

# Příručka k soupravě *therascreen*<sup>®</sup> MGMT Pyro<sup>®</sup> Kit



Verze 1

**IVD**

Pro diagnostiku in vitro

**CE**

**REF** 971061

**HB** 1061267CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R4 **MAT** 1061267CS



# Technologie QIAGEN pro zpracování a analýzu vzorků

Společnost QIAGEN je předním dodavatelem inovativních technologií pro zpracování a analýzu vzorků, které umožňují izolaci a detekci složek libovolného biologického vzorku. Naše vyspělé, vysoce kvalitní produkty a služby vám zajistí úspěšný průběh od odběru vzorku až po výsledek.

## Společnost QIAGEN určuje standardy pro:

- purifikaci DNA, RNA a proteinů;
- rozборы nukleových kyselin a proteinů;
- výzkum microRNA a RNAi;
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozборы.

Naším cílem je poskytovat co nejnovější technologie, které vám zaručí spolehlivé výsledky a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Obsah

<b>Zamýšlený účel použití</b>	<b>5</b>
<b>Shrnutí a vysvětlení</b>	<b>5</b>
<b>Princip postupu</b>	<b>6</b>
Kontroly	7
<b>Dodávané materiály</b>	<b>8</b>
Obsah soupravy	8
<b>Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy</b>	<b>9</b>
Doporučené míchačky destiček	10
<b>Upozornění a bezpečnostní opatření</b>	<b>10</b>
Bezpečnostní informace	10
Obecná ustanovení	10
<b>Skladování činidel a manipulace s nimi</b>	<b>11</b>
<b>Manipulace se vzorkem a jeho skladování</b>	<b>12</b>
<b>Postup</b>	<b>13</b>
Izolace DNA a konverze hydrogen siřičitanem	13
Protokoly	
■ 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24	14
■ 2: PCR s činidly dodanými v soupravě <i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit	16
■ 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance	19
■ 4: Příprava vzorků před pyrosekvenční analýzou na systému PyroMark Q24	21
■ 5: Spuštění systému PyroMark Q24	25
■ 6: Analýza běhu na systému PyroMark Q24	27
<b>Interpretace výsledků</b>	<b>28</b>
Návod na řešení potíží	30
<b>Kontrola kvality</b>	<b>32</b>
<b>Omezení</b>	<b>32</b>
<b>Charakteristiky funkčních vlastností analýz</b>	<b>33</b>
Hodnoty meze slepého vzorku	33
Linearita	33
Přesnost	35
Diagnostické vyhodnocení	38
<b>Odkazy</b>	<b>40</b>

<b>Symboly</b>	<b>41</b>
<b>Kontaktní údaje</b>	<b>41</b>
<b>Příloha A: Nastavení analýzy MGMT</b>	<b>42</b>
<b>Příloha B: Vyprázdnění zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami</b>	<b>43</b>
<b>Informace pro objednávky</b>	<b>44</b>

## Zamýšlený účel použití

Souprava *therascreen* MGMT Pyro Kit je prostředek sloužící ke kvantitativní detekci stavu methylationu *in vitro* založené na pyrosekvenační metodě Pyrosequencing® v exonu 1 lidského genu MGMT v genomové DNA získané ze vzorků lidské tkáně.

Souprava *therascreen* MGMT Pyro Kit je určena k použití jako doplnění ostatních prognostických faktorů k poskytování informací klinickým lékařům pomáhajícím při výběru pacientů s karcinomem, u nichž bude větší pravděpodobnost úspěšnosti léčby pomocí chemoterapie. Pro diagnostiku *in vitro*.

Určeno k použití pouze se systémem PyroMark® Q24. Systém PyroMark Q24 obsahuje:

- Přístroj PyroMark Q24 a přístroj PyroMark Q24 MDx.
- Vakuová stanice PyroMark Q24 a vakuová stanice PyroMark Q24 MDx.
- Software PyroMark Q24 (verze 2.0) a software PyroMark Q24 MDx (verze 2.0).

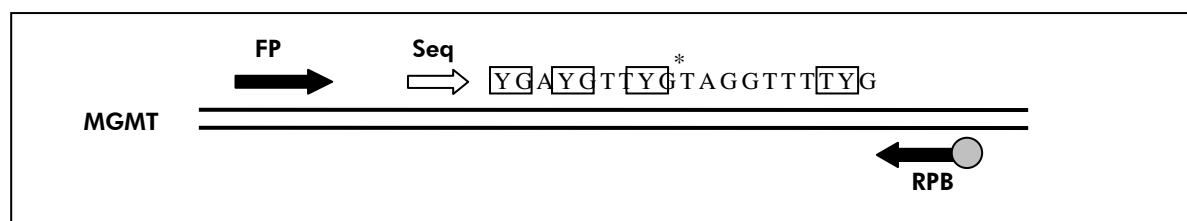
Tento výrobek je určen k použití pouze pro profesionální uživatele, jako jsou laboranti nebo lékaři vyškolení v postupech pro diagnostiku *in vitro*, molekulárně biologických metodách a obsluze systému PyroMark Q24.

## Shrnutí a vysvětlení

Souprava *therascreen* MGMT Pyro Kit slouží ke kvantitativnímu stanovení methylationu ve čtyřech v CpG lokacích v exonu 1 lidského genu MGMT (genomová sekvence chromozomu 10 od 131 265 519 do 131 265 537:

CGACGCCCGCAGGTCCTCG). Genomová DNA konvertovaná hydrogen siřičitanem je pomocí PCR amplifikována a v definované oblasti sekvenována v dopředném směru (obr. 1). Sekvence v okolí daných poloh slouží jako normalizační a referenční píky pro kvantifikaci a stanovení kvality analýzy.

Výrobek obsahuje pro každou analýzu směs PCR primerů a sekvenační primer; po dvou lahvičkách každého přípravku. Primery jsou dodány v roztoku. Každá lahvička obsahuje 24 µl každého primeru nebo směsi primerů. Souprava obsahuje primery a činidla k amplifikaci genů, plus pufry, primery a činidla ke kvantitativní detekci methylationu v reálném čase pomocí pyrosekvenační technologie Pyrosequencing v systému PyroMark Q24.



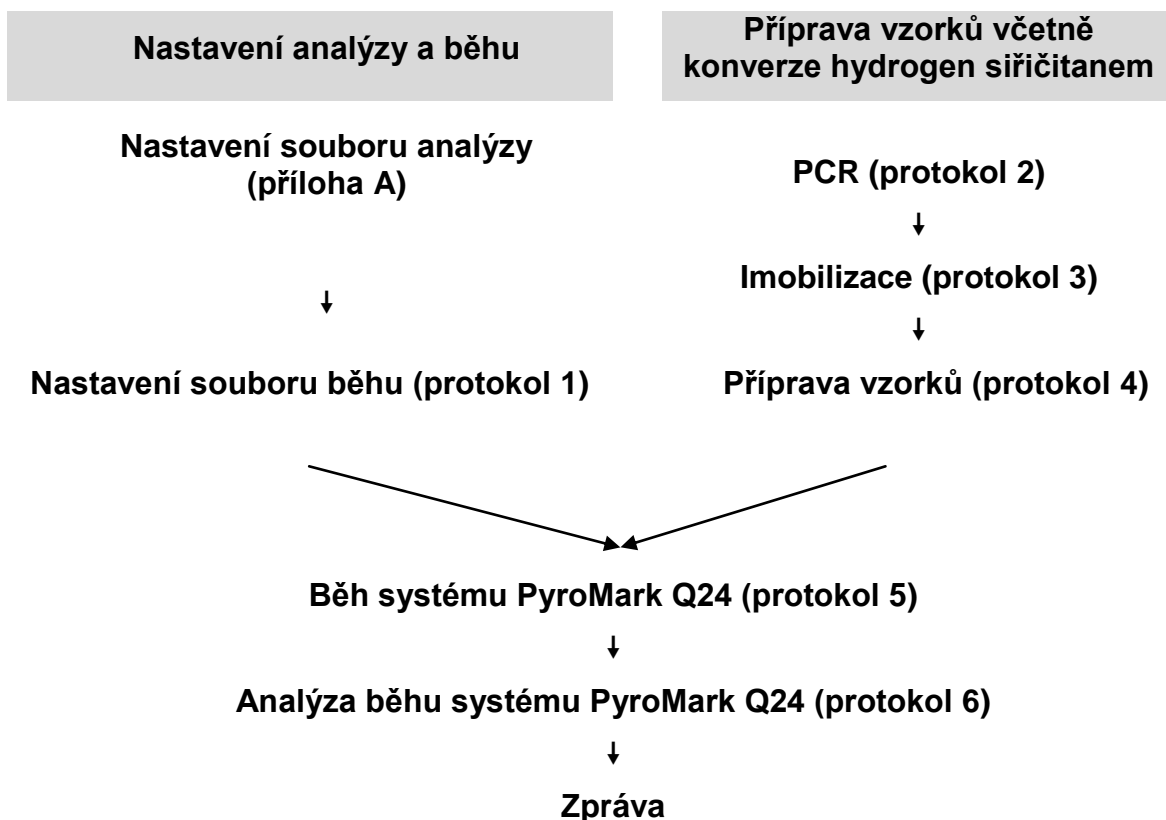
**Obrázek 1. Zobrazení analýzy MGMT.** Označená sekvence je analyzovaná sekvence po konverzi hydrogen siřičitanem. Y indikuje potenciálně methylované lokace a rámečky indikují analyzované lokace CpG. Hvězdička označuje lokaci kontroly pro konverzi hydrogen siřičitanem. **FP**: přímé PCR primery; **RPB**: zpětné PCR primery (**B** označuje biotinylacii); **Seq**: sekvenační primery.

## Princip postupu

Na schématu pracovního postupu je zobrazen průběh analýzy. Po PCR s primery vymezejícími definovanou oblast exonu 1 se amplikony imobilizují na kuličky Streptavidin Sepharose® High Performance. Připraví se jednořetězcová DNA a dojde k hybridizaci sekvenačního primeru a DNA. Vzorky se pak analyzují v systému PyroMark Q24 pomocí souboru nastavení analýzy a souboru běhu.

**Poznámka:** Schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s *uživatelskou příručkou PyroMark Q24* (viz „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenační analýzou na systému PyroMark Q24“, strana 21) mírně pozměněno.

