

Marzo de 2015

Manual uso del PyroMark[®] Q24 Control Oligo

Versión 1



Para la comprobación de la instalación del sistema PyroMark Q24 MDx.

Para uso diagnóstico *in vitro*



979303



1057421ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2

MAT

1057421ES



Sample & Assay Technologies

QIAGEN: Tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular, que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito, desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos con ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular.

Nuestra misión es ayudarlo a superar sus retos y a alcanzar el éxito. Si desea más información, visite www.qiagen.com.

Contenido

Contenido del kit	4
Símbolos	4
Conservación	5
Uso previsto	5
Limitaciones de uso del producto	5
Control de calidad	6
Asistencia técnica	6
Advertencias y precauciones	6
Introducción	7
Principio y procedimiento	7
Descripción de los protocolos	7
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	9
Protocolo: Verificación del funcionamiento del PyroMark Q24 MDx	10
Protocolo: Verificación del funcionamiento del sistema PyroMark Q24 MDx	15
Protocolo: Procedimiento para la resolución de problemas	23
Guía de resolución de problemas	31
Valoración de la calidad	31
Resultados de cuantificación	36
Alturas de picos mononucleotídicos	37
Señal de fondo	41
Diferencia en las alturas de los picos con y sin preparación de las muestras	41
Apéndice A: Preparación de la estación de vacío PyroMark Q24 MDx	43
Apéndice B: Vaciado del recipiente de desechos y de los recipientes	45
Bibliografía	47
Información para pedidos	48

Contenido del kit

PyroMark Q24 Control Oligo		
Referencia	979303	
Control Oligo 20 μM	50 μl	
Tampón de dilución 10x	2 x 1,7 ml	
Manual		1

Símbolos



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Número de referencia



Número de lote



Número de material



Componentes



Contiene



Número



Hidróxido de sodio



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante legal



Consultar la información proporcionada en el manual



Nota importante

Conservación

El PyroMark Q24 Control Oligo debe conservarse de -30 °C a -15 °C tras su recepción. Deben evitarse ciclos repetidos de descongelación y congelación (> 5 al año). El producto es estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en estas condiciones.

Uso previsto

El PyroMark Q24 Control Oligo ha sido desarrollado para verificar la correcta instalación del sistema PyroMark Q24 MDx en aplicaciones de Pyrosequencing® (pirosecuenciación) para diagnóstico *in vitro*.

Limitaciones de uso del producto

Para uso médico en diagnóstico *in vitro*, el sistema PyroMark Q24 MDx solo puede ser utilizado por:

- Personal que haya recibido una formación y una preparación especiales en relación con procedimientos en los que se utilizan productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*
- Laboratorios de análisis médicos acreditados

Todas las operaciones deben realizarse conforme a las instrucciones del sistema PyroMark Q24 MDx, de acuerdo con las indicaciones de los mensajes de diálogo que aparecen en la pantalla del PyroMark Q24 MDx, los manuales del usuario asociados, las guías y el Servicio Técnico de QIAGEN, dentro de los límites establecidos por las especificaciones técnicas.

No se incluyen en el producto los materiales para la preparación de las muestras antes del análisis de pirosecuenciación.

El producto está destinado exclusivamente a utilizarse en el sistema PyroMark Q24 MDx.

Para obtener resultados óptimos es necesario un cumplimiento estricto del manual del usuario del instrumento y de este manual. No se recomienda diluir los reactivos salvo tal como se describe en este manual, ya que se producirá una pérdida de rendimiento.

Debe prestarse atención a las fechas de caducidad y a las condiciones de conservación que aparecen impresas en la caja y en las etiquetas de todos los

componentes. No utilice componentes caducados o incorrectamente conservados.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de PyroMark Q24 Control Oligo se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Los resultados obtenidos con el sistema PyroMark Q24 MDx deben interpretarse dentro del contexto de todos los hallazgos clínicos y de laboratorio relevantes.

Asistencia técnica

En QIAGEN nos enorgullecemos de la calidad y de la disponibilidad de nuestro Servicio Técnico. Nuestros departamentos de Servicio Técnico cuentan con científicos expertos con amplia experiencia en los aspectos prácticos y teóricos de las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular y en el uso de los productos de QIAGEN®. Si tiene dudas o experimenta dificultades con el PyroMark Q24 Control Oligo o con los productos de QIAGEN en general, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

Los clientes de QIAGEN son una importante fuente de información sobre los usos avanzados o especializados de nuestros productos. Esta información es de utilidad para otros científicos además de para los investigadores de QIAGEN. Por este motivo, lo animamos a ponerse en contacto con nosotros si tiene cualquier sugerencia sobre el rendimiento de nuestros productos o sobre nuevas aplicaciones y técnicas.

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de Servicio Técnico (Technical Support Center) en www.qiagen.com/Support o póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos de Servicio Técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Advertencias y precauciones

Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea más información, consulte las fichas de datos de seguridad (*safety data sheets*, SDS) correspondientes. Estas fichas se pueden consultar en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, visualizar e imprimir la ficha correspondiente a cada kit y a cada componente del kit de QIAGEN.

Introducción

El PyroMark Q24 Control Oligo permite verificar la correcta instalación del sistema PyroMark Q24 MDx. Además, se puede utilizar en la resolución de problemas para determinar si un resultado inesperado está relacionado con el instrumento, con la estación de vacío PyroMark Q24 MDx o con el ensayo.

Principio y procedimiento

El PyroMark Q24 Control Oligo contiene un oligonucleótido biotinilado que permite al usuario verificar que el PyroMark Q24 MDx y la estación de vacío PyroMark Q24 MDx funcionan correctamente.

En condiciones definidas, el oligonucleótido firma una estructura de horquilla interna. Esta estructura permite el autocebado del oligonucleótido para extensión por la acción de la ADN-polimerasa y elimina la necesidad de un cebador de secuenciación en la reacción de pirosecuenciación. La región secuenciada incluye bases individuales de todos los nucleótidos, homopolímeros de dos y tres bases, y una base inestable/degenerada. El software analiza automáticamente esta posición variable y presenta los resultados como % de C y % de T. En la figura 1 se muestra la estructura del oligonucleótido.

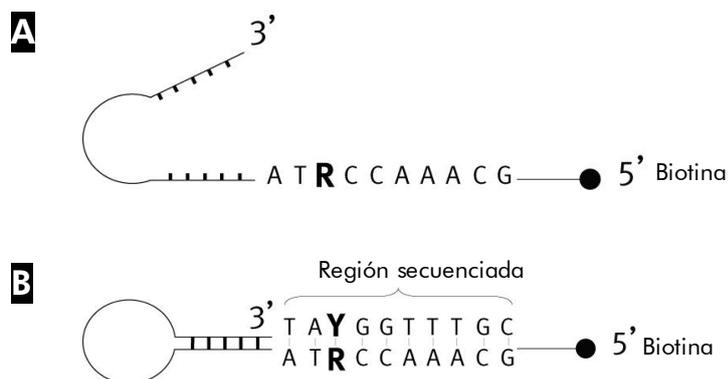


Figura 1. Estructura del PyroMark Q24 Control Oligo. **A** Estructura abierta del oligonucleótido. **B** Estructura autocebada del oligonucleótido, en la que se indica la secuencia analizada.

Descripción de los protocolos

Se recomienda realizar dos series analíticas para verificar la correcta instalación del sistema PyroMark Q24 MDx.

Funcionamiento del PyroMark Q24 MDx

Para verificar el correcto funcionamiento del PyroMark Q24 MDx, siga el procedimiento "Protocolo: Verificación del funcionamiento del PyroMark Q24 MDx", página 10. El PyroMark Q24 Control Oligo se agrega directamente a la

placa PyroMark Q24 **sin** preparación previa en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx.

Funcionamiento del sistema PyroMark Q24 MDx

Para verificar el correcto funcionamiento de todo el sistema PyroMark Q24 MDx, siga el procedimiento "Protocolo: Verificación del funcionamiento del sistema PyroMark Q24 MDx", página 15. El PyroMark Q24 Control Oligo se prepara utilizando la estación de vacío PyroMark Q24 MDx antes de su análisis en el PyroMark Q24 MDx.

Resolución de problemas del sistema PyroMark Q24 MDx

Para realizar una resolución de problemas de todo el sistema, siga el procedimiento "Protocolo: Procedimiento para la resolución de problemas", página 23. Se realiza una reacción de pirosecuenciación con 8 pocillos que contienen el PyroMark Q24 Control Oligo y 8 pocillos que contienen el PyroMark Q24 Control Oligo preparado en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS) correspondientes, que pueden solicitarse al proveedor del producto.

- Pipetas (ajustables)*
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Streptavidin-Sepharose® High Performance (GE Healthcare, ref. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 MDx (ref. 9001513)*†
- Software PyroMark Q24 MDx (ref. 9019063)†
- Placa PyroMark Q24 (ref. 979301)†
- Cartucho PyroMark Q24 (ref. 979302)†
- Estación de vacío PyroMark Q24 MDx (ref. 9001515 ó 9001517)*†
- Reactivos PyroMark Gold Q24 (ref. 971802)†
- Tampón de unión PyroMark (ref. 979306)†
- Solución desnaturalizante PyroMark (ref. 979307)†
- Tampón de lavado PyroMark, concentrado (ref. 979308)†
- Tampón de *annealing* PyroMark (ref. 979309)†
- Mezclador de placa* para inmovilización sobre microesferas
- Bloque calefactor* capaz de alcanzar temperaturas de 80 °C
- Placa o tiras de PCR de 24 pocillos
- Tapas de tiras
- Tubos de 1,5 ml o 2 ml para microcentrifugadora para la dilución del PyroMark Q24 Control Oligo
- Agua ultrapura (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm o equivalente)
- Etanol (70%)

* Asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

† Marcado CE-IVD conforme a la Directiva 98/79/CE de la Unión Europea. Los demás productos citados no tienen el marcado CE-IVD conforme a la Directiva 98/79/CE de la Unión Europea.

