



AdnaTest BreastCancerDetect

Trousse RT-PCR pour la détection de l'expression génétique associée au cancer du sein à partir d'enrichissement en cellules tumorales

Pour utilisation diagnostique in vitro

Mode d'emploi



Article nr. 81004/ 81019/ 81022

Table des Matières

Information pour les Commandes.....	3
Intention de la Trousse	3
Abréviations et Symboles	4
Brevets et Noms de Marque Enregistrés.....	5
Description du Produit	5
Composants de la Trousse.....	6
Matériel Supplémentaire Nécessaire.....	7
Conservation.....	8
Protocole d'Utilisation	10
A. Préparation des Dynabeads Oligo (dT) ₂₅	10
B. Isolation de l'ARNm	11
C. Transcription Inverse	13
D. PCR multiplexe.....	16
E. Analyse des fragments	18
Evaluation	20
Références.....	24
Détection des erreurs	24
Résumé du Mode d'Emploi.....	28
Protocole.....	29
AdnaTest BreastCancerDetect est distribué par :	36

Information pour les Commandes

AdnaTest ColonCancerSelect et *Adnatest ColonCancerDetect* sont développés et produits par Adnagen et distribués, vendus et mis sur le marché par Innogenetics.

	Spécifications	Nr. article
<i>AdnaTest BreastCancerSelect</i>	12 Sélections	81005
	24 Sélections	81021
	36 Sélections	81024
<i>AdnaTest BreastcancerDetect</i>	12 Détections	81004
	24 Détections	81019
	36 Détections	81022
<i>Adnacollect</i>	12 Systèmes	81003

Intention de la Trousse



AdnaTest BreastCancerDetect est utilisée pour la détection de l'expression génétique associée au cancer du sein, à partir de l'enrichissement magnétique en cellules tumorales en utilisant la transcription inverse et la PCR.

AdnaTest BreastCancerDetect est destinée à l'utilisation diagnostique in vitro.

AdnaTest BreastCancerSelect est utilisée pour l'enrichissement en cellules tumorales circulant dans le sang périphérique.

De plus amples informations sont disponibles sur le site Web : www.adnagen.com

Abréviations et Symboles

pb	paires de bases
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
C+	contrôle positif
C-	contrôle négatif
ADN	acide désoxyribonucléique
GA733-2	antigène 733-2 associé à une tumeur gastro-intestinale
Her-2	tyrosine kinase récepteur 1 (TRK1)
ARNm	acide ribonucléique messenger
Muc-1	gène Muc-1
PCR	réaction polymérase en chaine
RNAse	ribonucléase
rpm	révolution par minute
RT	transcription inverse
	date d'expiration
	température de conservation

Brevets et Noms de Marque Enregistrés

Ce test requière des licences d'Hoffmann-La Roche AG, Bâle. L'acquisition des *AdnaTests* ne dégage pas l'utilisateur de l'obligation d'effectuer la PCR avec licence.

Dynabeads est un nom de marque enregistré de Dynal Biotech ASA, Oslo, Norvège.

Les noms de marque *Sensiscript* et *HotStar Taq* sont enregistrés par QIAGEN, Hilden.

LabChip est un nom de marque enregistré de Caliper Technology Corp.

Description du Produit

AdnaTest BreastCancerDetect contient des billes recouvertes d'oligo (dT)₂₅ pour l'isolation de l'ARNm à partir du lysat de cellules tumorales pré-enrichies.

