 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

1. Champ d'application

Activité/méthode concernée : *extraction d'ADN*

Portée d'accréditation :

- ☐ Fixe
- ☐ FLEX1
- ☐ FLEX2
- ☒ FLEX3

2. Intitulé de méthode

Nom de la méthode : *extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de sang*

- ☐ Méthode manuelle
- ☒ Méthode semi-automatisée
- ☐ Méthode automatisée
- ☐ Autre méthode : à préciser

3. Elaboration du développement

3.1. Type de validation

- ☒ Adoption d'une nouvelle méthode
- ☐ Adaptation d'une méthode existante (contrainte technique, évolution technique, ...)
référence de la méthode concernée (codification du MOP) : à compléter
- ☐ Optimisation d'une méthode existante (temps, coût, ...)
référence de la méthode concernée (codification du MOP) : à compléter
- ☐ Alternative d'une méthode existante
référence de la méthode concernée (codification du MOP) : à compléter
- ☐ Traitement d'une matrice biologique non validée précédemment : à préciser


3.2. Revue de méthode

La revue de méthode s'appuie sur un référentiel :

- ☒ non
- ☐ oui : à préciser

3.3. Contexte et objectifs

Développer et routiniser une méthode de purification ADN à l'aide de billes paramagnétiques, adaptée au type de prélèvements traités au sein de la plateforme de génotypage GDScan. L'objectif étant de remplacer la méthode actuelle sur colonne de silice, au profit d'une méthode

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

sur billes paramagnétiques pour laquelle les leviers d'optimisation sont plus importants permettant de viser un meilleur rapport coût/qualité.

Objectifs:

- Parvenir à produire des extractions ADN sur matrice sang compatibles et adaptées à un traitement en génotypage haut-débit (Infinium, Illumina)
- Avoir accès à une méthode semi-automatisée afin de diminuer le risque d'erreur humaine et de viser un possible gain de temps pour l'opérateur
- Optimiser les coûts d'utilisation de cette méthode afin de réduire davantage les coûts d'extraction par la méthode actuelle sur colonne sans dégradation notable des performances à l'issue de l'opération de génotypage

3.4. Sélection de la méthode

L'actuelle méthode, sur colonne de silice induit, même avec un tarif négocié, un coût annuel élevé puisqu'actuellement, le consommable nécessaire à l'extraction a un coût unitaire de 1,29 € H.T. le point d'extraction/purification à partir de sang.


La technologie de purification par billes paramagnétiques peut apparaître de prime abord comme une technologie plus coûteuse puisqu'elle affiche un prix catalogue de l'ordre de 2,17 € H.T. le point d'extraction/purification à partir d'une matrice sang. Toutefois, cette technologie offre une souplesse d'utilisation qui nous permettrait d'optimiser ces coûts notamment en passant par réduction de la consommation de certains réactifs et, parallèlement, en négociant la tarification chez notre fournisseur.

Ainsi, nous prévoyons de réaliser un gain de 0,65 € H.T. \pm 25 % par point d'extraction en diluant ou réduisant les volumes d'utilisation de certains réactifs du kit et après négociation tarifaire.

Concernant la partie consommables plastiques annexes au kit d'extraction, nous sommes actuellement sur un coût de 0,34 € H.T. par point avec la méthode d'extraction sur colonne de silice.

Avec la technologie d'extraction sur billes magnétiques nous atteindrions après négociations un coût consommables plastiques à 0,32 € H.T. par point.

Enfin, la mise en place d'une telle technologie permettrait de viser un gain de temps d'intervention du personnel puisque l'extraction de 96 échantillons serait semi-automatisée et libère donc le personnel le temps de la durée d'extraction.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

3.5. Planification - Responsabilités

Pilote de projet : *C.Audebert*

Personnel concerné par la validation de méthode : *Assistentes Ingénieures, Personnels plateforme génotypage*

Date d'ouverture de l'enregistrement (JJ/MM/AA) : *15/11/2022*

Responsabilité (Nom-Prénom - Fonction)	Tâche (liste non exhaustive)	Délai de réalisation	Attribuée à (Nom-Prénom - Fonction)
C.Audebert Directeur R&D	Prospection et sélection d'un achat matériel en adéquation avec la méthode visée	4 mois	S.Merlin Assistant Ingénieure Responsable achats
C.Audebert Directeur R&D	Développement d'une méthode d'extraction sur billes magnétiques à partir d'une matrice sang sur un support robotique	4 mois	S.Merlin Assistant Ingénieure Responsable achats
C.Audebert Directeur R&D	Produits d'extraction ADN compatibles avec la technologie de génotypage utilisé sur la plateforme	4 mois	S.Merlin Assistant Ingénieure Responsable achats
C.Audebert Directeur R&D	Optimisation des coûts d'utilisation afin de les réduire autant que possible	4 mois	S.Merlin Assistant Ingénieure Responsable achats

Exemples de tâches (non exhaustif) : Sélection de la méthode, Développement - définition des essais, Développement - réalisation des essais, Développement - édition et interprétation des résultats, Rédaction - gestion des enregistrements relatifs, Vérification/validation, etc...

4. Contraintes du projet

Liste non exhaustive, détailler les catégories concernées


[X] Techniques :

Modification des pratiques en place au laboratoire.

Prévoir une formation des personnels habilités à l'extraction.

[X] Équipements :

Cette technologie nécessite un investissement matériel permettant sa mise en œuvre.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Il conviendra de sélectionner la meilleure option afin de permettre une optimisation investissement - coût - rendement.

[] Qualité des matrices/données :

[] Quantité de matrices/données :

[X] Coût - investissement :

La technologie ciblée nécessitera d'investir dans 2 robots afin d'assurer un débit adapté au volume de prélèvements traités par la plateforme.

La technologie sur billes magnétiques est, de base, une technologie plus coûteuse que celle actuellement utilisée. Il s'agira donc d'effectuer une optimisation du processus afin de réduire les coûts dûs à l'introduction de cette nouvelle méthode voir, si possible, de descendre à un coût inférieur aux coûts de traitement avec la méthode actuelle.