Protocolo: Verificación del funcionamiento del PyroMark Q24 MDx

Este protocolo describe cómo utilizar el PyroMark Q24 Control Oligo únicamente para verificar el funcionamiento del PyroMark Q24 MDx. Para verificar el funcionamiento de todo el sistema PyroMark Q24 MDx, incluida la estación de vacío PyroMark Q24 MDx, consulte "Protocolo: Verificación del funcionamiento del sistema PyroMark Q24 MDx", página 15.

Cuestión importante antes de comenzar

- Si desea más información acerca de cómo crear una configuración de ensayo y una configuración de serie analítica, consulte el "Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx".

Antes de comenzar

- Siga las instrucciones del "Guía de usuario del software PyroMark Q24" para instalar el sistema PyroMark Q24 MDx.
- Es necesario diluir el tampón de dilución suministrado con el PyroMark Q24 Control Oligo antes de su uso. Prepare tampón de dilución 1x mezclando 200 µl de tampón de dilución 10x con 1800 µl de agua ultrapura.
- Coloque el portaplaquetas PyroMark Q24 en un bloque calefactor a 80 °C para utilizarlo en el paso 11.

Procedimiento

1. **Configure un ensayo para el PyroMark Q24 Control Oligo utilizando el software PyroMark Q24 MDx.**
2. **Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione "New AQ Assay" (Nuevo ensayo AQ).**
3. **Escriba la siguiente secuencia en "Sequence to Analyze" (Secuencia para analizar): TAYGGTTTGC**

 Si desea más información acerca de cómo crear un archivo de configuración de ensayo, consulte la "Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx".

4. **Haga clic en el icono "Generate Dispensation Order" (Generar orden de dispensación) para obtener el siguiente orden de dispensación de nucleótidos: CTGACTGTG**

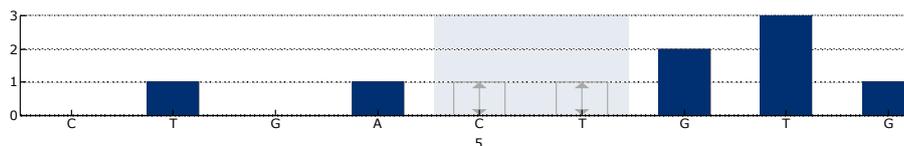


Figura 2. Histograma para el modo AQ. La primera y la tercera adición de nucleótidos son dispensaciones en blanco que sirven como controles negativos. La quinta y la sexta dispensación analizan la posición variable (base inestable/degenerada).

5. Haga clic en  en la barra de herramientas para guardar el ensayo.
6. Cree una configuración de serie analítica importando los parámetros del ensayo a los 24 pocillos.

Para agregar un ensayo a un pocillo, puede realizar uno de los procedimientos indicados a continuación:

- Haga clic con el botón secundario del ratón en el pocillo y seleccione "Load Assay" (Cargar ensayo) en el menú contextual.
- Seleccione el ensayo en el explorador de accesos directos y haga clic en el ensayo y arrástrelo al pocillo.

Los pocillos se identificarán mediante colores según el ensayo cargado en el pocillo.



Si desea más información acerca de cómo crear un archivo de configuración de serie analítica, consulte la "Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx".

7. Guarde la configuración de serie analítica en una unidad de memoria USB (suministrada con el sistema PyroMark Q24 MDx).
8. Imprima una lista de los volúmenes necesarios de mezcla enzimática, mezcla de sustrato y nucleótidos y la configuración de la placa. Seleccione "Pre Run Information" (Información previa de la serie analítica) en el menú "Tools" (Herramientas) y, cuando aparezca el informe, haga clic en .
9. Diluya el PyroMark Q24 Control Oligo hasta 0,04 μM tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Dilución del PyroMark Q24 Control Oligo

Componente	Volumen	Concentración
PyroMark Q24 Control Oligo	10 μ l	20 μ M
Tampón de dilución 1x*	90 μ l	–
Primera dilución seriada	100 μl	2 μM
Primera dilución seriada (de la anterior)	30 μ l	2 μ M
Tampón de dilución 1x*	1470 μ l	–
Dilución final	1500 μl	0,04 μM

* Asegúrese de que se haya diluido el tampón de dilución 10x suministrado con el PyroMark Q24 Control Oligo con agua ultrapura antes de su uso. Consulte “Antes de comenzar”, página 10.

- 10. Agregue 25 μ l del PyroMark Q24 Control Oligo diluido (0,04 μ M) a cada pocillo de una placa PyroMark Q24.**
- 11. Caliente la placa PyroMark Q24 con los PyroMark Q24 Oligos a 80 °C durante 2 min utilizando un bloque calefactor y el portaplacas PyroMark Q24 precalentado.**
- 12. Extraiga la placa PyroMark Q24 del portaplaca y deje enfriar las muestras hasta la temperatura ambiente (15–25 °C) durante al menos 5 min.**
- 13. Cargue el cartucho PyroMark Q24 con los volúmenes apropiados de reactivos PyroMark Gold Q24, indicados en el informe “Pre Run Information” generado en el paso 8.**
El informe “Pre Run Information”, al que puede accederse desde el menú “Tools” en la configuración de la serie analítica (consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”), proporciona información sobre los volúmenes de nucleótidos, mezcla enzimática y mezcla de sustrato necesarios para el ensayo.
- 14. Abra la tapa del compartimento del cartucho e inserte el cartucho PyroMark Q24 relleno con la etiqueta orientada hacia fuera. Introdúzcalo totalmente y, a continuación, empújelo hacia abajo.**
- 15. Asegúrese de que está visible la línea de la parte anterior del cartucho y cierre la tapa del compartimento.**
- 16. Abra el marco de sujeción de la placa y coloque la placa en el bloque calefactor.**
- 17. Cierre el marco de sujeción de la placa y la tapa del instrumento.**

18. Inserte la unidad de memoria USB (que contiene el archivo de serie analítica) en el puerto USB ubicado en la parte frontal del instrumento.

i No extraiga la unidad de memoria USB antes de que la serie analítica haya finalizado.

19. Seleccione "Run" (Serie analítica) en el menú principal (utilizando los botones de pantalla \blacktriangle y \blacktriangledown) y pulse "OK" (Aceptar).

20. Seleccione el archivo de serie analítica con los botones de pantalla \blacktriangle y \blacktriangledown .

i Para ver el contenido de una carpeta, seleccione la carpeta y pulse "Select" (Seleccionar). Para volver a la vista anterior, pulse "Back" (Atrás).

21. Cuando esté seleccionado el archivo, pulse "Select" para iniciar la serie analítica.

22. Cuando haya finalizado la serie analítica y el instrumento confirme que se ha guardado el archivo de serie analítica en la unidad de memoria USB, pulse "Close" (Cerrar).

23. Extraiga la unidad de memoria USB.

24. Abra la tapa del instrumento.

25. Abra la tapa del compartimento del cartucho y extraiga el cartucho PyroMark Q24 elevándolo y sacándolo.

26. Cierre la tapa del compartimento.

27. Abra el marco de sujeción de la placa y extraiga la placa PyroMark Q24 del bloque calefactor.

28. Cierre el marco de sujeción de la placa y la tapa del instrumento.

29. Deseche la placa PyroMark Q24 y limpie el cartucho PyroMark Q24 (consulte el *Manual de uso de los reactivos PyroMark Gold Q24*).

30. Abra la serie analítica en el software PyroMark Q24 MDx y analice todos los pocillos. El patrón de picos de la serie analítica 1 debería tener un aspecto similar al mostrado en la figura 3.

i Para obtener los valores de altura del pico, seleccione "Export Peak Heights" (Exportar alturas de picos) en el menú "Tools". Guarde los datos en un formato apropiado (*.csv o *.tsv). Abra este archivo en Microsoft® Excel (texto delimitado) y calcule la altura de pico mononucleotídico media para cada pocillo tal como se describe a continuación.

■ **Realice una evaluación de la calidad.**

Todos los pocillos deberían recibir una valoración de calidad "Passed" (Aprobado), mostrada como una barra azul en el campo inferior del pocillo en la ficha "Overview" (Resumen) y con la indicación del

porcentaje de C en un rectángulo azul en el pirograma (Pyrogram®). Si la valoración de la calidad es "Check" (Comprobar) o "Failed" (Fallido), consulte el área "Well Information" (Información del pocillo) para obtener una explicación.

■ **Evalúe la altura de los picos.**

La altura de pico debería ser idealmente 75 ± 20 RLU.

