

# Etape 4 : Protocole de PCR Multiplex

## Urodiag<sup>®</sup> Multiplex PCR Kit (OncoDiag)

50 tests Patients

Réf. No. UR50P



Le kit Urodiag<sup>®</sup> Multiplex PCR est un test de diagnostic in vitro destiné à la surveillance des patients atteints d'une tumeur de la vessie non infiltrant le muscle (TVNIM).

La procédure pour les réactions de PCR multiplex est réalisée avec le système StepOnePlus Real-Time (applied biosystems, Thermo Fisher Scientific). Le kit peut être conservé au congélateur (-15-25°C) jusqu'à 12 mois. Il n'est pas recommandé de congeler et décongeler le kit plus de 5 fois.

### Equipement et réactifs à fournir par l'utilisateur

- StepOnePlus Real-Time system
- MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 ml et Optical Adhesive Covers (applied biosystems, Thermo Fisher Scientific) ou MicroAmp Fast Reaction Tubes (8 tubes/strip, 0.1 ml) and MicroAmp Optical 8-Cap Strip (applied biosystems, Thermo Fisher Scientific)
- Micropipettes et pointes stériles avec filtre
- Microcentrifugeuse pour plaque PCR
- Vortex
- Bloc de refroidissement

---

### Contenu du kit

Le kit est conçu pour 50 patients (10 patients / cycle de PCR, pas plus de 5 cycles). Il est destiné à la détection de 4 mutations du gène *FGFR3* (G372C, R248C, S249C, Y375C) et à la quantification de 3 marqueurs de méthylation de l'ADN (*HS3ST2*, *SEPTIN9*, *SLIT2*) par PCR multiplex à partir d'ADN urinaire des patients.

Le kit est composé de 8 tubes (4 tubes pour le test de mutation, 3 tubes pour le test de méthylation et 1 tube avec de l'eau stérile). Chaque tube contient tous les composants nécessaires pour effectuer les tests de mutation et de méthylation.



	Capuchon	Tube	Vol.	Description
<b>Test de Mutation</b>	Bleu	<b>1</b>	1040 µl	Le tube contient tous les composants (PCR master mix, amorces et sondes) nécessaires pour détecter les mutations S249C, Y375C et le gène de la <i>GLOBINE</i>
		<b>2</b>	1040 µl	Le tube contient tous les composants (PCR master mix, amorces et sondes) nécessaires pour détecter les mutations G372C, R248C et le gène de la <i>GLOBINE</i>
		<b>3</b>	30 µl	Le tube contient un mélange de deux solutions d'ADN : (i) ADN synthétique du gène <i>FGFR3</i> qui est inséré dans un vecteur plasmidique et comprenant les mutations S249C et Y375C (ii) ADN humain pour détecter le gène de la <i>GLOBINE</i> (contrôle interne)
		<b>4</b>	30 µl	Le tube contient un mélange de deux solutions d'ADN : (i) ADN synthétique du gène <i>FGFR3</i> qui est inséré dans un vecteur plasmidique et comprenant les mutations G372C et R248C (ii) ADN humain pour détecter le gène de la <i>GLOBINE</i> (contrôle interne)
<b>Test de Methylation</b>	Rouge	<b>A</b>	1040 µl	Le tube contient tous les composants (PCR master mix, amorces et sondes) nécessaires pour détecter et quantifier les gènes <i>ALBUMINE</i> ( <i>allèle non méthylé</i> ) et <i>SEPTIN9</i> ( <i>allèle méthylé</i> )
		<b>B</b>	1040 µl	Le tube contient tous les composants (PCR master mix, amorces et sondes) nécessaires pour détecter et quantifier les gènes <i>HS3ST2</i> et <i>SLIT2</i> ( <i>allèles méthylés</i> )
		<b>C</b>	132 µl	ADN de contrôle (ADN humain 100% méthylé)
	Blanc	<b>H<sub>2</sub>O (eau)</b>	150 µl	Contrôle négatif (negative template control, NTC)

## Protocole

---

### Etape 1: Préparation des échantillons

Décongeler les tubes à température ambiante (15-25°C), puis les placer dans un bloc réfrigérant (recommandé). Mélanger doucement, centrifuger brièvement pour collecter les solutions au fond des tubes.

- **Test de Mutation**

**Note:** Il est recommandé de réaliser la détection des mutations *FGFR3* à partir de 10 ng d'ADN, soit 5 ng d'ADN pour la détection des mutations S249C et Y375C (Tube 1) et 5 ng d'ADN pour la détection des mutations G372C et R248C (Tube 2).

(Pour le patient, la quantité minimale d'ADN est de 5 ng, soit 2,5 ng pour la détection des mutations S249C et Y375C et 2,5 ng pour la détection des mutations G372C et R248C).

Préparer les échantillons conformément aux recommandations du Tableau 1 ci-dessous.

