PGM au cours du processus.

Il est important que les noms de fichier contiennent uniquement les caractères suivants (A-Z, a-z, 0-9, ., _ [tiret bas], - [tiret]).

Si le logiciel rencontre un caractère non compris dans cet ensemble, ou plusieurs espaces consécutifs, son exécution peut échouer.

Nom de l'échantillon lors du multiplexage :

Chaque index ne peut être répertorié qu'une seule fois dans la réaction programmée. Par conséquent, toute information de suivi nécessaire pour les échantillons séquencés avec de multiples cibles en utilisant le même index doit figurer dans un seul champ Sample Name (Nom de l'échantillon) (qui est intégré dans le nom du fichier FASTQ).

Il est conseillé de garder la trace de tous les échantillons et toutes les cibles d'une analyse Ion S5 ou Ion PGM qui sont séquencés à l'aide du même index. Un identifiant unique doit être attribué à ce lot d'échantillons/de cibles, et celui-ci doit figurer dans le champ Sample Name (Nom de l'échantillon) de la réaction programmée.

Des exemples de noms d'échantillon qui peuvent être utilisés pour le suivi sont présentés ci-après :

- S1_FR1_FR2_FR3_IGK (un échantillon séquencé avec plusieurs tests à l'aide du même index)
- S1_FR1_S4_TRG (plusieurs échantillons séquencés avec plusieurs tests à l'aide du même index)
- Pool02_IX002 (Pool 02 fait référence à tous les échantillons/toutes les cibles séquencés avec IonXpress_002 et suivi ailleurs)

Index lors du multiplexage :

Notez que les index IonXpress 5 et 6 ne sont pas utilisés dans les kits LymphoTrack Dx *IGH* (FR1, FR2, FR3) et *TRG* et les index 3, 5, 6, 7 et 15 ne sont pas utilisés dans les kits de test LymphoTrack Dx *IGK* pour l'instrument Ion S5 et Ion PGM.

Tableau 7. Paramètres de l'assistant de programmation de l'analyse par combinaison de plateforme.

Paramètre	Combinaison de plateforme validée		
	Ion Chef et Ion S5	OT2 et Ion S5	OT2 et Ion PGM
Ion Reporter (Rapporteur Ion)	Ion Reporter - None (Rapporteur Ion - Aucun) Sample Grouping – Blank (Regroupement des échantillons – Vide)	Ion Reporter - None (Rapporteur Ion - Aucun) Sample Grouping – Blank (Regroupement des échantillons – Vide)	Ion Reporter - None (Rapporteur Ion - Aucun) Sample Grouping – Blank (Regroupement des échantillons – Vide)
(Research) Application ([Recherche] Application)	Application – DNA (Application – ADN) Target Technique – Other (Technique cible – Autre)	Application – DNA (Application – ADN) Target Technique – Other (Technique cible – Autre)	Application – DNA (Application – ADN) Target Technique – Other (Technique cible – Autre)
Kits	<p>Sample Preparation Kit (Kit de préparation de l'échantillon) – laisser vide</p> <p>Library Kit Type (Type de kit de bibliothèque) – laisser vide</p> <p>Template Kit (Kit modèle) :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sélectionner l'instrument : Chef ▪ Ion 510, Ion 520 et Ion 530 Kit – Chef <p>Sequencing Kit (Kit de séquençage)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ion 510, Ion 520 et Ion 530 Kit – Chef <p>Templating Size – 400bp (Taille du modèle – 400 pb)</p> <p>Flows (Flux) – 850</p> <p>Control Sequence (Séquence contrôle) – laisser vide</p> <p>Chip Type (Type de puce) :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ion 520 Chip ou ▪ Ion 530 Chip <p>Barcode Set (Ensemble de code-barre) – IonXpress ou LymphoTrack_IonXpress³</p>	<p>Sample Preparation Kit (Kit de préparation de l'échantillon) – laisser vide</p> <p>Library Kit Type (Type de kit de bibliothèque) – laisser vide</p> <p>Template Kit (Kit modèle) :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sélectionner l'instrument : OneTouch ▪ Ion 520 et Ion 530 Kit – OT2 <p>Sequencing Kit (Kit de séquençage)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ion 520 et Ion 530 Kit – OT2 <p>Templating Size – 400bp (Taille du modèle – 400 pb)</p> <p>Flows (Flux) – 850</p> <p>Control Sequence (Séquence contrôle) – laisser vide</p> <p>Chip Type (Type de puce) :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ion 520 Chip ou ▪ Ion 530 Chip <p>Barcode Set (Ensemble de code-barre) – IonXpress ou LymphoTrack_IonXpress³</p>	<p>Sample Preparation Kit (Kit de préparation de l'échantillon) – laisser vide</p> <p>Library Kit Type (Type de kit de bibliothèque) – laisser vide</p> <p>Template Kit (Kit modèle) :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sélectionner l'instrument : OneTouch ▪ Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit - 400 <p>Sequencing Kit (Kit de séquençage)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit <p>s.o. (sans objet)</p> <p>Flows (Flux) – 850</p> <p>Control Sequence (Séquence contrôle) – laisser vide</p> <p>Chip Type (Type de puce) :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ion 316 Chip v2 BC ou ▪ Ion 318 Chip v2 BC <p>Barcode Set (Ensemble de code-barre) – IonXpress ou LymphoTrack_IonXpress³</p>
Plugins (Modules d'extension)	Sélectionner FileExporter ^{1,2}	Sélectionner FileExporter ^{1,2}	Sélectionner FileExporter ^{1,2}
Projects (Projets)	Sélectionner le dossier de projet approprié afin d'enregistrer la réaction ou ajouter un nouveau projet	Sélectionner le dossier de projet approprié afin d'enregistrer la réaction ou ajouter un nouveau projet	Sélectionner le dossier de projet approprié afin d'enregistrer la réaction ou ajouter un nouveau projet
Template Name (Nom de modèle)	Saisir un nom de modèle et ajouter des notes éventuellement	Saisir un nom de modèle et ajouter des notes éventuellement	Saisir un nom de modèle et ajouter des notes éventuellement
Reference (Référence)	Laisser toutes les sections vides	Laisser toutes les sections vides	Laisser toutes les sections vides
Monitoring (Surveillance)	Bead Loading (Chargement des billes) (%) ≤ 30 Key Signal (Signal principal) (1-100) ≤ 30 Usable Sequence (Séquence utilisable) (%) ≤ 30	Bead Loading (Chargement des billes) (%) ≤ 30 Key Signal (Signal principal) (1-100) ≤ 30 Usable Sequence (Séquence utilisable) (%) ≤ 30	Bead Loading (Chargement des billes) (%) ≤ 30 Key Signal (Signal principal) (1-100) ≤ 30 Usable Sequence (Séquence utilisable) (%) ≤ 30