## Schéma pracovního postupu analýzy *therascreen* MGMT Pyro



### Kontroly

Součástí soupravy je methylovaná kontrolní DNA jako pozitivní kontrola pro PCR a sekvenační reakce. Tato kontrolní DNA je vysoce methylovaná a konvertovaná hydrogen siřičitanem. Doporučuje se také, aby každý běh pyrosekvenační metodou Pyrosequencing zahrnoval pro srovnání i analýzu vzorku DNA odvozeného od zdravého dárce krve. Dále by každé nastavení PCR mělo vždy obsahovat i negativní kontrolu (bez templátu DNA).


## Dodávané materiály

### Obsah soupravy

#### *therascreen* MGMT Pyro Kit (krabice 1/2)

<b>Souprava <i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit</b>	<b>(48)</b>
<b>Katalogové č.</b>	<b>971061</b>
<b>Počet reakcí</b>	<b>48</b>
PCR Primer Mix MGMT (Směs PCR primerů MGMT)	2 x 24 µl
Seq Primer MGMT (Seq primer MGMT)	2 x 24 µl
PyroMark PCR Master Mix (PCR master mix PyroMark), 2x	850 µl
CoralLoad <sup>®</sup> Concentrate (Koncentrát CoralLoad <sup>®</sup> ), 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Methylated Control DNA (Methylovaná kontrolní DNA), 10 ng/µl	100 µl

#### *therascreen* Pyro buffers and reagents (krabice 2/2)

<b><i>therascreen</i> Pyro buffers and reagents</b>		
PyroMark Binding Buffer (Vazebný pufr PyroMark)		10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Hybridizační pufr PyroMark)		10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Denaturační roztok PyroMark)*		250 ml
PyroMark Wash Buffer (Promývací pufr PyroMark), 10x		25 ml
Enzyme Mixture (Směs enzymů)		1 lahvička
Substrate Mixture (Směs substrátů)		1 lahvička
dATP <sub>α</sub> S		1180 µl
dCTP		1180 µl
dGTP		1180 µl
dTTP		1180 µl
Handbook (Příručka)		1

\* Obsahuje hydroxid sodný.



## Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

- Souprava na izolaci DNA (viz „Izolace DNA a konverze hydrogen siřičitanem“, strana 13)
  - Činidla na konverzi DNA hydrogen siřičitanem (viz „Izolace DNA a konverze hydrogen siřičitanem“, strana 13)
  - Pipety (nastavitelné)\*
  - Sterilní špičky na pipety (s filtry pro nastavení PCR)
  - Stolní mikrocetrifuga\*
  - Termocykler a příslušné PCR zkumavky
  - Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, kat. č. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
  - PyroMark Q24 (kat. č. 9001513 nebo 9001514)\*<sup>†</sup>
  - Software PyroMark Q24 (kat. č. 9019062 nebo 9019063)<sup>†</sup>
  - Destičky PyroMark Q24 (kat. č. 979201)<sup>†</sup>
  - Kazeta PyroMark Q24 (kat. č. 979202)<sup>†</sup>
  - Vakuová stanice PyroMark Q24 (kat. č. 9001515 nebo 9001517)\*<sup>†</sup>
  - Míchačka destiček\* pro imobilizaci na kuličky (viz „Doporučené míchačky destiček“, strana 10)
  - Topný blok\* s dosažitelnou teplotou 80 °C
  - PCR destičky se 24 jamkami nebo stripy
  - Víčka na stripy
  - Vysoce čištěná voda (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm nebo ekvivalent)
- Poznámka:** Součástí dodávky je dostatečný objem vody pro PCR, imobilizaci DNA a k rozpuštění směsi enzymů a směsi substrátů. Další vysoce čištěná voda je nutná na ředění promývacího pufru PyroMark, 10x.
- Ethanol (70 %)<sup>‡</sup>

\* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a zkalibrovány podle doporučení výrobce.

<sup>†</sup> Označení CE-IVD je v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES. Všechny ostatní uvedené výrobky nemají označení CE-IVD podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES.

<sup>‡</sup> Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje jiné látky, například metanol nebo metyletylketon.

## Doporučené míchačky destiček

Míchačky destiček doporučené k použití se soupravou *therascreen* MGMT Pyro Kit jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1. Míchačky destiček doporučené k použití se soupravou *therascreen* MGMT Pyro Kit**

Výrobce	Výrobek	Katalogové číslo
Eppendorf	Thermomixer comfort (základní zařízení)	5355 000.011
	Termoblok pro MTP	5363 000.012
	Adaptační destička na PCR zkumavky 96 x 0,2 ml ke vložení do bloků pro mikrotitrační destičky	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag <sup>®</sup> Teleshake	51410 (115 V=51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V=51110 U)

## Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro

### Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav společnosti QIAGEN<sup>®</sup>.

Na komponenty soupravy ... se vztahují následující bezpečnostní věty a bezpečnostní opatření.

#### PyroMark Denaturation Solution



Varování! Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Může být korozivní pro kovy. Uniklý produkt absorbujte, aby se zabránilo materiálním škodám. Uchovávejte pouze v původním obalu. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

#### PyroMark Enzyme Mixture



Obsahuje: (R\*,R\*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Nebezpečí! Dráždí kůži. Způsobuje vážné poškození očí. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. PŘI expozici nebo podezření: Volejte TOXIKOLOGICKÉ STŘEDISKO nebo lékaře. Odložte kontaminované oblečení a před použitím je vyperte. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

### PyroMark Substrate Mixture



Obsahuje: acetic acid. Varování! Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ ošetření. Odložte kontaminované oblečení a před použitím je vyperte. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

## Obecná ustanovení

Uživatel by měl vždy věnovat pozornost dodržování následujících pravidel.

- Pro dosažení optimálních výsledků je nutné přísně dodržovat pokyny v návodu pro uživatele. Jiné ředění činidel než to, které je popsáno v této příručce, se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu.
- Povšimněte si, že schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s *uživatelskou příručkou PyroMark Q24* (viz „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenční analýzou na systému PyroMark Q24“, strana 21) mírně pozměněno.
- Komponenty tohoto produktu stačí k provedení 48 reakcí v až 5 nezávislých bězích.
- Používejte sterilní špičky na pipety (s filtry pro nastavení PCR).
- Pozitivní materiály (vzorky, pozitivní kontroly a amplikony) se musí skladovat a extrahovat odděleně od všech ostatních činidel. Do reakční směsi je přidávejte v odděleném prostoru.
- Před zahájením analýzy důkladně rozmrazte všechny složky na pokojovou teplotu (15 až 25 °C).
- Po rozmrazení složky promíchejte (opakovaným pipetováním nahoru a dolů nebo na pulsní třepačce) a krátce odstředte.
- Na základě nezdařených výsledků nelze posuzovat stav methylationu.

## Skladování činidel a manipulace s nimi

Souprava *therascreen* MGMT Pyro Kit se dodává ve dvou krabicích. Souprava *therascreen* MGMT Pyro Kit (krabice 1/2) se dodává v suchém ledu. PCR master mixy PyroMark, koncentrát CoralLoad, methylovaná kontrolní DNA a všechny primery musí být při dodání uloženy při teplotě –30 až –15 °C.

Krabice s pufrů a činidly *therascreen* Pyro (krabice 2/2) obsahuje pufrů, směs enzymů, směs substrátů, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP a dTTP (činidla na pyrosekvenční

analýzu) a dodává se v chladícím obalu. Při dodání by měly být uvedené součásti uloženy při teplotě 2 až 8 °C. Z důvodu minimalizace ztráty aktivity se doporučuje uchovávat směs enzymů i substrátů v dodaných lahvičkách.

Rekonstituované směsi enzymů nebo substrátů jsou stabilní po dobu nejméně 10 dnů při teplotě 2 až 8 °C. Rekonstituované směsi enzymů nebo substrátů lze zamrazit a uložit v původních lahvičkách při teplotě –30 až –15 °C. Zmražená činidla by neměla prodělat opakované zmražení/rozmražení více než 6krát.

**Poznámka:** Nukleotidy se nesmí zamrazovat.

Souprava *therascreen* MGMT Pyro Kit je stabilní až do doby použitelnosti soupravy, uchovává-li se za stanovených podmínek.

## Manipulace se vzorkem a jeho skladování

Všechny vzorky jsou potenciálně infekční a podle toho se s nimi musí zacházet.

Materiál vzorků tvoří lidská DNA konvertovaná hydrogen siřičitanem, extrahovaná z krve nebo vzorků tkání fixovaných formalinem zalitých v parafinu (FFPE).

Nelze použít vzorky pacientů, kterým je podáván heparin. Nelze použít vzorky krve, které byly odebrány do zkumavek obsahujících antikoagulační činidlo heparin. Heparin ovlivňuje PCR.

## Postup

### Izolace DNA a konverze hydrogen siřičitanem

Funkčnost systému pro extrakci lidské DNA ze vzorků tumorů fixovaných formalinem zalitých v parafinu byla stanovena pomocí souprav EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue Kit a QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit. U systému QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit byla funkčnost stanovena u vzorků krve od zdravých dárců s přidavkem nádorových buněk.

Na purifikaci DNA z daných typů lidských vzorků pro účely soupravy *therascreen* MGMT Pyro Kit se doporučují soupravy QIAGEN uvedené v tabulce 2. Purifikaci DNA provádějte podle pokynů v příručkách k daným soupravám.

Ke konverzi hydrogen siřičitanem se doporučuje souprava EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite Kit (kat. č. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (kat. č. 59144) nebo EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (kat. č. 59124) od společnosti QIAGEN.

**Tabulka 2. Doporučené soupravy na purifikaci DNA k použití se soupravou *therascreen* MGMT Pyro Kit**

Materiál vzorku	Souprava na izolaci nukleových kyselin	Katalogové číslo (QIAGEN)
Tkáň zalitá v parafinu	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Krev	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit <sup>†</sup>	61104

\* Postupujte dle protokolu pro použití tkání zalitých v parafinu. Souprava EZ1 DNA Tissue Kit by se měla používat společně se stanicí EZ1 Advanced (kat. č. 9001410 nebo 9001411) a kartou EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9018298), se stanicí EZ1 Advanced XL (kat. č. 9001492) a kartou EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9018700) nebo se stanicí BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (kat. č. 9000705; již není v nabídce) a kartou EZ1 DNA Paraffin Section Card (kat. č. 9015862).