Tube	Contrôle				Patient	
	Contrôle 1		Contrôle 2		Test 1	Test 2
	Positif	Négatif	Positif	Négatif		
1	16 µl	16 µl	/	/	16 µl	/
2	/	/	16 µl	16 µl	/	16 µl
3	4 µl	/	/	/	/	/
4	/	/	4 µl	/	/	/
ADN patient (~2.5-5 ng)	/	/	/	/	4 µl	4 µl
H <sub>2</sub> O	/	4 µl	/	4 µl	/	/
Volume final	20 µl					

- **Test de Méthylation**

**Note:** Il est recommandé de réaliser le test de Méthylation à partir de 20 ng d'ADN converti au bisulfite de sodium, soit 10 ng d'ADN bisulfité pour la quantification des gènes *ALBUMINE* et *SEPTINE9* (Tube A) et 10 ng d'ADN bisulfité pour la quantification des gènes *HS3ST2* et *SLIT2* (Tube B).

(Pour le patient, la quantité minimale d'ADN bisulfité est de 10 ng, soit 5 ng pour la quantification des gènes *ALBUMINE* et *SEPTINE9* (Tube A) et 5 ng d'ADN bisulfité pour la quantification des gènes *HS3ST2* et *SLIT2* (Tube B).

Préparer les échantillons conformément aux recommandations du Tableau 2 ci-dessous.

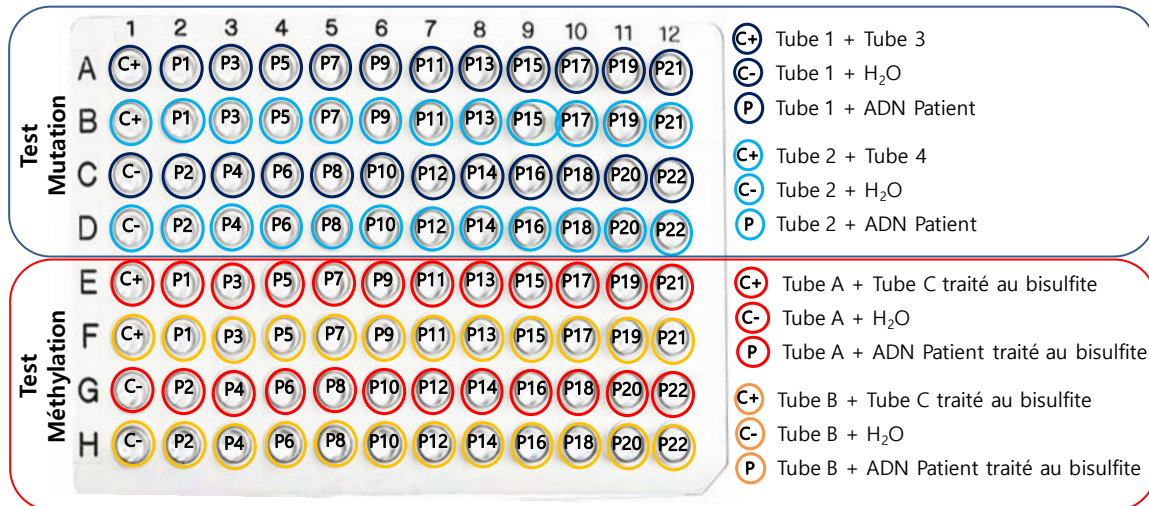
Tube	Contrôle				Patient	
	Contrôle 1		Contrôle 2		Test 1	Test 2
	Positive	Negative	Positive	Negative		
A	16 µl	16 µl	/	/	16 µl	/
B	/	/	16 µl	16 µl	/	16 µl
C* (~10 ng)	4 µl	/	4 µl	/	/	/
DNA patient* (~5-10 ng)	/	/	/	/	4 µl	4 µl
H <sub>2</sub> O	/	4 µl	/	4 µl	/	/
Final volume	20 µl					

\* ADN converti au bisulfite de sodium

## Etape 2: Dépôt des échantillons dans une plaque 96 puits MicroAmp Fast Optical ou MicroAmp Fast Reaction (8 tubes / bandelette)

Ci-dessous, il est représenté le plan du dépôt des échantillons en plaque PCR 96 puits (ou en barrette de 8 tubes 0,1 ml) pour analyser 22 patients.

1- Distribuer les volumes appropriés (réactifs/échantillons) dans les puits ou tubes correspondants (cf. Tableaux 1 et 2).



2- Après avoir recouvert la plaque 96 puits avec le film optique ou fermer les tubes PCR avec les capuchons (qualité optique), homogénéiser le mélange réactionnel par vortexage pendant 2 à 5 secondes.

3- Centrifuger la plaque PCR 96 puits ou les tubes PCR à l'aide d'un rotor de microplaque pendant 10-15 secondes à environ 1000 x g (3000 rpm).