¹Remarque : le plugin *FileExporter* version 5.0.4 du logiciel *Torrent Suite™* ne peut pas générer de fichiers FASTQ. Contacter le support technique de Thermo Fisher pour plus d'informations en cas d'affichage d'un message « DOCSTRING ERROR » (ERREUR CHAÎNE DOC).

²Remarque : éviter les noms de fichiers longs car ils peuvent interférer avec le plugin *FileExporter*.

³Remarque : en cas d'utilisation de la version v5.2 ou v5.6 de TSS, se reporter au fichier *LymphoTrack_IonXpress.csv* situé sur le CD du logiciel fourni [\(REF 95000007\)](#)

8. Analyse des données

Le test LymphoTrack Dx *IGK* – S5/PGM est destiné à produire des données de séquençage qui peuvent être analysées à l'aide de la suite logicielle LymphoTrack Dx – S5/PGM fournie sur le CD inclus (REF 95000007). **Ce CD comprend les instructions détaillées pour l'installation et l'utilisation de la suite logicielle.**

Les échantillons préparés avec le test LymphoTrack Dx *IGK* – S5/PGM génèrent des fichiers FASTQ qui peuvent être facilement traités grâce à l'application LymphoTrack Dx Data Analysis.

Caractères du nom du chemin et du nom du fichier :

1) Éviter d'inclure des espaces dans le nom du chemin des fichiers ou du logiciel (le nom du chemin comprend le nom des dossiers de fichiers et celui des fichiers), l'utilisation de plus d'un espace consécutif est proscrite.

2) Il est important que les noms de fichiers contiennent uniquement les caractères suivants (A-Z, a-z, 0-9, _ [tiret bas], - [tiret]).

Si le logiciel rencontre un caractère non compris dans cet ensemble, ou plusieurs espaces consécutifs dans le nom de fichier, l'exécution du logiciel LymphoTrack Dx – S5/PGM peut échouer. Assurez-vous d'utiliser uniquement ces caractères lors de la configuration de l'analyse prévue.

9. Spécifications du test

Les calculs effectués par le logiciel sont arrondis au dixième le plus proche afin de déterminer les résultats du test.

