

PyroMark Qiagen



WorkFlow



~ 2h



~ 15 min



~ 10-120 min

Assay Design

PCR

Sample prep

Pyrosequencing

PCR primer



Region of interest

PCR primer,
biotinylated



Assay design

PyroMark Assay Design - [EMP006 - Position1 (AQ)]

File Edit Assay Windows Help

Assay Type: Allele Quantification (AQ)
Description:

Sequence Editor Graphic View Final Primer Set

ΔG Tm

CAAAGGGAAACATTTTCA
AAAGGGAACATTTTCAC

CAAAGGGAAACATTTTCACTGTAGGTTGTGCATCTCTGTTTAGAATTAAGATGATACTGGAAAAAAAAAGATCTCAGGGTAATATGGTA
GTTTTCCCTTTGAAAAGTGACATCCAACACGTAGAGACAAATCTTAATTTCTACTATGACCTTTTTTTTTTTTCTAGAGTCCCATTATACCAT

ACTATGACCTTTTTTTTTTCTA

Primer Set 1 Score: 94

General Warnings

F1 CAAAGGGAAACATTTTCA
R1 ATCTTTTTTTTTTCCAGTATCA
S1 AAAGGGAACATTTTCAC

	PCR Product	Forward PCR Primer, F1	Reverse PCR Primer, R1	Sequencing Primer, S1
Length, nt	75	19	23	18
Position, 5'-3'		1 - 19	75 - 53	3 - 20
Warnings				
Tm, °C		62.6	63.0	51.7
%GC	31.2	31.6	21.7	33.3

