

# *therascreen*<sup>®</sup> UGT1A1 Pyro<sup>®</sup> Kit Εγχειρίδιο



Έκδοση 1

**IVD**

Για διαγνωστική χρήση in vitro

**CE**

**REF**

971540

**HB**

1061270EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

**R3**

**MAT**

1061270EL



# Τεχνολογίες δείγματος και ανάλυσης της QIAGEN

Η QIAGEN είναι ο κορυφαίος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης για την απομόνωση και την ανίχνευση του περιεχομένου βιολογικών δειγμάτων οποιοδήποτε τύπου. Τα προηγμένα και υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας εξασφαλίζουν την επιτυχία από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

## Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στις αναλύσεις νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών δειγμάτων και ανάλυσης

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση της επιτυχίας σας και της επίτευξης καινοτόμων ανακαλύψεων. Για περισσότερες πληροφορίες επισκεφθείτε μας στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## **Περιεχόμενα**

<b>Προβλεπόμενη χρήση</b>	<b>5</b>
<b>Σύνοψη και επεξήγηση</b>	<b>5</b>
<b>Αρχή λειτουργίας διαδικασίας</b>	<b>6</b>
Πρότυπα ελέγχου	7
<b>Παρεχόμενα υλικά</b>	<b>8</b>
Περιεχόμενα του kit	8
<b>Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται</b>	<b>10</b>
Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας	11
<b>Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις</b>	<b>11</b>
Πληροφορίες ασφαλείας	11
Γενικές προφυλάξεις	12
<b>Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων</b>	<b>13</b>
<b>Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων</b>	<b>13</b>
<b>Διαδικασία</b>	<b>14</b>
Απομόνωση DNA	14
Πρωτόκολλ	
■ 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24	15
■ 2: PCR με τη χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit	18
■ 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance	21
■ 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24	23
■ 5: Εκτέλεση ανάλυσης στο σύστημα PyroMark Q24	27
■ 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24	30
<b>Ερμηνεία αποτελεσμάτων</b>	<b>31</b>
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	34
<b>Ποιοτικός έλεγχος</b>	<b>37</b>
<b>Περιορισμοί</b>	<b>37</b>
<b>Χαρακτηριστικά απόδοσης</b>	<b>37</b>
Ακρίβεια	37
Διαγνωστική αξιολόγηση	38
<b>Αναφορές</b>	<b>40</b>

<b>Σύμβολα</b>	<b>41</b>
<b>Πληροφορίες επικοινωνίας</b>	<b>41</b>
<b>Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro</b>	<b>42</b>
<b>Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανών</b>	<b>44</b>
<b>Πληροφορίες παραγγελίας</b>	<b>46</b>

## Προβλεπόμενη χρήση

Το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit είναι μια εξέταση ανίχνευσης *in vitro* βασιζόμενη στην αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων, η οποία βασίζεται στην Pyrosequencing® (τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού), για τη γονιδιακή αποτύπωση των παραλλαγών αλληλόμορφων \*28 και \*6 του ανθρώπινου γονιδίου UGT1A1 σε γενωμικό DNA προερχόμενο από δείγματα ανθρώπινου ιστού.

Το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit προορίζεται για την παροχή πληροφοριών στους κλινικούς ερευνητές ως βοήθημα για την επιλογή ασθενών με μεγαλύτερο κίνδυνο για μειωμένη δραστηριότητα του γονιδίου UDP τρανσφεράσης του γλυκουρονικού οξέος. Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Για χρήση μόνο με το σύστημα PyroMark® Q24. Τα συστήματα PyroMark Q24 περιέχουν τα παρακάτω:

- Το όργανο PyroMark® Q24 και το όργανο PyroMark Q24 MDx.
- Το σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 και το σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 MDx.
- Το λογισμικό PyroMark Q24 (έκδοση 2.0) και το λογισμικό PyroMark Q24 MDx (έκδοση 2.0).

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες χρήστες, όπως τεχνικούς και ιατρούς, που έχουν εκπαιδευτεί σε διαγνωστικές διαδικασίες *in vitro*, σε τεχνικές μοριακής βιολογίας και στη χρήση του συστήματος PyroMark Q24.

## Σύνοψη και επεξήγηση

Το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit χρησιμοποιείται για τη γονιδιακή αποτύπωση της παραλλαγής αλληλόμορφου \*28 (για τη διάκριση μεταξύ 6 και 7 TA επαναλήψεις) και της παραλλαγής αλληλόμορφου \*6 (για τη διάκριση μεταξύ G και A γονότυπου) του ανθρώπινου γονιδίου UGT1A1.

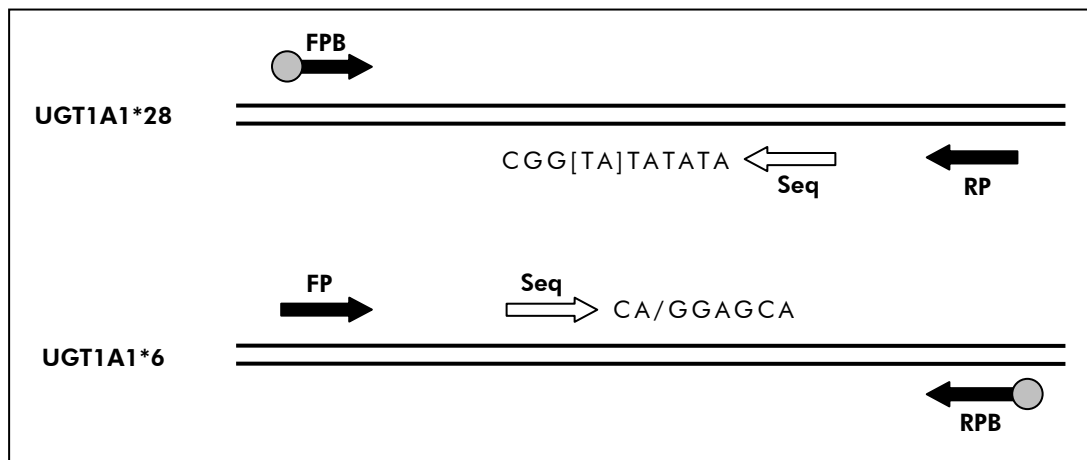
Το kit αποτελείται από δύο αναλύσεις PCR (Εικόνα 1) για τη γονιδιακή αποτύπωση:

- της παραλλαγής αλληλόμορφου \*28
- της παραλλαγής αλληλόμορφου \*6

Οι δύο περιοχές πολλαπλασιάζονται ξεχωριστά με αντίδραση PCR και υποβάλλονται σε προσδιορισμό αλληλουχίας μέσω της καθορισμένης περιοχής. Οι αλληλουχίες που περιβάλλουν τις καθορισμένες θέσεις χρησιμοποιούνται ως κορυφές κανονικοποίησης και αναφοράς για τη γονιδιακή αποτύπωση και την ποιοτική αξιολόγηση της ανάλυσης.