- Validité de la réaction S5 et PGM
 - Chargement > 50 %
 - Enrichissement > 50 %
 - Clonal > 50 %
- % de lectures le plus important du contrôle positif *IGK* $\geq 5,0$ %
- % de lectures le plus important du contrôle négatif NGS $< 3,0$ %

10. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des populations cellulaires clonales.
- Les analyses par PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de l'amplification par PCR par l'héparine ou d'autres agents qui peuvent être présents dans l'échantillon analysé.
- Une variance plus élevée à la limite de détection (LD) analytique ou à proximité est intrinsèque à la plupart des technologies, notamment au séquençage de nouvelle génération. Des tests de suivi sont suggérés lorsqu'un résultat est proche de la LD analytique du test.
- Veiller à toujours interpréter les résultats des tests de clonalité moléculaire dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.

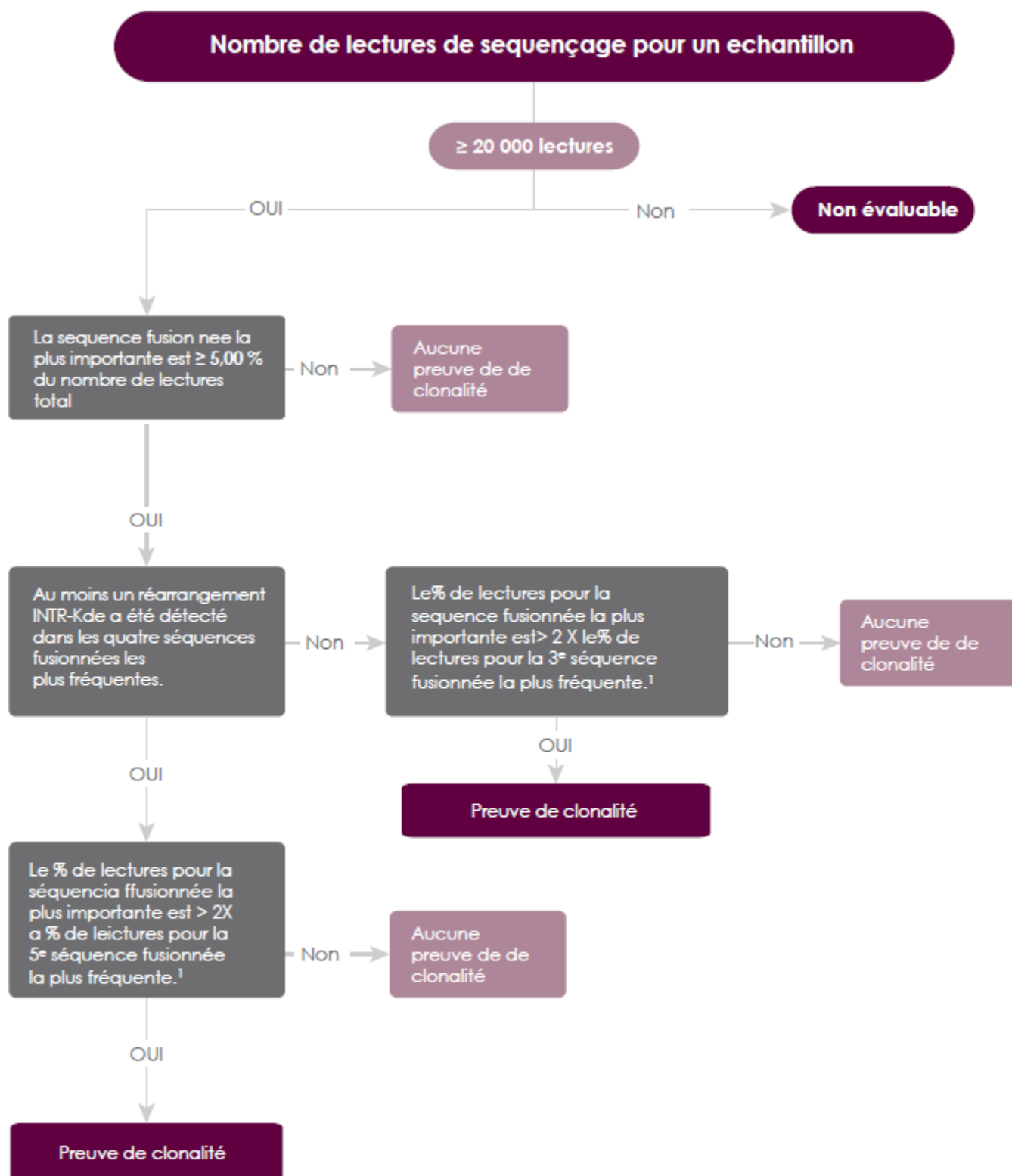
11. Interprétation et rapports

Utiliser le rapport *Merged Read Summary* (Résumé de lecture fusionné) pour identifier les séquences de lecture fusionnées les plus importantes et leurs fréquences avant la détermination de la clonalité à l'aide des critères figurant ci-dessous. Consulter la section 8 : *Analyse des données* pour plus d'informations sur le rapport *Merged Read Summary* (Résumé de lecture fusionné). Certains processus clonaux peuvent entraîner la détection de deux clones ou plus. Ceci peut inclure une population dominante avec une population sous-clonale réduite ou la présence de syndromes lymphoprolifératifs multiples. Il est particulièrement important d'interpréter ces causes dans leur contexte clinique.

Tableau 8. Critères d'interprétation

Critère 1	Critère 2	Critère 3	Résultat
Le nombre total de lectures pour chaque échantillon est ≥ 20 000 .	La séquence fusionnée la plus importante est ≥ 5,0 % du nombre de lectures total.	Au moins un réarrangement INTR-K _{de} est détecté dans les quatre séquences fusionnées les plus fréquentes et le % de lectures pour la séquence fusionnée la plus importante est $> 2 \times$ le % de lectures pour la 5 ^e séquence fusionnée la plus fréquente. ¹	PREUVE DE CLONALITÉ DÉTECTÉE