<sup>†</sup> Označení CE-IVD je v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES.

# Protokol 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24



## Důležitý bod před zahájením

- V případě potřeby lze získat celý rozsah výsledků ověřením meze slepého vzorku (LOB) na vzorku krve zdravého dárce. Bližší informace naleznete v pokynech CLSI EP17-A „Protokol pro určení mezí detekce a mezí kvantifikace, schválené pokyny“.

## Úkony před zahájením

- Vytvořte nastavení analýzy (popis viz „Příloha A“, strana 42). To je třeba provést pouze jednou před prvním spuštěním analýzy *therascreen* MGMT.

## Postup

1. **Klikněte na tlačítko  v panelu nástrojů.**  
Vytvořil se nový soubor běhu.
2. **Zadejte parametry běhu (viz část „Parametry běhu“ na straně 15).**
3. **Na destičce zadejte analýzu k jamkám odpovídajícím daným testovaným vzorkům.**  
**Poznámka:** Každé nastavení PCR mělo vždy obsahovat i vzorek pro negativní kontrolu (bez templátu DNA).  
**Poznámka:** Doporučuje se také, aby každý běh pyrosekvenční metodou zahrnoval pro srovnání i kontrolního vzorku DNA od zdravého dárce krve. Jako pozitivní kontrola pro PCR a sekvenční reakce (viz „Kontroly“, strana 7) může být zahrnuta také methylovaná kontrolní DNA.
4. **Jakmile je běh nastaven a systém PyroMark Q24 připraven ke spuštění, vytiskněte si seznam požadovaných objemů směsi enzymů, směsi substrátů, nukleotidů a uspořádání destičky. Z nabídky „Tools“ (Nástroje) vyberte položku „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním běhu) a po zobrazení zprávy klikněte na tlačítko .**
5. **Zavřete soubor běhu a pomocí Průzkumníku Windows® ho zkopírujte na jednotku USB dodanou se systémem.**  
Vytisknutou zprávu s informacemi před spuštěním běhu použijte jako šablonu při nanášení vzorků (viz „Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance“ na straně 19).  
Spuštění analýzy destičky systémem PyroMark Q24 viz „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 25.

## Parametry běhu

Run name (Název běhu):	Název běhu se zadává při uložení souboru. Přejmenováním souboru dojde i ke změně názvu běhu.
Instrument method (Metoda přístroje):	Vyberte metodu přístroje podle kazety, která se bude pro daný běh používat. Viz instrukce dodané s výrobky.
Plate ID (ID destičky):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte ID destičky PyroMark Q24.
Bar code (Čárový kód):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte číslo čárového kódu destičky. Pokud máte k počítači připojenu čtečku čárových kódů, kód přečtěte čtečkou. Umístěte ukazatel myši do textového pole „Barcode“ (Čárový kód) a kliknutím čárový kód sejměte.
Reagent ID (ID činidla):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte čísla šarží soupravy <i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit krabice 1 a krabice 2, která bude použita. Číslo šarže je uvedeno na štítku výrobku. <b>Poznámka:</b> Doporučuje se zadávat číslo šarže, aby bylo možné v případě potřeby vysledovat neočekávané problémy se soupravou <i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit.
Run note (Poznámky k běhu):	<b>Nepovinné:</b> Zadejte poznámky o obsahu nebo účelu běhu.

## Přidání souborů analýz

Analýzu lze k jamce připojit některým z těchto způsobů:

- Klikněte na jamku pravým tlačítkem a z místní nabídky vyberte položku „Load Assay“ (Načíst analýzu).
- Vyberte analýzu v prohlížeči zkratk, klikněte na ni a přetáhněte ji na jamku.

Jamka se označí barevně podle zvolené načtené analýzy.

## Zadání ID vzorků a poznámek

Chcete-li zadat ID vzorku nebo poznámku, vyberte buňku a zadejte text.

Chcete-li ID vzorku nebo poznámku upravit, vyberte buňku (stávající obsah se označí) nebo na buňku dvakrát klikněte.

## Protokol 2: PCR s činidly dodanými v soupravě *therascreen* MGMT Pyro Kit

Tento protokol se vztahuje na amplifikaci PCR oblasti DNA konvertované hydrogen siřičitanem pomocí soupravy *therascreen* MGMT Pyro Kit.

### Důležité body před zahájením

- DNA polymeráza HotStarTaq<sup>®</sup> v master mixu PyroMark PCR vyžaduje aktivační krok **15 minut při 95 °C**.
- Všechny reakční směsi připravujte před zahájením pyrosequenční analýzy v prostoru odděleném od prostoru určeného na purifikaci DNA, přidávání templátu DNA do PCR, analýzy PCR produktů nebo přípravy vzorků.
- Používejte jednorázové špičky obsahující hydrofobní filtry z důvodu minimalizace křížové kontaminace.
- DNA konvertovaná hydrogen siřičitanem musí být použita jako templát DNA. Doporučuje se souprava EpiTect Bisulfite Kit (kat. č. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (kat. č. 59144) nebo EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (kat. č. 59124) od společnosti QIAGEN.

### Úkony před zahájením

- Zkumavky s PCR primery před otevřením krátce odstředíte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- Upravte koncentraci DNA vzorku podle potřeby na 2 – 10 ng/μl.

### Postup

#### 1. Rozmrazte všechny potřebné složky.

Před použitím řádně promíchejte.

#### 2. Připravte reakční směs podle tabulky 3.

Reakční směs obvykle obsahuje kromě vzorku všechny složky nutné k provedení PCR.

Reakční směs připravte v objemu vyšším než je nutné k provedení celkového počtu PCR analýz.



**Tabulka 3. Příprava reakční směsi**

Složka	Objem na reakci (μl)
PCR master mix PyroMark, 2x	12,5
Koncentrát CoralLoad, 10x	2,5
Směs PCR primerů MGMT	1,0
Vida (H <sub>2</sub> O, je součástí dodávky)	4,0
<b>Celkový objem</b>	<b>20,0</b>

**3. Reakční směs důkladně promíchejte a naneste 20 μl do každé PCR zkumavky.**

Není nutné mít PCR zkumavky uložené v ledu, neboť HotStarTaq DNA polymeráza je při laboratorní teplotě neaktivní.

**4. Do jednotlivých PCR zkumavek (tabulka 4) přidejte 5 μl templátu DNA konvertovaného hydrogen siřičitanem (10 – 50 ng genomové DNA měřeno před konverzí hydrogen siřičitanem) a důkladně promíchejte.**

**Poznámka:** Každé nastavení PCR mělo vždy obsahovat i vzorek pro negativní kontrolu (bez templátu DNA).

**Poznámka:** Doporučuje se také, aby každý běh pyrosekvenační metodou zahrnoval pro srovnání i kontrolního vzorku DNA od zdravého dárce krve. Jako pozitivní kontrola pro PCR a sekvenační reakce (viz „Kontroly“, strana 7) může být zahrnuta také methylovaná kontrolní DNA.

**Tabulka 4. Příprava PCR**

Složka	Objem na reakci (μl)
Reakční směs	20
Vzorek DNA	5
<b>Celkový objem</b>	<b>25</b>

5. Termocykler naprogramujte podle pokynů výrobce na podmínky uvedené v tabulce 5.

**Tabulka 5. Optimalizovaný protokol cyklování**

			Poznámky
<b>Iniciační aktivační krok:</b>	15 minut	95 °C	Tento zahřívací krok slouží k aktivaci HotStarTaq DNA polymerázy.
<b>Cyklování ve 3 krocích:</b>			
Denaturace	20 sekund	95 °C	
Hybridizace	30 sekund	53 °C	
Prodlužování	20 sekund	72 °C	
Počet cyklů	42		
<b>Konečné prodlužování:</b>	5 minut	72 °C	

6. Uložte PCR zkumavky do termocykleru a spusťte cyklovací program.
7. Po ukončení amplifikace pokračujte krokem „Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance“ na straně 19.

## Protokol 3: Imobilizace PCR produktů na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance

Tento protokol popisuje imobilizaci templátu DNA na kuličky Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare), která musí předcházet analýze na systému PyroMark Q24.

### Důležité body před zahájením

- Před zahájením imobilizace nechte všechna požadovaná činidla a roztoky temperovat na laboratorní teplotu (15 – 25 °C).

### Postup

1. **Jemně protřepejte lahvičku obsahující Streptavidin Sepharose High Performance, aby byl roztok homogenní.**
2. **Připravte master mix pro imobilizaci DNA podle tabulky 6.** Připravte o 10 % vyšší objem, než je nutné pro provedení celkového množství reakcí.

Tabulka 6. Master mix pro imobilizaci DNA

Složka	Objem na vzorek (μl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
Vazebný pufr PyroMark	40
Vida (H <sub>2</sub> O, je součástí dodávky)	28
<b>Celkový objem</b>	<b>70</b>

3. **Naneste 70 μl master mixu do jamek na 24jamkové PCR destičce (nebo stripu) podle předem definovaného nastavení běhu (viz „Protokol 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24“ na straně 14).**
4. **Do každé jamky obsahující master mix přidejte 10 μl biotinylovaného PCR produktu z protokolu 2 podle předem definovaného nastavení běhu (viz „Protokol 2: PCR s činidly dodanými v soupravě *therascreen* MGMT Pyro Kit“ na straně 16).**

Po nanesení master mixu i PCR produktu by celkový objem v jamce měl být 80 μl.

5. **PCR destičku (nebo stripy) zavřete víčky.**

Zkontrolujte, zda nemůže dojít k přetékání kapaliny mezi jamkami.

6. **Míchejte PCR destičku při laboratorní teplotě (15 – 25 °C) po dobu 5 - 10 min při 1400 ot./min.**

Během tohoto kroku připravte vakuovou stanicí PyroMark Q24 na přípravu vzorku podle návodu v *uživatelské příručce systému PyroMark Q24*.

**7. Pokračujte ihned krokem „Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenační analýzou na systému PyroMark Q24“ na straně 21.**

**Poznámka:** Sepharosové kuličky rychle sedimentují. Kuličky je nutné odebrat okamžitě po míchání.

Pokud od míchání destiček (nebo stripů) uplyne více než 1 minuta, zamíchejte je před odběrem kuliček znovu po dobu 1 minuty.