## Etape 3: Programmation du StepOnePlus Real-Time system

La configuration de la réaction PCR est enregistrée dans le fichier « URODIAG\_TEMPLATE\_PCR.edt

Placer la plaque PCR 96 puits ou les tubes PCR dans la machine et démarrer le programme de PCR (voir ci-dessous).

### Paramètres

Test de Mutation	
Réactifs Taqman (TaqMan reagents)	
Mode Quantitation –Comparative Ct	
Volume par puits (Reaction volume per well)	<b>20 µl</b>
Vitesse rampe (Ramp speed)	<b>Fast</b>
Taux de rampe (Ramp rate)	<b>100%</b>
Seuil de positivité ou Threshold (ΔRn)	R248C <b>0.24</b> G372C <b>0.15</b> S249C <b>0.15</b> Y375C <b>0.15</b> GLOBIN <b>0.15</b>
Baseline	<b>Auto</b>
Référence passive (Passive reference)	<b>ROX</b>

Test de Méthylation	
Réactifs TaqMan (TaqMan reagents)	
Mode Quantitation –Comparative Ct	
Volume par puits (Reaction volume per well)	<b>20 µl</b>
Vitesse rampe (Ramp speed)	<b>Fast</b>
Taux de rampe (Ramp rate)	<b>100%</b>
Seuil de positivité ou Threshold (ΔRn)	ALBUMINE <b>0.10</b> HS3ST2 <b>0.10</b> SEPTIN9 <b>0.10</b> SLIT2 <b>0.10</b>
Baseline	<b>Auto</b>
Référence passive (Passive reference)	<b>ROX</b>

- **Fluorophore (Reporter)**

Test de Mutation		
Détection	Reporter	Quencher
G372C	VIC	(aucun)
R248C	FAM	(aucun)
S249C	FAM	(aucun)
Y375C	VIC	(aucun)
<i>GLOBINE</i>	NED	(aucun)

Test de Méthylation		
Détection	Reporter	Quencher
<i>ALBUMIN</i>	VIC	(aucun)
<i>HS3ST2</i>	FAM	(aucun)
<i>SEPTIN9</i>	FAM	(aucun)
<i>SLIT2</i>	VIC	(aucun)

- **Conditions de la PCR multiplex**

Etapes	Nombre de cycles	Time	Température	Collecte de données de fluorescence
Activation initiale de la PCR (hot start)	1	5 min	95°C	-
Dénaturation	40	45 secs	95°C	-
Hybridation/ extension		45 secs	60°C	✓

#### Etape 4: Rendu des résultats

- **Contrôle Qualité (CQ)**

Test de Mutation		Valeurs Ct	Rendu
<b>Contrôle 1</b>	Contrôle positif pour <i>GLOBINE</i>	28-32	PASSE
	Contrôle positif pour S249C	29-33	PASSE
	Contrôle positif pour Y375C		PASSE
	Contrôle négatif	Pas d'amplification	PASSE
<b>Contrôle 2</b>	Contrôle positif pour <i>GLOBINE</i>	28-32	PASSE
	Contrôle positif pour G372C	29-33	PASSE
	Contrôle positif pour R248C		PASSE
	Contrôle négatif	Pas d'amplification	PASSE
<b>Patient</b>	<i>GLOBINE</i>	28-32	PASSE

Test de Méthylation		Valeurs Ct	Rendu
Contrôle 1	Contrôle positif pour <i>ALBUMINE</i>	26-30	PASSE
	Contrôle positif pour <i>SEPTINE9</i>	26-30	PASSE
	Contrôle négatif	Pas d'amplification	PASSE
Contrôle 2	Contrôle positif pour <i>HS3ST2</i>	26-30	PASSE
	Contrôle positif pour <i>SLIT2</i>		PASSE
	Contrôle négatif	Pas d'amplification	PASSE
Patient	<i>ALBUMINE</i>	26-30	PASSE

▪ Patient

Test de Mutation		Valeurs Ct	Interprétation	Résultat
Patient	Mutation S249C	25-40	ADN muté pour S249C	POSITIF
	Mutation Y375C		ADN muté pour Y375C	POSITIF
	Mutation G372C		ADN muté pour G372C	POSITIF
	Mutation R248C		ADN muté pour R248C	POSITIF

Test de Méthylation		Valeurs Ct	Interprétation	Détermination du degré de méthylation des 3 gènes cibles
Patient	<i>HS3ST2</i>	25-40	Présence d'allèles méthylés du gène <i>HS3ST2</i>	
	<i>SEPTINE9</i>		Présence d'allèles méthylés du gène <i>SEPTINE9</i>	
	<i>SLIT2</i>		Présence d'allèles méthylés du gène <i>SLIT2</i>	

Une fois l'analyse terminée, les données PCR (Cts) sont exportées vers un fichier texte, puis vers le logiciel Urodiag avec le rendu des résultats en automatique.