ⓘ Si los valores se encuentran dentro de los límites definidos, el sistema está instalado correctamente. Si los resultados no son los anteriormente indicados, consulte "Guía de resolución de problemas", página 31, para ver los posibles motivos del fallo y repita la serie analítica 1. Si falla la repetición de la serie 1, consulte nuestro Centro de Servicio Técnico en www.qiagen.com/Support o póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos de Servicio Técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

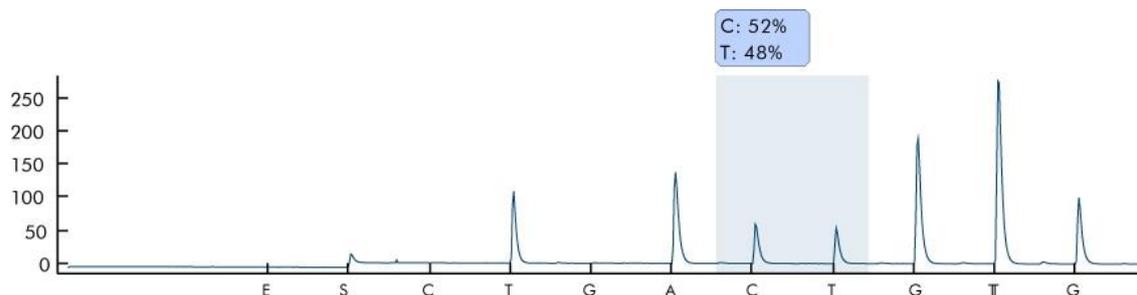


Figura 3. Pirograma de la serie analítica 1.

Protocolo: Verificación del funcionamiento del sistema PyroMark Q24 MDx

Este protocolo describe cómo utilizar el PyroMark Q24 Control Oligo para verificar la función del sistema PyroMark Q24 MDx, incluida la estación de vacío PyroMark Q24 MDx. Para verificar sólo la función del PyroMark Q24 MDx, consulte “Protocolo: Verificación del funcionamiento del PyroMark Q24 MDx”, página 10.

Cuestión importante antes de comenzar

- Si desea más información acerca de cómo crear una configuración de ensayo y una configuración de serie analítica, consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”.

Antes de comenzar

- Siga las instrucciones presentadas en el *Manual de usuario del PyroMark Q24* para instalar el sistema PyroMark Q24 MDx.
- Es necesario diluir el tampón de dilución suministrado con el PyroMark Q24 Control Oligo antes de su uso. Prepare tampón de dilución 1x mezclando 200 μ l de tampón de dilución 10x con 1800 μ l de agua ultrapura.
- Coloque el portaplacas PyroMark Q24 en un bloque calefactor a 80 °C para utilizarlo en el paso 30.
- Deje que todos los reactivos y las soluciones necesarios alcancen la temperatura ambiente (15–25 °C) antes de comenzar.

Procedimiento

1. **Configure un ensayo para el PyroMark Q24 Control Oligo utilizando el software PyroMark Q24 MDx.**
2. **Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione “New AQ Assay”.**
3. **Escriba la siguiente secuencia en “Sequence to Analyze”:**
TAYGGTTTGCA

 Si desea más información acerca de cómo crear un archivo de configuración de ensayo, consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”.

4. **Introduzca manualmente lo siguiente en “Dispensation Order” (Orden de dispensación):**
ACGTTATCGTTGC



Si desea más información acerca de cómo crear un archivo de configuración de ensayo, consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”.

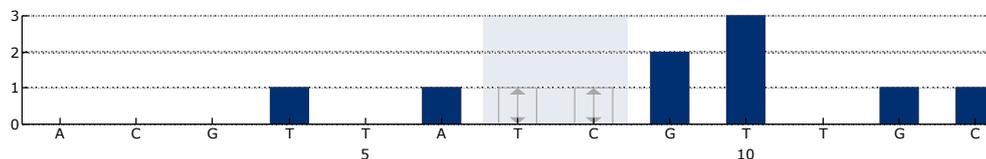


Figura 4. Histograma para el modo AQ. Las adiciones de nucleótidos 1, 2, 3, 5 y 11 son dispensaciones en blanco que sirven como controles negativos. Las dispensaciones 7 y 8 analizan la posición variable.

- Haga clic en en la barra de herramientas para guardar el ensayo.
- Cree una configuración de serie analítica importando los parámetros del ensayo a los 24 pocillos.

Para agregar un ensayo a un pocillo, puede realizar uno de los procedimientos indicados a continuación:

- Haga clic con el botón secundario del ratón en el pocillo y seleccione “Load Assay” en el menú contextual.
- Seleccione el ensayo en el explorador de accesos directos y haga clic en el ensayo y arrástrelo al pocillo.

Los pocillos se identificarán mediante colores según el ensayo cargado en el pocillo.



Si desea más información acerca de cómo crear un archivo de configuración de serie analítica, consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”.

- Guarde la configuración de serie analítica en una unidad de memoria USB (suministrada con el sistema PyroMark Q24 MDx).
- Imprima una lista de los volúmenes necesarios de mezcla enzimática, mezcla de sustrato y nucleótidos y la configuración de la placa. Seleccione “Pre Run Information” en el menú “Tools” y, cuando aparezca el informe, haga clic en .
- Agite suavemente el frasco que contiene estreptavidina-sefarosa de alto rendimiento hasta que la solución esté homogénea.
- Prepare una mezcla maestra para inmovilización del ADN según se indica en la tabla 2. Prepare un volumen un 10% mayor que el volumen necesario para el número total de reacciones que vayan a realizarse.

Tabla 2. Mezcla maestra para inmovilización del ADN

Número de muestras	1	26*
Estreptavidina-sefarosa de alto rendimiento	2 μ l	52 μ l
Tampón de unión PyroMark	40 μ l	1.040 μ l
Agua ultrapura	13 μ l	338 μ l
Volumen total	55 μl	1.430 μl

* Proporciona una cantidad suficiente para las 24 muestras necesarias.

11. Diluya el PyroMark Q24 Control Oligo hasta 0,04 μ M tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Dilución del PyroMark Q24 Control Oligo

Componente	Volumen	Concentración
PyroMark Q24 Control Oligo	10 μ l	20 μ M
Tampón de dilución 1x*	90 μ l	–
Primera dilución seriada	100 μl	2 μM
Primera dilución seriada (de la anterior)	30 μ l	2 μ M
Tampón de dilución 1x*	1470 μ l	–
Dilución final	1500 μl	0,04 μM

* Asegúrese de que se haya diluido el tampón de dilución 10x suministrado con el PyroMark Q24 Control Oligo con agua ultrapura antes de su uso. Consulte "Antes de comenzar", página 15.

12. Agite el tubo que contiene la mezcla maestra y agregue 55 μ l de la mezcla maestra y 25 μ l del PyroMark Q24 Control Oligo diluido (0,04 μ M) a los 24 pocillos de una placa o de tiras de PCR de 24 pocillos.

13. Selle la placa de PCR (o las tiras) mediante tapas de tiras.

14. Agite la placa de PCR a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 5-10 min a 1400 rpm.



Las microesferas de sefarosa sedimentan rápidamente. La captura de las microesferas debe tener lugar justo después de la agitación.

i Durante este paso, prepare la estación de vacío PyroMark Q24 MDx para la preparación de las muestras (consulte el Apéndice A, página 43).

15. Agregue 25 μ l de tampón de annealing PyroMark a cada pocillo de una placa PyroMark Q24.

i Mantenga uno de los portaplacas PyroMark Q24 (suministrados con la estación de vacío PyroMark Q24 MDx) a temperatura ambiente (15–25 °C) y utilícelo como soporte al preparar y mover la placa.

16. Coloque la placa (o las tiras) de PCR y la placa PyroMark Q24 en la mesa de trabajo de la estación de vacío PyroMark Q24 MDx (consulte la Figura 5).

i Asegúrese de que la placa tenga la misma orientación que durante la carga de las muestras.

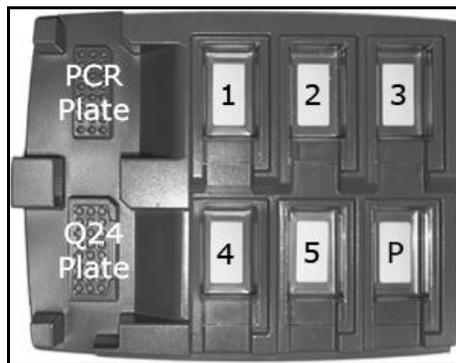


Figura 5. Colocación de la placa (o las tiras) de PCR y de la placa PyroMark Q24 en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx. Las posiciones marcadas contienen etanol al 70% (1), solución desnaturalizante PyroMark (2), tampón de lavado PyroMark (3) y agua ultrapura (4, 5). P: Posición de detención.

17. Abra el interruptor de vacío para aplicar vacío a la herramienta de vacío.

18. Descienda con cuidado las sondas de filtro a la placa (o las tiras) de PCR para capturar las microesferas que contienen el molde inmovilizado. Mantenga las sondas en posición durante 15 s. Tenga cuidado al asir la herramienta.

i Las microesferas de sefarosa sedimentan rápidamente. Si ha transcurrido más de 1 min desde la agitación de la placa (o de las tiras), vuelva a agitarla(s) durante 1 min antes de capturar las microesferas.

19. Transfiera la herramienta al recipiente que contiene etanol al 70% (recipiente 1). Enjuague las sondas de filtro durante 5 s.

20. Transfiera la herramienta al recipiente que contiene solución desnaturalizante PyroMark (recipiente 2). Enjuague las sondas de filtro durante 5 s.

21. Transfiera la herramienta al recipiente que contiene tampón de lavado PyroMark (recipiente 3). Enjuague las sondas de filtro durante 10 s.
22. Eleve la herramienta más allá de la vertical a 90° durante 5 s para drenar el líquido de las sondas de filtro (consulte la Figura 6).