Sequence to Analyze: TCTT/AGGTT GTGCATCTCT GTTAGAATT AAGATGATACTGGAAAAAAAAAGATCTCAGGGTAATATGGTA

Primer Set 1 94

F1 CAAAGGGAAACATTTTCA
R1 ATCTTTTTTTTTTCCAGTATCA
S1 AAAGGGAACATTTTCAC

#1 94
F1 CAAAGGGAAACATTTTCA
R1 ATCTTTTTTTTTTCCAGTATCA
S1 AAAGGGAACATTTTCAC

#2 94
F1 CAAAGGGAAACATTTTCA
R2 CTTTTTTTTTCCAGTATCATC
S1 AAAGGGAACATTTTCAC

#3 94
F1 CAAAGGGAAACATTTTCA
R3 GATCTTTTTTTTTTCCAGTATC
S1 AAAGGGAACATTTTCAC

#4 94
F1 CAAAGGGAAACATTTTCA
R4 TTTTTTTTTTCCAGTATCATC
S1 AAAGGGAACATTTTCAC

#5 94
F1 CAAAGGGAAACATTTTCA
R5 TCTTTTTTTTTTCCAGTATCA
S1 AAAGGGAACATTTTCAC

#6 94
F1 CAAAGGGAAACATTTTCA
R6 TTTTCCAGTATCATCTTAATCTA
S1 AAAGGGAACATTTTCAC

#7 94
F1 CAAAGGGAAACATTTTCA

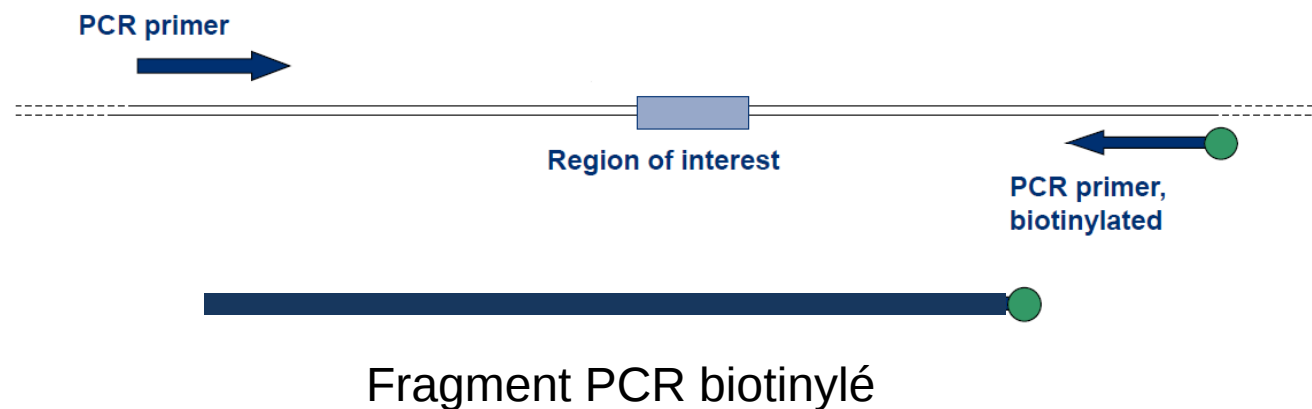
Variable Positions

Name: Position1
Position: 24 Type: SNP/Point Mutation
Variation: C/A
Alleles: 1. A