[] Autre(s) :

5. Caractéristiques de la méthode et performances attendues

5.1. Principe de la méthode


La technologie est basée sur l'adsorption réversible des acides nucléiques. sur des billes paramagnétiques dans des conditions de tampon appropriées. Après la lyse du sang total, des billes paramagnétiques sont ajoutées et les conditions de liaison dans lesquelles l'ADN se lie aux billes magnétiques sont ajustées par l'ajout d'un tampon de liaison. Après séparation magnétique de leur milieu, les billes paramagnétiques sont lavées pour éliminer les contaminants et sels. Enfin, l'ADN hautement purifié est élué et peut être directement utilisé pour des applications en aval.

5.2. Domaine d'application

La présente méthode s'applique à l'ensemble des prélèvements de sang bovin reçus au sein de la plateforme de génotypage GDScan.

5.3. Matrice(s)/Données

Matrice(s) / données concernée(s)	Nature	Conditionnement / emplacement	Conservation pré-traitement
•	sang total	tube EDTA	température ambiante
•	bulbes de poils	pochette Kit GDScan	température ambiante

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

•	biopsie auriculaire = cartilage	tube avec conservateur (Allflex TSU ou TST)	température ambiante
•	semence	paillette de conservation de sperme dilué	température ambiante
•	ADN	plaques ADN (4x96 échantillons)	5°C +/- 3°C
•	métadonnées et données de géotypage	base de données / serveur	-
•	autre (à préciser) :	(à préciser)	(à préciser)

5.4. Traçabilité des échantillons

Pour chaque essai, l'ensemble des informations liées aux prélèvements (enregistrement et traçabilité) tout au long de la méthode d'extraction d'ADN doit être conservé et l'accès aux informations clairement identifié.

5.5. Paramètres


Le ou les paramètre(s) analysé(s) sont :

[X] quantitatifs (ex : concentration en ADN) : Concentration ADN > 15 ng/μL

[X] qualitatifs (ex : Call Rate) : Call Rate (intervient en fin de validation)

5.6. Critères de performance attendus

Méthode	Nombre d'échantillons	Critères de performance	Répétabilité	Reproductibilité
Extraction d'ADN	16 prélèvements (dont 8 satisfaisants au critère de concentration seront géotypés)	Pour au moins 90 % des échantillons : - [ADN] > 15 ng/μL - Call Rate > 0,95 - Médiane Call Rate > 0,975	16 mêmes prélèvements (dont 8 satisfaisants au critère de concentration seront géotypés)	16 mêmes prélèvements (dont 8 satisfaisants au critère de concentration seront géotypés)
Géotypage d'ADN	32 échantillons d'ADN	Pour au moins 90 % des échantillons :	Procédure de contrôle	Procédure de contrôle

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

		<ul style="list-style-type: none"> - Call Rate > 0,95 pour au moins 90 % des échantillons - Médiane Call Rate > 0,975 - Prochain essai interlaboratoire validé (à posteriori) 	répétabilité GDB_PRO_05_ Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN	reproductibilité GDB_PRO_05_ Contrôle de répétabilité et de reproductibilité : méthode de génotypage haut-débit par puces à ADN
Nouveau support de génotypage	2 charolais + 2 holstein déjà génotypés sur version N-1	<ul style="list-style-type: none"> - Présence 580 SNP ISO (GDB_FI_15_SNP ISO 580) - 99 % de similarité 580 SNP ISO N-1 et N (génotypes valides) 	2 mêmes charolais + 2 mêmes holstein déjà génotypés sur version N-1	2 mêmes charolais + 2 mêmes holstein déjà génotypés sur version N-1
Autre : Extraction ADN	96 prélèvements extraits et génotypés	<ul style="list-style-type: none"> Pour au moins 90 % des échantillons : - [ADN] > 15 ng/μL - Call Rate > 0,95 - Médiane Call Rate > 0,975 		

6. Essai 1

6.1. Introduction


Les travaux sont réalisés via un kit Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501 qui serait le type de kit utilisé sur la plateforme, en routine.

Les purifications sont réalisées dans les conditions les plus proches de la réalité puisqu'effectuées sur un robot de type Magnetapure 32, or nous envisageons l'investissement robotique sur du Magnetapure 96.

Matrices supportées par le Kit: Prise d'essai de 200 μL sang total

6.2. Mode Opérateur

Pour l'ensemble de l'essai, le volume d'entrée matériel a été modifié par rapport aux recommandations fournisseur, les volumes de réactifs de lyse ont été modifiés en proportion.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

PK 15 µL + Prise d'essai sang (en tube EDTA): 150 µL + MBL1 60 µL

Condition 1 (contrôle):

Post lyse, pas de modification apportée au protocole fournisseur

Condition 2:

Post lyse, modification apportée au protocole fournisseur:

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau RNase/DNase free

Apport de MBL3&4 de 400 µL

Condition 3:

Post lyse, modifications apportées au protocole fournisseur:

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau

Dilution du MBL2 au 1/3 dans de l'eau

Apport de MBL3&4 de 400 µL

Condition 4:

Post lyse, modifications apportées au protocole fournisseur:

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau

Dilution du MBL2 au 1/3 dans de l'éthanol absolu

Apport de MBL3&4 de 400 µL

6.3. Points à développer (liste non exhaustive)

- Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :

Magnetapure 32

Programmation Magnetapure32 #conditions 2 à 4:

AS154_S


NAME:NucleoMagBlood150LL

STEP:7

STATUS:00

TIME:2019-6-5

11:21:54

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 1 1 1 0 1 5 1 2 0 0 5
Binding 1 5.0 120 0.0 550 5 0 0 80 0 3 0
WashMBL3 2 5.0 120 0.0 400 3 0 0 80 0 5 0
Wash2MBL3 3 5.0 120 0.0 400 3 0 0 80 0 5 0
EtOH80 4 5.0 120 0.0 800 3 0 0 80 0 5 0
WashMBL4 5 0.0 30 0.0 400 3 0 0 80 0 1 0
Elution 6 5.0 120 0.0 60 5 56 0 80 0 5 0
release 4 1.0 0 0.0 800 10 0 0 80 0 3 0
AS154_E

➤ Kits et réactifs : *compléter le tableau ci-dessous*

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501	1806-001	(ex : à conserver à l'obscurité)	Température ambiante

➤ Matrices (quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...) :


L'ensemble des purifications de cet essai est réalisé sur 4 prélèvements de sang:

FR6114467370 GD445023
FR6114467367 GD445021
FR6117116619 GD445035
FR6117116647 GD445045

- Milieu : L'essai a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche et Développement
- Main d'oeuvre : Assistante ingénieure S. Merlin

6.4. Résultats de l'essai - Conclusion

Dosage Qubit et profil nanodrop:

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Seules les conditions présentant un profil nanodrop avec des ratios A260/280 et A260/A230 proches de 1.8 seront dosés.