Figura 6. Ilustración de la herramienta de vacío elevada más allá de la vertical a 90°.

23. Mientras mantiene la herramienta sobre la placa PyroMark Q24, cierre el interruptor de vacío de la herramienta (Off).
24. Libere las microesferas en la placa que contiene 25 μ l de tampón de *annealing* PyroMark agitando la herramienta de un lado a otro. Deje reposar las sondas de filtro en el fondo de los pocillos.
25. Transfiera la herramienta al primer recipiente que contiene agua ultrapura (recipiente 4) y agite la herramienta durante 10 s.
26. Lave las sondas de filtro bajándolas hasta introducirlas en el segundo recipiente que contiene agua ultrapura (recipiente 5) y aplicando vacío. Enjuague las sondas con 70 ml de agua ultrapura.
27. Eleve la herramienta más allá de la vertical a 90° durante 5 s para drenar el líquido de las sondas de filtro (consulte la Figura 6).
28. Cierre el interruptor de vacío de la herramienta (Off) y sitúela en la posición de detención (P).
29. Apague la bomba de vacío.

i Al final de cada día de trabajo deben desecharse los residuos líquidos y las soluciones residuales y debe comprobarse que no haya polvo ni derramamientos en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx (consulte el Apéndice B, página 45).
30. Caliente la placa PyroMark Q24 con las muestras a 80 °C durante 2 min utilizando un bloque calefactor y el portaplacas PyroMark Q24 precalentado.
31. Extraiga la placa PyroMark Q24 del portaplaca y deje enfriar las muestras hasta la temperatura ambiente (15–25 °C) durante al menos 5 min.

- 32. Cargue el cartucho PyroMark Q24 con los volúmenes apropiados de reactivos PyroMark Gold Q24, indicados en el informe "Pre Run Information" generado en el paso 8.**

El informe "Pre Run Information", al que puede accederse desde el menú "Tools" en la configuración de la serie analítica (consulte la "Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx"), proporciona información sobre los volúmenes de nucleótidos, mezcla enzimática y mezcla de sustrato necesarios para el ensayo.

- 33. Abra la tapa del compartimento del cartucho e inserte el cartucho PyroMark Q24 relleno con la etiqueta orientada hacia fuera. Introdúzcalo totalmente y, a continuación, empújelo hacia abajo.**

- 34. Asegúrese de que está visible la línea de la parte anterior del cartucho y cierre la tapa del compartimento.**

- 35. Abra el marco de sujeción de la placa y coloque la placa en el bloque calefactor.**

- 36. Cierre el marco de sujeción de la placa y la tapa del instrumento.**

- 37. Inserte la unidad de memoria USB (que contiene el archivo de serie analítica) en el puerto USB ubicado en la parte frontal del instrumento.**



No extraiga la unidad de memoria USB antes de que la serie analítica haya finalizado.

- 38. Seleccione "Run" en el menú principal (utilizando los botones de pantalla ▲ y ▼) y pulse "OK".**

- 39. Seleccione el archivo de serie analítica con los botones de pantalla ▲ y ▼.**



Para ver el contenido de una carpeta, seleccione la carpeta y pulse "Select". Para volver a la vista anterior, pulse "Back".

- 40. Cuando esté seleccionado el archivo, pulse "Select" para iniciar la serie analítica.**

- 41. Cuando la serie analítica haya finalizado y el instrumento confirme que se ha guardado el archivo en la unidad de memoria USB, pulse "Close".**

- 42. Extraiga la unidad de memoria USB.**

- 43. Abra la tapa del instrumento.**

- 44. Abra la tapa del compartimento del cartucho y extraiga el cartucho PyroMark Q24 elevándolo y sacándolo.**

- 45. Cierre la tapa del compartimento.**

- 46. Abra el marco de sujeción de la placa y extraiga la placa PyroMark Q24 del bloque calefactor.**

47. Cierre el marco de sujeción de la placa y la tapa del instrumento.
48. Deseche la placa PyroMark Q24 y limpie el cartucho PyroMark Q24 (consulte el *Manual de uso de los reactivos PyroMark Gold Q24*).
49. Abra la serie analítica en el software PyroMark Q24 MDx y analice todos los pocillos. El patrón de picos de la serie analítica 2 debería tener un aspecto similar al mostrado en la figura 7.

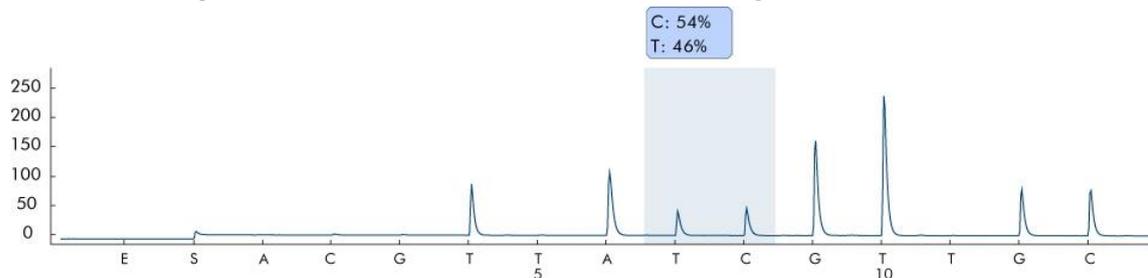


Figura 7. Pirograma de la serie analítica 2.

50. Confirme la correcta instalación del sistema y el uso de los reactivos evaluando la valoración de la calidad, los resultados de cuantificación, las alturas de los picos nucleotídicos y la señal de fondo.



Para obtener los valores de altura del pico, seleccione “Export Peak Heights” en el menú “Tools”. Guarde los datos en un formato apropiado (*.csv o *.tsv). Abra este archivo en Microsoft Excel (texto delimitado) y calcule la altura de pico mononucleotídico media y el valor de fondo para cada pocillo tal como se describe a continuación.

■ **Realice una evaluación de la calidad.**

Todos los pocillos deberían recibir una valoración de calidad “Passed” (Aprobado), mostrada como una barra azul en el campo inferior del pocillo en la ficha “Overview” (Resumen) y con la indicación del porcentaje de C en un rectángulo azul en el pirograma. Si la valoración de la calidad es “Check” o “Failed”, consulte el área “Well Information” para obtener una explicación.

■ **Evalúe los resultados de cuantificación.**

Seleccione “AQ Analysis Statistics Report” (Informe de estadísticas del análisis AQ) en el menú “Reports” (Informes). El informe presenta los resultados de cuantificación con la desviación típica. El % de C debería estar en el intervalo de 40–60%. La desviación típica no debería superar 2 unidades de porcentaje.

■ **Evalúe las alturas de picos mononucleotídicos.**

La altura de pico mononucleotídico media debería ser idealmente 75 ± 20 RLU.

$$\text{Altura de pico mononucleotídico media} = \frac{\text{Suma de picos mononucleotídicos (dispensaciones 4, 6, 12, 13)}}{4}$$

■ **Evalúe la señal de fondo.**

La señal de fondo de las dispensaciones en blanco no debería ser superior al 3%.

$$\text{Señal de fondo (\%)} = \frac{\text{Suma de los blancos (dispensaciones 1, 2, 3, 5)}}{\text{Suma de picos mononucleotídicos (dispensaciones 4, 6, 12, 13)}} \times 100$$

ⓘ Si los valores se encuentran dentro de los límites definidos, el sistema está instalado correctamente. Si los resultados no son los anteriormente indicados, consulte “Guía de resolución de problemas”, página 31, para ver las posibles causas y las acciones que deben realizarse. Si la guía de resolución de problemas no explica el problema, visite nuestro Centro de Servicio Técnico en www.qiagen.com/Support o póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos de Servicio Técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Protocolo: Procedimiento para la resolución de problemas

Si se ha obtenido un resultado inesperado, es esencial determinar si éste está relacionado con el PyroMark Q24 MDx, con la estación de vacío PyroMark Q24 MDx o con el ensayo. Este protocolo describe cómo utilizar el kit del PyroMark Q24 Control Oligo para verificar el funcionamiento del sistema PyroMark Q24 MDx, comparando los resultados con y sin la estación de vacío PyroMark Q24 MDx.

Cuestión importante antes de comenzar

- Si desea más información acerca de cómo crear una configuración de ensayo y una configuración de serie analítica, consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”.

Antes de comenzar

- Siga las instrucciones presentadas en el *Manual de usuario del PyroMark Q24* para instalar el sistema PyroMark Q24 MDx.
- Es necesario diluir el tampón de dilución suministrado con el PyroMark Q24 Control Oligo antes de su uso. Prepare tampón de dilución 1x mezclando 200 µl de tampón de dilución 10x con 1.800 µl de agua ultrapura.
- Coloque el portaplacas PyroMark Q24 en un bloque calefactor a 80 °C para utilizarlo en el paso 30.
- Deje que todos los reactivos y las soluciones necesarios alcancen la temperatura ambiente (15–25 °C) antes de comenzar.

Procedimiento

- 1. Configure un ensayo para el PyroMark Q24 Control Oligo utilizando el software PyroMark Q24 MDx.**
- 2. Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione “New AQ Assay”.**
- 3. Escriba la siguiente secuencia en “Sequence to Analyze”:**
TAYGGTTTGCA

 Si desea más información acerca de cómo crear un archivo de configuración de ensayo, consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”.