## Protokol 4: Příprava vzorků před pyrosekvenační analýzou na systému PyroMark Q24

Tento protokol popisuje přípravu jednořetězcové DNA a připojení sekvenačních primerů k templátu před provedením pyrosekvenační analýzy na systému PyroMark Q24.

### Důležité body před zahájením

- Podle stejného vzorce, který byl předem definován pro destičku v nastavení běhu (viz „Protokol 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24“ na straně 14), naneste sekvenační primer.
- Schéma pracovního postupu bylo ve srovnání s *uživatelskou příručkou PyroMark Q24* (krok 18) mírně pozměněno. Dobu chlazení vzorků po jejich zahřátí na 80 °C nezkracujte.
- Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v *uživatelské příručce PyroMark Q24*, a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte.

### Úkony před zahájením

- Zkumavky se sekvenačními primery před otevřením krátce odstředíte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- Jeden stojan na destičky PyroMark Q24 uložte na předehřátý topný blok na teplotu 80 °C jako přípravu na krok 17. Druhý stojan na destičky PyroMark Q24, který bude použit v kroku 18, ponechte v prostředí s laboratorní teplotou (15 - 25 °C).
- Promývací pufr PyroMark je dodáván v 10x koncentrované formě. Před prvním použitím naředte: k 25 ml 10x koncentrovaného promývacího pufru PyroMark přidejte 225 ml vysoce čištěné vody (konečný objem bude 250 ml).

Pracovní roztok promývacího pufru 1x PyroMark je stabilní při 2 – 8 °C až do vyznačené doby použitelnosti.

### Postup

#### 1. Naředte dostatečné množství daného sekvenačního primeru Seq primer MGMT hybridizačním pufrem PyroMark podle Tabulky 7.

Roztok sekvenačních primerů připravte o objemu větším než je požadované množství pro sekvenování celkového počtu vzorků (počet vzorků + jedna dávka navíc).

**Tabulka 7. Příklad ředění sekvenačního primeru**

Složka	Objem na vzorek (μl)	Objem na 9 + 1 reakcí (μl)
Seq primer MGMT	0,8	8,0
Hybridizační pufr PyroMark	24,2	242,0
<b>Celkový objem</b>	<b>25,0</b>	<b>250,0</b>

2. Do každé jamky na destičce PyroMark Q24 naneste 25 μl naředěného sekvenačního primeru podle vzoru v nastavení běhu (viz „Protokol 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24“ na straně 14).

Jeden stojan na destičky PyroMark Q24 (součást dodávky vakuové stanice PyroMark Q24) uchovávejte při laboratorní teplotě (15 – 25 °C) a použijte ho jako pomůcku při přípravě a přenášení destičky.

3. Uložte PCR destičku (nebo stripy) z protokolu 3 a destičku PyroMark Q24 na pracovní stůl (obrázek 2).

Zkontrolujte, zda má destička stejnou orientaci jako při nanášení vzorku.



**Obrázek 2. Uložení PCR destičky (nebo stripů) a destičky PyroMark Q24 do vakuové stanice.**

4. Otevřete přívod vakua a zaveďte vakuum do vakuové hlavice.
5. Opatrně spusťte filtrační sondy vakuové hlavice do PCR destičky (nebo stripů) a odeberte kuličky obsahující imobilizovaný templát. Sondy ponechte na místě po dobu 15 sekund. Při zvedání vakuové hlavice postupujte velmi opatrně.

**Poznámka:** Sepharosové kuličky rychle sedimentují. Kuličky je nutné odebrat okamžitě po míchání.

Pokud od míchání destiček (nebo stripů) uplyne více než 1 minuta, zamíchejte je před odběrem kuliček znovu po dobu 1 minuty.

6. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 40 ml 70 % etanolu (obrázek 2). Proplachujte filtrační sondy po dobu 5 sekund.
7. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující 40 ml denaturačního roztoku (obrázek 2). Proplachujte filtrační sondy po dobu 5 sekund.
8. Přeneste hlavici do vaničky obsahující 50 ml promývacího pufu (obrázek 2). Proplachujte filtrační sondy po dobu 10 sekund.
9. Zvedněte vakuovou hlavici nahoru, naklopte ji svisle přes 90° a po dobu 5 sekund nechte tekutinu na filtračních sondách oschnout (obrázek 3).



Obrázek 3. Zobrazení vakuové hlavice naklopené svisle přes 90°.

10. Podržte vakuovou hlavici nad destičkou PyroMark Q24 a zavřete přívod vakua na hlavici (poloha Off).
11. Ponořte filtrační sondy do rozředěného sekvenačního primeru a jemným pohybem hlavice do stran uvolněte kuličky do destičky PyroMark Q24. Dbejte, aby nedošlo ke zničení povrchu destičky PyroMark Q24 poškrábáním filtračními sondami.
12. Přeneste vakuovou hlavici do vaničky obsahující vysoce čištěnou vodu (obrázek 2) a po dobu 10 sekund hlavici protřepávejte.
13. Promyjte filtrační sondy ponořením do vysoce čištěné vody (obrázek 2) a zavedením vakua. Opláchněte sondy 70 ml vysoce čištěné vody.
14. Zvedněte hlavici nahoru, naklopte ji svisle přes 90° a po dobu 5 sekund nechte tekutinu na filtračních sondách oschnout (obrázek 3).
15. Zavřete přívod vakua na hlavici (Off) a uložte hlavici do skladovací polohy (P).
16. Vypněte vakuovou pumpu.  
**Poznámka:** Na konci pracovního dne je potřeba zlikvidovat odpadní a zbytkové roztoky a zkontrolovat vakuovou stanici PyroMark Q24, zda není znečištěna prachem a potřísněna tekutinami (viz příloha B na straně 43).
17. Ohřejte destičku PyroMark Q24 se vzorky na 80 °C po dobu 2 minut s využitím předehřátého stojanu na destičky PyroMark Q24.

18. Odeberte destičku PyroMark Q24 z horkého stojanu, položte ji na druhý stojan PyroMark Q24 umístěný v prostředí s laboratorní teplotou (15 – 25 °C) a nechte vzorky vychladnout na laboratorní teplotu po dobu 10 – 15 minut.
19. Pokračujte krokem „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 25.



## Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24

Tento protokol popisuje přípravu a nanesení činidel PyroMark Gold Q24 na kazetu PyroMark Q24 a zahájení a ukončení běhu systému PyroMark Q24. Podrobnější popis uvádějící nastavení běhu naleznete v *uživatelské příručce systému PyroMark Q24*.

### Důležitý bod před zahájením

- Ve zprávě „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním běhu), která se nachází v nabídce „Tools“ (Nástroje) při nastavení běhu (viz „Protokol 1: Nastavení běhu na systému PyroMark Q24“ na straně 14), jsou uvedeny informace o objemu nukleotidů, enzymů, substrátů a pufrů nutných pro provedení daného běhu.

### Úkony před zahájením

- Zapněte systém PyroMark Q24. Hlavní vypínač je umístěn na zadní straně přístroje.

### Postup

1. **Rozpusťte lyofilizovanou směs enzymů a směs substrátů vždy v 620  $\mu$ l vody ( $H_2O$ , součást dodávky).**
2. **Míchání proveďte mírným kroužením lahvičkou.**

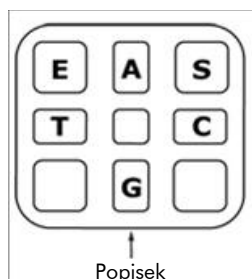
Neprovádějte vířivé pohyby!

Aby bylo zajištěno úplné rozpuštění směsi, ponechte ji v prostředí s laboratorní teplotou (15 – 25 °C) po dobu 5 – 10 minut. Před započítím plnění kazety PyroMark Q24 se přesvědčte, že roztok není zakalený. Pokud nemají být činidla bezprostředně použita, uložte lahvičky s činidly na led\* nebo do ledničky.

3. **Umožněte činidlům a kazetě PyroMark Q24 získat okolní teplotu (20 - 25 °C).**
4. **Umístěte kazetu PyroMark Q24 tak, aby byla natočena štítkem k vám.**
5. **Naneste na kazetu PyroMark Q24 příslušné objemy nukleotidů, směsi enzymů a směsi substrátů podle obrázku 4.**

Přesvědčte se, že se z pipety nepřenesly do kazety žádné vzduchové bubliny.

\* Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.



**Obrázek 4. Ilustrace kazety PyroMark Q24 při pohledu shora.** Popisy odpovídají štítkům na lahvičkách s činidly. Přidejte směs enzymů (**E**), směs substrátů (**S**) a nukleotidy (**A**, **T**, **C**, **G**) podle údajů o objemech uvedených ve zprávě Pre Run information (Informace před spuštěním běhu), která se nachází v nabídce „Tools“ (Nástroje) při nastavení běhu.

6. Otevřete dvířka kazety a vložte kazetu naplněnou reagenty štítkem ven. Kazetu zcela zasuňte a zatlačte dolů.
7. Zkontrolujte, zda je vidět linka na přední straně kazety, a zavřete dvířka.
8. Otevřete rámeček na upevnění destičky a umístěte destičku na topný blok.
9. Zavřete rámeček na upevnění destičky a víko přístroje.
10. Do USB portu na přední straně přístroje zasuňte USB jednotku (obsahující soubor běhu).  
USB jednotku nechte zasunutou až do ukončení běhu.
11. Z hlavní nabídky vyberte příkaz „Run“ (Spustit) pomocí tlačítek ▲ a ▼ na obrazovce a stiskněte tlačítko „OK“.
12. Pomocí tlačítek na obrazovce ▲ a ▼ vyberte soubor běhu.  
Chcete-li si prohlédnout obsah složky, vyberte danou složku a stiskněte tlačítko „Select“ (Vybrat). Chcete-li se vrátit zpět na předchozí zobrazení, stiskněte tlačítko „Back“ (Zpět).
13. Máte-li vybraný požadovaný běh, stiskněte tlačítko „Select“ (Vybrat).
14. Jakmile se běh dokončí a přístroj potvrdí, že soubor běhu byl uložen na USB jednotku, stiskněte tlačítko „Close“ (Zavřít).
15. Vyměňte USB jednotku.
16. Otevřete víko přístroje.
17. Otevřete dvířka kazety a kazetu s reagenty nadzdvihněte a vytáhněte ven.
18. Zavřete dvířka.
19. Otevřete rámeček na upevnění destičky a odeberte destičku z topného bloku.
20. Zavřete rámeček na upevnění destičky a víko přístroje.
21. Destičku zlikvidujte a kazetu vyčistěte podle návodu k výrobku, který je součástí dodávky kazety.
22. Proveďte analýzu běhu podle „Protokol 6: Analýza běhu na systému PyroMark Q24“ na straně 27.