Condition 1	Dosage (ng/μL)	A260/280 (protéines) ~1.8	A260/230 (sels chao.) >1.8	Condition 2	Dosage (ng/μL)	A260/280 (protéines) ~1.8	A260/230 (sels chao.) >1.8
1	63	1.88	1.23	1	64	1.97	1.91
2	76	1.91	1.56	2	60	1.94	1.9
3	82	1.87	1.63	3	82	1.84	1.66
4	74	1.9	2.17	4	70	1.94	1.96

Conclusion de l'essai:

Réduction des volumes d'entrées pour la lyse → Valide

Dilution des billes au 1/3 dans de l'eau → Valide

Dilution du réactif MBL2 → Invalide

Réduction des volumes des tampons MBL3 & MBL4 → Valide


7. Essai 2

7.1. Introduction

Les travaux sont réalisés via un kit Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501 qui serait le type de kit utilisé sur la plateforme, en routine.

Les purifications sont réalisées dans les conditions les plus proches de la réalité puisqu'effectuées sur un robot de type Magnetapure 32, or nous envisageons l'investissement robotique sur du Magnetapure 96.

Matrices supportées par le Kit: Prise d'essai de 200 μL sang total

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

7.2. Mode Opérateur

Phase de lyse: PK 15 µL + Prise d'essai sang (en tube EDTA): 150 µL + MBL1 60 µL

Condition :

Post lyse, modification apportée au protocole fournisseur:

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau

Apport de MBL2 divisé par 3 soit 100 µL

Apport de MBL3&4 de 400 µL

7.3. Points à développer (liste non exhaustive)

- Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :

Magnetapure 32

Programmation Magnetapure 32:

AS154_S

NAME:NucleoMagBlood150

STEP:7

STATUS:00

TIME:2019-6-5 11:21:54

OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 1 1 1 0 1 5 1 2 0 0 5

Binding 1 5.0 120 0.0 350 5 0 0 80 0 3 0

WashMBL3 2 5.0 120 0.0 400 3 0 0 80 0 5 0

Wash2MBL3 3 5.0 120 0.0 400 3 0 0 80 0 5 0

EtOH80 4 5.0 120 0.0 800 3 0 0 80 0 5 0


WashMBL4 5 0.0 30 0.0 400 3 0 0 80 0 1 0

Elution 6 5.0 120 0.0 60 5 56 0 80 0 5 0

release 4 1.0 0 0.0 800 10 0 0 80 0 3 0

AS154_E

- Kits et réactifs : compléter le tableau ci-dessous

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501	1806-001	(ex : à conserver à l'obscurité)	Température ambiante

➤ Matrices (*quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...*) :

L'ensemble des purifications de cet essai est réalisé sur 4 prélèvements de sang:

FR6114467370	GD445023
FR6114467367	GD445021
FR6117116619	GD445035
FR6117116647	GD445045

➤ Milieu :

L'essai a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche et Développement

➤ Main d'oeuvre :

Assistante ingénieure S. Merlin

7.4. Résultats de l'essai - Conclusion


Dans ces conditions les concentrations ADN obtenues sont nulles, il n'est donc pas possible d'être si stringent sur le volume du tampon de binding.

Conclusion: Il faut donc rester sur un rapport équivalent vol.lyse/vol.binding.

8. Essai 3

8.1. Introduction

Les travaux sont réalisés via un kit Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501 qui serait le type de kit utilisé sur la plateforme, en routine.

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Les purifications sont réalisées dans les conditions les plus proches de la réalité puisqu'effectuées sur un robot de type Magnetapure 32, or nous envisageons l'investissement robotique sur du Magnetapure 96.

Matrices supportées par le Kit: Prise d'essai de 200 µL sang total (tube EDTA)

8.2. Mode Opérateur

Condition 1 :

Modifications apportées au protocole fournisseur:

Lyse: PK 15 µL + Prise d'essai sang: 150 µL + **MBL1 40 µL**

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau

Apport de MBL2 de **200 µL**

Apport de MBL3&4 de **400 µL**

Condition 2 :

Modifications apportées au protocole fournisseur:

Lyse: **PK 10 µL + Prise d'essai sang: 100 µL + MBL1 40 µL**

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau

Apport de MBL2 de **150 µL**

Apport de MBL3&4 de **400 µL**

Condition 3 :


Modifications apportées au protocole fournisseur:

Lyse: **PK 10 µL + Prise d'essai sang: 100 µL + MBL1 30 µL**

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau

Apport de MBL2 de **150 µL**

Apport de MBL3&4 de **400 µL**

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

8.3. Points à développer (liste non exhaustive)

- Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :

Magnetapure 32

Programmation Magnetapure 32:

AS154_S

NAME:NucleoMagBlood100

STEP:7

STATUS:00

TIME:2019-6-5 11:21:54

OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 1 1 1 0 1 5 1 2 0 0 5

Binding 1 5.0 120 0.0 265 5 0 0 80 0 3 0

WashMBL3 2 5.0 120 0.0 400 3 0 0 80 0 5 0

Wash2MBL3 3 5.0 120 0.0 400 3 0 0 80 0 5 0

EtOH80 4 5.0 120 0.0 800 3 0 0 80 0 5 0

WashMBL4 5 0.0 30 0.0 400 3 0 0 80 0 1 0

Elution 6 5.0 120 0.0 60 5 56 0 80 0 5 0

release 4 1.0 0 0.0 800 10 0 0 80 0 3 0


AS154_E

- Kits et réactifs : compléter le tableau ci-dessous

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501	1806-001	(ex : à conserver à l'obscurité)	Température ambiante