- 4. Introduzca manualmente lo siguiente en “Dispensation Order”:**
ACGTTATCGTTGC

i Si desea más información acerca de cómo crear un archivo de configuración de ensayo, consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”.

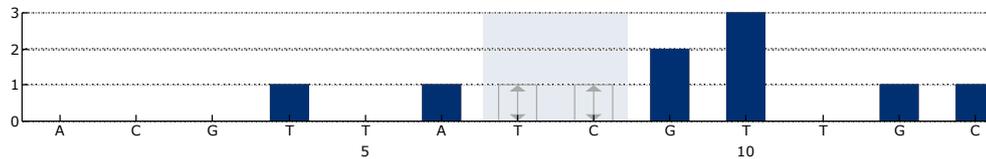


Figura 8. Histograma para el modo AQ. Las adiciones de nucleótidos 1, 2, 3, 5 y 11 son dispensaciones en blanco que sirven como controles negativos. Las dispensaciones 7 y 8 analizan la posición variable.

5. Haga clic en  en la barra de herramientas para guardar el ensayo.
6. Cree una configuración de serie analítica importando los parámetros del ensayo a los pocillos adecuados.

i Recomendamos utilizar 16 pocillos: 8 pocillos para las muestras preparadas con la estación de vacío PyroMark Q24 MDx y 8 muestras agregadas directamente a la placa PyroMark Q24.

Para agregar un ensayo a un pocillo, puede realizar uno de los procedimientos indicados a continuación:

- Haga clic con el botón secundario del ratón en el pocillo y seleccione “Load Assay” en el menú contextual.
- Seleccione el ensayo en el explorador de accesos directos y haga clic en el ensayo y arrástrelo al pocillo.
- Recomendado: Rellene los campos Sample ID (Identificación de la muestra), Plate ID (Identificación de la placa), Barcode (Código de barras), Reagent ID (Identificación del reactivo) y Run Note (Nota sobre la serie analítica).

Los pocillos se identificarán mediante colores según el ensayo cargado en el pocillo.

i Si desea más información acerca de cómo crear un archivo de configuración de serie analítica, consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”.

7. Guarde la configuración de serie analítica en una unidad de memoria USB (suministrada con el sistema PyroMark Q24 MDx).
8. Imprima una lista de los volúmenes necesarios de mezcla enzimática, mezcla de sustrato y nucleótidos y la configuración de la placa. Seleccione “Pre Run Information” en el menú “Tools” y, cuando aparezca el informe, haga clic en .
9. Agite suavemente el frasco que contiene estreptavidina-sefarosa de alto rendimiento hasta que la solución esté homogénea.

10. Prepare una mezcla maestra para inmovilización del ADN según se indica en la tabla 4. Prepare un volumen un 10% mayor que el volumen necesario para el número total de reacciones que vayan a realizarse.

Tabla 4. Mezcla maestra para inmovilización del ADN.

Número de muestras	1	9*
Estreptavidina-sefarosa de alto rendimiento	2 μ l	18 μ l
Tampón de unión PyroMark	40 μ l	360 μ l
Agua ultrapura	13 μ l	117 μ l
Volumen total	55 μl	495 μl

* Proporciona una cantidad suficiente para las 8 muestras necesarias.

11. Diluya el PyroMark Q24 Control Oligo hasta 0,04 μ M tal como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Dilución del PyroMark Q24 Control Oligo.

Componente	Volumen	Concentración
PyroMark Q24 Control Oligo	10 μ l	20 μ M
Tampón de dilución 1x*	90 μ l	–
Primera dilución seriada	100 μl	2 μM
Primera dilución seriada (de la anterior)	30 μ l	2 μ M
Tampón de dilución 1x*	1470 μ l	–
Dilución final	1500 μl	0,04 μM

* Asegúrese de que se haya diluido el tampón de dilución 10x suministrado con el PyroMark Q24 Control Oligo con agua ultrapura antes de su uso. Consulte "Antes de comenzar", página 23.

12. Agite el tubo que contiene la mezcla maestra y agregue 55 μ l de la mezcla maestra y 25 μ l del PyroMark Q24 Control Oligo diluido (0,04 μ M) a 8 pocillos de una placa o de tiras de PCR de 24 pocillos.

13. Selle la placa de PCR (o las tiras) mediante tapas de tiras.

14. Agite la placa de PCR a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 5-10 min a 1400 rpm.

i Las microesferas de sefarosa sedimentan rápidamente. La captura de las microesferas debe tener lugar justo después de la agitación.

i Durante este paso, prepare la estación de vacío PyroMark Q24 MDx para la preparación de las muestras (consulte el Apéndice A, página 43).

15. Agregue 25 µl de tampón de annealing PyroMark a cada pocillo de la placa PyroMark Q24 que vaya a utilizarse con el PyroMark Q24 Control Oligo inmovilizado para su procesamiento con la estación de vacío PyroMark Q24 MDx. Agregue 25 µl del PyroMark Q24 Control Oligo diluido (0,04 µM) a otros 8 pocillos de acuerdo con la configuración de la serie analítica.

i Mantenga uno de los portaplacas PyroMark Q24 (suministrados con la estación de vacío PyroMark Q24 MDx) a temperatura ambiente (15–25 °C) y utilícelo como soporte al preparar y mover la placa.

16. Coloque la placa (o las tiras) de PCR y la placa PyroMark Q24 en la mesa de trabajo de la estación de vacío PyroMark Q24 MDx (consulte la figura 9).

i Asegúrese de que la placa tenga la misma orientación que durante la carga de las muestras.

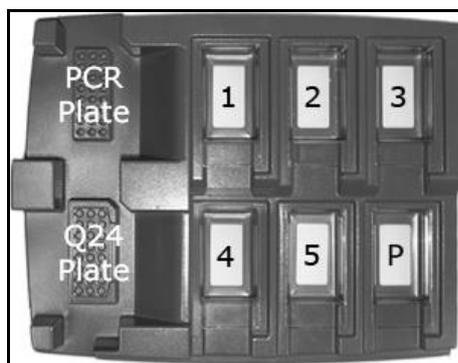


Figura 9. Colocación de la placa (o las tiras) de PCR y de la placa PyroMark Q24 en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx. Las posiciones marcadas contienen etanol al 70% (1), solución desnaturalizante PyroMark (2), tampón de lavado PyroMark (3) y agua ultrapura (4, 5). P: Posición de detención.

17. Abra el interruptor de vacío para aplicar vacío a la herramienta de preparación del vacío.

18. Descienda con cuidado las sondas de filtro a la placa (o las tiras) de PCR para capturar las microesferas que contienen el molde inmovilizado. Mantenga las sondas en posición durante 15 s. Tenga cuidado al asir la herramienta.

i Las microesferas de sefarosa sedimentan rápidamente. Si ha transcurrido más de 1 min desde la agitación de la placa (o de las tiras), vuelva a agitarla(s) durante 1 min antes de capturar las microesferas.

- 19. Transfiera la herramienta al recipiente que contiene etanol al 70% (recipiente 1). Enjuague las sondas de filtro durante 5 s.**
- 20. Transfiera la herramienta al recipiente que contiene solución desnaturalizante PyroMark (recipiente 2). Enjuague las sondas de filtro durante 5 s.**
- 21. Transfiera la herramienta al recipiente que contiene tampón de lavado PyroMark (recipiente 3). Enjuague las sondas de filtro durante 10 s.**
- 22. Eleve la herramienta más allá de la vertical a 90° durante 5 s para drenar el líquido de las sondas de filtro (consulte la figura 10).**



Figura 10. Ilustración de la herramienta de vacío elevada más allá de la vertical a 90°.

- 23. Mientras mantiene la herramienta sobre la placa PyroMark Q24, cierre el interruptor de vacío de la herramienta (Off).**
- 24. Libere las microesferas en la placa que contiene 25 μ l de tampón de *annealing* PyroMark agitando la herramienta de un lado a otro. Deje reposar las sondas de filtro en el fondo de los pocillos.**
- 25. Transfiera la herramienta al primer recipiente que contiene agua ultrapura (recipiente 4) y agite la herramienta durante 10 s.**
- 26. Lave las sondas de filtro bajándolas hasta introducirlas en el segundo recipiente que contiene agua ultrapura (recipiente 5) y aplicando vacío. Enjuague las sondas con 70 ml de agua ultrapura.**
- 27. Eleve la herramienta más allá de la vertical a 90° durante 5 s para drenar el líquido de las sondas de filtro (consulte la figura 10).**
- 28. Cierre el interruptor de vacío de la herramienta (Off) y sitúela en la posición de detención (P).**
- 29. Apague la bomba de vacío.**

i Al final de cada día de trabajo deben desecharse los residuos líquidos y las soluciones residuales y debe comprobarse que no haya polvo ni derramamientos en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx (consulte el Apéndice B, página 45).

30. Caliente la placa PyroMark Q24 con las muestras a 80 °C durante 2 min utilizando un bloque calefactor y el portaplacas PyroMark Q24 precalentado.

31. Extraiga la placa PyroMark Q24 del portaplaca y deje enfriar las muestras hasta la temperatura ambiente (15–25 °C) durante al menos 5 min.

32. Cargue el cartucho PyroMark Q24 con los volúmenes apropiados de reactivos PyroMark Gold Q24, indicados en el informe “Pre Run Information” generado en el paso 8.

El informe “Pre Run Information”, al que puede accederse desde el menú “Tools” en la configuración de la serie analítica (consulte la “Guía de usuario del software PyroMark Q24 MDx”), proporciona información sobre los volúmenes de nucleótidos, mezcla enzimática y mezcla de sustrato necesarios para el ensayo.