**Protokol 6: Analýza běhu na systému PyroMark Q24** Tento protokol popisuje analýzu methylationu po dokončeném běhu *therascreen* MGMT pomocí softwaru PyroMark Q24.

## Postup

1. Zasuňte USB jednotku obsahující vytvořený soubor běhu do USB portu počítače.
2. Pomocí Průzkumníku Windows přesuňte soubor běhu z USB jednotky do požadovaného umístění v počítači.
3. Otevřete soubor běhu v režimu CpG softwaru PyroMark Q24 buď zvolením možnosti „Open“ (Otevřít) v nabídce „File“ (Soubor) nebo dvojitým kliknutím na soubor (✓) v prohlížeči zkratk.
4. Chcete-li provést analýzu běhu a získat přehled výsledků, klikněte na jedno z tlačítek analýzy.



Analyzovat všechny jamky



Analyzovat vybranou jamku

Výsledky analýzy (četnost methylationu) a stanovení kvality se zobrazí nad pozicí proměnné v záznamu Pyrogram®. Bližší informace o analýze běhu najdete v *uživatelské příručce systému PyroMark Q24*.

5. Chcete-li vygenerovat zprávu, vyberte z nabídky „Reports“ (Zprávy) možnost „CpG Full Report“ (Celá zpráva CpG) nebo „CpG Analysis Results“ (Výsledky CpG analýzy).

**Poznámka:** Za spolehlivé se doporučuje považovat výsledky, kde výška píku přesahuje 30 RLU. V nastavení analýzy určete hodnotu 30 RLU jako „required peak height for passed quality“ (požadovanou výšku píku pro uznání kvality výsledku) (viz příloha A, strana 42 a *uživatelská příručka systému PyroMark Q24*).

**Poznámka:** Zpráva s výsledky CpG analýzy by se měla použít jako dokumentace a interpretace kvantitativního vyhodnocení methylationu. Čísla uváděná v pyrogramu jsou zaokrouhlená a neudávají zcela přesnou kvantitativní hodnotu.

**Poznámka:** Pyrogram by měl být vždy porovnán s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. Naměřené píky by měly výškově odpovídat sloupcům histogramu.

## Interpretace výsledků

Doporučuje se, aby každý běh zahrnoval pro srovnání i analýzu vzorku DNA odvozeného od zdravého dárce krve.

Kontrola konverze hydrogen siřičitanem (označeno žlutým pruhem v okně Pyrogram) indikuje kompletnost konverze hydrogen siřičitanem. Signál v kontrole konverze hydrogen siřičitanem může indikovat neúplnou konverzi hydrogen siřičitanem, která může mít za následek zkreslenou kvantifikaci methylationu, a vygeneruje varování.

Mez slepého vzorku (LOB, limit of blank) reprezentuje četnost methylationu získanou ze vzorků krve zdravého dárce s pravděpodobností 95 % (viz tabulka 8 a „Charakteristiky funkčních vlastností analýz“, strana 33).

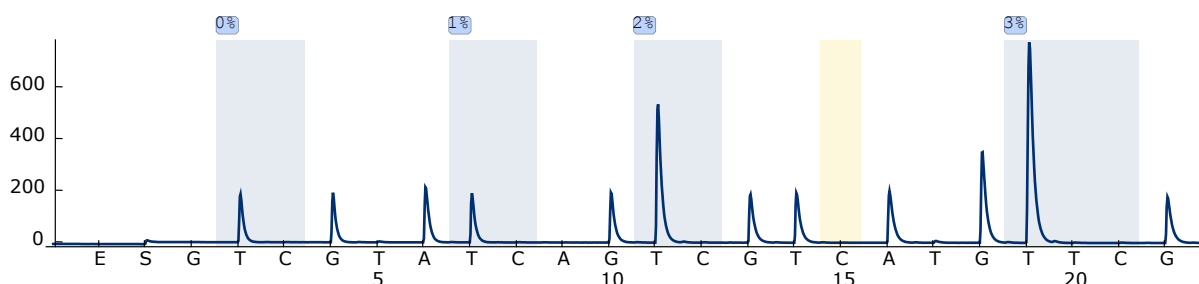
**Tabulka 8. Stanovená hodnota LOB pro specifické lokace methylationu pomocí vzorků krve zdravého dárce**

Poloha	LOB (% jednotek)
Lokace CpG 1	1,5
Lokace CpG 2	1,8
Lokace CpG 3	3,2
Lokace CpG 4	3,4
Střední hodnota lokace CpG 1 až 4	2,1

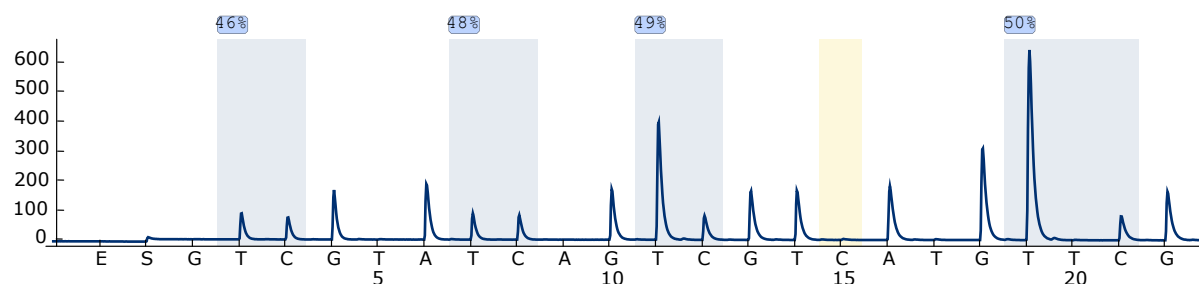
**Poznámka:** Tyto hodnoty vycházejí z běhů, kde signál převyšoval 30 relativních světelných jednotek (RLU, relative light units), při běžné analýze 10 ng DNA izolované z krve (měřeno před provedením konverze hydrogen siřičitanem). Doporučujeme ověřit funkčnost metody v laboratoři.

## Reprezentativní snímky

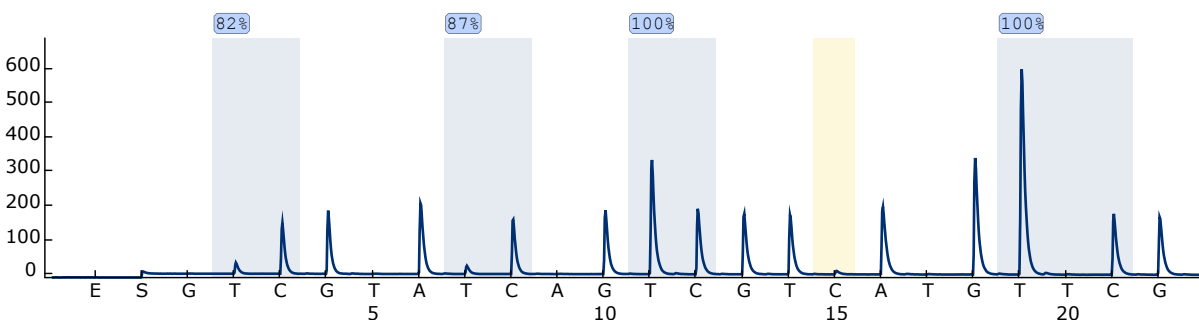
Na obrázcích 5 – 7 jsou uvedeny ukázkové výsledky pyrogramu.



**Obrázek 5. Záznam pyrogramu získaný z analýzy nemethylované DNA konvertované hydrogen siřičitanem ze vzorku krve od zdravého dárce. Sloupek u přidávání 15 představuje kontrolu dokončení konverze hydrogen siřičitanem.**



**Obrázek 6. Záznam pyrogramu získaný z analýzy nemethylované DNA konvertované hydrogen siřičitanem ze vzorku krve od zdravého dárce. Sloupek u přidávání 15 představuje kontrolu dokončení konverze hydrogen siřičitanem.**



**Obrázek 7. Záznam pyrogramu získaný z analýzy vysoce methylované DNA konvertované hydrogen siřičitanem (methylovaná kontrolní DNA, je součástí dodávky). Sloupek u přidávání 15 představuje kontrolu dokončení konverze hydrogen siřičitanem.**

## Návod na řešení potíží

Tato příručka k odstraňování potíží může být užitečná při řešení všech vzniklých problémů. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vědečtí pracovníci, kteří pracují v technických službách společnosti QIAGEN, vám vždy ochotně odpoví na jakékoli dotazy týkající se informací či protokolů v této příručce nebo technologií přípravy vzorků či zpracování analýz (kontaktní informace najdete na zadní straně obálky nebo na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Poznámka:** Řešení všeobecných problémů s přístrojem jsou uvedena v *uživatelské příručce PyroMark Q24*.