La transcription inverse résulte en ADNc qui est utilisé comme matrice pour la détection des cellules tumorales et la caractérisation par PCR multiplexe. Trois antigènes associés aux tumeurs et un gène de contrôle sont amplifiés à l'aide du *PrimerMix BreastCancer*. Les amorces génèrent des fragments des tailles suivantes:

GA733-2 : 395 pb
Muc-1 : 293 pb
Her-2 : 270 pb
Actin : 114 pb (contrôle interne de PCR)

Composants de la Trousse

AdnaTest BreastCancerDetect comprend les composants suivants (nombre de tubes) :

Tableau 1 : Composants de la trousse

Composants	[Symbole]	81004 (12 tests)	81019 (24 tests)	81022 (36 tests)
<i>Lysis/Binding Buffer</i>	[3]	1	1	1
Dynabeads oligo(dT) ₂₅	[4]	1	2	3
Buffer A	[5]	1	1	1
Buffer B	[6]	1	1	1
10mM Tris-HCL	[7]	1	1	1
<i>PrimerMixBreastDetect</i>	[8]	1	2	3
<i>Contrôle Positif (C+)</i>	[9]	1	2	3
Calibrateur Gel	[10]	1	2	3

Les réactifs sont en quantité suffisante pour analyser 6 contrôles PCR et 12 échantillons sanguins.

Matériel Supplémentaire Nécessaire

Equipement:

- Agitateur pour tubes de 1,5 ml
- Concentreur à particules magnétiques MPC-S (DynaL MPC-S, Invitrogen, cat. Nr. 120-20D)
- Thermo mixeur et bain-marie (50°C)
- Thermocycleur avec couvercle chauffant et une vitesse de chauffage de 2°C/sec.
- Electrophorèse à gel d'agarose et système de documentation d'image ou un système d'analyse alternatif comme le Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies)

Materiel:

- Tubes à PCR stériles à fine paroi, sans RNase, de 0,2 ml
- Tubes de réaction stériles et sans RNase de 1,5 ml
- Pipettes (1-200 µl), embouts de pipettes sans RNase avec filtre à aérosol
- Gants de protection
- Gels d'agarose, par exemple gel d'agarose à 4% pré-coulés avec bromide d'éthidium (SIGMA, cat nr. P 6097)

Réactifs :

- Trousse de Transcription Inverse *Sensiscript* (Qiagen, e.g. cat nr. 205211, 50 réactions)

Remarque: La trousse *Sensiscript* Reverse Transcription (cat nr. 205211, 50 réactions) suffira pour seulement 25 échantillons car un double volume est requis pour chaque réaction.

- RNAsine recombinante, inhibiteur de RNase, 2500U (Promega, cat nr. N2511)
- Trousse *HotStar Taq Master Mix* (Qiagen, e.g. cat nr. 203443, 250U)

Conservation

Adnatest BreastCancerDetect doit être conservé à 4°C.

Cependant le *PrimerMix BreastDetect* [8], le *Contrôle Positif* [9] (C+) et le *Gel Calibrator* [10] doivent être retirés de la trousse et conservés séparément à -20°C.

Afin d'éviter toute contamination possible et des changements répétés de température nous recommandons d'aliquoter le Primer Mix. Aucun composant ne peut être utilisé après la date d'expiration.

Recommandations avant Utilisation

- Le test doit être effectué par du personnel qualifié pour l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.
- Tous les composants et réactifs supplémentaires fournis par d'autres fournisseurs doivent être conservés selon les instructions. Les avis de sécurité des producteurs respectifs restent valides.
- Porter des gants de protection pour éviter toute contamination par ADN, ARN et RNases.
- La procédure d'emploi doit être suivie suivant la séquence indiquée et doit se soumettre à toutes les spécifications établies en tenant compte des temps d'incubations et des températures d'incubation.
- Effectuer le traitement des échantillons et l'analyse consécutive des produits PCR amplifiés dans des locaux différents pour éviter des contaminations croisées.
- L'utilisation de produits d'autres fournisseurs peut donner des résultats de qualité inférieure.
- Les règles de sécurité et d'hygiène du laboratoire doivent être respectées (par exemple porter des blouses de laboratoire, des lunettes et des gants de protection).

Protocole d'Utilisation

Les sections A à C décrivent l'isolation de l'ARNm et la transcription inverse.