- Matrices (quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...) :

L'ensemble des purifications de cet essai est réalisé sur 4 prélèvements de sang:

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

FR6114467370 GD445023
FR6114467367 GD445021
FR6117116619 GD445035
FR6117116647 GD445045

➤ Milieu :

L'essai a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche et Développement

➤ Main d'oeuvre :

Assistante ingénieure S. Merlin


8.4. Résultats de l'essai - Conclusion

Condi tion 1	Dosa ge (ng/μ L)	A260/ 280 (proté ines) ~1.8	A260/ 230 (sels chao.) >1.8	Condi tion 2	Dosa ge (ng/μ L)	A260/ 280 (proté ines) ~1.8	A260/ 230 (sels chao.) >1.8	Condi tion 3	Dosa ge (ng/μ L)	A260/ 280 (proté ines) ~1.8	A260/ 230 (sels chao.) >1.8
1	78.2	1.82	1.38	1	56.2	1.81	1.35	1	48.4	1.92	1.81
2	76.2	1.87	1.73	2	44	1.88	1.53	2	46.4	1.94	1.68
3	110	1.9	2.28	3	92.6	1.93	2.01	3	97.2	1.88	1.78
4	115	1.9	2.12	4	22.2	1.94	1.5	4	25.6	1.97	1.77

Réduction des volumes en entrée de lyse (#condition 2&3) → Valide

Réduction supplémentaire du volume MBL1 (condition 3) → Valide

En conséquence, les volumes des tampons critiques (PK, MBL1, MBL2) peuvent être considérablement réduits. On peut donc envisager un achat ponctuel de PK et MBL2 dont le coût serait négligeable.

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

En sortie, considérant la condition 3 de cet essai, voici les reliquats théorique que nous obtiendrions pour un kit 4x96:

PK	→	61,6%
MBL1	→	74,4%
MBL2	→	64,0%
MBL3	→	65,9%
MBL4	→	69,3%
MBL5	→	81,6% (élution 60 µL)

9. Essai 4

9.1. Introduction

Les travaux sont réalisés via un kit Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501 qui serait le type de kit utilisé sur la plateforme, en routine.

Les purifications sont réalisées sur Magnetapure 96, robot dont nous nous doterions.

Matrices supportées par le Kit: Prise d'essai de 200 µL sang total

9.2. Mode Opératoire

Condition appliquées:

Modifications apportées au protocole fournisseur:

Lyse: **PK 10 µL + Prise d'essai sang: 100 µL + MBL1 30 µL**

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau

Apport de MBL2 de **150 µL**

Apport de MBL3&4 de **400 µL**

9.3. Points à développer (liste non exhaustive)

- Matériel (type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...) :


Magnetapure 96

Programme Magnetapure 96:

AS180_S

NAME:NMBloodB

STEP:9

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

STATUS:11

TIME:2022-11-17 16:44:51

OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 0 1 1 0 1 5 0 2

-Load- 1 0 1 0 5 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0

binding 2 50 80 0 265 5 0 1 1 1 2 3 10 8 8 8 1

MBL3 3 50 80 0 400 5 0 1 1 2 2 3 5 1 1 1 1

MBL3 4 50 80 0 400 5 0 1 1 2 2 3 5 10 10 10 1

EtOH 5 50 80 0 400 5 0 1 1 2 2 3 5 1 1 1 1

MBL4 6 0 80 0 400 1 0 1 1 2 2 3 1 10 10 10 1

elution 8 50 90 0 60 8 56 1 1 1 2 3 60 18 1 1 1

relargage 3 5 80 0 400 10 0 0 1 1 2 3 1 1 1 1 1

-Unload- 2 0 1 0 5 1 0 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1

AS180_E

➤ Kits et réactifs : *compléter le tableau ci-dessous*

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501	1806-001	(ex : à conserver à l'obscurité)	Température ambiante

➤ Matrices (*quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...*) :


L'ensemble des purifications de cet essai est réalisé sur 48 prélèvements de sang:

➤ Milieu :

L'essai a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche et Développement

➤ Main d'oeuvre :

Assistante ingénieure S. Merlin

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT


9.4. Résultats de l'essai - Conclusion

	1	2	3	4	5	6
A	71.39	7.29	78.11	56.51	49.06	70.28
B	26.72	52.15	35.97	66.28	64.08	74.84
C	22.14	75.14	27.85	56.48	73.17	63.15
D	42.21	53.78	56.41	57.32	46.73	52.86
E	72.96	40.75	33.75	70.19	69.64	56.09
F	67.05	55.69	23.39	54.72	45.59	76.97
G	20.95	17.07	35.7	83.3	67.31	52.31
H	10.09	17.12	22.43	55.03	60.82	82.79

Genotypage sur 4 extractions:

Génotypage sur les échantillons suivant déjà vus dans le circuit au préalable

Individu	Call Rate
GD301254	0,9995146
GD301249	0,9995313

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

GD301256	0,9994476
GD424558	0,9994978

Les paramètres mis en place pour l'extraction d'ADN à partir de prélèvement de sang sur le système Magnetapure 96 sont validés. Il s'agit maintenant d'effectuer une analyse extraction/génotypage sur une plaque complète, sur le site de la plateforme GD Scan et sur notre appareil.

10. Essai 5

10.1. Introduction

Les travaux sont réalisés via un kit Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501

Les purifications sont réalisées sur Magnetapure 96.