Η αλληλουχία της παραλλαγής αλληλόμορφου \*28 προσδιορίζεται με αντίστροφο προσανατολισμό και της παραλλαγής αλληλόμορφου \*6 με πρόσθιο προσανατολισμό.

Το προϊόν αποτελείται από μείγμα εκκινητή PCR και εκκινητή αλληλούχισης για κάθε ανάλυση. Οι εκκινητές παρέχονται υπό μορφή διαλύματος. Κάθε φιαλίδιο περιέχει 24 μl από κάθε εκκινητή ή μείγμα εκκινητή.



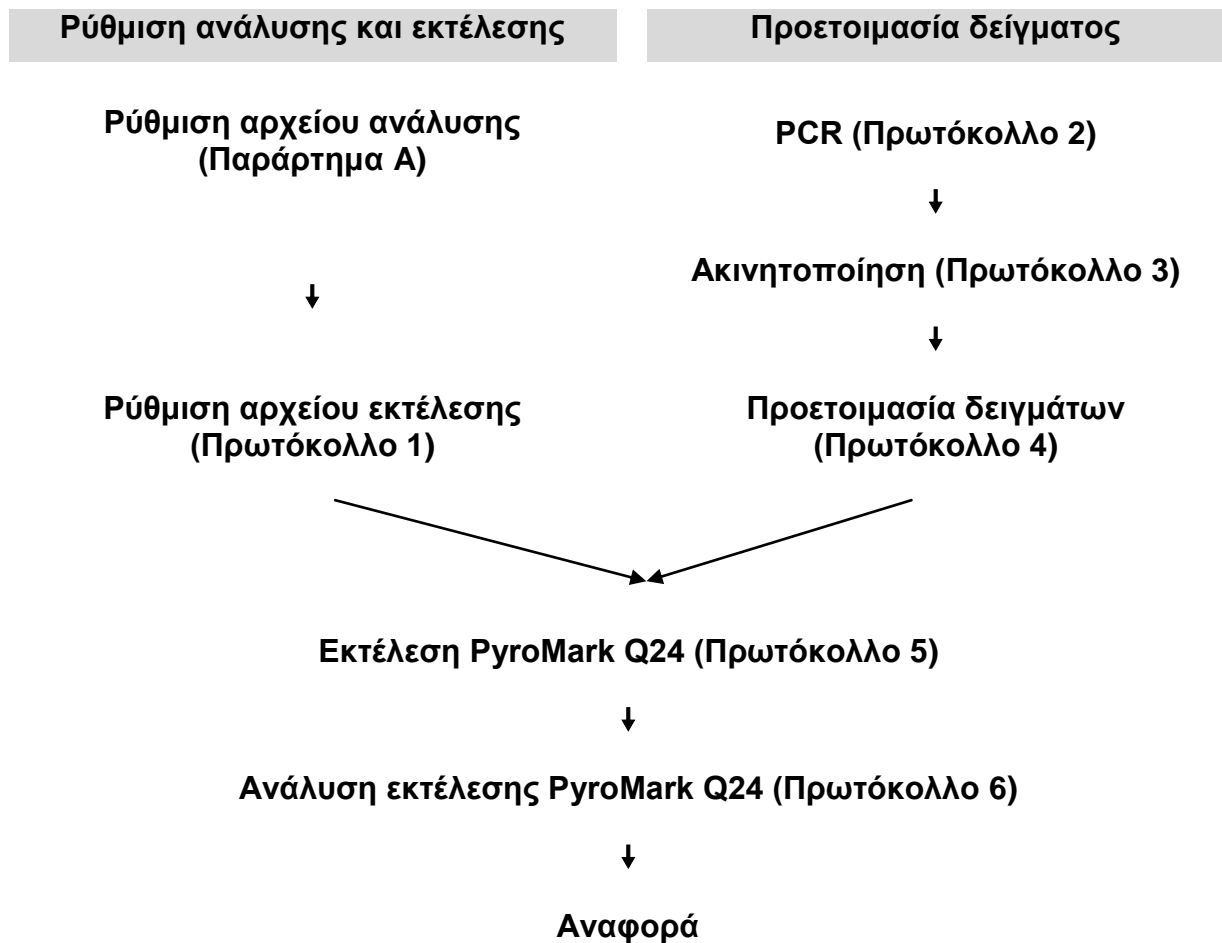
**Εικόνα 1. Απεικόνιση της ανάλυσης UGT1A1.** Η αλληλουχία που υποδεικνύεται είναι η αλληλουχία που υποβλήθηκε σε ανάλυση με πολυμορφικά νουκλεοτίδια που επισημαίνονται με αγκύλες ή κάθετο. Μέρος των TA επαναλήψεων που αναλύθηκαν με τη UGT1A1 \*28 ανάλυση καλύπτονται από τον εκκινητή αλληλούχισης. **FP, FPB:** Πρόσθιοι εκκινητές PCR (το B συμβολίζει τη βιοτινυλίωση), **RP, RPB:** Αντίστροφοι εκκινητές PCR (το B συμβολίζει τη βιοτινυλίωση), **Seq:** Εκκινητές αλληλούχισης.