A. Préparation des Dynabeads Oligo (dT)₂₅

1. Amener le *Lysis/Binding Buffer* [3] à température ambiante.

Remarque : Vérifier que le *Lysis/Binding Buffer* ne contienne pas de précipité. Si un précipité est observé, remettre le tampon à température ambiante et agiter jusqu'à dissolution complète.

2. Remettre en suspension les *Dynabeads Oligo (dT)₂₅* [4] en pipetant vigoureusement avant l'usage; ne pas vortexer!
3. Calculer le volume de billes requis pour tous les échantillons à tester (20 µl par échantillon plus 10%) et transférer le volume calculé dans un tube de réaction sans RNase de 1,5 ml.
4. Placer le tube dans le MPC-S.

Remarque : Dans le MPC-S, l'aimant peut être inséré suivant 2 positions. Utiliser *toujours* la position frontale pour être sûr que l'aimant soit le plus près possible du tube de réaction.

5. Après une minute retirer le surnageant avec une pipette.
6. Lavage.

- a. Retirer l'aimant du MPC-S.
 - b. Ajouter le volume original (étape 3) de *Lysis/Binding Buffer* [3] et remettre les billes en suspension en pipetant plusieurs fois. Remettre doucement en suspension pour éviter l'apparition de mousse.
 - c. Placer l'aimant dans le MPC-S.
 - d. Après 1 minute retirer le surnageant avec une pipette.
Répéter une fois (deux lavages au total).
7. Retirer le tube du MPC-S et remettre les billes en suspension avec le *Lysis/Binding Buffer* jusqu'au volume original (20 µl par échantillon plus 10%, comme calculé au point 3).

B. Isolation de l'ARNm

Préparation

- I. Amener le *Washing Buffer A* [5] et le *Washing Buffer B* [6] à température ambiante.
- II. Placer 10 mM *Tris-HCL* [7] dans la glace.
- III. Dégeler l'eau sans RNase (partie de la trousse *Sensiscript Reverse Transcriptase*, Qiagen).
- IV. Ajuster le thermo mixeur ou le bain-marie à 50°C.

Procédure

1. Aliquoter 20 µl de billes (venant du point A7) dans chaque tube contenant le lysat cellulaire (du point B16 du manuel *Adnatest BreastCancerSelect*).
2. Placer les tubes 10 min à température ambiante sur un agitateur de tubes et faire tourner les tubes lentement (approximativement 5 rpm) pendant 10 min à température ambiante sur un appareil permettant l'inclinaison ainsi que la rotation.
3. Placer les tubes dans le MPC-S.
4. Après une minute retirer les surnageant.
5. Lavage A
 - a. Retirer l'aimant du MPC-S.
 - b. Ajouter 100 µl de *Washing Buffer A* [5] à chaque tube et remettre les billes en suspension en pipetant.
 - c. Placer l'aimant dans le MPC-S.
 - d. Après une minute retirer complètement les surnageant.
 Répéter une fois (deux lavages au total).
6. Lavage B
 - a. Retirer l'aimant du MPC-S.
 - b. Ajouter 100 µl de *Washing Buffer B* [6] à chaque tube et remettre les billes en suspension en pipetant et transférer dans un nouveau tube de réaction de 1,5 ml.
 - c. Placer l'aimant dans le MPC-S et incubé pendant 1 min.
 - d. Retirer complètement les surnageant.

Répéter une fois dans les mêmes tubes de réaction (deux lavages au total).

7. Retirer l'aimant du MPC-S.
8. Ajouter 100 µl de Tris-HCL 10mM [7] à chaque tube et remettre les billes en suspension en pipetant.
9. Ajouter l'aimant dans le MPC-S.
10. Après 1 min. retirer complètement les surnageant.
11. Retirer l'aimant du MPC-S.
12. Remettre en suspension le complexe ARNm/billes dans 29,5 µl d'eau sans RNase.
13. Placer les tubes dans un thermo mixeur ou un bain-marie et incubé pendant 5 min à 50°C. Mélanger à approximativement 650 rpm.
14. Placer immédiatement les tubes sur la glace pendant au moins 2 min.
15. Continuer immédiatement (endéans les 5 min) avec la transcription inverse (Section C).