10.2. Mode Opérateur

Condition appliquées:

Modifications apportées au protocole fournisseur:

Lyse: **PK 10 µL + Prise d'essai sang: 100 µL + MBL1 30 µL**

Dilution des B-beads au 1/3 dans de l'eau

Apport de MBL2 de **150 µL**

Apport de MBL3&4 de **400 µL**

10.3. Points à développer *(liste non exhaustive)*

- Matériel *(type d'appareil, référence, consigne, réglage, etc...)* :

Magnetapure 96


Programme Magnetapure 96:

AS180_S

NAME:NMBloodB

STEP:9

STATUS:11

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

TIME:2022-11-17 16:44:51

OPTION:1 1 1 1 1 1 1 1 0 5 0 1 1 0 1 5 0 2

-Load- 1 0 1 0 5 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0

binding 2 50 80 0 265 5 0 1 1 1 2 3 10 8 8 8 1

MBL3 3 50 80 0 400 5 0 1 1 2 2 3 5 1 1 1 1

MBL3 4 50 80 0 400 5 0 1 1 2 2 3 5 10 10 10 1

EtOH 5 50 80 0 400 5 0 1 1 2 2 3 5 1 1 1 1

MBL4 6 0 80 0 400 1 0 1 1 2 2 3 1 10 10 10 1

elution 8 50 90 0 60 8 56 1 1 1 2 3 60 18 1 1 1

relargage 3 5 80 0 400 10 0 0 1 1 2 3 1 1 1 1 1

-Unload- 2 0 1 0 5 1 0 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1

AS180_E


➤ Kits et réactifs : compléter le tableau ci-dessous

Kits et autres réactifs			
Produits / Consommables	Numéro de lot	Spécifications particulières	Stockage
Nucleomag Blood 200 Macherey Nagel ref. 744501	2208-002	(ex : à conserver à l'obscurité)	Température ambiante


➤ Matrices (quantité, traçabilité échantillon, traitement, spécificités, etc...) :

L'ensemble des purifications de cet essai est réalisé sur 96 prélèvements de sang:


ID	CODE BARRE	SEXE	RACE	TYPE MAT BIOLO	date reception Labo Douai	Plaque ADN	Position ADN	Date extraction
FR7221292265	GD445809	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A01	19/01/2023
FR2716162139	GD445807	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B01	19/01/2023
FR6125093475	GD445808	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C01	19/01/2023

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT


FR7221292273	GD445810	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D01	19/01/2023
FR7221292277	GD445814	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E01	19/01/2023
FR7221292274	GD445811	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F01	19/01/2023
FR2716162135	GD445805	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G01	19/01/2023
FR7221292282	GD445816	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H01	19/01/2023
FR7221292275	GD445812	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A02	19/01/2023
FR7221292276	GD445813	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B02	19/01/2023
FR2716162137	GD445806	1	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C02	19/01/2023
FR7635903826	GD445843	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D02	19/01/2023
FR7635903813	GD445842	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E02	19/01/2023
FR7635903808	GD445841	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F02	19/01/2023
FR7635903799	GD445840	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G02	19/01/2023
FR2837244240	GD478200	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H02	19/01/2023
FR2837244224	GD478197	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A03	19/01/2023
FR2837244225	GD478198	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B03	19/01/2023
FR2837244163	GD478182	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C03	19/01/2023
FR2837244186	GD478185	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D03	19/01/2023
FR2837244237	GD478199	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E03	19/01/2023
FR2837244242	GD478201	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F03	19/01/2023
FR2837244198	GD478190	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G03	19/01/2023
FR2837244207	GD478192	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H03	19/01/2023
FR2837244217	GD478195	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A04	19/01/2023
FR2837244189	GD478187	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B04	19/01/2023
FR2837244210	GD478193	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C04	19/01/2023
FR2837244218	GD478196	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D04	19/01/2023
FR2837244216	GD478194	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E04	19/01/2023
FR2837244169	GD478183	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F04	19/01/2023
FR2837244194	GD478189	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G04	19/01/2023

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

FR2837244191	GD478188	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H04	19/01/2023
FR2837244187	GD478186	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A05	19/01/2023
FR2837244180	GD478184	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B05	19/01/2023
FR2837244203	GD478191	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C05	19/01/2023
FR1448011918	GD478180	2	56	Sang	18/01/2023	SAM230153	D05	19/01/2023
FR1448011914	GD478178	2	56	Sang	18/01/2023	SAM230153	E05	19/01/2023
FR1448011916	GD478179	2	56	Sang	18/01/2023	SAM230153	F05	19/01/2023
FR7635903746	GD478128	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G05	19/01/2023
FR7635903745	GD478127	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H05	19/01/2023
FR7635903734	GD478124	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A06	19/01/2023
FR7635903751	GD478129	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B06	19/01/2023
FR7635903752	GD478130	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C06	19/01/2023
FR7635903759	GD478131	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D06	19/01/2023
FR7635903740	GD478125	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E06	19/01/2023
FR7635903743	GD478126	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F06	19/01/2023
FR7635903733	GD478123	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G06	19/01/2023
FR7635903762	GD478132	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H06	19/01/2023
FR7635903731	GD478122	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A07	19/01/2023
FR4243557197	GD448216	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B07	19/01/2023
FR4243454489	GD430381	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C07	19/01/2023
FR4243454488	GD430379	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D07	19/01/2023
FR4243454492	GD430385	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E07	19/01/2023
FR4322261259	GD430395	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F07	19/01/2023
FR4243454490	GD430383	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G07	19/01/2023
FR4322261268	GD430401	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H07	19/01/2023
FR4243528147	GD430391	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A08	19/01/2023
FR4322261261	GD430399	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B08	19/01/2023
FR4322261260	GD430397	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C08	19/01/2023