		Au moins un réarrangement INTR-K _{de} est détecté dans les quatre séquences fusionnées les plus fréquentes et le % de lectures pour la séquence fusionnée la plus importante est $\leq 2 \times$ le % de lectures pour la 5 ^e séquence fusionnée la plus fréquente. ¹	Aucune preuve de clonalité détectée
		Aucun réarrangement INTR-K _{de} n'est détecté dans les quatre séquences fusionnées les plus fréquentes et le % de lectures pour la séquence fusionnée la plus importante est $> 2 \times$ le % de lectures pour la 3 ^e séquence fusionnée la plus fréquente. ¹	PREUVE DE CLONALITÉ DÉTECTÉE
		Aucun réarrangement INTR-K _{de} n'est détecté dans les quatre séquences fusionnées les plus fréquentes et le % de lectures pour la séquence fusionnée la plus importante est $\leq 2 \times$ le % de lectures pour la 3 ^e séquence fusionnée la plus fréquente. ¹	Aucune preuve de clonalité détectée
	La séquence fusionnée la plus importante est < 5,0 % du nombre de lectures total.	s.o. (sans objet)	Aucune preuve de clonalité détectée
Le nombre total de lectures pour chaque échantillon est < 20 000 .	s.o. (sans objet)	s.o. (sans objet)	Non évaluable

¹Les valeurs sont arrondies au dixième le plus proche à des fins de comparaison.



¹Arrondir les valeurs au centièmes de pour cent pour la comparaison.

Figure 4 : interprétation des données d'après les critères du Tableau 8.

12. Données de l'échantillon

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

LymphoTrack Report for assay IGK

Sample name: index001_001

Total Read Count: 187803

Caution: Do not edit fields and save.

Top 10 Merged Read Summary

Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	V-coverage	CDR3 seq
1	AGCAGGGCCACTGGCA	222	13683	IGKV3D-20_01	IGKDEL	7.29	7.29	96.95	not found
2	AGCAGGGCCACTGGCA	149	3226	IGKV3D-20_01	IGKJ1_01	1.72	9.00	99.24	CAGCAGTATGGTAGCTC
3	AACAGGGCCACTGGCA	149	3060	IGKV3-11_01	IGKJ4_01	1.63	10.63	97.71	CAGCAGCGTAGCAACTC
4	AGCAGGGCCACTGGCA	147	2520	IGKV3D-20_01	IGKJ4_01	1.34	11.97	99.24	not found
5	AGCAGGGCCACTGGCA	149	1492	IGKV3D-20_01	IGKJ2_01	0.79	12.77	97.71	CAGCAGTATGGTAGCTC
6	ACCAGGGCCACTGGTA	152	1133	IGKV3-15_01	IGKJ1_01	0.60	13.37	100.00	CAGCAGTATAATAACTC
7	AGAGTATTATAACTGC	226	992	IGKV1-5_03	IGKJ1_01	0.53	13.90	89.52	CAACAGTATCAGAGTTA
8	AACAGGGCCACTGGCA	152	599	IGKV3-11_01	IGKJ4_01	0.32	14.22	100.00	CAGCAGCGTAGCAACTC
9	AGAGCCGCGGTCTTT	235	424	IGKINTR	IGKDEL	0.23	14.45	100.00	not found
10	AGAGCCGCGGTCTTT	236	330	IGKINTR	IGKDEL	0.18	14.62	100.00	not found