## Αρχή λειτουργίας διαδικασίας

Η ροή εργασιών στη σελίδα 7 απεικονίζει τη διαδικασία της ανάλυσης. Μετά την PCR με τη χρήση εκκινητών για τη στόχευση των παραλλαγών αλληλόμορφων \*28 και \*6, τα αμπλικόνια ακινητοποιούνται σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose® High Performance. Προετοιμάζεται το μονόκλωνο DNA και οι αντίστοιχοι εκκινητές αλληλούχισης υπόκεινται σε υβριδισμό με το DNA. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύονται στο σύστημα PyroMark Q24 με τη βοήθεια ενός αρχείου ρύθμισης εκτέλεσης και ενός αρχείου εκτέλεσης.

**Σημείωση:** Η ροή εργασίας έχει τροποποιηθεί ελαφρώς σε σύγκριση με το *PyroMark Q24 User Manual* (βλέπε “Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24”, σελίδα 23).

## Ροή εργασιών της διαδικασίας *therascreen* UGT1A1 Pyro



### Πρότυπα ελέγχου

Το πρότυπο ελέγχου ανθρώπινου DNA περιλαμβάνεται στο κιτ ως θετικό πρότυπο ελέγχου για την PCR και τις αντιδράσεις αλληλούχισης. Αυτό το πρότυπο ελέγχου DNA έχει ένα ομόζυγο TA6/TA6 και G/G γονότυπο όταν αναλύονται για τις παραλλαγές αλληλόμορφου \* 28 και \* 6, αντίστοιχα.

Ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (χωρίς πρότυπο DNA) θα πρέπει να περιλαμβάνεται σε κάθε ρύθμιση PCR για μία τουλάχιστον ανάλυση.

## Παρεχόμενα υλικά


### Περιεχόμενα του ΚΙΤ

#### *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit (κουτί 1/2)

<b><i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>Αρ. καταλόγου</b>	<b>971480</b>
<b>Αριθμός αντιδράσεων</b>	<b>24</b>
Μείγμα εκκινητού PCR UGT1A1 *28	24 μl
Μείγμα εκκινητού PCR UGT1A1 Ex *6	24 μl
Εκκινητής αλληλούχισης UGT1A1 *28	24 μl
Εκκινητής αλληλούχισης UGT1A1 *6	24 μl
Κύριο μείγμα PCR PyroMark, 2x	850 μl
Συμπύκνωμα CoralLoad <sup>®</sup> , 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Πρότυπο ελέγχου ανθρώπινου DNA, 2 ng/μl	100 μl



## Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια *therascreen* (κουτί 2/2)

<b>Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια <i>therascreen</i></b>		
Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης PyroMark		10 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού PyroMark		10 ml
Διάλυμα μετουσίωσης PyroMark*		250 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PyroMark, 10x		25 ml
Μείγμα ενζύμων		1 φιαλίδιο
Μείγμα υποστρώματος		1 φιαλίδιο
dATP $\alpha$ S		1180 $\mu$ l
dCTP		1180 $\mu$ l
dGTP		1180 $\mu$ l
dTTP		1180 $\mu$ l
Εγχειρίδιο		1

\* Περιέχει υδροξείδιο του νατρίου.

## Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλ. “Απομόνωση DNA”, σελίδα 14)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)\*
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας (με φίλτρα για ρύθμιση PCR)
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος\*
- Θερμοκυκλοποιητής\* και κατάλληλα σωληνάρια PCR
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, αρ. κατ. 17-5113-01, [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9001513 ή 9001514)\*<sup>†</sup>
- Λογισμικό PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9019062 ή 9019063)<sup>†</sup>
- Πλάκα PyroMark Q24 (αρ. κατ. 979301)<sup>†</sup>
- Φυσίγγιο PyroMark Q24 (αρ. κατ. 979302)<sup>†</sup>
- Σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 (αρ. κατ. 9001515 ή 9001517)\*<sup>†</sup>
- Αναδευτήρας πλάκας\* για ακινητοποίηση σε σφαιρίδια (βλέπε “Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας, σελίδα 11)
- Μονάδα θέρμανσης\* με δυνατότητα επίτευξης θερμοκρασίας 80°C
- Πλάκα PCR 24 φρεατίων ή ταινίες PCR
- Πώματα για τις ταινίες
- Νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q<sup>®</sup> 18,2 MΩ x cm ή ισοδύναμο).  
**Σημείωση:** Παρέχεται επαρκής ποσότητα νερού στο κιτ για PCR, μονιμοποίηση DNA και για τη διάλυση του μείγματος ενζύμων και του μείγματος υποστρώματος. Απαιτείται πρόσθετη ποσότητα νερού υψηλής καθαρότητας για την αραίωση του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης PyroMark, 10x.
- Αιθανόλη (70%)<sup>‡</sup>

\* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

<sup>†</sup> Με σήμανση CE-IVD σύμφωνα με την Οδηγία 98/79/EK της ΕΕ. Κανένα από τα υπόλοιπα προϊόντα που παρατίθενται στον κατάλογο δεν φέρει σήμανση CE-IVD βάσει της Οδηγίας 98/79/EK της ΕΕ.

<sup>‡</sup> Μην χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη, η οποία περιέχει και άλλες ουσίες, όπως η μεθανόλη ή μεθυλαιθυλοκετόνη.

## Συνιστώμενοι αναδευτήρες πλάκας

Οι αναδευτήρες πλάκας που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 συνιστώνται για τη χρήση με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit.

**Πίνακας 1. Αναδευτήρες πλάκας που συνιστώνται για τη χρήση με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit**

Κατασκευαστής	Προϊόν	Αριθ. καταλόγου
	Θερμικός αναμεικτήρας comfort (Βασική συσκευή)	5355 000.011
Eppendorf	Μονάδα θέρμανσης για MTP	5363 000.012
	Πλάκας προσαρμογής για 96 x 0,2 ml PCR σωληνάρια για τοποθέτηση σε μονάδες για πλάκες μικροπιλοποίησης	5363 007.009
		51410
H+P Labo technik Gmbh	Variomag® Teleshake	(115 V = 51410 U)
		51110
	Variomag Monoshake	(115 V = 51110 U)

## Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση In Vitro

### Πληροφορίες ασφαλείας

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Αυτά διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), όπου μπορείτε να βρείτε, να εμφανίσετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit της QIAGEN®, καθώς και για τα περιεχόμενά του.

Οι παρακάτω δηλώσεις επικινδυνότητας και προφυλάξεων αφορούν τα συστατικά του *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit.