Ne pas conserver le complexe ARNm/billes!

C Transcription Inverse

(Trousse *Sensiscript* Reverse Transcriptase, Qiagen)

1. Dégeler 10 x tampon RT et dNTPs à température ambiante, mélanger en vortexant, centrifuger brièvement, et conserver dans la glace. Préparer le RT Master Mix sur la glace.
2. Préparer le Master Mix RT en fonction du nombre de réactions nécessaires (Tableau 2). Le volume de Master Mix doit être supérieur de 10% au volume calculé pour le nombre total de réactions de transcription inverse.
Un contrôle de réaction négatif sans ARNm doit toujours être préparé (contrôle de RT).
3. Vortexer le Master Mix RT, centrifuger brièvement et distribuer 10,5 µl dans des tubes à PCR individuels de 0,2 ml.
4. Remettre délicatement en suspension avec une pipette les complexes ARNm/billes (du point B14). Transférer le volume total de 29,5 µl dans un tube à réaction PCR de 0,2 ml contenant le Master Mix RT. Mélanger vigoureusement et centrifuger brièvement. Pour le contrôle RT : ajouter 29,5 µl d'eau sans RNase au lieu de l'ARNm.

Tableau 2 : Transcription Inverse

Composants			Volume
Master Mix RT	Trousse	10 x Tampon RT	4,0 µl
	<i>Sensiscript</i>	dNTP	4,0 µl
	Reverse Transcriptase (Qiagen)	<i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptase (SRT)	2,0 µl
	RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)		0,5 µl
Echantillon	complexe ARNm/billes ou H ₂ O ARN-free (comme contrôle RT)		29,5 µl
Volume total			40,0 µl

5. L'ADNc est synthétisé dans un thermocycleur d'après les conditions suivantes (Tableau 3).

Tableau 3 : programme RT

37°C	->	60 min
93°C	->	5 min
4°C	->	∞

6. Placer les tubes de réaction avec l'ADNc dans la glace ou conserver à -20° pendant 14 jours maximum.

D PCR multiplexe

7. Dégeler le *Master Mix HotStar Taq* (Qiagen), l'eau distillée et le Contrôle Positif (C+) [9], vortexer doucement, centrifuger rapidement et conserver dans la glace. Dégeler le *PrimerMix BreastDetect* [8], vortexer, centrifuger pour ramener le liquide vers le bas, et placer dans la glace.
8. Le Master Mix PCR est préparé suivant le tableau 4 en fonction du nombre d'échantillons.

Le volume de Master Mix doit être au moins supérieur de 10% au volume calculé pour le nombre total de réactions de transcription inverse. Noter qu'un *Contrôle Positif* [9], un *Contrôle Négatif* (eau/C-) et un contrôle RT doivent toujours être préparés.

9. Pour chaque préparation répartir 42,0 µl de Master Mix dans chaque tube de réaction PCR de 0,2 ml. Remettre en suspension le mélange ADNc/billes en pipetant et ajouter 8,0 µl de cette suspension (étape C6).

Remarque: Pour le C- 8,0 µl d'eau distillée sont ajoutés au lieu de l'ADNc.

Tableau 4 : Préparation de la PCR Multiplexe

Composants			Volumes
Master Mix PCR	<i>HotStar Taq</i>	<i>HotStar Taq</i>	25,0 µl
	Master Mix Kit (Qiagen)	<i>Master Mix</i>	13,0 µl
		Eau distillée	
	<i>PrimerMix BreastDetect</i> [8]		4,0 µl
Echantillons	ADNc ou Contrôle RT ou Contrôle négatif (eau/C-) ou <i>Contrôle Positif (C+)</i> [9] Pour chacun		8,0 µl
Volume total			50,0 µl

Un thermocycleur est utilisé pour la PCR en suivant le programme décrit dans le Tableau 5. Faire fonctionner le thermocycleur en suivant une croissance de 2°C/seconde.