### Komentáře a návrhy

---

#### Signály u kontroly bez templátu (negativní kontroly)

- |                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| a) Vzájemné signály sousedních jamek | Signál z jedné jamky je detekován v sousední jamce. Neumisťujte vzorky s vysokou intenzitou signálu vedle kontrolních jamek bez templátu.           |
| b) Kontaminace PCR                   | Používejte sterilní pipetovací špičky s filtry. Materiál, jako jsou vzorky, kontroly a amplikony, uchovávejte a extrahujte odděleně od činidel PCR. |

#### Slabá nebo neočekávaná sekvence

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| a) Nízká kvalita genomové DNA | Nízká kvalita genomové DNA může být příčinou selhání PCR. Provedte analýzu PCR vzorků elektroforézou (například na systému QIAxcel <sup>®</sup> nebo elektroforézou na agarózovém gelu). |
|-------------------------------|--|

## Komentáře a návrhy

---

### Výsledek „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo)

- a) Malá výška píku Příčinou nízkých píků mohou být chyby při přípravě PCR nebo vzorku před zahájením pyrosekvenování.
- Je důležité, aby všechny vzorky byly vakuovou hlavicí plně uchopeny. Dbejte, aby se vakuová hlavice zanořovala do vzorků pomalu a aby geometrie PCR destičky nebo proužku, použité imobilizaci DNA, umožňovala kompletní zachycení vzorků.
- Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v *uživatelské příručce systému PyroMark Q24*, a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte.
- V případě upozornění „Check“ (Ověřit) pečlivě porovnejte pyrogram s histogramem, který lze zobrazit kliknutím pravým tlačítkem myši v okně Pyrogram. Pokud naměřené píky odpovídají výškám sloupců histogramu, výsledek je platný. V jiném případě je doporučeno provést novou analýzu vzorku.
- b) Zobrazí se upozornění „Uncertain/Failed bisulfite conversion at dispensation: 15“ (Neurčitost/selhání konverze hydrogen siřičitanem při přidávání: 15)
- Zkontrolujte, zda je hodnota „Allowed percentage for passed quality“ (Povolené procento vyhovující kvality) a „Allowed percentage for check quality“ (Povolené procento kontroly kvality) nastavena na 7,0 a 10,0 (v uvedeném pořadí).
- Poznámka:** V případě hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo) je možné, že konverze hydrogen siřičitanem nebyla úplná, což může nepříznivě ovlivnit kvantifikaci methylationu.
- Ke konverzi hydrogen siřičitanem se doporučuje používat soupravu EpiTect Bisulfite Kit (kat. č. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (kat. č. 59144) nebo EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (kat. č. 59124) od společnosti QIAGEN a striktně dodržovat protokol konverze.

## Komentáře a návrhy

---

### Výrazné pozadí

- |  |  |
|--|--|
| a) Nesprávné skladování nukleotidů                         | Nukleotidy skladujte při teplotě 2 až 8 °C. Uchování při teplotách –15 až –25 °C může zvyšovat pozadí.                         |
| b) Krátká doba chlazení vzorků před pyrosekvenční analýzou | Vzorky uložte na držáku destiček PyroMark Q24 na 10 až 15 minut do prostoru s laboratorní teplotou. Doba chlazení nezkracujte. |
| c) Kontaminace kazety                                      | Kazetu pečlivě vyčistěte, jak je popsáno v návodu k výrobku. Uložte kazetu na místě chráněném před světlem a prachem.          |

### Žádné signály v pozitivní kontrole

- |   |  |
|---|--|
| a) Nedostatečné množství směsi enzymů nebo substrátů ve všech jamkách | Zkontrolujte, zda jste správně naplnili kazetu PyroMark Q24 podle zadání ve zprávě „Pre Run Information“ (Informace před spuštěním běhu) v nabídce „Tools“ (Nástroje).   |
| b) Činidla nebyla správně uskladněna nebo naředěna.                   | Připravte činidla <i>therascreen</i> podle pokynů v části „Protokol 5: Spuštění systému PyroMark Q24“ na straně 25.  |
| c) Chyba při přípravě PCR nebo vzorku                                 | Manipulační chyby při nastavení PCR, programování cyklu PCR nebo přípravě vzorku před zahájením pyrosekvenování mohou mít za následek ztrátu signálu. Pravidelně provádějte funkční test filtračních sond, jak je popsáno v <i>uživatelské příručce systému PyroMark Q24</i> , a v případě potřeby filtrační sondy vyměňte. Zopakujte PCR a pyrosekvenční analýzu. |

## Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN, certifikovaným podle ISO, je každá výrobní šarže souprav *therascreen* MGMT Pyro testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

## Omezení

Všechny generované diagnostické výsledky je nutno interpretovat společně s dalšími klinickými nebo laboratorními nálezy.

Každý uživatel je zodpovědný za platnost funkčnosti systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčnosti výrobků QIAGEN.



# Charakteristiky funkčních vlastností analýz

## Hodnoty meze slepého vzorku

Mez slepého vzorku (LOB, tabulka 9) byla stanovena pro čtyři lokace CpG analyzované soupravou *therascreen* MGMT Pyro Kit s použitím vzorků DNA získaných z krve zdravých dárců podle doporučení v pokynech Ústavu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A „Protokol pro určení mezí detekce a mezí kvantifikace, schválené pokyny“. Chyby  $\alpha$  a  $\beta$  (falešně pozitivní a falešně negativní) byly dány jako 5 %.

Hodnoty meze slepého vzorku (LOB) reprezentují četnosti methylationu získané ze vzorků krve zdravých dárců s pravděpodobností 95 %.

**Tabulka 9. Stanovená hodnota LOB pro specifické lokace methylationu pomocí vzorků krve zdravých dárců**

Poloha	LOB (% jednotek)
Lokace CpG 1	1,5
Lokace CpG 2	1,8
Lokace CpG 3	3,2
Lokace CpG 4	3,4
Střední hodnota lokace CpG 1 až 4	2,1

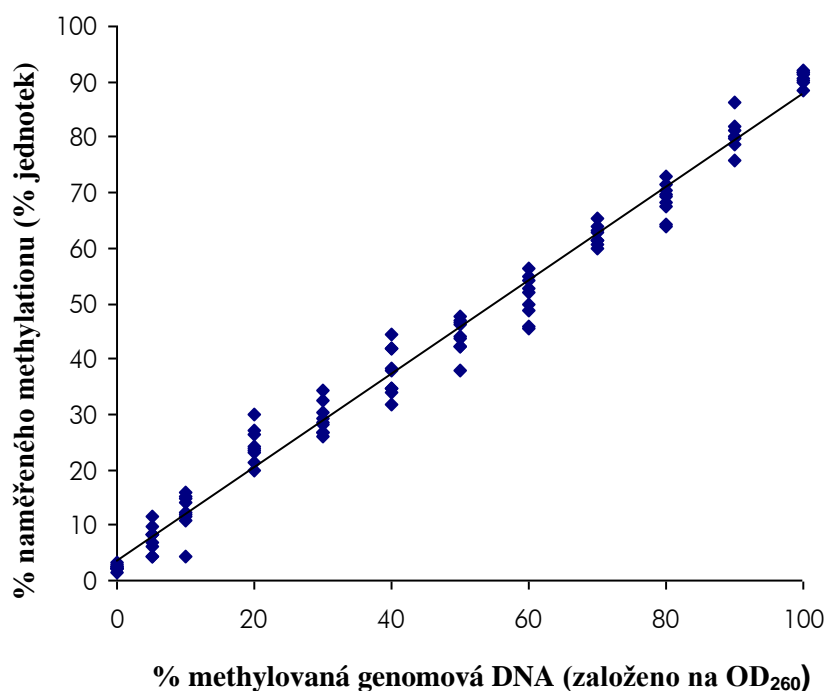
**Poznámka:** Je doporučeno funkčnost metody potvrdit v laboratoři.

## Linearita

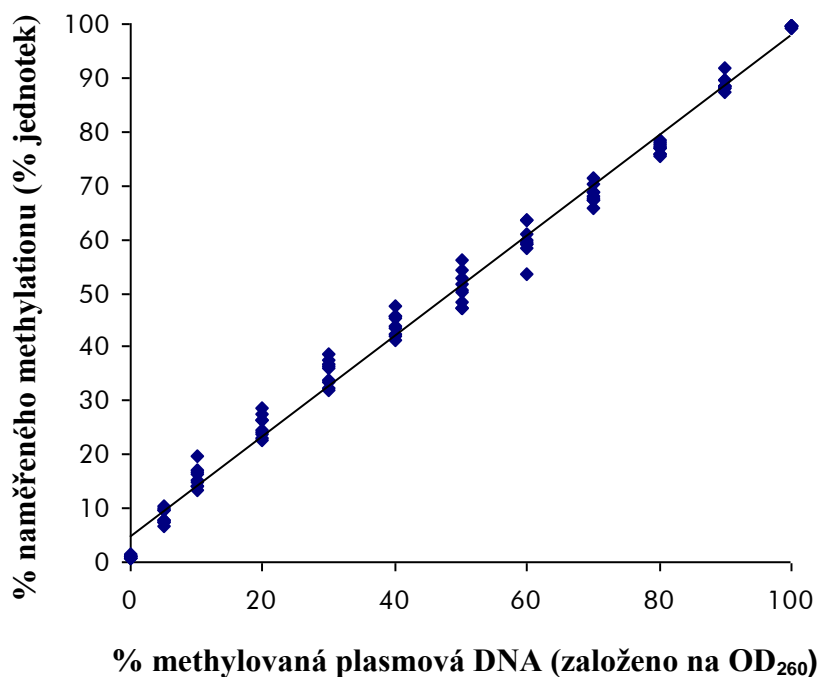
Pomocí směsí nemethylované a methylované genomové DNA konvertované hydrigen siřičitanem byla z kontrolní soupravy DNA EpiTect PCR (kat. č. 59104) a při souběžném použití směsí plasmidů přenášejících příslušnou sekvenci nemethylovaného nebo methylovaného vzorku (například přenášení nukleotidů C a T do lokací CpG) zjištěna linearita. Genomické DNA a plasmidy byly smíchány v poměrech tak, aby poskytly dvanáct úrovně methylationu (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 %). Každá směs byla analyzována třemi různými šaržemi soupravy *therascreen* MGMT Pyro Kit ve třech běžích pyrosekvenování, každý se třemi opakováními.

Výsledky (n = 9 pro každou úroveň výskytu mutací) byly analyzovány podle pokynu CLSI EP6-A „Hodnocení linearit kvantitativních měřicích postupů: statistická metoda; schválené pokyny“ pomocí softwaru Analyse-it<sup>®</sup> v2.21 (Analyse-it Software, Ltd., UK) a pro střední methylation lokace CpG 1 až 4 pomocí genomové nebo plasmové DNA jako templátu jsou zobrazeny na obrázku 8 a 9.

Výsledky byly lineární v rámci povolené nelinearity 5 % jednotek v testovaném rozmezí 0 až 100 % úrovní methylationu pro všechny lokace methylationu a pro střední hodnotu čtyř lokací methylationu.