#### PyroMark Denaturation Solution



Προσοχή! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα. Σκουπίστε τη χυμένη ποσότητα για να προλάβετε υλικές ζημιές. Να διατηρείται μόνο στον αρχικό περιέκτη. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά

ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/ πρόσωπο.

### PyroMark Enzyme Mixture



Περιέχει: (R\*,R\*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Κίνδυνος! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/ πρόσωπο.

### PyroMark Substrate Mixture



Περιέχει: acetic acid. Προσοχή! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε/ Επισκεφθείτε γιατρό. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/ πρόσωπο.

## Γενικές προφυλάξεις

**Σημείωση:** Ο χρήστης πρέπει να λαμβάνει πάντοτε υπόψη του τα εξής:

- Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο του χρήστη είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Δεν συνιστάται η αραίωση των αντιδραστηρίων, με τρόπο που δεν προβλέπεται από το παρόν εγχειρίδιο, καθώς κάτι τέτοιο θα οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης.
- Η ροή εργασίας έχει τροποποιηθεί ελαφρώς (βλέπε “Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24”, σελίδα 23) σε σύγκριση με το *Εγχειρίδιο χρήση PyroMark Q24*.
- Τα συστατικά αυτού του προϊόντος επαρκούν για την εκτέλεση 24 αντιδράσεων σε μέχρι και 5 ανεξάρτητες εκτελέσεις.
- Χρησιμοποιείτε αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας με φίλτρα (για ρύθμιση της PCR).
- Αποθηκεύετε και του μείγματος τα θετικά υλικά (δείγματα, θετικά πρότυπα ελέγχου και αμπλικόνια) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετε τα στο μείγμα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο.
- Αποψύχετε πλήρως όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από την έναρξη μιας ανάλυσης.

- Μετά την απόψυξη, αναμείξτε τα συστατικά με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με παλμική ανάδευση) και φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα.
- Λανθασμένα αποτελέσματα δεν αποτελούν βάση για την αξιολόγηση κατάστασης μεταλλάξεων.

## Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit παρέχεται σε δύο κουτιά. Το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit (κουτί 1/2) μεταφέρεται σε ξηρό πάγο. Το κύριο μείγμα PCR PyroMark, το συμπύκνωμα CoralLoad, το πρότυπο ελέγχου DNA και όλοι οι εκκινητές πρέπει να αποθηκεύονται μετά την παραλαβή σε θερμοκρασίες από  $-30$  μέχρι  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Τα ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια *therascreen* (κουτί 2/2) που περιέχουν τα ρυθμιστικά διαλύματα, το μείγμα ενζύμων, το μείγμα υποστρώματος και τα αντιδραστήρια dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP και dTTP (δηλ. τα αντιδραστήρια για την ανάλυση Pyrosequencing) παραδίδονται σε ψυχόμενες συσκευασίες. Τα συστατικά αυτά πρέπει να αποθηκεύονται μετά την παραλαβή στους  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Για να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια δραστηριότητας, συνιστάται η φύλαξη τόσο του μείγματος ενζύμων όσο και του μείγματος υποστρώματος στα παρεχόμενα φιαλίδια.

Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 10 ημέρες στους  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Τα ανασυσταθέντα μείγματα ενζύμων και υποστρώματος μπορούν να καταψυχθούν και να αποθηκευτούν στα φιαλίδια τους στους  $-30$  μέχρι  $-15^{\circ}\text{C}$ . Κατεψυγμένα αντιδραστήρια δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε περισσότερους από 3 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

**Σημείωση:** Τα νουκλεοτίδια δεν πρέπει να καταψύχονται.

Το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit, όταν αποθηκεύεται υπό αυτές τις συνθήκες.

## Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων

Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά υλικά.

Το υλικό δείγματος είναι ανθρώπινο DNA που εκχυλίζεται από αίμα ή δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE).

Αντενδείκνυται η χρήση δειγμάτων από άτομα που υποβάλλονται σε θεραπευτική αγωγή με ηπαρίνη. Τα δείγματα αίματος που έχουν συλλεχθεί σε σωληνάρια που περιέχουν ηπαρίνη ως αντιπηκτικό, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται. Η ηπαρίνη επηρεάζει την PCR.

## Διαδικασία

### Απομόνωση DNA

Η απόδοση του συστήματος καθορίστηκε τη βοήθεια του EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue Kit και του QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit για την εκχύλιση ανθρώπινου DNA από δείγματα όγκου μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη. Για το σύστημα του QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, η απόδοση καθορίστηκε με τη βοήθεια δειγμάτων αίματος από υγιή δότη, στα οποία έχουν προστεθεί εν μέρει κύτταρα όγκου εξωγενώς.

Τα κιτ QIAGEN που αναφέρονται στον Πίνακα 2 συνιστώνται για καθαρισμό DNA από τους τύπους ανθρώπινων δειγμάτων που ενδείκνυται για χρήση σε συνδυασμό με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit. Εκτελέστε καθαρισμό DNA ακολουθώντας τις οδηγίες που παρατίθενται στα εγχειρίδια των κιτ.

**Πίνακας 2. Συνιστώμενα κιτ καθαρισμού DNA για χρήση σε συνδυασμό με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit**

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος	Αριθμός καταλόγου (QIAGEN)
Ιστός εγκλεισμένος σε παραφίνη	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Αίμα	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit <sup>†</sup>	61104

\* Σύμφωνα με το πρωτόκολλο για τη χρήση με ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη. Το EZ1 DNA Tissue Kit πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το EZ1 Advanced (αρ. κατ. 9001410 ή 9001411) και την EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9018298), με το EZ1 Advanced XL (αρ. κατ. 9001492) και την EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9018700) ή με το BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (αρ. κατ. 9000705, δεν κυκλοφορεί πλέον) και την EZ1 DNA Paraffin Section Card (αρ. κατ. 9015862).


<sup>†</sup> Με σήμανση CE-IVD σύμφωνα με την Οδηγία 98/79/EK της ΕΕ.

# Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24


## Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Δημιουργήστε ένα Assay Setup (Ρύθμιση ανάλυσης) όπως περιγράφεται στο “Παράρτημα Α Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* UGT1A1 Pyro”, σελίδα 44. Η διαδικασία αυτή πρέπει να πραγματοποιηθεί μία μόνο φορά, πριν από την πρώτη εκτέλεση των αναλύσεων *therascreen* UGT1A1 Pyro.

## Διαδικασία

1. **Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων.**  
Δημιουργείται ένα νέο αρχείο εκτέλεσης.
2. **Εισαγάγετε τις παραμέτρους της εκτέλεσης (βλ. “Παράμετροι εκτέλεσης” σελίδα 16).**
3. **Προετοιμάστε την πλάκα προσθέτοντας αναλύσεις για την παραλλαγή αλληλόμορφου \*28 και την παραλλαγή αλληλόμορφου \*6 σε φρεάτια που αντιστοιχούν στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν.**  
**Σημείωση:** Ένα αρνητικό δείγμα προτύπου ελέγχου (χωρίς πρότυπο DNA) πρέπει να συμπεριλαμβάνεται σε κάθε ρύθμιση PCR για τουλάχιστον μία ανάλυση.

**Σημείωση:** Συμπεριλάβετε ένα δείγμα με πρότυπο ελέγχου ανθρώπινου DNA για οποιαδήποτε ανάλυση ως θετικό πρότυπο ελέγχου για την PCR και αντιδράσεις αλληλουχίας (βλέπε “Πρότυπα ελέγχου”, σελίδα 7).

4. **Όταν η εκτέλεση έχει ρυθμιστεί και είναι έτοιμη να εκτελεστεί στο σύστημα PyroMark Q24, εκτυπώστε έναν κατάλογο με τους απαιτούμενες όγκους μείγματος ενζύμων, μείγματος υποστρώματος και νουκλεοτιδίων, καθώς και την καρτέλα με τη διάταξη της πλάκας. Επιλέξτε “Pre Run Information” (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση) από το μενού “Tools” (Εργαλεία) και, όταν εμφανιστεί η αναφορά, κάντε κλικ στο .**
5. **Κλείστε το αρχείο εκτέλεσης και αντιγράψτε το σε ένα USB stick (παρέχεται μαζί με το σύστημα) με τη βοήθεια της εφαρμογής Windows® Explorer.**

Οι εκτυπωμένες πληροφορίες πριν από την εκτέλεση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπο για την προετοιμασία του δείγματος (βλ. “Πρωτόκολλο 3: Ακινητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance”, σελίδα 21).

Για την ανάλυση της πλάκας στο σύστημα PyroMark Q24, βλ. “Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση ανάλυσης στο σύστημα PyroMark Q24”, σελίδα 27.

## Παράμετροι εκτέλεσης

Run name (Όνομα εκτέλεσης):	Το όνομα της εκτέλεσης παρέχεται κατά την αποθήκευση του αρχείου. Εάν αλλάξετε το όνομα του αρχείου, θα αλλάξει και το όνομα της εκτέλεσης.
Instrument method (Μέθοδος οργάνου):	Επιλέξτε τη μέθοδο οργάνου σύμφωνα με τα αντιδραστήρια και το φυσίγγιο που θα χρησιμοποιηθούν για την εκτέλεση. Ανατρέξτε στις οδηγίες που παρέχονται με τα προϊόντα.
Plate ID (Αναγνωριστικό πλάκας):	<b>Προαιρετικά:</b> Εισαγάγετε το αναγνωριστικό της πλάκας PyroMark Q24.
Bar code (Γραμμωτός κώδικας):	<b>Προαιρετικά:</b> Εισαγάγετε το γραμμωτό κώδικα για την πλάκα ή, αν υπάρχει συνδεδεμένη συσκευή ανάγνωσης γραμμωτού κώδικα στον υπολογιστή σας, τοποθετήστε το δρομέα του ποντικιού στο πλαίσιο κειμένου “Barcode” (Γραμμωτός κώδικας) (κάνοντας κλικ στο πλαίσιο) και σαρώστε το γραμμωτό κώδικα.
Reagent ID (Αναγνωριστικό κιτ και αντιδραστηρίου):	<b>Προαιρετικά:</b> Εισαγάγετε τον αριθμό παρτίδας για το <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit κουτί 1 και κουτί 2 που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Οι αριθμοί παρτίδας αναγράφονται στην ετικέτα του προϊόντος. <b>Σημείωση:</b> Συνιστούμε την εισαγωγή των αριθμών παρτίδας έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση τυχόν μη αναμενόμενων προβλημάτων με το <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit.
Run note (Σημείωση εκτέλεσης):	<b>Προαιρετικά:</b> Εισαγάγετε μια σημείωση σχετικά με τα συστατικά ή το σκοπό της εκτέλεσης.

## Προσθήκη αρχείων ανάλυσης

Για να προσθέσετε μια ανάλυση σε ένα φρεάτιο, έχετε δύο δυνατότητες:

- Κάντε δεξί κλικ στο φρεάτιο και επιλέξτε “Load Assay” (Φόρτωση ανάλυσης) από το θεματικό μενού.
- Επιλέξτε την ανάλυση στο φυλλομετρητή συντομεύσεων και, στη συνέχεια, κάντε κλικ και μετακινήστε την ανάλυση στο φρεάτιο.

Τα φρεάτια διαθέτουν χρωματική κωδικοποίηση σύμφωνα με την ανάλυση που φορτώνεται σε αυτά.



## **Εισαγωγή αναγνωριστικών των δειγμάτων και σημειώσεων**

Για να εισαγάγετε το αναγνωριστικό ενός δείγματος ή μια σημείωση, επιλέξτε το κελί και εισαγάγετε το κείμενο.

Για να επεξεργαστείτε ένα αναγνωριστικό δείγματος ή μια σημείωση, επιλέξτε το κελί (θα επιλεγούν τα τρέχοντα περιεχόμενα) ή κάντε διπλό κλικ στο κελί.

## Πρωτόκολλο 2: PCR με τη χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit

Το πρωτόκολλο αυτό αφορά ενισχύση περιοχής με την PCR για τη γονιδιακή αποτύπωση της παραλλαγής αλληλόμορφου \*28 και μια ξεχωριστή ενισχύση περιοχής με την PCR για τη γονιδιακή αποτύπωση της παραλλαγής αλληλόμορφου \*6 με τη χρήση του *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit.

### Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Η HotStarTaq<sup>®</sup> DNA πολυμεράση στο κύριο μείγμα PyroMark προϋποθέτει ένα βήμα ενεργοποίησης διάρκειας **15 λεπτών στους 95°C**.
- Προετοιμάστε όλα τα μείγματα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο από αυτόν που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό DNA, την προσθήκη πρότυπου DNA στην PCR, την ανάλυση προϊόντος PCR ή την προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση της αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού.
- Χρησιμοποιήστε ρύγχι μίας χρήσης που περιέχουν υδρόφοβα φίλτρα για να ελαχιστοποιήσετε την πιθανότητα επιμόλυνσης.

### Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Πριν ανοίξετε τα σωληνάρια με τους εκκινητές της PCR, φυγοκεντρίστε τα για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Προσαρμόστε τη συγκέντρωση του προτύπου ελέγχου και του δείγματος DNA στα 0,4–2 ng/μl, εάν είναι απαραίτητο.
- **Σημείωση:** Το πρότυπο ελέγχου ανθρώπινου που περιλαμβάνεται στο kit παρέχεται σε συγκέντρωση 2 ng/μl.

### Διαδικασία

- 1. Αποψύξτε όλα τα απαιτούμενα συστατικά.**  
Αναμείξτε τα καλά πριν από τη χρήση.
- 2. Προετοιμάστε ένα μείγμα αντίδρασης για κάθε σετ εκκινητή PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 3.**  
Το μείγμα αντίδρασης περιέχει συνήθως όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την PCR, εκτός από το δείγμα.

Προετοιμάστε μεγαλύτερη ποσότητα μείγματος αντίδρασης από αυτήν που απαιτείται για το συνολικό αριθμό αναλύσεων PCR που πρόκειται να εκτελεστούν.

**Πίνακας 3. Προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης για κάθε μείγμα εκκινήτη της PCR**

<b>Συστατικό</b>	<b>Όγκος/αντίδραση (μl)</b>
Κύριο μείγμα PCR PyroMark, 2x	12,5
Συμπύκνωμα CoralLoad, 10x	2,5
Μείγμα εκκινήτου PCR UGT1A1 παραλλαγής αλληλόμορφου *28 ή Μείγμα εκκινήτου PCR UGT1A1 παραλλαγής αλληλόμορφου *6	1,0
Νερό (H <sub>2</sub> O, παρέχεται)	4,0
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>20,0</b>

**3. Αναμείξτε σχολαστικά το μείγμα αντίδρασης και διοχετεύστε 20 μl σε κάθε σωληνάριο PCR.**

Δεν είναι απαραίτητο να διατηρείτε τα σωληνάρια PCR στον πάγο, καθώς η HotStarTaq DNA πολυμεράση είναι ανενεργή σε θερμοκρασία δωματίου.

**4. Προσθέστε 5 μl πρότυπου DNA (2–10 ng γενωμικού DNA) στα μεμονωμένα σωληνάρια PCR (βλέπε Πίνακα 4) και αναμείξτε προσεκτικά.**

**Σημείωση:** Ένα αρνητικό δείγμα προτύπου ελέγχου (χωρίς πρότυπο DNA) πρέπει να συμπεριλαμβάνεται σε κάθε ρύθμιση PCR για τουλάχιστον μία ανάλυση).

**Σημείωση:** Συμπεριλάβετε ένα δείγμα με πρότυπο ελέγχου ανθρώπινου DNA για οποιαδήποτε ανάλυση ως θετικό πρότυπο ελέγχου για την PCR και αντιδράσεις αλληλουχίας (βλέπε “Πρότυπα ελέγχου”, σελίδα 7).

**Πίνακας 4. Προετοιμασία της PCR**

<b>Συστατικό</b>	<b>Όγκος/αντίδραση (μl)</b>
Μείγμα αντίδρασης	20
Δείγμα DNA	5
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>25</b>

**5. Προγραμματίστε το θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 5.**

**Πίνακας 5. Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο κυκλοποίησης**

			<b>Σχόλια</b>
Αρχικό βήμα ενεργοποίησης:	15 λεπτά	95°C	Η HotStarTaq DNA πολυμεράση ενεργοποιείται σε αυτό το βήμα θέρμανσης.
<b>Κυκλοποίηση 3 βημάτων:</b>			
Μετουσίωση	20 δευτερόλεπτα	95°C	
Υβριδισμός	30 δευτερόλεπτα	53°C	
Επέκταση	20 δευτερόλεπτα	72°C	
Αριθμός κύκλων	42		
Τελική επέκταση:	5 λεπτά	72°C	

6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια PCR στο θερμοκυκλοποιητή και ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης.
7. Μετά την ενίσχυση, προχωρήστε στο “Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance”, σελίδα 21.

## Πρωτόκολλο 3: Ακίνητοποίηση των προϊόντων της PCR σε σφαιρίδια Streptavidin Sepharose High Performance

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αφορά την ακίνητοποίηση πρότυπου DNA σε Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) πριν από την ανάλυση στο σύστημα PyroMark Q24.

### Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Αφήστε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια και διαλύματα να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία.

### Διαδικασία

1. Ανακινήστε ελαφρώς τη φιάλη που περιέχει Streptavidin Sepharose High Performance μέχρι να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.
2. Προετοιμάστε ένα κύριο μείγμα για την ακίνητοποίηση DNA σύμφωνα με τον Πίνακα 6. Προετοιμάστε 10% μεγαλύτερη ποσότητα μείγματος από αυτήν που απαιτείται για το συνολικό αριθμό των αντιδράσεων που πρόκειται να εκτελεστούν.