Figure 5 : ce tableau, généré via le LymphoTrack Dx Reporter, montre les 10 premières lectures du résumé de lecture fusionnées avec les 500 premières lectures ; une lecture est fusionnée avec une autre si seulement 1 ou 2 pb les différencient l'une de l'autre. Les séquences ont été générées avec le test LymphoTrack Dx IGK – S5/PGM et analysées avec la suite logicielle LymphoTrack Dx – S5/PGM (REF 95000007).

13. Caractéristiques de performance

Le test LymphoTrack Dx IGK – S5/PGM et le test par électrophorèse capillaire traditionnelle (test IdentiClone® IGK Gene Clonality – ABI detection, REF 91020021) ont été comparés en termes de concordance (ou pourcentage de concordance globale), pourcentage de concordance positive (PPA) et pourcentage de concordance négative (NPA) ; les résultats ont été respectivement de 100 % (49/49 cas), 100 % et 100 %.

Tableau 9. Comparaison entre le test LymphoTrack Dx IGK – S5/PGM et le test IdentiClone IGK Gene Clonality - ABI

		Test IdentiClone IGK Gene Clonality (Tubes A+B)	
		Clonal	Non clonal
Test LymphoTrack Dx IGK – S5/PGM	Clonal	15	0
	Non clonal	0	34

La performance analytique du test LymphoTrack Dx IGK – S5/PGM a été évaluée en analysant l'ajout d'ADN de lignée de cellules clonales à différentes dilutions dans l'ADN d'amygdale. La limite de détection (LD) était observée avec la dilution de l'ADN à 5 %. Les % de lecture les plus élevés dans l'ADN d'amygdale étaient < 2 %. La régression linéaire R^2 était > 0,96 pour une plage de dilution de l'ADN comprise entre 0 et 10 %. Le coefficient de variation (CV en %) pour 8 analyses effectuées par 2 opérateurs, avec 2 lots de réactif et 2 instruments était inférieur à 15 % lors de l'analyse des dilutions de l'ADN à 5 % et 10 %.

14. Guide de dépannage

Tableau 10. Dépannage

Survenue pendant	Erreur	Action
Préparation de l'échantillon et du réactif	La quantité d'ADN est inférieure à 50 ng par une méthode basée sur l'ADNdb	Ne pas analyser l'échantillon
Préparation de l'échantillon et du réactif	L'intégrité de l'ADN de l'échantillon est faible	Analyser l'échantillon à l'aide du Specimen Control Size Ladder d'Invivoscribe (REF 20960021 pour la détection par ABI ou REF 20960020 pour la détection sur gel)
Création de la bibliothèque par quantification des amplicons et groupement	La concentration des amplicons est inférieure à 1 nM	Vérifier l'échelle du bioanalyseur ou de l'instrument LabChip GX et répéter la PCR si inférieure à 1 nM.
Préparation de la séquence modèle (template) et démarrage du S5 ou PGM	s.o. (sans objet)	Appeler le support technique Thermo Fisher Scientific au +1 800 831 6844
Installation du CD	Le logiciel LymphoTrack Dx n'est pas installé correctement	Appeler le support technique Invivoscribe au +1 858 224 6600
Analyse des données	L'exécution du logiciel LymphoTrack Dx est interrompue	Appeler le support technique Invivoscribe au +1 858 224 6600
Analyse des données	La macro Excel ne peut être exécutée	Appeler le support technique Invivoscribe au +1 858 224 6600
Analyse des données	Aucune séquence clonale n'est détectée pour le contrôle positif	Appeler le support technique Invivoscribe au +1 858 224 6600
Contrôle négatif sans ADN (NTC)	Le NTC montre des amplicons après la PCR	Répéter le test

15. Support technique et service client

Nous vous remercions d'avoir acheté le test LymphoTrack Dx IGK– S5/PGM. Nous vous sommes reconnaissants de votre fidélité. Nous sommes à votre disposition pour vous aider à comprendre ce test, et notre support technique est disponible du lundi au vendredi pour vous permettre de réaliser les tests efficacement dans votre laboratoire.