Tableau 5 : programme PCR

95°C	15 min	} 35 cycles
94°C	1 min	
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

E. Analyse des fragments

Bioanalyzer Agilent 2100

L'analyse avec le Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies) sur le DNA 1000 LabChip est recommandée. Suivre les instructions du manuel DNA 1000 LabChip.

Vérifier qu'aucune bille ne soit transférée dans le LabChip. Des billes magnétiques dans le gel peuvent causer des résultats erronés. Lors de l'utilisation du Bioanalyzer 2100 un seuil de détection doit être établi comme décrit ci-dessous :

Commencer le programme Bioanalyzer *Bio Sizing* et créer un *Default Assay*.

Sous la rubrique Instrument sélectionner *Assay* > *Electrophoresis* > *ds1000* > *DNA 1000 Series II*.

Sous la rubrique *Data* choisir *Assay properties* > *global normal* > *height threshold (FU)* mettre le *Min Peak Height* à 0 pour détecter tous les signaux. Sous *Global Advanced* mettre le *Ladder Peak Height* à 0.

Gel d'Agarose

Alternativement les produits PCR peuvent être analysés sur un gel d'agarose à 4%. Appliquer 10,0 µl de chaque produit et 10,0 µl du *Gel Calibrator* [10]. En plus appliquer une échelle de 100 bp comme repère de taille suivant les instructions du fabricant.

Pour être sûr que les fragments peuvent être discriminés avec précision il est recommandé de laisser migrer le gel sur une distance d'au moins 5 cm.

Conditions d'électrophorèse : 100V > ou = 1 h.

Evaluation

Un test est considéré positif si un fragment PCR d'au moins une transcription associée à une tumeur est clairement détecté.

Si le Bioanalyzer Agilent 2100 est utilisé, les pics avec une concentration >0.30 ng/µl sont considérés comme positifs (Fig.1). Les pics qui ne sont pas détectés dans une position supérieure sont considérés comme négatifs (concentration <0,15 ng/µl) Les pics avec une concentration de 0,15 ng/µl à 0,30 ng/µl sont non concluant et requièrent un nouveau test à partir d'un échantillon frais prélevé après 3 à 4 semaines.

Pour évaluer les résultats obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose référez-vous à la Fig. 2.

Le *Gel Calibrator* peut aider à évaluer le gel d'agarose. L'intensité de la coloration du *Gel Calibrator* indique les fragments qui ne peuvent être jugés ni positifs ni négatifs. Dans ce cas un nouveau test à partir d'un échantillon frais prélevé après 3 à 4 semaines est recommandé.

Les fragments qui sont colorés plus intensivement que le *Gel Calibrator* sont positifs ; ceux qui sont moins colorés sont négatifs.

De plus les critères suivants doivent être remplis :

- Le fragment du gène de contrôle 'actine' doit être présent dans tous les échantillons de patient (contrôle interne de PCR). Un signal 'actine' donne un contrôle positif pour trois procédures :
 - a. La séparation cellulaire est réussie.

- b. La transcription inverse et
- c. la PCR multiplexe sont réussies.

- Les échantillons Contrôle Négatif (eau/C-) et Contrôle RT ne doivent montrer aucune bande de plus de 80 paires de bases (dimères d'amorce).
- Un fragment de plus de 1kb indique une contamination par ADN génomique. La procédure de séparation n'est pas réussie et les résultats doivent être éliminés si un tel fragment apparaît.

Remarque : Les *AdnaTest BreastCancerSelect* et *AdnaTest BreastCancerDetect* sont optimisés pour exclure le faible niveau d'expression des transcriptions associées aux tumeurs. Tout changement dans le protocole ou l'utilisation du Bioanalyzer Agilent 2100 peuvent parfois conduire à la détection de faible niveau d'expression par des cellules de donneurs sains sous le seuil de positivité.