Πίνακας 6. Κύριο μείγμα για ακίνητοποίηση DNA

Συστατικό	Όγκος/δείγμα (μl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης PyroMark	40
Νερό (H <sub>2</sub> O, παρέχεται)	28
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>70</b>

3. Προσθέστε 70 μl του κύριου μείγματος στα φρεάτια μιας πλάκας 24 φρεατίων ή ταινιών PCR, όπως έχει καθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. “Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24”, σελίδα 15).
4. Προσθέστε 10 μl βιοτινυλιωμένου προϊόντος PCR από το Πρωτόκολλο 2 σε κάθε φρεάτιο που περιέχει κύριο μείγμα, όπως έχει καθοριστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. “Πρωτόκολλο 2: PCR με τη χρήση των αντιδραστηρίων PCR που παρέχονται με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit”, σελίδα 18).  
Ο συνολικός όγκος ανά φρεάτιο πρέπει να ανέρχεται σε 80 μl μετά την προσθήκη του κύριου μείγματος και του προϊόντος PCR.
5. Σφραγίστε την πλάκα PCR (ή τις ταινίες) με τα ειδικά πώματα.  
Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει κίνδυνος διαρροής μεταξύ των φρεατίων.

**6. Αναδεύστε την πλάκα PCR σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για 5–10 λεπτά στις 1400 σ.α.λ.**

Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος, προετοιμάστε το σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 για την προετοιμασία δειγμάτων, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*.

**7. Προχωρήστε αμέσως στο “Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24”, σελίδα 23.**

**Σημείωση:** Τα σφαιρίδια σεφαρόζης καθιζάνουν γρήγορα. Η συλλογή των σφαιριδίων πρέπει να γίνει αμέσως μετά από την επόμενη ανάδευση.

Εάν έχουν περάσει περισσότερα από 1 λεπτά από την ανάδευση της πλάκας (ή των ταινιών), αναδεύστε ξανά για 1 λεπτό πριν από τη συλλογή των σφαιριδίων.

## Πρωτόκολλο 4: Προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αφορά την προετοιμασία μονόκλωνου DNA και τον υβριδισμό του εκκινητή αλληλούχισης στο πρότυπο πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού στο PyroMark Q24.

### Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Πριν ανοίξετε τα σωληνάρια με τους εκκινητές αλληλούχισης, φυγοκεντρίστε τα για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Προσθέστε τους 2 διαφορετικούς εκκινητές αλληλούχισης με τον ίδιο τρόπο όπως καθορίστηκε για την πλάκα κατά τη ρύθμιση του κύκλου (βλ. “Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24”, σελίδα 15), ανάλογα με την περιοχή της ανάλυσης (παραλλαγή αλληλόμορφου \*28 ή παραλλαγή αλληλόμορφου \*6).
- Η ροή εργασίας έχει τροποποιηθεί ελαφρώς σε σύγκριση με το *Εγχειρίδιο χρήση Pyro Kit Q24* (βήμα 18). Μη μειώνετε τον χρόνο της ψύξης των δειγμάτων μετά τη θέρμανση στους 80°C.
- Εκτελέστε τη δοκιμή λειτουργίας για τους καθετήρες με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *εγχειρίδιο χρήση PyroMark Q24* σε τακτά χρονικά διαστήματα και να ανταλλάσσετε τους καθετήρες με φίλτρο όταν ενδείκνυται.

### Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Τοποθετήστε ένα στήριγμα πλάκας PyroMark Q24 σε προθερμασμένη στους 80°C μονάδα θέρμανσης, για να χρησιμοποιηθεί στο βήμα 17. Αφήστε ένα δεύτερο στήριγμα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για να χρησιμοποιηθεί στο βήμα 18.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PyroMark παρέχεται υπό μορφή συμπυκνώματος 10x. Πριν από την πρώτη χρήση, προσθέστε νερό υψηλής καθαρότητας σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης PyroMark 10x για την επίτευξη τελικής όγκου 250 ml και να αποκτήσετε διάλυμα εργασίας 1x.

Το διάλυμα εργασίας ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 1x PyroMark είναι σταθερό στους 2–8°C μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.

### Διαδικασία

1. **Αραιώστε επαρκή ποσότητα κάθε εκκινητή αλληλούχισης (Εκκινητής αλληλούχισης UGT1A1 \*28 και Εκκινητής αλληλούχισης UGT1A1 \*6) στο ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού PyroMark όπως αναφέρεται στον Πίνακα 7.**

Προετοιμάστε μία μεγαλύτερη ποσότητα αραιωμένου εκκινητή αλληλούχισης από ό,τι απαιτείται για το συνολικό αριθμό δειγμάτων που πρόκειται να υποβληθούν σε προσδιορισμό αλληλουχίας (για τον αριθμό των δειγμάτων + ένα επιπλέον).

**Πίνακας 7. Παράδειγμα αραιώσης των εκκινητών αλληλούχισης**

Συστατικό	Όγκος/δείγμα (μl)	Όγκος για 9 + 1 αντιδράσεις (μl)
Εκκινητής αλληλούχισης UGT1A1 *28 ή Εκκινητής αλληλούχισης UGT1A1 Ex *6	0,8	8,0
Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού PyroMark	24,2	242,0
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>25,0</b>	<b>250,0</b>

2. Προσθέστε 25 μl από τον αραιωμένο εκκινητή αλληλούχισης σε κάθε φρεάτιο της πλάκας PyroMark Q24, σύμφωνα με τη ρύθμιση της εκτέλεσης (βλ. “Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24”, σελίδα 15).

Διατηρήστε ένα από τα στηρίγματα της πλάκας PyroMark Q24 (παρέχεται μαζί με το σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24) σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) και χρησιμοποιήστε τον ως στήριγμα κατά την προετοιμασία και τη μετακίνηση της πλάκας.

3. Τοποθετήστε την πλάκα (ή τις ταινίες) PCR από το Πρωτόκολλο 3 και την πλάκα PyroMark Q24 στον πάγκο εργασίας (Εικόνα 2).

Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα έχει τον ίδιο προσανατολισμό όπως και κατά τη φόρτωση των δειγμάτων.



**Εικόνα 2. Τοποθέτηση της πλάκας (ή των ταινιών) PCR και της πλάκας PyroMark Q24 στο σταθμό εργασίας υπό κενό.**

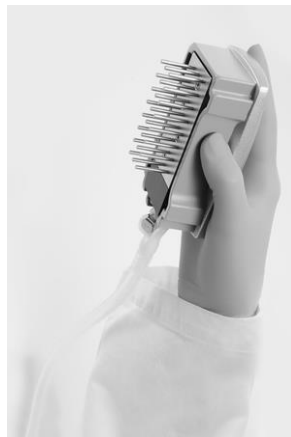


4. Εφαρμόστε κενό στο εργαλείο ενεργοποιώντας τη λειτουργία κενού.
5. Βυθίστε προσεκτικά τους καθετήρες με φίλτρο του εργαλείου κενού στην πλάκα (ή τις ταινίες) PCR για τη συλλογή των σφαιριδίων που περιέχουν το ακινητοποιημένο πρότυπο. Κρατήστε τους καθετήρες σε αυτήν τη θέση για 15 δευτερόλεπτα. Ανυψώστε το εργαλείο κενού με προσοχή.