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

FR4243557184	GD448215	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D08	19/01/2023
FR4243528149	GD430393	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E08	19/01/2023
FR4243526870	GD430389	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F08	19/01/2023
FR4243526868	GD430387	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G08	19/01/2023
FR4243485576	GD448224	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H08	19/01/2023
FR4243485574	GD448222	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A09	19/01/2023
FR4243485575	GD448223	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B09	19/01/2023
FR4243485567	GD448217	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C09	19/01/2023
FR4243485580	GD448228	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D09	19/01/2023
FR4243485572	GD448220	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E09	19/01/2023
FR4243485570	GD448218	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F09	19/01/2023
FR4243485571	GD448219	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G09	19/01/2023
FR5945462281	GD477766	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H09	19/01/2023
FR5945462289	GD477782	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A10	19/01/2023
FR5945462277	GD477760	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B10	19/01/2023
FR5945462298	GD477800	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C10	19/01/2023
FR5945462303	GD477808	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D10	19/01/2023
FR5945462417	GD477789	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E10	19/01/2023
FR5945462293	GD477790	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F10	19/01/2023
FR5945462299	GD477802	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G10	19/01/2023
FR5945462416	GD477787	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	H10	19/01/2023
FR5945462296	GD477796	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	A11	19/01/2023
FR5945462415	GD477785	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	B11	19/01/2023
FR5946022959	GD477706	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	C11	19/01/2023
FR5946022955	GD477702	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	D11	19/01/2023
FR5946023041	GD477739	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	E11	19/01/2023
FR5945462297	GD477798	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	F11	19/01/2023
FR5945462283	GD477770	2	66	Sang	18/01/2023	SAM230153	G11	19/01/2023


 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Concentration calculée (ng/μL)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	56,01	69,20	60,44	56,55	55,48	55,39	62,12	63,29	56,08	62,61	62,21	60,54
B	67,51	68,36	57,99	58,69	36,07	52,34	60,13	63,39	53,78	62,85	68,47	51,62
C	59,48	57,28	59,02	58,17	47,87	48,88	47,99	55,53	57,26	73,39	67,25	57,66
D	63,00	69,12	55,54	39,73	49,93	54,53	55,58	38,57	41,22	68,84	65,35	54,97
E	59,88	53,98	48,89	64,56	60,21	40,32	49,32	62,92	54,13	15,83	59,15	62,25
F	47,31	52,19	61,49	39,93	34,27	27,35	65,97	36,34	59,53	70,57	67,97	61,37
G	41,40	63,49	60,39	10,11	66,61	56,70	70,83	47,47	46,70	65,49	61,59	68,87
H	58,57	66,28	69,03	62,42	58,48	58,91	61,22	67,22	59,96	57,98	62,96	64,81


-> réf fichier dosage \GD_Labo\projets labo\DNA Banking\SAM\Dosage ADN -> fichier Excel
DOSAGE BLOOD MAGNE SAM230153

Call Rate:


ID	CODE BARRE	ID GENOTYPAGE	Date debut genotypage	Date de Scan	Call Rate	Callrate 580 Iso
FR7221292265	GD445809	WG6984828-MSA7_A01	23/01/2023	24/01/2023	0,9994476	1
FR2716162139	GD445807	WG6984828-MSA7_B01	23/01/2023	24/01/2023	0,9994978	1
FR6125093475	GD445808	WG6984828-MSA7_C01	23/01/2023	24/01/2023	0,9993137	1
FR7221292273	GD445810	WG6984828-MSA7_D01	23/01/2023	24/01/2023	0,9991798	1
FR7221292277	GD445814	WG6984828-MSA7_E01	23/01/2023	24/01/2023	0,9990627	1
FR7221292274	GD445811	WG6984828-MSA7_F01	23/01/2023	24/01/2023	0,9993974	1
FR2716162135	GD445805	WG6984828-MSA7_G01	23/01/2023	24/01/2023	0,9995481	1
FR7221292282	GD445816	WG6984828-MSA7_H01	23/01/2023	24/01/2023	0,9992468	1
FR7221292275	GD445812	WG6984828-MSA7_A02	23/01/2023	24/01/2023	0,9989287	1
FR7221292276	GD445813	WG6984828-MSA7_B02	23/01/2023	24/01/2023	0,998979	1
FR2716162137	GD445806	WG6984828-MSA7_C02	23/01/2023	24/01/2023	0,9994644	1
FR7635903826	GD445843	WG6984828-MSA7_D02	23/01/2023	24/01/2023	0,9993305	1
FR7635903813	GD445842	WG6984828-MSA7_E02	23/01/2023	24/01/2023	0,9994141	1
FR7635903808	GD445841	WG6984828-MSA7_F02	23/01/2023	24/01/2023	0,9993806	1
FR7635903799	GD445840	WG6984828-MSA7_G02	23/01/2023	24/01/2023	0,9993974	1
FR2837244240	GD478200	WG6984828-MSA7_H02	23/01/2023	24/01/2023	0,9991631	1
FR2837244224	GD478197	WG6984828-MSA7_A03	23/01/2023	24/01/2023	0,997824	1
FR2837244225	GD478198	WG6984828-MSA7_B03	23/01/2023	24/01/2023	0,999297	1