Toute déviation du protocole peut produire des résultats faussement négatifs ou faussement positifs.

Au cas où une assistance est nécessaire pour l'interprétation des résultats, contacter svp l'équipe de support.

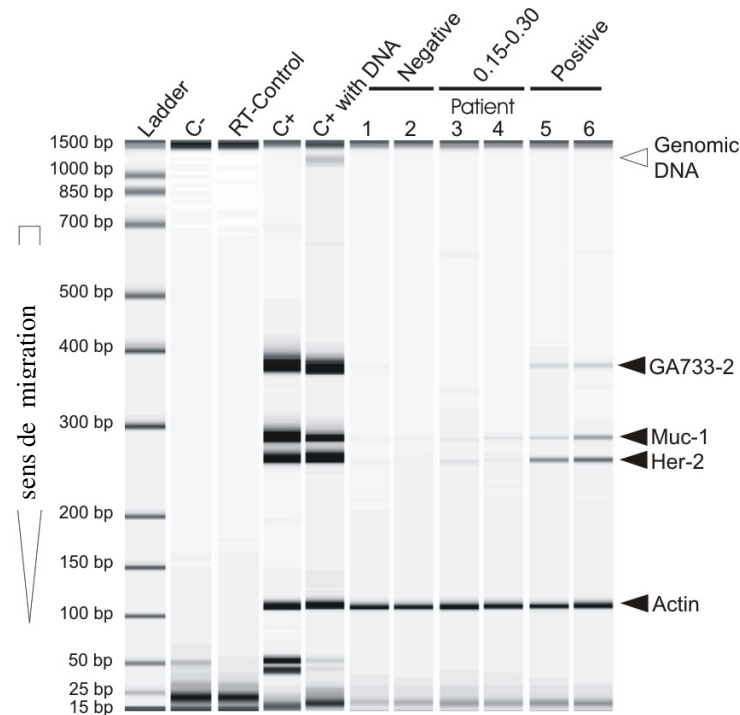


Fig. 1 : *AdnaTest BreastCancerDetect* sur échantillons de patients analysés par Bioanalyzer 2100 (Agilent) :

Tailles standard d'ADN (échelle), contrôle PCR (C-), Contrôle RT, Contrôle Positif (C+) et ADNc d'une lignée cellulaire qui a été contaminée par l'ADN génomique. Les patients 1 et 2 sont négatifs, les patients 5 et 6 sont positifs pour au moins un des trois marqueurs associées à une tumeur, GA733-2, Muc-1 et Her-2. Les patients 3 et 4 ne peuvent être évalués car ayant des concentrations comprises entre 0,15 ng/µl et 0,30 ng/ul.

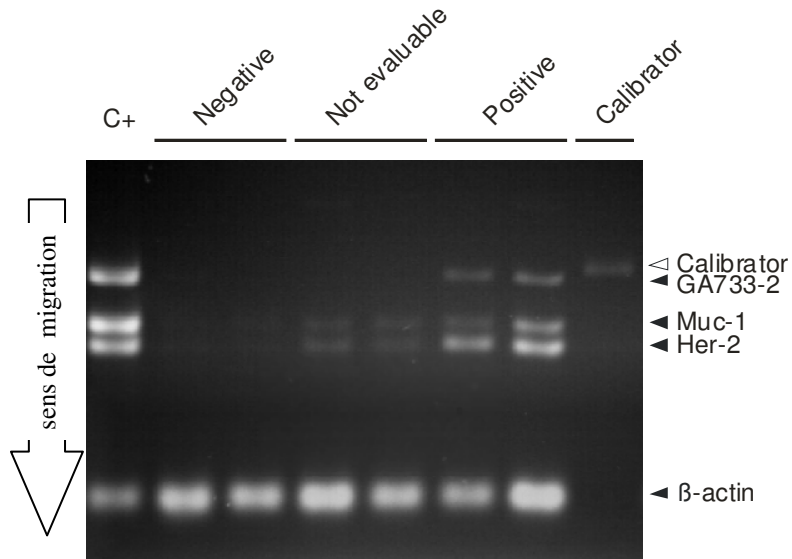


Fig. 2 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 4%.