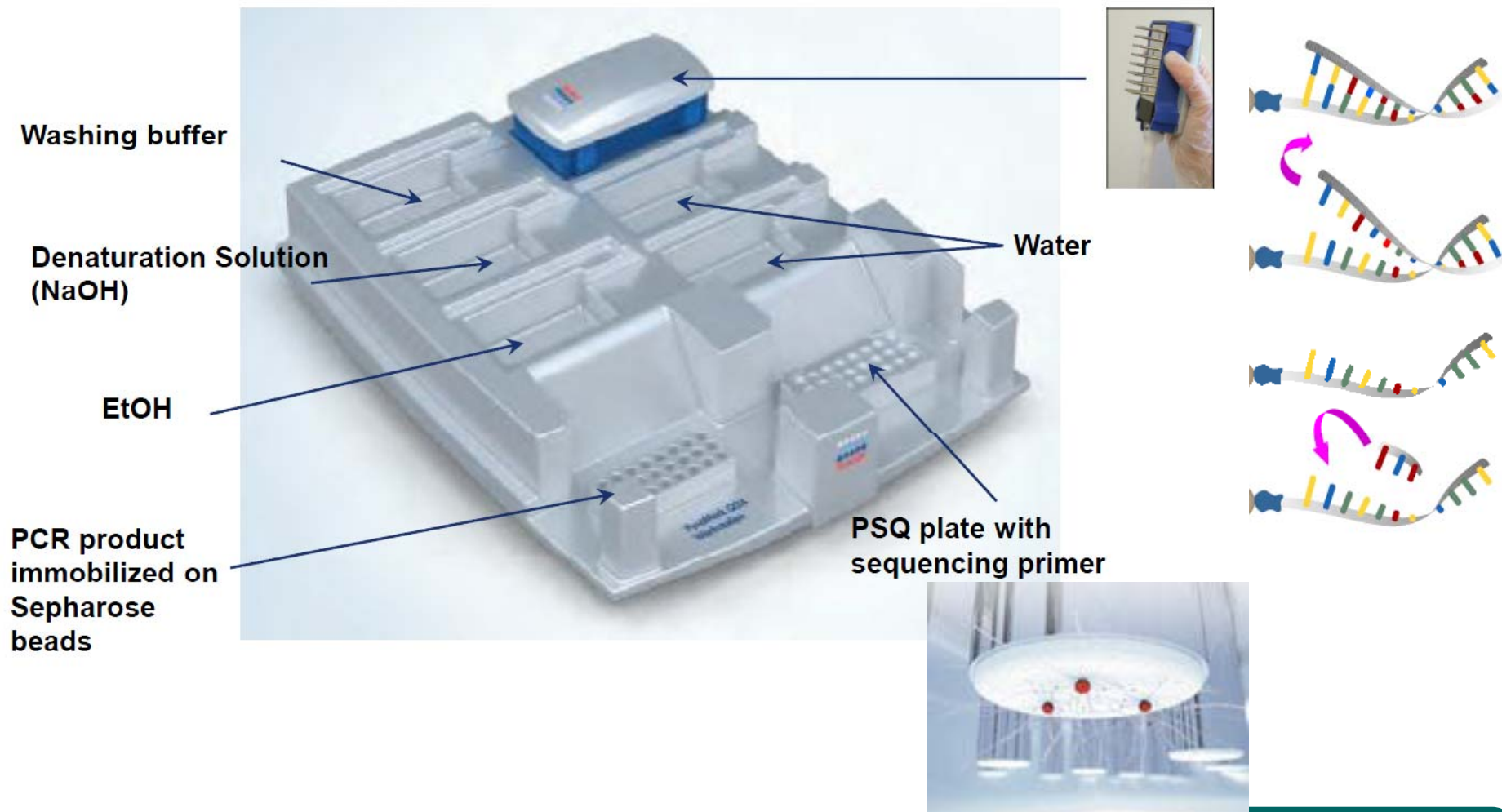
1 of 1

PCR / RT-PCR

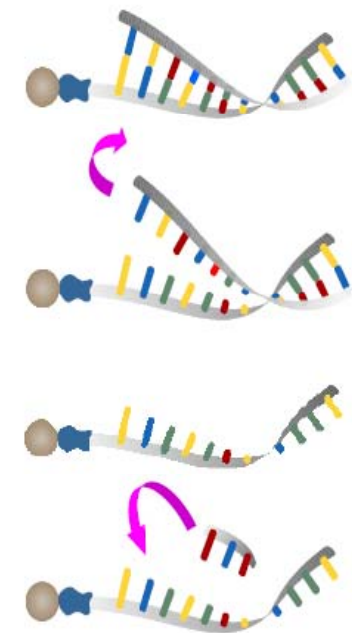
- Sur n'importe quelle machine PCR
- PyroMark PCR Kit / PyroMark OneStep RT-PCR Kit / kit classique
- Région amplifiée de 70 - 500 bp
- Un des primers doit être biotinylé



Préparation des échantillons



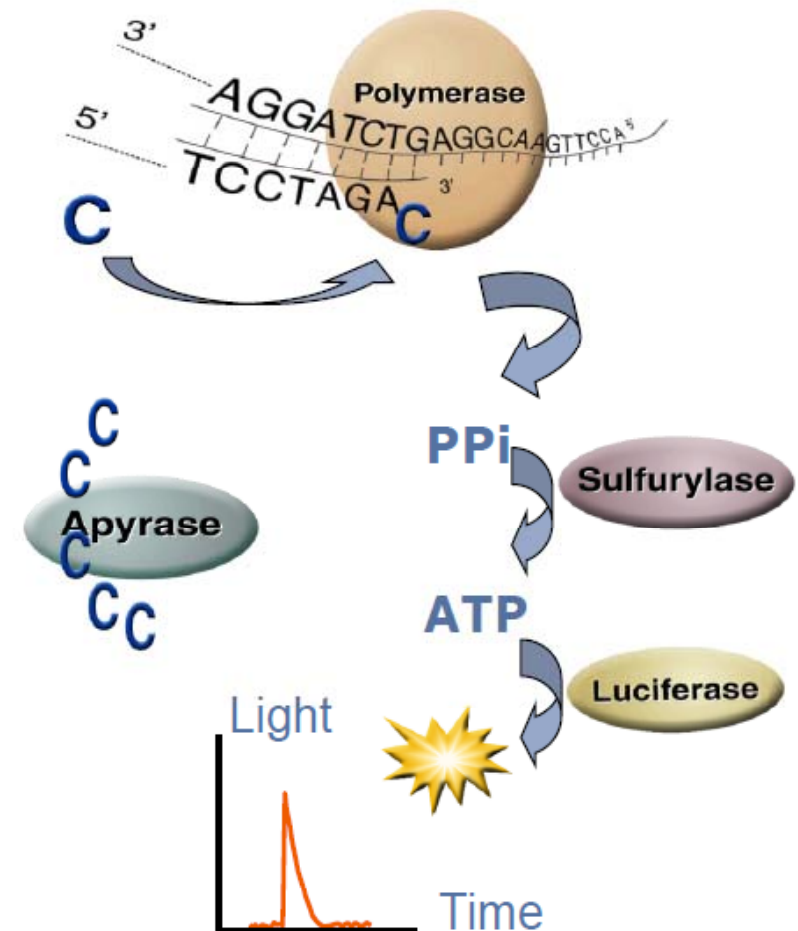
- Immobilisation des produits PCR sur billes de streptavidine, par agitation
- Sur la WORKSTATION :
 - Dénaturation à la soude
 - Lavage/ neutralisation du simple brin et récupération des simples brins dans un tampon avec l'amorce de séquençage
- Hybridation du primer de séquençage par refroidissement progressif de la plaque après 2min à 80°C
- Dans le pyroséquenceur
 - Réaction de Pyroséquençage