Coordonnées



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | États-Unis

Téléphone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Heures d'ouverture: 7 h – 17 h heure du Pacifique


Service technique: support@invivoscribe.com | Service client: sales@invivoscribe.com | Site internet: www.invivoscribe.com

16. Bibliographie

- JJM van Dongen *et al.*, (2003). *Leukemia* 17, 2257–2317.
- Miller, JE (2013). In Cheng, L., Zhang, D., Eble, J.N. (Eds), *Molecular Genetic Pathology* (2nd Ed., sections 30.2.7.13 and 30.2.7.18) New York, USA: Springer Science & Business Media.
- Tonegawa, S. (1983). *Nature* 302:575-581.
- Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, and Morley AA. *Blood* 75, 2220-2222.
- Logiciel LymphoTrack Dx – S5/PGM package Instructions for Use (REF 95000007)
- Agilent DNA 1000 Kit Guide
- LabChip GX/GX II User Manual
- HT DNA High Sensitivity LabChip Kit LabChip GX/GXII User Guide
- User Guide: Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit – Chef (Man0016854, Rév. C.0)
- User Guide: Ion 520 & Ion 530 Kit – OT2 (Man0010844, Rév. D.0)
- User Guide: Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit (Man0014579 Rév. A.0)
- User Guide: Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Man0014583, Rév. A.0)
- <http://www.thermofisher.com>
- <http://ioncommunity.thermofisher.com>
- <http://www.agilent.com>
- <http://www.perkinelmer.com>

17. Symboles

Les symboles suivants sont utilisés pour l'étiquetage des produits de diagnostic NGS d'Invivoscribe.

	Numéro de référence		Date de péremption
	Volume du réactif		Représentant agréé dans la Communauté européenne
	Numéro de lot		Consulter les instructions d'utilisation
	Conditions de conservation		Destiné au diagnostic <i>in vitro</i>
	Identifiant Unique de L'Appareil		Fabricante
	Conformité Britannique Évaluée		Personne responsable au Royaume-Uni
	Mandataire Suisse		Conformité Européenne

18. Informations légales

Ce produit est couvert par un ou plusieurs des brevets et applications de brevet suivants, appartenant à Invivoscribe, Inc. ou concédés sous licence exclusive de celui-ci. Numéro de brevet européen EP 1549764B1 (validé dans 16 pays et complété par les brevets européens correspondants numérotés EP2418287A3 et EP 2460889A3), numéro de brevet japonais JP04708029B2, numéro de demande de brevet japonais 2006-529437, numéro de demande de brevet brésilien PI0410283.5, numéro de brevet canadien CA2525122, Numéro de brevet indien IN243620, numéro de brevet mexicain MX286493, numéro de brevet chinois CN1806051 et numéro de brevet coréen 101215194.

L'utilisation de ce produit peut nécessiter des méthodes d'amplification d'acide nucléique telles que la réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Toute licence nécessaire pour mettre en pratique des méthodes d'amplification ou pour utiliser des réactifs, des enzymes d'amplification ou des équipements couverts par des brevets tiers est de la responsabilité de l'utilisateur et aucune licence de ce type n'est accordée par Invivoscribe, Inc., ni explicitement ni implicitement.

©2023 Invivoscribe, Inc. Tous droits réservés. Les marques mentionnées dans ce document sont la propriété d'Invivoscribe, Inc. et / ou de ses filiales, ou (en ce qui concerne les marques de tiers utilisées dans la présente), leurs propriétaires respectifs.

THERMO FISHER SCIENTIFIC® et ION PGM™ et ION S5™ sont des marques commerciales de Thermo Fisher Scientific ou de ses filiales.

19. Test LymphoTrack Dx IGK - Ion S5 : Résumé en Une Page

- 19.1. Enfiler des gants et retirer les mélanges mères (master mixes) du congélateur. Utiliser un mélange mère (master mix) indexé différent pour chaque contrôle et échantillon. Laisser les tubes de mélange mère (master mix) décongeler ; puis vortexer doucement pour mélanger.
- 19.2. Sous une hotte de confinement ou de sécurité, pipetter 45 µl de chaque mélange mère (master mix) dans les puits individuels d'une plaque de PCR pour les échantillons, les contrôles positifs et négatifs, ainsi que les contrôles sans ADN (un puits pour chaque mélange mère (master mix) indexé).
- 19.3. Ajouter 0,2 µl d'ADN polymérase Taq ou équivalent (à 5 U/µl) à chaque mélange mère (master mix).
- 19.4. Ajouter 5 µl d'ADN des échantillons à une concentration minimale de 10 ng/µl et 5 µl des échantillons de contrôle dans les puits contenant les réactions de mélanges mères (master mixes) respectives, aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger.
- 19.5. Ajouter 5 µl d'eau de qualité biologie moléculaire au puits contenant le mélange mère (master mix) respectif pour le contrôle négatif sans ADN, puis aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger.
- 19.6. Sceller la plaque et amplifier l'ADN cible à l'aide du programme de thermocycleur standard :