Image sur gel d'agarose à 4% représentant des échantillons positifs et négatifs et des échantillons ne pouvant être évalués.

Les échantillons qui montrent la même intensité que le *Calibrator* [10] ne sont pas valables.

Références

Pour les références veuillez vous référer à notre site web :

<http://www.adnagen.com>

Détection des erreurs

Une défaillance de l'analyse de l'expression génétique peut être due à diverses raisons.

Il est essentiel que toutes les étapes du test soient effectuées précisément d'après le manuel d'emploi.

Si les problèmes persistent, le tableau suivant vous donne des commentaires sur les causes possibles et suggère des corrections. Etant donné que les problèmes peuvent trouver leur origine dans la procédure d'enrichissement cellulaire, le Tableau 6 réfère également à la trousse *AdnaTest BreastCancerSelect*.

N'hésitez pas à nous contacter si les problèmes persistent.

Tableau 6: Détection des erreurs

Problème	Causes possibles	Suggestions pour correction
Aucune bande, actine incluse, pour tous les échantillons.	Erreur de pipetage	Répéter
	Problème de réactifs	Contrôler les réactifs (conservation etc.)
	Contamination de la RNase	Vérifier que des réactifs et du matériel sans RNase (pipettes, embouts, tubes de réaction etc.) ont été employés. Porter des gants et les changer régulièrement.
	Mauvaise qualité des échantillons de sang	Vérifier que les échantillons sanguins ont été prélevés uniquement dans les tubes de prélèvement appropriés. Vérifier que les échantillons sanguins n'étaient pas hémolysés et que le prélèvement sanguin a été

		fait avant le traitement. Eliminer les échantillons si les billes de sélection s'agglutinent durant l'enrichissement cellulaire. Les échantillons sanguins doivent être testés endéans les 4 h (EDTA) ou 24 h (<i>AdnaCollect</i>) après le prélèvement. Les échantillons sanguins doivent être conservés dans la glace ou à 4 °C.
	Les bandes ne peuvent être identifiées suite à une séparation inefficace.	Vérifier la concentration du gel, des tampons, le temps de séparation et le voltage appliqués.
Les contrôles RT et C- montrent de fragments	Contamination	Changer tous les réactifs. Nous recommandons d'aliquoter tous les réactifs

plus larges que 80 bp.		avant usage. Utiliser des embouts à filtre. Si possible, garder la préparation des échantillons et la mise en route de la réaction dans des locaux séparés de ceux de l'analyse des produits PCR.
Bandes diffuses dans le gel d'agarose.	Les conditions d'électrophorèse du gel ne sont pas optimales.	Vérifier la concentration du gel d'agarose. Vérifier le tampon d'électrophorèse.
Les bandes sont plus larges que 1000 bp.	Contamination avec l'ADN génomique	Répéter l'enrichissement en cellules tumorales et la RT-PCR.

Résumé du Mode d'Emploi

AdnaTest *BreastCancerDetect*

Composants	<i>Lysis/Binding Buffer</i>	[3]
	<i>Oligo(dT)₂₅ Beads</i>	[4]
	<i>Buffer A</i>	[5]
	<i>Buffer B</i>	[6]
	<i>Tris HCL</i>	[7]
	<i>PrimerMix BreastDetect</i>	[8]
	<i>Contrôle positif (C+)</i>	[9]
	<i>Calibrateur de Gel</i>	[10]