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

FR2837244163	GD478182	WG6984828-MSA7_C03	23/01/2023	24/01/2023	0,9993305	1
FR2837244186	GD478185	WG6984828-MSA7_D03	23/01/2023	24/01/2023	0,9991798	1
FR2837244237	GD478199	WG6984828-MSA7_E03	23/01/2023	24/01/2023	0,9993472	1
FR2837244242	GD478201	WG6984828-MSA7_F03	23/01/2023	24/01/2023	0,999364	1
FR2837244198	GD478190	WG6984828-MSA7_G03	23/01/2023	24/01/2023	0,9989455	1
FR2837244207	GD478192	WG6984828-MSA7_H03	23/01/2023	24/01/2023	0,9989455	1
FR2837244217	GD478195	WG6984828-MSA7_A04	23/01/2023	24/01/2023	0,9990961	0,998276
FR2837244189	GD478187	WG6984828-MSA7_B04	23/01/2023	24/01/2023	0,9992802	1
FR2837244210	GD478193	WG6984828-MSA7_C04	23/01/2023	24/01/2023	0,999364	1
FR2837244218	GD478196	WG6984828-MSA7_D04	23/01/2023	24/01/2023	0,9993806	1
FR2837244216	GD478194	WG6984828-MSA7_E04	23/01/2023	24/01/2023	0,9992635	1
FR2837244169	GD478183	WG6984828-MSA7_F04	23/01/2023	24/01/2023	0,9993137	1
FR2837244194	GD478189	WG6984828-MSA7_G04	23/01/2023	24/01/2023	0,9993472	1
FR2837244191	GD478188	WG6984828-MSA7_H04	23/01/2023	24/01/2023	0,9988785	1
FR2837244187	GD478186	WG6984828-MSA7_A05	23/01/2023	24/01/2023	0,999297	1
FR2837244180	GD478184	WG6984828-MSA7_B05	23/01/2023	24/01/2023	0,9993974	1
FR2837244203	GD478191	WG6984828-MSA7_C05	23/01/2023	24/01/2023	0,9992635	1
FR1448011918	GD478180	WG6984828-MSA7_D05	23/01/2023	24/01/2023	0,9992635	1
FR1448011914	GD478178	WG6984828-MSA7_E05	23/01/2023	24/01/2023	0,9990793	1
FR1448011916	GD478179	WG6984828-MSA7_F05	23/01/2023	24/01/2023	0,9989455	1
FR7635903746	GD478128	WG6984828-MSA7_G05	23/01/2023	24/01/2023	0,9990793	1
FR7635903745	GD478127	WG6984828-MSA7_H05	23/01/2023	24/01/2023	0,9991631	1
FR7635903734	GD478124	WG6984828-MSA7_A06	23/01/2023	24/01/2023	0,9992133	1
FR7635903751	GD478129	WG6984828-MSA7_B06	23/01/2023	24/01/2023	0,9993806	1
FR7635903752	GD478130	WG6984828-MSA7_C06	23/01/2023	24/01/2023	0,9995313	1
FR7635903759	GD478131	WG6984828-MSA7_D06	23/01/2023	24/01/2023	0,9994978	1
FR7635903740	GD478125	WG6984828-MSA7_E06	23/01/2023	24/01/2023	0,99923	1
FR7635903743	GD478126	WG6984828-MSA7_F06	23/01/2023	24/01/2023	0,9994644	1

	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

FR7635903733	GD478123	WG6984828-MSA7_G06	23/01/2023	24/01/2023	0,998979	1
FR7635903762	GD478132	WG6984828-MSA7_H06	23/01/2023	24/01/2023	0,9987446	1
FR7635903731	GD478122	WG6984828-MSA7_A07	23/01/2023	24/01/2023	0,9990292	1
FR4243557197	GD448216	WG6984828-MSA7_B07	23/01/2023	24/01/2023	0,9975394	0,998276
FR4243454489	GD430381	WG6984828-MSA7_C07	23/01/2023	24/01/2023	0,998912	1
FR4243454488	GD430379	WG6984828-MSA7_D07	23/01/2023	24/01/2023	0,9991965	0,998276
FR4243454492	GD430385	WG6984828-MSA7_E07	23/01/2023	24/01/2023	0,9988618	1
FR4322261259	GD430395	WG6984828-MSA7_F07	23/01/2023	24/01/2023	0,9977235	1
FR4243454490	GD430383	WG6984828-MSA7_G07	23/01/2023	24/01/2023	0,9978575	0,994828
FR4322261268	GD430401	WG6984828-MSA7_H07	23/01/2023	24/01/2023	0,9989622	1
FR4243528147	GD430391	WG6984828-MSA7_A08	23/01/2023	24/01/2023	0,9991128	1
FR4322261261	GD430399	WG6984828-MSA7_B08	23/01/2023	24/01/2023	0,9982927	0,998276
FR4322261260	GD430397	WG6984828-MSA7_C08	23/01/2023	24/01/2023	0,9985102	1
FR4243557184	GD448215	WG6984828-MSA7_D08	23/01/2023	24/01/2023	0,9985772	1
FR4243528149	GD430393	WG6984828-MSA7_E08	23/01/2023	24/01/2023	0,9991296	1
FR4243526870	GD430389	WG6984828-MSA7_F08	23/01/2023	24/01/2023	0,9988952	1
FR4243526868	GD430387	WG6984828-MSA7_G08	23/01/2023	24/01/2023	0,9986107	1
FR4243485576	GD448224	WG6984828-MSA7_H08	23/01/2023	24/01/2023	0,9965184	0,996552
FR4243485574	GD448222	WG6984828-MSA7_A09	23/01/2023	24/01/2023	0,9986777	0,998276
FR4243485575	GD448223	WG6984828-MSA7_B09	23/01/2023	24/01/2023	0,9988283	0,998276
FR4243485567	GD448217	WG6984828-MSA7_C09	23/01/2023	24/01/2023	0,9987446	1
FR4243485580	GD448228	WG6984828-MSA7_D09	23/01/2023	24/01/2023	0,9991965	1
FR4243485572	GD448220	WG6984828-MSA7_E09	23/01/2023	24/01/2023	0,9980081	0,996552
FR4243485570	GD448218	WG6984828-MSA7_F09	23/01/2023	24/01/2023	0,9979411	1
FR4243485571	GD448219	WG6984828-MSA7_G09	23/01/2023	24/01/2023	0,9974223	0,998276
FR5945462281	GD477766	WG6984828-MSA7_H09	23/01/2023	24/01/2023	0,9974055	1
FR5945462289	GD477782	WG6984828-MSA7_A10	23/01/2023	24/01/2023	0,9990459	1
FR5945462277	GD477760	WG6984828-MSA7_B10	23/01/2023	24/01/2023	0,9984768	1