Étape	Température	Durée	Cycle
1	95°C	7 minutes	1
2	95°C	45 secondes	29 x
3	60°C	45 secondes	
4	72°C	90 secondes	
5	72°C	10 minutes	1
6	15 °C	∞	1

- 19.7. Retirer la plaque d'amplification du thermocycleur.
- 19.8. Purifier les produits de PCR à l'aide du système de purification Agencourt AMPure XP. Ajouter 90 µl de particules à chaque réaction de 50 µl, puis éluer l'ADN purifié dans 40 µl de tampon TE.
- 19.9. Quantifier les amplicons à l'aide de la méthode appropriée (*c.-à-d.* Agilent 2100 Bioanalyzer ou LabChip GX).
- 19.10. Sur la base de la quantification, ajouter un volume égal de chaque amplicon dans un tube (ne pas inclure le NTC) ; utiliser le tampon TE pour obtenir un volume total de 10 µl par mélange mère (master mix). Vortexer doucement pour mélanger, puis centrifuger brièvement.
- 19.11. Diluer la bibliothèque à 20 pM avec de l'eau dépourvue de nucléase.
- 19.12. Réaliser une PCR en émulsion afin de préparer le modèle à l'aide de l'instrument Ion Chef ou Ion OT2 associé aux instruments Ion ES.
 - Utiliser l'instrument Ion Chef avec les kits Ion 510, Ion 520 et Ion 530 Kit–Chef ou
 - Utiliser l'instrument Ion OneTouch avec les kits Ion 520 et Ion 530 Kit – OT2
- 19.13. Démarrer l'instrument Ion S5 et charger la puce Ion 520 ou Ion 530 avec les ISP.
- 19.14. Créer une Planned Run (Réaction programmée) à l'aide du Torrent Browser (Navigateur torrent).
- 19.15. Démarrer la réaction Ion S5.
- 19.16. Analyser et visualiser les données acquises avec la suite logicielle LymphoTrack Dx – S5/PGM incluse.

20. Test LymphoTrack Dx IGK - Ion PGM : Résumé en Une Page

- 20.1. Enfiler des gants et retirer les mélanges mères (master mixes) du congélateur. Utiliser un mélange mère (master mix) indexé différent pour chaque contrôle et échantillon. Laisser les tubes de mélange mère (master mix) décongeler ; puis vortexer doucement pour mélanger.
- 20.2. Sous une hotte de confinement, pipetter 45 µl de chaque mélange mère (master mix) dans les puits individuels d'une plaque de PCR pour les échantillons, les contrôles positifs et négatifs, ainsi que les contrôles sans ADN (un puits pour chaque mélange mère (master mix) indexé).
- 20.3. Ajouter 0,2 µl d'ADN polymérase Taq à chaque mélange mère (master mix).
- 20.4. Ajouter 5 µl d'ADN des échantillons à une concentration minimale de 10 ng/µl et 5 µl des échantillons de contrôle dans les puits contenant les réactions de mélanges mères (master mixes) respectives, aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger.
- 20.5. Ajouter 5 µl d'eau de qualité biologie moléculaire au puits contenant le mélange mère (master mix) respectif pour le contrôle négatif sans ADN, puis aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger.
- 20.6. Sceller la plaque et amplifier l'ADN cible à l'aide du programme de thermocycleur standard :



Étape	Température	Durée	Cycle
1	95°C	7 minutes	1
2	95°C	45 secondes	29 x
3	60°C	45 secondes	
4	72°C	90 secondes	
5	72°C	10 minutes	1
6	15 °C	∞	1