33. Abra la tapa del compartimento del cartucho e inserte el cartucho PyroMark Q24 relleno con la etiqueta orientada hacia fuera. Introdúzcalo totalmente y, a continuación, empújelo hacia abajo.

34. Asegúrese de que está visible la línea de la parte anterior del cartucho y cierre la tapa del compartimento.

35. Abra el marco de sujeción de la placa y coloque la placa en el bloque calefactor.

36. Cierre el marco de sujeción de la placa y la tapa del instrumento.

37. Inserte la unidad de memoria USB (que contiene el archivo de serie analítica) en el puerto USB ubicado en la parte frontal del instrumento.

i No extraiga la unidad de memoria USB antes de que la serie analítica haya finalizado.

38. Seleccione “Run” en el menú principal (utilizando los botones de pantalla ▲ y ▼) y pulse “OK”.

39. Seleccione el archivo con los botones de pantalla ▲ y ▼.

i Para ver el contenido de una carpeta, seleccione la carpeta y pulse “Select”. Para volver a la vista anterior, pulse “Back”.

40. Cuando esté seleccionado el archivo, pulse “Select” para iniciar la serie analítica.

41. Cuando haya finalizado la serie analítica y el instrumento confirme que se ha guardado el archivo de serie analítica en la unidad de memoria USB, pulse "Close".
42. Extraiga la unidad de memoria USB.
43. Abra la tapa del instrumento.
44. Abra la tapa del compartimento del cartucho y extraiga el cartucho PyroMark Q24 elevándolo y sacándolo.
45. Cierre la tapa del compartimento.
46. Abra el marco de sujeción de la placa y extraiga la placa PyroMark Q24 del bloque calefactor.
47. Cierre el marco de sujeción de la placa y la tapa del instrumento.
48. Deseche la placa PyroMark Q24 y limpie el cartucho PyroMark Q24 (consulte el *Manual de uso de los reactivos PyroMark Gold Q24*).
49. Abra la serie analítica en el software PyroMark Q24 MDx y analice todos los pocillos. El patrón de picos debería tener un aspecto similar al mostrado en la figura 11.

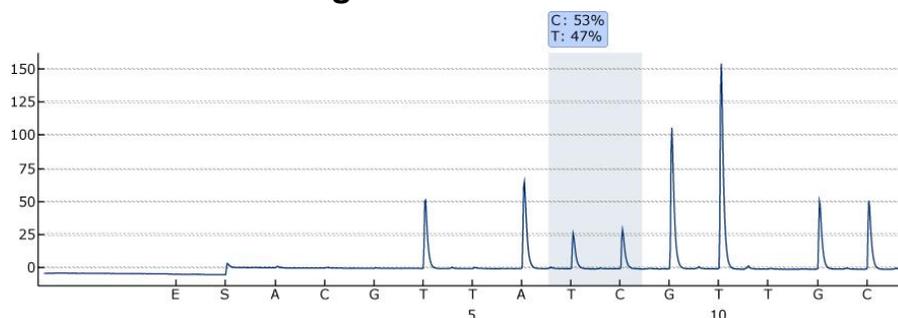


Figura 11. Pirograma de la serie analítica 3.

50. Confirme la correcta instalación del sistema y el uso de los reactivos evaluando la valoración de la calidad, los resultados de cuantificación, las alturas de los picos nucleotídicos y la señal de fondo.



Para obtener los valores de altura del pico, seleccione "Export Peak Heights" en el menú "Tools". Guarde los datos en un formato apropiado (*.csv o *.tsv). Abra este archivo en Microsoft Excel (texto delimitado) y calcule la altura de pico mononucleotídico media y el valor de fondo para cada pocillo tal como se describe a continuación.

■ **Realice una evaluación de la calidad.**

Todos los pocillos deberían recibir una valoración de calidad "Passed" (Aprobado), mostrada como una barra azul en el campo inferior del pocillo en la ficha "Overview" (Resumen) y con la indicación del porcentaje de C en un rectángulo azul en el pirograma. Si la valoración de la calidad es "Check" o "Failed", consulte el área "Well Information" para obtener una explicación.

■ **Evalúe los resultados de cuantificación.**

Seleccione "AQ Analysis Statistics Report" en el menú "Reports". El informe presenta los resultados de cuantificación con la desviación típica. El % de C debería estar en el intervalo de 40–60%. La desviación típica no debería superar 2 unidades de porcentaje.

■ **Evalúe las alturas de picos mononucleotídicos.**

La altura de pico mononucleotídico media debería ser idealmente 75 ± 20 RLU.

$$\text{Altura de pico mononucleotídico media} = \frac{\text{Suma de picos mononucleotídicos (dispensaciones 4, 6, 12, 13)}}{4}$$

■ **Evalúe la señal de fondo.**

La señal de fondo de las dispensaciones en blanco no debería ser superior al 3%.

$$\text{Señal de fondo (\%)} = \frac{\text{Suma de los blancos (dispensaciones 1, 2, 3, 5)}}{\text{Suma de picos mononucleotídicos (dispensaciones 4, 6, 12, 13)}} \times 100$$

51. Evalúe la diferencia en las alturas de los picos con y sin preparación de las muestras. La reducción de la altura de los picos entre las muestras preparadas con la estación de vacío PyroMark Q24 MDx en comparación con el PyroMark Q24 Control Oligo agregado directamente a la placa PyroMark Q24 no debería ser superior al 20%.



Si los valores se encuentran dentro de los límites definidos, el sistema está instalado correctamente. Si los resultados no son los anteriormente indicados, consulte "Guía de resolución de problemas", página 31, para ver las posibles causas y las acciones que deben realizarse. Si la guía de resolución de problemas no explica el problema, visite nuestro Centro de Servicio Técnico en www.qiagen.com/Support o póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos de Servicio Técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener más información, consulte también la página de preguntas frecuentes (*Frequently Asked Questions, FAQ*) de nuestro Centro de Servicio Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del Servicio Técnico de QIAGEN se encargarán de responder a cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).

Se incluyen secciones para cada evaluación realizada:

- Valoración de la calidad, más abajo
- Resultados de cuantificación, página 36
- Alturas de picos mononucleotídicos, página 37
- Señal de fondo, página 41
- Diferencia en las alturas de los picos con y sin preparación de las muestras, página 41

 Consulte el *Manual de usuario del PyroMark Q24* para la resolución de problemas generales del instrumento.

Valoración de la calidad

Comentarios y sugerencias

Advertencia del software por picos anchos

La concentración del PyroMark Q24 Control Oligo es demasiado alta

 Siga el protocolo relevante. Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo en el tampón de dilución tal como se describe en los protocolos.

Comentarios y sugerencias

Pico alto del sustrato

La contaminación de la muestra da lugar a un consumo inusualmente elevado de la mezcla de sustrato (se manifiesta por una señal de presecuenciación elevada)

i Cambie los tampones. Utilice únicamente tampones suministrados por QIAGEN o por distribuidores autorizados de QIAGEN.

i Utilice la función de zoom para comprobar si se ha generado algún pico (seleccione una sección del pirograma con el botón primario del ratón).

Secuencia deficiente o incorrecta

- a) El PyroMark Q24 Control Oligo no está preparado correctamente
- b) Orden de dispensación incorrecto
- c) Los tampones o los reactivos se han diluido o conservado incorrectamente
- d) Error de dispensación (observado, por ejemplo, en forma de picos divididos)

i Siga las instrucciones recogidas en los protocolos para preparar el PyroMark Q24 Control Oligo. Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo en el tampón de dilución tal como se describe en los protocolos. Asegúrese de que el tampón de dilución 10x suministrado se diluya primero hasta 1x con agua ultrapura.

i Compruebe que ha escrito la secuencia correcta en la configuración del ensayo.

i Siga las instrucciones que se suministran con los reactivos. Incluya un pocillo vacío (que contenga solo el tampón de *annealing* PyroMark) en la serie analítica para comprobar si los picos de fondo provienen de los nucleótidos.

i Limpie o sustituya el cartucho PyroMark Q24. Si el problema persiste, póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

-
- e) Cartucho PyroMark Q24 obstruido
- f) Cartucho PyroMark Q24 dañado
- g) Tiempo de *annealing* demasiado largo
- ⓘ No se dispensan correctamente los nucleótidos debido a la obstrucción de una aguja del cartucho PyroMark Q24. Limpie el cartucho PyroMark Q24 y compruebe que funciona correctamente.
- ⓘ Deseche el cartucho PyroMark Q24 conforme a la normativa medioambiental federal, estatal y local para la eliminación de residuos de laboratorio.
- ⓘ Realice el *annealing* durante el período de tiempo correcto y a las temperaturas indicadas en los protocolos.

Picos pequeños o ausentes

- a) Cantidad insuficiente de molde para inmovilización
- b) No hay suficiente mezcla enzimática o de sustrato para todos los pocillos
- c) Los pocillos marcados en la configuración de la serie analítica no concuerdan con la posición de las muestras en la placa
- d) Uno o más de los compartimentos de nucleótidos del cartucho PyroMark Q24 no está relleno correctamente con reactivos o nucleótidos
- ⓘ Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo correctamente y de utilizar las cantidades especificadas en los protocolos.
- ⓘ Rellene el cartucho PyroMark Q24 conforme a las instrucciones descritas en el informe "Pre Run Information".
- ⓘ Compruebe que ha cargado la placa PyroMark Q24 correctamente, conforme a la configuración de la serie analítica.
- ⓘ Asegúrese de que se añadan cantidades suficientes de los reactivos al cartucho PyroMark Q24. Siga las instrucciones de uso que se suministran con los productos.