Vous avez besoin de

Tubes PCR de 0,2 ml
1x tube de réaction de 1,5 ml par échantillon
Pipettes et embouts de 1-200 µl
Gel d'agarose à 4%
Sensiscript RT kit (Qiagen)
HotStarTaq MasterMix kit (Qiagen)

Protocole

- Amener [3], [4], [5] et [6] à température ambiante et placer [7] dans la glace.
- Laver 2 x 20 µl de billes *Oligo(dT)₂₅* [4] par échantillon avec 20 µl de *Lysis/Binding Buffer* [3] par échantillon.
- Ajouter 20 µl de billes *Oligo(dT)₂₅* [4] lavées à chaque échantillon.
- Incuber pendant 10 min à température ambiante sous rotation à 5 rpm.
- Placer les tubes de réaction dans le MPC-S et retirer le surnageant.
- Laver les billes avec 2 x 100 µl de *Buffer A* [5].
- Remettre les billes en suspension dans 100 µl de *Buffer B* [6].
- Laver les billes avec 1 x 100 µl de *Buffer B* [6].
- Laver les billes avec 1 x 100 µl *TrisHCL* [7].
- Mettre les billes en suspension dans 29,5 µl d'eau sans RNase.
- Incuber pendant 5 min à 50 °C et placer dans la glace au moins 2 min.
- Continuer avec la transcription inverse (RT), voir Tableau 7 et Tableau 8.

Tableau 7 : Transcription inverse

Composants			Volume
Mastermix RT	Trousse	10 x Buffer RT	4,0 µl
	<i>Sensiscript</i>	dNTPs	4,0 µl
	Reverse Transcriptase (Qiagen)	<i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptase (SRT)	2,0 µl
	RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)		0,5 µl
Echantillon	Complexe ARNm/bille ou H ₂ O sans RNase (comme contrôle RT)		29,5 µl
Volume total			40,0 µl

Tableau 8: Programme RT

37 °C	->	60 min
93 °C	->	5 min
4 °C	->	∞

- Continuer avec la PCR Multiplexe (Tableau 9) ou conserver les produits RT à -20 °C pendant 14 jours maximum.

Tableau 9 : PCR Multiplexe

Composants			Volumes
Master Mix PCR	Trousse <i>HotStar Taq</i>	<i>Master Mix</i> <i>HotStar Taq</i>	25,0 µl
	<i>Master</i> (Qiagen)	Eau distillée	13,0 µl
	<i>PrimerMix BreastDetect</i> [8]		4,0 µl
	Echantillons		8,0 µl
ADNc ou contrôle RT ou Contrôle Négatif (eau/C-) ou <i>Contrôle</i> <i>Positif</i> (C+) [9] Pour chacun :			
Volume total			50 µl

- Pour l'analyse des fragments utiliser le Bioanalyzer 2100 (Agilent). Alternativement analyser les fragments, les échantillons et le *Gel Calibrator* [10], dans un gel d'agarose à 4% (80-100 V pendant environ 60 min).

Tableau 10 : programme PCR

95°C	15 min	} 35 cycles
94°C	1 min	
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

AdnaTest BreastCancerDetect est distribué par :

INNOGENETICS N.V. TEL: +32 9 329 16 11
Technologiepark 6
B-9052 Zwijnaarde, BELGIUM

Support Technique:

INNOGENETICS GmbH TEL: +49 2867 990 731
Lembeckerstrasse 19
D-46359 Heiden
GERMANY

INNOGENETICS TEL: +34 93 270 53 11
DIAGNOSTICA IBERIA
S.L. Unipersonal
C/Tarragona, 161, planta 14
08014 Barcelona
SPAIN

INNOGENETICS s.a.r.l. TEL: +33 1 69 07 48 34
Z.A. Courtaboeuf
Les Conquérants, Bât. Le Kilimandjaro
8/10 av. des Tropiques
F-91940 Les Ulis
FRANCE

INNOGENETICS Srl TEL: +39 06 911 80 375
Via del mare 36
I-00040 Pomezia
ITALY