- 20.7. Retirer la plaque d'amplification du thermocycleur.
- 20.8. Purifier les produits de PCR à l'aide du système de purification Agencourt AMPure XP. Ajouter 90 µl de particules à chaque réaction de 50 µl, puis éluer l'ADN purifié dans 40 µl de tampon TE.
- 20.9. Quantifier les amplicons à l'aide de la méthode appropriée (*c.-à-d.* Agilent 2100 Bioanalyzer ou LabChip GX).
- 20.10. Sur la base de la quantification, ajouter un volume égal de chaque amplicon dans un tube (ne pas inclure le NTC) ; utiliser le tampon TE pour obtenir un volume total de 10 µl par mélange mère (master mix). Vortexer doucement pour mélanger, puis centrifuger brièvement.
- 20.11. Diluer la bibliothèque à 20 pM avec le tampon TE 1X ou l'eau dépourvue de nucléase fournie avec le kit Hi-Q View OT2.
- 20.12. À l'aide de l'instrument Ion OneTouch 2 et du kit Ion PGM Hi-Q View OT2, réaliser une PCR en émulsion afin de créer des particules Ion Sphere (ISP) matrice brin sens.
- 20.13. Enrichir les ISP matrice brin sens avec l'instrument Ion OneTouch ES.
- 20.14. Démarrer l'instrument Ion PGM et charger la puce Ion 316 Chip v2 BC ou Ion 318 Chip v2 BC avec les ISP.
- 20.15. Créer une Planned Run (Réaction programmée) à l'aide du Torrent Browser (Navigateur torrent).
- 20.16. Démarrer la réaction Ion PGM.
- 20.17. Analyser et visualiser les données acquises avec la suite logicielle LymphoTrack Dx – S5/PGM incluse.


21. Annexe A : Configurer le plugin *FileExporter* et charger les codes-barres personnalisés

En cas d'utilisation du logiciel Torrent Suite v5.2.2 ou v5.6, vérifier la configuration du plugin *FileExporter* et charger les codes-barres personnalisés à l'aide du fichier *LymphoTrack_IonXpress.csv* inclus dans le CD fourni (REF 95000007).

21.1. Vérifier la configuration du plugin *FileExporter*.

- 21.1.1. Se connecter au logiciel Torrent Suite en tant qu'administrateur.
- 21.1.2. Confirmer que la configuration du plugin est correcte pour *FileExporter*.
 - Cliquer sur l'icône engrenage () dans l'écran d'accueil du serveur *Torrent Suite* et sélectionner **Plugins** dans le menu déroulant.
 - Localiser le plugin *FileExporter* et cliquer sur l'icône engrenage, puis sélectionner **Configure (Configurer)** (la fenêtre de configuration s'ouvre).
 - Dans **File > Options (Fichier > Options)** : cocher les cases FASTQ.
 - Pour *Archive Type (Type d'archive)*, sélectionner **Zip**.
 - Sélectionner la préférence en termes de *Naming Option (Option d'attribution de noms)*.
 - Enregistrer la configuration.
- 21.1.3. Vérifier la **Change Plugin Configuration** (Configuration de modification du plugin) pour le plugin *FileExporter*.
 - Cliquer sur l'icône engrenage () et sélectionner **Configure (Configurer)**.
 - Faire défiler vers le bas et cliquer sur **Admin Interface (Interface administrateur)**.
 - Faire défiler vers le bas et sélectionner **Plugins** sur le côté gauche, puis sélectionner **FileExporter**.
 - Vérifier que les sections *Status (État)* et *Userinputfields (Champs saisis par l'utilisateur)* affichent { }; dans le cas contraire, supprimer le contenu jusqu'à afficher { }. Ne modifier aucun autre paramètre (que ceux mentionnés ici).
 - Sélectionner **Save (Enregistrer)**.

21.2. Charger les codes-barres personnalisés.

- 21.2.1. Se connecter au logiciel Torrent Suite en tant qu'administrateur.
 - Cliquer sur l'icône engrenage () puis sélectionner **References (Références)** dans le menu déroulant.
 - Sélectionner **Barcodes (Codes-barres)** puis sélectionner **Add new DNA Barcodes (Ajouter de nouveaux codes-barres ADN)**.
 - Sélectionner **Choose File (Choisir un fichier)** et charger le fichier *LymphoTrack_IonXpress.csv*.
 - Attribuer un nom dans *Barcode set name (Nom attribué au fichier)* (p.ex. *LymphoTrack_IonXpress*) et cliquer sur **Upload (Charger)**.
 - Ce nom de code-barre sera utilisé pour tous les tests LymphoTrack dans la configuration de l'analyse.
 - Vérifier les nouveaux codes-barres ajoutés dans le menu **Barcodes (Codes-barres)**.
- 21.2.2. Passer à l'étape 7.12 Créer une Planned Run (Réaction programmée).