Comentarios y sugerencias

- e) Error de dispensación (observado, por ejemplo, en forma de picos divididos)  Limpie o sustituya el cartucho PyroMark Q24. Si el problema persiste, póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).
- f) Cartucho PyroMark Q24 obstruido  No se dispensan correctamente los nucleótidos debido a la obstrucción de una aguja del cartucho PyroMark Q24. Limpie el cartucho PyroMark Q24 y compruebe que funciona correctamente.
-  No se dispensan correctamente las enzimas o sustratos debido a la obstrucción del cartucho PyroMark Q24 (se manifiesta por la ausencia de señal de preselección y por la ausencia de picos en el pirograma). Limpie el cartucho PyroMark Q24 y compruebe que funciona correctamente.
- g) Cartucho PyroMark Q24 dañado  Deseche el cartucho PyroMark Q24 conforme a la normativa medioambiental federal, estatal y local para la eliminación de residuos de laboratorio.
- h) Los tampones o los reactivos se han diluido o conservado incorrectamente  Siga las instrucciones que se suministran con los reactivos.
- i) Se ha iniciado el PyroMark Q24 MDx sin que se haya introducido una placa  Limpie el bloque calefactor y el sistema de lente y cable de fibra óptica conforme a las instrucciones provistas en el *Manual de usuario del PyroMark Q24*.

Comentarios y sugerencias

- i) El PyroMark Q24 Control Oligo no está preparado correctamente
- ⓘ Siga las instrucciones recogidas en los protocolos para preparar el PyroMark Q24 Control Oligo. Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo en el tampón de dilución tal como se describe en los protocolos. Asegúrese de que el tampón de dilución 10x suministrado se diluya primero hasta 1x con agua ultrapura.
- k) La contaminación de la muestra da lugar a un consumo inusualmente elevado de la mezcla de sustrato (se manifiesta por una señal de presecuenciación elevada)
- ⓘ Cambie los tampones. Utilice únicamente tampones suministrados por QIAGEN o por distribuidores autorizados de QIAGEN.
- ⓘ Utilice la función de zoom para comprobar si se ha generado algún pico (seleccione una sección del pirograma con el botón primario del ratón).

Advertencia relativa a la relación señal-ruido

Diversas

- ⓘ Consulte los puntos a) a k) del apartado "Picos pequeños o ausentes", más arriba.

Resultados de cuantificación

Comentarios y sugerencias

Secuencia deficiente o incorrecta

- a) El PyroMark Q24 Control Oligo no está preparado correctamente
- ⓘ Siga las instrucciones recogidas en los protocolos para preparar el PyroMark Q24 Control Oligo. Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo en el tampón de dilución tal como se describe en los protocolos. Asegúrese de que el tampón de dilución 10x suministrado se diluya primero hasta 1x con agua ultrapura.
- b) Secuencia para analizar u orden de dispensación incorrectos
- ⓘ Compruebe que ha escrito la secuencia correcta en la configuración del ensayo.
- c) Los tampones o los reactivos se han diluido o conservado incorrectamente
- ⓘ Siga las instrucciones que se suministran con los reactivos. Incluya un pocillo vacío (que contenga solo el tampón de *annealing* PyroMark) en la serie analítica para comprobar si los picos de fondo provienen de los nucleótidos.
- d) Error de dispensación (observado, por ejemplo, en forma de picos divididos)
- ⓘ Limpie o sustituya el cartucho PyroMark Q24. Si el problema persiste, póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).
- e) Cartucho PyroMark Q24 obstruido
- ⓘ No se dispensan correctamente los nucleótidos debido a la obstrucción de una aguja del cartucho PyroMark Q24. Limpie el cartucho PyroMark Q24 y compruebe que funciona correctamente.
- f) Cartucho PyroMark Q24 dañado
- ⓘ Deseche el cartucho PyroMark Q24 conforme a la normativa medioambiental federal, estatal y local para la eliminación de residuos de laboratorio.

Comentarios y sugerencias

- g) Tiempo de *annealing* demasiado largo

ⓘ Realice el *annealing* durante el período de tiempo correcto y a las temperaturas indicadas en los protocolos.

Señal de fondo alta

- a) Las condiciones de almacenamiento de uno o más reactivos no cumplían las instrucciones indicadas en "Conservación", página 5

ⓘ Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos y utilice reactivos nuevos en caso necesario.

ⓘ ¡Los nucleótidos nunca deben congelarse!

- b) Los reactivos han caducado

ⓘ Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos y utilice reactivos nuevos en caso necesario.

Alturas de picos mononucleotídicos

Comentarios y sugerencias

Secuencia deficiente o incorrecta

- a) El PyroMark Q24 Control Oligo no está preparado correctamente

ⓘ Siga las instrucciones recogidas en los protocolos para preparar el PyroMark Q24 Control Oligo. Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo en el tampón de dilución tal como se describe en los protocolos. Asegúrese de que el tampón de dilución 10x suministrado se diluya primero hasta 1x con agua ultrapura.

- b) Secuencia para analizar u orden de dispensación incorrectos

ⓘ Compruebe que ha escrito la secuencia correcta en la configuración del ensayo.

Comentarios y sugerencias

- c) Los tampones o los reactivos se han diluido o conservado incorrectamente
- ⓘ Siga las instrucciones que se suministran con los reactivos. Incluya un pocillo vacío (que contenga solo el tampón de *annealing* PyroMark) en la serie analítica para comprobar si los picos de fondo provienen de los nucleótidos.
- d) Error de dispensación (observado, por ejemplo, en forma de picos divididos)
- ⓘ Limpie o sustituya el cartucho PyroMark Q24. Si el problema persiste, póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).
- e) Cartucho PyroMark Q24 obstruido
- ⓘ No se dispensan correctamente los nucleótidos debido a la obstrucción de una aguja del cartucho PyroMark Q24. Limpie el cartucho PyroMark Q24 y compruebe que funciona correctamente.
- f) Cartucho PyroMark Q24 dañado
- ⓘ Deseche el cartucho PyroMark Q24 conforme a la normativa medioambiental federal, estatal y local para la eliminación de residuos de laboratorio.
- g) Tiempo de *annealing* demasiado largo
- ⓘ Realice el *annealing* durante el período de tiempo correcto y a las temperaturas indicadas en los protocolos.

Picos pequeños o ausentes

- a) Cantidad insuficiente de molde para inmovilización
- ⓘ Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo correctamente y de utilizar las cantidades especificadas en los protocolos.
- b) No hay suficiente mezcla enzimática o de sustrato para todos los pocillos
- ⓘ Rellene el cartucho PyroMark Q24 conforme a las instrucciones descritas en el informe "Pre Run Information".

Comentarios y sugerencias

- c) Los pocillos marcados en la configuración de la serie analítica no concuerdan con la posición de las muestras en la placa
- ① Compruebe que ha cargado la placa PyroMark Q24 correctamente, conforme a la configuración de la serie analítica.
- d) Uno o más de los compartimentos de nucleótidos del cartucho PyroMark Q24 no está relleno correctamente con reactivos o nucleótidos
- ① Asegúrese de que se añadan cantidades suficientes de los reactivos al cartucho PyroMark Q24. Siga las instrucciones de uso que se suministran con los productos.
- e) Error de dispensación (observado, por ejemplo, en forma de picos divididos)
- ① Limpie o sustituya el cartucho PyroMark Q24. Si el problema persiste, póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).
- f) Cartucho PyroMark Q24 obstruido
- ① No se dispensan correctamente los nucleótidos debido a la obstrucción de una aguja del cartucho PyroMark Q24. Limpie el cartucho PyroMark Q24 y compruebe que funciona correctamente.
- ① No se dispensan correctamente las enzimas o sustratos debido a la obstrucción del cartucho PyroMark Q24 (se manifiesta por la ausencia de señal de presecuenciación y por la ausencia de picos en el pirograma). Limpie el cartucho PyroMark Q24 y compruebe que funciona correctamente.
- g) Cartucho PyroMark Q24 dañado
- ① Deseche el cartucho PyroMark Q24 conforme a la normativa medioambiental federal, estatal y local para la eliminación de residuos de laboratorio.
- h) Los tampones o los reactivos se han diluido o conservado incorrectamente
- ① Siga las instrucciones que se suministran con los reactivos.

Comentarios y sugerencias

- i) El PyroMark Q24 Control Oligo no está preparado correctamente
- ① Siga las instrucciones recogidas en los protocolos para preparar el PyroMark Q24 Control Oligo. Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo en el tampón de dilución tal como se describe en los protocolos. Asegúrese de que el tampón de dilución 10x suministrado se diluya primero hasta 1x con agua ultrapura.
- j) La contaminación de la muestra da lugar a un consumo inusualmente elevado de la mezcla de sustrato (se manifiesta por una señal de presecuenciación elevada)
- ① Cambie los tampones. Utilice únicamente tampones suministrados por QIAGEN o por distribuidores autorizados de QIAGEN.
- ① Utilice la función de zoom para comprobar si se ha generado algún pico (seleccione una sección del pirograma con el botón primario del ratón).