	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

FR5945462298	GD477800	WG6984828-MSA7_C10	23/01/2023	24/01/2023	0,9983429	1
FR5945462303	GD477808	WG6984828-MSA7_D10	23/01/2023	24/01/2023	0,9979746	0,998276
FR5945462417	GD477789	WG6984828-MSA7_E10	23/01/2023	24/01/2023	0,9991296	1
FR5945462293	GD477790	WG6984828-MSA7_F10	23/01/2023	24/01/2023	0,9983261	0,996552
FR5945462299	GD477802	WG6984828-MSA7_G10	23/01/2023	24/01/2023	0,9979579	0,996552
FR5945462416	GD477787	WG6984828-MSA7_H10	23/01/2023	24/01/2023	0,9975394	0,998276
FR5945462296	GD477796	WG6984828-MSA7_A11	23/01/2023	24/01/2023	0,9980248	0,996552
FR5945462415	GD477785	WG6984828-MSA7_B11	23/01/2023	24/01/2023	0,9989287	1
FR5946022959	GD477706	WG6984828-MSA7_C11	23/01/2023	24/01/2023	0,9992802	1
FR5946022955	GD477702	WG6984828-MSA7_D11	23/01/2023	24/01/2023	0,9994644	1
FR5946023041	GD477739	WG6984828-MSA7_E11	23/01/2023	24/01/2023	0,9993974	1
FR5945462297	GD477798	WG6984828-MSA7_F11	23/01/2023	24/01/2023	0,997439	1
FR5945462283	GD477770	WG6984828-MSA7_G11	23/01/2023	24/01/2023	0,9976901	0,998276
FR5945462411	GD477810	WG6984828-MSA7_H11	23/01/2023	24/01/2023	0,9977068	1
FR5368482401	GD444224	WG6984828-MSA7_A12	23/01/2023	24/01/2023	0,9985437	0,998276
FR4243097168	GD448230	WG6984828-MSA7_B12	23/01/2023	24/01/2023	0,9994811	1
FR2940335133	GD301466	WG6984828-MSA7_C12	23/01/2023	24/01/2023	0,9996652	1
FR7613948192	GD478264	WG6984828-MSA7_D12	23/01/2023	24/01/2023	0,9995481	1
FR5942124572	GD466882	WG6984828-MSA7_E12	23/01/2023	24/01/2023	0,9972047	0,998276
FR5942124590	GD466887	WG6984828-MSA7_F12	23/01/2023	24/01/2023	0,9977403	1
FR5942124591	GD466888	WG6984828-MSA7_G12	23/01/2023	24/01/2023	0,995514	1
FR5945201044	LAFSCOL5 03523	WG6984828-MSA7_H12	23/01/2023	24/01/2023	0,9990124	1

L'ultime essai réalisé en condition dites réelles sur la plateforme GD Scan et avec notre propre appareil est validé avec 98,95% d'extraction validés par un dosage picogreen et 100% de ces mêmes échantillons validés en génotypage avec un call rate > 0,99%

11. Analyse

11.1. Facteurs de risques

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Matériel : *panne, casse de la tête aimantée*

Matière : *prélèvements de sang de mauvaise qualité (mal conservés avant transmission au laboratoire, coagulés, noir, ...).*

Méthode : RAS

Milieu : *coupure de courant*

Main d'œuvre : *non respect des modes opératoires, mauvaise gestion/conservation de réactifs, utilisation d'un mauvais programme.*

11.2. Incertitudes

La notion d'incertitude ne s'applique qu'à la seule méthode de dosage de la concentration d'ADN. A l'issue du dosage, l'incertitude de mesure, qui dépend directement du coefficient de détermination r^2 associé à la réalisation de la gamme étalon, est vérifiée. Nous avons fixé un seuil d'écart toléré à 0,99, ainsi r^2 doit être supérieur à 0,99 afin de valider la mesure, ce qui est le cas dans notre essai.

11.3. Robustesse

Non vérifiée.

11.4. Conclusion

La méthode d'extraction d'ADN par billes paramagnétiques à partir de sang, répond aux critères de performance attendus et met en évidence l'obtention de résultats qualitativement satisfaisants.


Comme envisagé, nous parvenons à atteindre une réduction conséquente des coûts engendrés par rapport à la méthode d'extraction sur colonne de silice. En tenant compte:

- D'une primo négociation sur le tarif de billes magnétiques (remise consentie de 27 %)
- De la mise au point d'un protocole permettant une diminution significative de la consommation des réactifs.
- D'une charge portée par les réactifs actuels (membrane de silice) de 1,29 € H.T. par point contre : 0,62 € H.T. sur billes paramagnétiques (incluant l'achat de 2 réactifs complémentaires).


Estimation coût plastique:

Extraction sur colonne de silice: plaque de lyse 0,034 €, pointes 0,08 €, plaque élution/caps 0,23 € soit 0,34 € par point

Extraction par billes magnétiques: deepwell 0,20 €, peigne 0,028 €, pointes 0,064 €, plaque élution 0,023 €, film autocollant 0,003 € soit 0,32 € par point

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

Au final, le gain financier apporté par ce changement de méthode d'extraction s'élève à 0,69 € H.T. par point d'extraction, ce gain est légèrement supérieur à l'objectif fixé de 0,65 € H.T. ce qui valide l'opération.

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT

12. Sélection, vérification et validation de méthode

Partie réservée au Directeur Recherche et Développement

Référence du présent enregistrement de validation de méthode :

GDB_FORM_53_Validation de méthode_Extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de sang_221115_01_v1.0

Intitulé de la méthode : *Extraction d'ADN sur billes magnétiques à partir de sang*

Référence de l'essai sélectionné : *Essai 5*

Vérification de la méthode :

☒ **approuvée** (enregistrements produits suffisants - critères de performance atteints et conformes aux exigences du client)

☐ **non approuvée**

Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe Audebert

Date : 27/01/2023

Visa :

Validation de la méthode :

Conditions

Domaine d'application : *extraction ADN*

Ressources humaines :

- *personnel autorisé : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN sous condition de formation*
- *personnel formateur : Sophie Merlin*
- *personnel à former/habiller : personnel de la plateforme GD Scan habilité à l'extraction d'ADN*
- *autre : à préciser*

Autres conditions : *Information au client*

Aptitude à l'emploi :

☒ **accordée**, mise en application à compter du : 27/01/2023


☐ **non accordée**, commentaires :

Signature Directeur Recherche et Développement :

Nom : Christophe AUDEBERT

Date : 27/01/2023

Visa :

 GD Biotech AGRI-AGRO SOLUTIONS	Validation de méthode	Version 1.0
GDB_FORM_53	SMQ	07/02/2023
Rédaction : L. LIETAR	Vérification : K. LE ROUX, P. BOUVELLE	Approbation : C. AUDEBERT