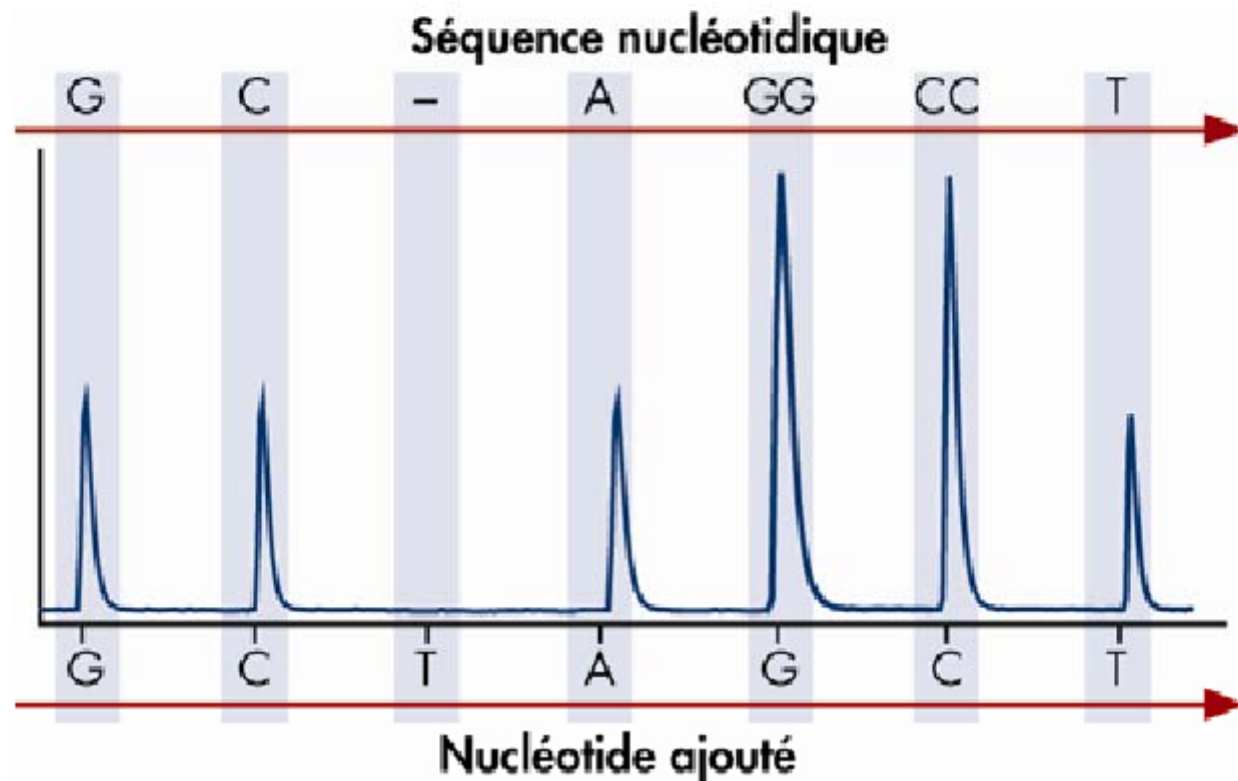
Pyroséquençage

- Incorporation d'un nucléotide à la fois
- Cette incorporation génère un pyrophosphate
- Ce pyrophosphate ajouté à la Sulfurylase génère un ATP
- ATP + Luciférase = signal lumineux
- Signal transformé en pyrogramme
- L'excès de dNTP est éliminé par l'Apyrase

La quantité de lumière est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés.



Pyroséquençage



Les applications

➤ Les applications testées lors du prêt :

- Quantification d'allèles (expression)
- Analyses de méthylation

➤ Autres applications :

- Détection de SNP
- Identification microbienne

Possibilité de validation de résultats obtenus en HiSeq

Points positifs / Limites

➤ Points positifs :

- Facilité d'utilisation
- Préparation des échantillons rapide
- La lecture sur le Q24 varie de 10 min à 2h en fonction des applications
- Possibilité de séquencer à nouveau à partir des mêmes échantillons

➤ Limites :

- Limité à 100 - 200 pb
- Technique de Pyroséquençage (homopolymères)

PyroMark Q24 pour 24 échantillons

Coût manip sans la PCR 2.53 € / éch

PyroMark Q96 pour 96 échantillons

Coût manip sans la PCR 1.40 € / éch



Merci de votre attention

Assay design

Pyrosequencing Assay Design Analysis Report

Assay Name	Assay1	Created by	LGC/lfresard
Assay Type	Allele Quantification (AQ)	Created Date	14/02/2013 14:33
Direction	Forward	Changed Date	14/02/2013 14:33
Description			
Notes	>galGal4_dna range=chr1:99403-99823 5'pad=210 3'pad=210 strand=+ repeatMasking=none AAATTCTATTGGGTTTTTTAAGAACAGCATTTCACATTTTCTCATTGC TTTCCTCTGAGAAGGAGTTTCTTTGAGACATGATTTGCAGAGGAGTAG CCTGGAGCTCCTTGTATCTAGGCCAGCCAGAGCAACGATAGGAAAGA ACTGGGAAAGGAAAGATAGGAAAGAACATTTCCAGCCTGTGCTGCCCAAG GTAGGACAAAC/TGCCAAACACTGCCTCCTGTGCAAGCACTAATGGAAGCAC GGAGTTGCTTTTTTCTCTAAATGACAGATTTGGGGGGGTTAAAGAAA TCAGCAGTGCCTCATGCTCTGTAGCAGCAAGGGACTCCACTGGCTG CATCTTCATTCTATTTAATCACTGCTGGTACTCATATTGCAGGAAAAAA AATGCGGCAATGGTTGATCTA		

Primer Set 22			Score: 87 Quality: Medium		
Primer	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
↗ PCR	F4	ACTGGGAAAGGAAAGATAG	19	59.8	42.1
↖ PCR	R6	CCTGCAATATGAGTACCA	18	58.9	44.4
➡ Sequencing	S1	GCCCAAGGTAGGACAA	16	54.4	56.3
Target Polymorphisms	Position1				
Sequence to Analyze	AC/TGCCAAA CACTGCCTCC TGTGCAAGC				
Analysis Steps	Name:	Biotinylated PCR Primer Hairpin Analysis			
	Description:	Evaluates hairpin structures on the biotinylated PCR primer.			
	Penalty:	0			
	Name:	Duplex Formation Analysis			
	Description:	Identifies possible annealing between the sequencing primer and the biotinylated PCR primer.			
	Penalty:	0			
	Name:	Mispriming Analysis			
	Description:	Identifies alternate annealing sites for the sequencing primer on the amplicon.			
	Penalty:	0			