**Obrázek 8.** Linearita střední hodnoty methylationu lokace CpG 1 až 4 pomocí směsí kontrolní DNA Epitect.



**Obrázek 9.** Linearita střední hodnoty methylationu lokace CpG 1 až 4 pomocí směsí kontrolní plasmové DNA.

## Přesnost

Tyto údaje o přesnosti umožňují stanovení celkové variability analýzy a byly získány třikrát opakovanými analýzami výše uvedených směsí genomové a plasmové DNA na třech různých úrovních.

Opakovatelnost (variabilita v rámci analýzy a mezi dávkami) byla vypočítána na základě dat sloužících ke stanovení linearity (tři běhy ve stejný den s různými šaržemi soupravy *therascreen* MGMT Pyro Kit). Střední přesnost (variabilita v rámci laboratoře) byla stanovena ve třech běžích v jedné laboratoři ve třech různých dnech s různými operátory, nástroji PyroMark Q24 a šaržemi soupravy *therascreen* MGMT Pyro Kit. Reprodukovatelnost (mezilaboratorní variabilita) byla vypočítána ze dvou běhů, jeden v interní a druhý v externí laboratoři, a při použití různých šarží soupravy *therascreen* MGMT Pyro Kit.

Odhady přesnosti jsou vyjádřeny jako směrodatná odchylka naměřených frekvencí středního methylationu v lokacích CpG 1 až 4 v % jednotkách (tabulka 10 a 11). Opakovatelnost, střední přesnost a reprodukovatelnost pomocí směsí genomových DNA dosahovala hodnot 0,5 – 4,3, 0,4 – 4,0 a 0,4 – 4,4 % v uvedeném pořadí, v měřeném rozsahu 0 až 100 % úrovně methylationu. Podobných výsledků bylo dosaženo pomocí směsí plasmové DNA (viz tabulka 11).

**Obrázek 10. Přesnost střední hodnoty methylationu lokace CpG 1 až 4 pomocí směsi kontrolní DNA\* EpiTect.**

% methylovaná kontrolní DNA EpiTect <sup>†</sup>	Opakovatelnost		Střední přesnost		Reprodukovatelnost	
	Střední hodnota	SD <sup>‡</sup>	Střední hodnota	SD	Střední hodnota	SD
0	2,4	0,5	2,2	0,4	2,6	0,7
5	7,1	2,7	7,7	2,5	9,3	3,9
10	12,8	2,2	12,9	2,3	15,3	3,3
20	23,7	2,3	23,6	2,2	24,2	2,6
30	29,8	2,6	31,0	2,6	30,4	3,0
40	36,7	3,3	37,0	3,6	38,1	3,7
50	44,1	2,9	44,8	3,6	44,2	2,7
60	51,3	3,6	52,4	3,5	51,2	3,3
70	62,3	1,9	62,8	2,1	61,2	2,9
80	68,6	3,1	69,4	3,1	66,9	3,4
90	80,6	3,3	79,5	2,2	77,0	4,3
100	90,8	1,2	91,7	2,1	90,0	1,9

\* Všechny hodnoty jsou dány jako % jednotky.

<sup>†</sup> Na základě měření OD<sub>260</sub>.

<sup>‡</sup> SD: standardní odchylka (n = 9 pro opakovatelnost a střední přesnost, n = 12 pro reprodukovatelnost).

**Tabulka 11. Přesnost střední hodnoty methylationu lokace CpG 1 až 4 pomocí směsí plasmové DNA\***

Plasmová směs DNA (%) <sup>†</sup>	Opakovatelnost		Střední přesnost		Reprodukovatelnost	
	Střední hodnota	SD <sup>‡</sup>	Střední hodnota	SD	Střední hodnota	SD
0	1,1	0,2	1,0	0,1	1,1	0,3
5	8,6	1,4	8,3	1,1	10,2	3,0
10	15,7	1,9	15,1	2,8	18,8	3,2
20	25,3	2,1	25,5	3,1	28,4	3,6
30	35,2	2,3	34,3	3,2	36,2	2,5
40	44,1	2,0	43,7	3,3	42,8	2,4
50	50,3	3,2	51,8	2,9	52,1	2,5
60	60,2	2,2	60,9	2,8	59,3	2,3
70	68,4	1,7	68,7	1,5	66,9	2,7
80	76,9	1,1	77,4	0,8	75,7	2,1
90	88,9	1,3	88,8	1,7	85,1	4,6
100	99,5	0,1	99,5	0,2	99,0	0,8

\* Všechny hodnoty jsou dány jako % jednotky.

<sup>†</sup> Na základě měření OD<sub>260</sub>. Hodnoty 0 – 100 % indikují poměr plasmidů nesoucích nukleotidy C v lokacích CpG (reprezentují methylované nukleotidy C) ve směsi s plasmidy nesoucími nukleotidy T v lokacích CpG (reprezentují nemethylované nukleotidy C).

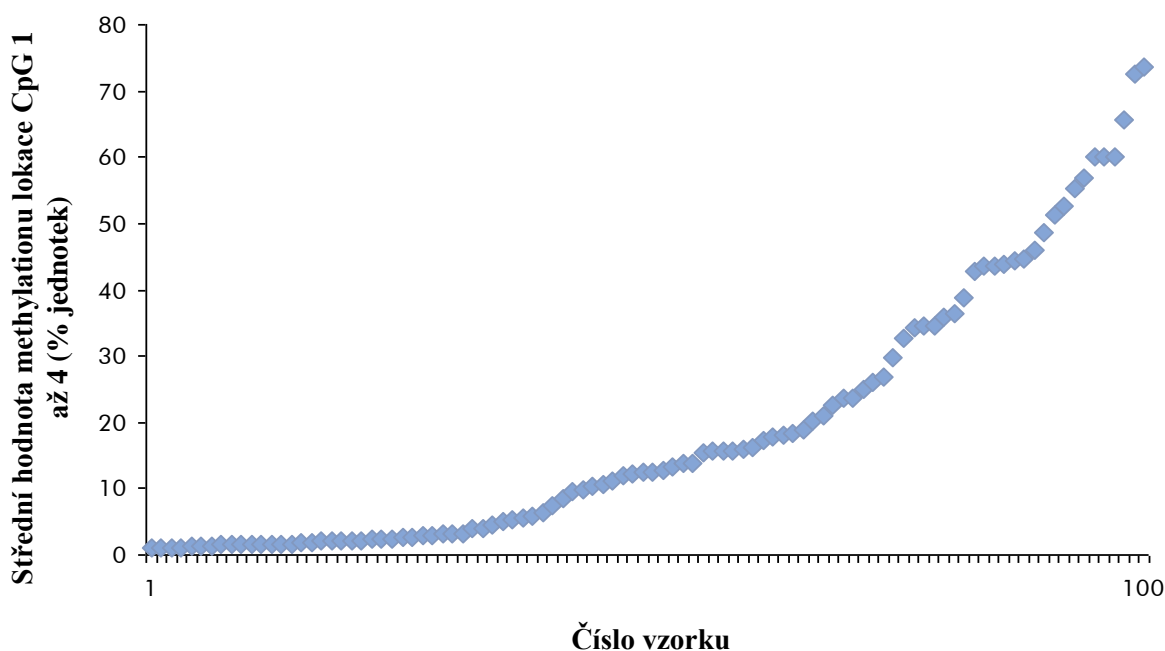
<sup>‡</sup> SD: standardní odchylka (n = 9 pro opakovatelnost a střední přesnost, n = 12 pro reprodukovatelnost).

## Diagnostické vyhodnocení

Souprava *therascreen* MGMT Pyro Kit byla hodnocena porovnáním se sekvenováním Sangerovou metodou. DNA byla extrahována ze 100 vzorků tumorů glioblastomů fixovaných formalinem, zalitých v parafinu (FFPE) a analyzovaných na methylation ve čtyřech lokacích CpG analyzovaných soupravou *therascreen* MGMT Pyro Kit.

DNA byla izolována pomocí soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit a konvertována hydrogen siřičitanem pomocí soupravy Epitect Bisulfite Kit. Pyrosekvenační analýza byla provedena soupravou *therascreen* MGMT Pyro Kit systémem PyroMark Q24 a sekvenováním Sangerovou metodou na genetickém analyzátoru ABI™ 3130.

Ze 100 vzorků analyzovaných sekvenováním Sangerovou metodou bylo možné stanovit stav methylationu ve 49 vzorcích, zatímco soupravou *therascreen* MGMT Pyro Kit bylo možné stanovit úroveň methylationu ve všech vzorcích. Střední úrovně methylationu mezi 1 a 74 % jednotek byly detekovány ve 100 vzorcích pyrosekvenační analýzou (obrázek 10). Rozložení úrovní methylationu pro jednotlivé lokace je zobrazeno na obrázku 11.



**Obrázek 10.** Střední hodnota methylationu lokace CpG 1 až 4 získaná ze 100 vzorků glioblastomu pomocí soupravy *therascreen* MGMT Pyro Kit. Vzorky jsou řazeny podle vzestupné úrovně methylationu.



**Tabulka 12. Výsledky analýzy methylovaných vzorků v lokacích CpG 1 až 4 pro analyzované vzorky glioblastomu**

Souprava <i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit	Sekvenování Sangerovou metodou			
	Nemethylované	Methylované	Neznámé	Celkem
Nemethylované	17	0	18	35
Methylované	2	32	31	65
Neznámé	0	0	0	0
Celkem	19	32	49	100

**Poznámka:** Ve všech běžích použitých k determinaci výkonnostních charakteristik signál převyšoval 30 RLU při běžné analýze 10 ng DNA izolované z krve (měřeno před konverzí hydrogen siřičitanem).















## Odkazy

Společnost QIAGEN udržuje velkou aktuální online databázi vědeckých publikací využívajících produkty QIAGEN. Přehledné možnosti vyhledávání umožňují najít požadované články jednoduchým hledáním podle klíčových slov nebo určením aplikace, oblasti výzkumu, názvu atd.

Kompletní seznam odkazů na literaturu najdete v online referenční databázi QIAGEN na stránkách [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) nebo se můžete obrátit na technické služby společnosti QIAGEN nebo místního dodavatele.