Picos muy altos

El PyroMark Q24 Control Oligo no está preparado correctamente

- ① Siga las instrucciones recogidas en los protocolos para preparar el PyroMark Q24 Control Oligo. Asegúrese de diluir el PyroMark Q24 Control Oligo en el tampón de dilución tal como se describe en los protocolos. Asegúrese de que el tampón de dilución 10x suministrado se diluya primero hasta 1x con agua ultrapura.

Señal de fondo

Comentarios y sugerencias

Señal de fondo alta

- a) Las condiciones de almacenamiento de uno o más reactivos no cumplían las instrucciones indicadas en "Conservación", página 5
- ⓘ Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos y utilice reactivos nuevos en caso necesario.
- ⓘ ¡Los nucleótidos nunca deben congelarse!
- b) Los reactivos han caducado
- ⓘ Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos y utilice reactivos nuevos en caso necesario.

Diferencia en las alturas de los picos con y sin preparación de las muestras

Comentarios y sugerencias

Preparación incorrecta de las muestras

- a) Líquido residual en algunos pocillos o tubos al capturar las microesferas que contienen el molde inmovilizado en las sondas de filtro
- ⓘ Sustituya la sonda de filtro correspondiente en la herramienta de vacío de la estación de vacío PyroMark Q24 MDx. Consulte las instrucciones para la preparación de las muestras en nuestro Centro de Servicio Técnico en www.qiagen.com/Support o póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos de Servicio Técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

- b) Las sondas de filtro no funcionan correctamente
- ⓘ Compruebe las sondas de filtro. Agregue 80 μ l de agua ultrapura a cada pocillo de una placa de PCR. Encienda la bomba de vacío y abra el interruptor de vacío (On) para aplicar vacío. Descienda la herramienta de vacío a la placa de PCR y espere 10 segundos. Compruebe que todos los pocillos de la placa de PCR están vacíos. Si no es así, sustituya las sondas de filtro fallidas y repita la prueba.
- c) Residuo blanco (microesferas de estreptavidina-sefarosa de alto rendimiento) en algunos pocillos o tubos al capturar las microesferas que contienen el molde inmovilizado en las sondas de filtro
- ⓘ No deje la placa de PCR, utilizada en el paso de inmovilización, durante más de 1 min una vez finalizada la mezcla. Si es necesario, mezcle durante un minuto más antes de capturar las microesferas.
- d) Fuga en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx
- ⓘ Asegúrese de que los tubos están correctamente conectados y de que no hay fugas. Es posible que el filtro de desechos esté húmedo y que sea necesario sustituirlo.

Apéndice A: Preparación de la estación de vacío PyroMark Q24 MDx

Este protocolo describe cómo preparar la estación de vacío PyroMark Q24 MDx antes de usarla para preparar ADN monocatenario.

Procedimiento

1. **Llene cinco recipientes separados (suministrados con la estación de vacío PyroMark Q24 MDx) de la forma siguiente:**
 - **Aproximadamente 50 ml de etanol (70%) (1)**
 - **Aproximadamente 40 ml de solución desnaturalizante PyroMark (2)**
 - **Aproximadamente 50 ml de tampón de lavado PyroMark (3)**
 - **Aproximadamente 50 ml de agua ultrapura (4)**
 - **Aproximadamente 70 ml de agua ultrapura (5)**

En la figura 12 se presenta una configuración sugerida. Rellene los recipientes hasta estos niveles cuando sea necesario.

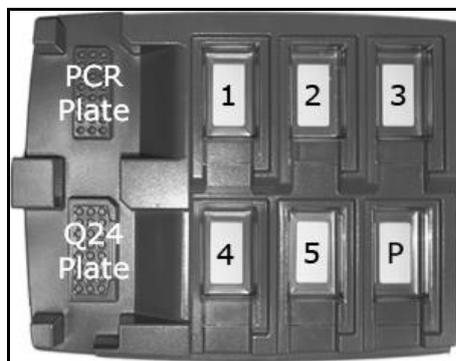


Figura 12. Posiciones en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx.

2. **Encienda la bomba de vacío.**
3. **Abra el interruptor de vacío para aplicar vacío a la herramienta de preparación del vacío.**
4. **Lave las sondas de filtro bajándolas hasta introducirlas en el agua ultrapura (recipiente 5). Enjuague las sondas con 70 ml de agua ultrapura. Asegúrese de que el agua se transfiera al recipiente de desechos. En caso contrario, asegúrese de que los tubos están correctamente conectados y de que no están rotos. Sustituya los tubos si están rotos (consulte "Sustitución de los tubos" en el *Manual de usuario del PyroMark Q24*).**
5. **Asegúrese de que el filtro de desechos está seco. Sustituya el filtro si está húmedo (consulte "Sustitución del filtro de desechos" en el *Manual de usuario del PyroMark Q24*).**

- 6. Rellene el recipiente 5 con 70 ml de agua ultrapura.**
- 7. Cierre el interruptor de vacío de la herramienta (Off) y sitúe la herramienta en la posición de detención (P).**

Apéndice B: Vaciado del recipiente de desechos y de los recipientes

<p>ADVERTENCIA</p> 	<p>Productos químicos peligrosos</p> <p>La solución desnaturalizante PyroMark utilizada en la estación de vacío PyroMark Q24 MDx contiene hidróxido de sodio, que puede provocar irritación de los ojos y de la piel. Lleve siempre gafas protectoras, guantes y una bata de laboratorio. La autoridad responsable (p. ej., el jefe de laboratorio) debe tomar las medidas preventivas necesarias para garantizar que el entorno del puesto de trabajo sea seguro y que los operadores del instrumento no estén expuestos a niveles peligrosos de sustancias tóxicas (químicas o biológicas) según se define en las fichas de datos de seguridad (SDS) correspondientes o en los documentos de la OSHA*, ACGIH† o COSHH‡. La ventilación de humos y la eliminación de residuos deben realizarse de acuerdo con todas las normativas y leyes nacionales, estatales y locales en materia de salud y seguridad.</p>
---	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Administración de salud y seguridad laboral) (Estados Unidos).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Conferencia estadounidense de higienistas industriales gubernamentales) (Estados Unidos).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Control de sustancias peligrosas para la salud) (Reino Unido).

Asegúrese de cumplir todas las normativas medioambientales nacionales, estatales y locales relativas a la eliminación de los residuos de laboratorio.

Se necesita el elemento siguiente:

- Agua ultrapura (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, o equivalente).

Procedimiento

- 1. Asegúrese de que no se aplica vacío a la herramienta de vacío, de que el interruptor de vacío está cerrado (Off) y de que la bomba de vacío está apagada.**
- 2. Elimine las soluciones residuales de los recipientes.**
- 3. Enjuague los recipientes con agua ultrapura o sustitúyalos en caso necesario.**
- 4. Vacíe el recipiente de desechos.**



Se puede retirar la tapa sin desconectar el tubo.

5. En caso de que sea necesario limpiar (de polvo o derramamientos) la estación de vacío PyroMark Q24 MDx, siga las instrucciones descritas en el apartado "Limpieza de la estación de vacío PyroMark Q24" del *Manual de usuario del PyroMark Q24*.

Bibliografía

QIAGEN mantiene una base de datos en línea extensa y actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan productos de QIAGEN. Las opciones integrales de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante una búsqueda sencilla de una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica en línea de QIAGEN en www.qiagen.com/RefDB/search.asp o póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN o con su distribuidor local.

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
PyroMark Q24 Control Oligo	Para la comprobación de la instalación del sistema	979303
Accesorios		
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Para 5 x 24 muestras para uso en el PyroMark Q24 MDx: mezcla enzimática, mezcla de sustrato y nucleótidos	971802
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Para el <i>annealing</i> del cebador de secuenciación al producto de la PCR monocatenario y para la reacción de pirosecuenciación	979309
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Para la unión del producto de la PCR biotinilado a microesferas de sefarosa	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Para la desnaturalización del producto de la PCR bicatenario en ADN molde monocatenario	979307
PyroMark Wash Buffer, concentrate (200 ml)	Para el lavado de ADN monocatenario	979308
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de 24 pocillos para reacción de secuenciación	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para dispensación de nucleótidos y reactivos	979302
Productos relacionados		
PyroMark Q24 MDx	Plataforma de detección basada en secuencias para la pirosecuenciación de 24 muestras en paralelo	9001513
PyroMark Q24 MDx Software	Software de aplicación	9019063

Producto	Contenido	Referencia
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Estación de vacío (220 V) para preparar 24 muestras en paralelo, desde el producto de la PCR hasta el molde monocatenario	9001515* 9001517†
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para la comprobación del rendimiento del sistema	979304

Para obtener información actualizada sobre licencias y sobre exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte la guía o el manual del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Las guías y los manuales del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al Servicio Técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

* Para el resto del mundo (excepto el Reino Unido).

† Para el Reino Unido.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Pyrosequencing®, Pyrogram®, PyroMark® (Grupo QIAGEN); Microsoft® (Microsoft Corporation); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare).

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del PyroMark Q24 Control Oligo la aceptación de los siguientes términos:

1. El PyroMark Q24 Control Oligo puede utilizarse exclusivamente de acuerdo con las indicaciones recogidas en el *Manual de uso del PyroMark Q24 Control Oligo* y empleando únicamente los componentes contenidos en el producto. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este producto con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual de uso del PyroMark Q24 Control Oligo* y en otros protocolos disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este producto ni su uso no infrinjan derechos de terceros.
3. Este producto y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN específicamente renuncia a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del producto aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda facilitar o conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este producto y sus componentes.

Para ver los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 021-3865-3865 ■ Fax 021-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