## Symbols

 $\Sigma$	Obsahuje činidla pro <N> testů
	Datum použitelnosti
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Součásti
	Obsahuje
	Číslo
	Hydroxid sodný
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Teplotní omezení
	Výrobce
	Viz návod k použití



## Kontaktní údaje

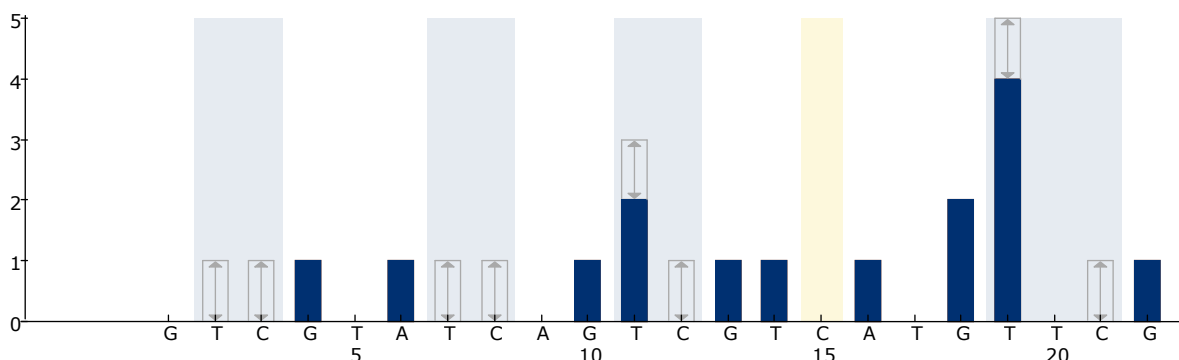
Technickou pomoc a další informace si vyhledejte v našem centru technické podpory na stránkách [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) nebo se obraťte telefonicky na některé z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN nebo místního distributora (viz zadní strana obálky nebo navštivte stránky [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Příloha A: Nastavení analýzy MGMT

Před prvním spuštěním analýzy MGMT je nutné nastavit soubor analýzy. Nastavte analýzu MGMT pomocí softwaru PyroMark Q24, jak je popsáno níže.


### Postup

1. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a vyberte možnost „New AQ Assay“ (Nová AQ analýza).
2. Do pole „Sequence to Analyze“ (Analyzovaná sekvence) zadejte následující sekvenci:  
YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT
3. Ručně zadejte následující „Dispensation Order“ (Pořadí přidávání nukleotidů):  
GTCGTATCAGTCGTCATGTTTCG
4. Klikněte na kartu „Analysis Parameters“ (Parametry analýzy) a u položky „Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:“ (Prahová hodnota výšky píku – požadovaná výška píku pro uznání kvality výsledku:) zvyšte hodnotu na 30.
5. Na kartě „Analysis Parameters“ (Parametry analýzy) nastavte parametry „Allowed percentage for passed quality“ (Povolené procento vyhovující kvality) a „Allowed percentage for check quality“ (Povolené procento kontroly kvality) nastavena na 7,0 a 10,0 (v uvedeném pořadí).
6. Na panelu nástrojů klikněte na tlačítko  a uložte analýzu jako „MGMT“.



**Obrázek 12. Histogram analýzy MGMT.** Sloupek u přidávání 15 představuje kontrolu dokončení konverze hydrogen siřičitanem.

## Příloha B: Vyprázdnění zásobníku a vaniček s odpadními tekutinami

<b>VÝSTRAHA</b> 	<b>Nebezpečné chemické látky</b> Denaturační roztok používaný ve vakuové stanici obsahuje hydroxid sodný, který dráždí oči a pokožku. Vždy používejte ochranné brýle, rukavice a laboratorní oděv. Zodpovědný orgán (například vedoucí laboratoře) musí přijmout nutná bezpečnostní opatření, která zajistí, aby okolní pracoviště bylo bezpečné a pracovníci obsluhující přístroje nebyli vystaveni nebezpečným úrovním toxických látek (chemických či biologických) dle údajů v příslušných bezpečnostních listech (SDS) nebo dokumentech OSHA*, ACGIH† nebo COSHH‡. Odvětrání výparů a likvidace odpadních látek musí být v souladu s národními, státními a místními zdravotnickými a bezpečnostními předpisy.
--	---

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Úřad pro ochranu zdraví a bezpečnosti při práci) (USA)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Americká konference státních průmyslových hygieniků) (USA)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrola látek škodlivých zdraví) (Spojené království)

Při likvidaci laboratorního odpadu zajistěte dodržování státních a místních předpisů o ochraně životního prostředí.

### Důležitý bod před zahájením

- Tento protokol vyžaduje vysoce čištěnou vodu.

### Postup

- B1. Zkontrolujte, že do vakuové hlavice není zavedeno vakuum. Ujistěte se, že přívod vakua je zavřený (Off) a vakuová pumpa je vypnutá.**
- B2. Zlikvidujte všechny roztoky, které zbyly ve vaničkách.**
- B3. Vypláchněte vaničky vysoce čištěnou vodou, v případě potřeby je vyměňte.**
- B4. Vyprázdňte zásobník s odpadními tekutinami.**
- B5. Víčko lze odejmout bez nutnosti odpojení hadiček.**
- B6. Je-li nutné vakuovou stanicí vyčistit (například kvůli prachu nebo potřísnění tekutinami), postupujte dle pokynů v *uživatelské příručce systému PyroMark Q24*.**

## Informace pro objednávky

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit (48)	Pro 48 reakcí na systémech PyroMark Q24: Seq primery, PCR primery, methylovaná kontrolní DNA, PCR master mix PyroMark, koncentrát CoralLoad, vazebný pufr PyroMark, hybridizační pufr PyroMark, denaturační roztok PyroMark, promývací pufr PyroMark, směs enzymů, směs substrátů, nukleotidy dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP a H <sub>2</sub> O	971061
<b>Příslušenství</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24jamkové reakční destičky na sekvenování	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kazety na přidávání nukleotidů a činidel	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Opakovaně použitelné sondy s filtrem k vakuové stanici PyroMark Q96 a Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Kontroly pro ověření systému při instalaci	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Kontroly pro ověření výkonu systému	979304
<b>Související produkty</b>		
PyroMark Q24 MDx	Detekční platforma na sekvenačním základě pro paralelní pyrosekvenování 24 vzorků	9001513
PyroMark Q24	Detekční platforma na sekvenačním základě pro paralelní pyrosekvenování 24 vzorků	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuová stanice (220 V) pro paralelní přípravu 24 vzorků jednořetězcové DNA z PCR produktu	9001517* 9001515†

\* pouze ve Spojeném království.

† ostatní státy

<b>Výrobek</b>	<b>Obsah</b>	<b>Kat. č.</b>
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuová stanice (220 V) pro paralelní přípravu 24 vzorků jednořetězcové DNA z PCR produktu	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Aplikační software	9019063
PyroMark Q24 Software	Software pro analýzu	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Souprava na přípravu 50 vzorků DNA: 50 kolonek QIAamp MinElute <sup>®</sup> , proteináza K, pufr, sběrné zkumavky (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Souprava pro přípravu 48 vzorků: kazety na činidla (tkáňová), jednorázové špičky s filtrem, jednorázové držáky špiček, zkumavky na odběr vzorků (2 ml), eluční zkumavky (1,5 ml), pufr G2, proteináza K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Souprava pro přípravu 50 vzorků: odstředivací kolonky QIAamp Mini Spin, pufr, činidla, zkumavky, přípojky na vakuum	61104
EpiTect Bisulfite Kit	Souprava pro přípravu 48 vzorků: odstředivací kolonky EpiTect Bisulfite Spin, reakční směs, pufr na ochranu DNA, nosič RNA, pufr	59104
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit	Souprava pro přípravu 48 vzorků: odstředivací kolonky EpiTect DNA Spin, směs hydrogen siřičitanu, pufr na ochranu DNA, nosič RNA, pufr, deparafinizační roztok, pufr lýzy FTB	59144
EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit	Souprava pro přípravu 48 vzorků: odstředivací kolonky EpiTect DNA Spin, směs hydrogen siřičitanu, pufr na ochranu DNA, nosič RNA, pufr	59124

Výrobek	Obsah	Kat. č.
EpiTect PCR Control DNA Set (100)	Sada kontrolní lidské DNA (obsahující metylovanou i nemetylovanou DNA konvertovanou hydrogen siřičitanem a nekonvertovanou nemetylovanou DNA) pro 100 kontrolních PCR	59695

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty viz příslušný manuál soupravy QIAGEN nebo uživatelská příručka. Manuály k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od pracovníků technického servisu společnosti QIAGEN či místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, QIAxcel<sup>®</sup>, BioRobot<sup>®</sup>, CoralLoad<sup>®</sup>, EpiTect<sup>®</sup>, EZ1<sup>®</sup>, HotStarTaq<sup>®</sup>, MinElute<sup>®</sup>, Pyro<sup>®</sup>, Pyrogram<sup>®</sup>, PyroMark<sup>®</sup>, Pyrosequencing<sup>®</sup>, *therascreen*<sup>®</sup> (skupina QIAGEN); ABI<sup>™</sup> (Life Technologies); Analyse-it<sup>®</sup> (Analyse-it Software, Ltd., UK); Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore Corporation); Sepharose<sup>®</sup> (GE Healthcare); Variomag<sup>®</sup> (Florida Scientific Services, Inc.); Windows<sup>®</sup> (Microsoft Corporation).

#### Ujednání o omezené licenci

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel soupravy *therascreen* MGMT Pyro Kit svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Soupravu *therascreen* MGMT Pyro Kit je dovoleno používat výhradně v souladu s *příručkou k soupravě* *therascreen* MGMT Pyro a je určena k použití pouze s přibalenými součástmi. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsaných v *příručce k soupravě* *therascreen* MGMT Pyro a dalších protokolech dostupných na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje také žádné záruky, že tato souprava nebo její užívání nezasahuje do práv třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN odmítá jakékoliv jiné licence, výslovné nebo předpokládané, než ty výslovně uvedené.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly vést k výše uvedenému zakázanému jednání nebo jej usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy vyplývající z tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy, včetně poplatků za právní zástupce, v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

© 2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ Orders 1-800-243-800 ■ 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 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ 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 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

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

**Korea (South)** ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

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

**Mexico** ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

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

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

**Singapore** ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

**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)