**Σημείωση:** Τα σφαιρίδια σεφαρόζης καθιζάνουν γρήγορα. Η συλλογή των σφαιριδίων πρέπει να γίνει αμέσως μετά από την επόμενη ανάδευση.

Εάν έχουν περάσει περισσότερα από 1 λεπτά από την ανάδευση της πλάκας (ή των ταινιών), αναδεύστε, πριν από τη συλλογή των σφαιριδίων, ξανά για 1 λεπτό.

6. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στη λεκάνη που περιέχει 40 ml αιθανόλης 70% (Εικόνα 2). Εκτελέστε έκπλυση των καθετήρων με φίλτρο για 5 δευτερόλεπτα.
7. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στη λεκάνη που περιέχει 40 ml διαλύματος αποδιάταξης (Εικόνα 2). Εκτελέστε έκπλυση των καθετήρων με φίλτρο για 5 δευτερόλεπτα.
8. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στη λεκάνη που περιέχει 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Εικόνα 2). Εκτελέστε έκπλυση των καθετήρων με φίλτρο για 10 δευτερόλεπτα.
9. Ανυψώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, σε κατακόρυφη θέση και σε γωνία μεγαλύτερη από 90°, για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους καθετήρες με φίλτρο (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Απεικόνιση του εργαλείου κενού σε κατακόρυφη θέση με κλίση μεγαλύτερη των 90°.

10. Όσο διάστημα το εργαλείο κενού βρίσκεται πάνω από την πλάκα PyroMark Q24, κλείστε το διακόπτη κενού του εργαλείου (Off).
11. Ελευθερώστε τα σφαιρίδια στην πλάκα πλάκα PyroMark Q24 κατεβάζοντας τους καθετήρες με φίλτρο στο αραιωμένο εκκινητή αλληλούχισης και μετακινώντας το εργαλείο προσεκτικά από τη μία άκρη στην άλλη. Προσέξτε να μην καταστρέψετε την επιφάνεια της πλάκας PyroMark Q24 από το ξύσιμο με τους καθετήρες με φίλτρο.

12. Μεταφέρετε το εργαλείο κενού στη λεκάνη που περιέχει νερό υψηλής καθαρότητας (Εικόνα 2) και ανακινήστε το για 10 δευτερόλεπτα.
13. Καθαρίστε τους καθετήρες με φίλτρο βυθίζοντάς τους στο νερό υψηλής καθαρότητας (Εικόνα 2) και εφαρμόζοντας κενό. Εκτελέστε έκπλυση των καθετήρων με 70 ml νερού υψηλής καθαρότητας.
14. Ανυψώστε το εργαλείο κενού προς τα πάνω και πίσω, σε κατακόρυφη θέση και σε γωνία μεγαλύτερη από 90°, για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αποστραγγιστεί το υγρό από τους καθετήρες με φίλτρο (Εικόνα 3).
15. Κλείστε το διακόπτη κενού του εργαλείου (Off) και τοποθετήστε το εργαλείο κενού στη μόνιμη θέση (P).
16. Κλείστε την αντλία κενού.  
**Σημείωση:** Στο τέλος της εργάσιμης ημέρας, τα υγρά απόβλητα και τα υπολείμματα διαλυμάτων θα πρέπει να απορριφθούν και ο σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 να ελεγχθεί για σκόνη και διαρροές (βλέπε “Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανών”, σελίδα 44).
17. Θερμάνετε την πλάκα PyroMark Q24 με τα δείγματα στους 80°C για 2 λεπτά χρησιμοποιώντας το συγκρατητήρα πλάκας PyroMark Q24 που έχει προθερμανθεί.
18. Αφαιρέστε την πλάκα PyroMark Q24 από το ζεστό στήριγμα πλάκας και τοποθετήστε την σε ένα δεύτερο στήριγμα πλάκας PyroMark Q24 που διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) και αφήστε τα δείγματα να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10–15 λεπτά.
19. Προχωρήστε στο “Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση ανάλυσης στο σύστημα PyroMark Q24”, σελίδα 27.

## Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση ανάλυσης στο σύστημα PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιγράφει την προετοιμασία και τη φόρτωση των PyroMark Gold Q24 αντιδραστηρίων στο φυσίγγιο PyroMark Q24 και την έναρξη και ολοκλήρωση μιας εκτέλεσης στο σύστημα PyroMark Q24. Για λεπτομερή περιγραφή των ενεργειών που απαιτούνται για τη ρύθμιση μιας εκτέλεσης, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*.

### Σημαντική υπόδειξη πριν από την έναρξη

- Η αναφορά των πληροφοριών πριν από την εκτέλεση, που βρίσκεται στο μενού “Tools” (Εργαλεία) στη ρύθμιση εκτέλεσης (βλ. “Πρωτόκολλο 1: Ρύθμιση εκτέλεσης για το σύστημα PyroMark Q24”, σελίδα 15), παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον όγκο των νουκλεοτιδίων, των ενζύμων και του ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος που απαιτούνται για μια συγκεκριμένη εκτέλεση.

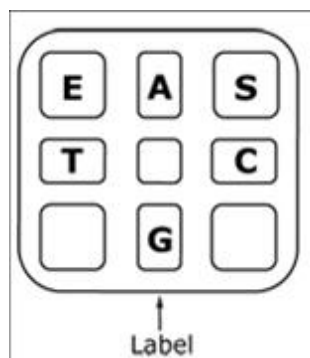
### Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Ενεργοποιήστε το σύστημα PyroMark Q24. Ο διακόπτης λειτουργίας βρίσκεται στην πίσω πλευρά του οργάνου.

### Διαδικασία

1. **Διαλύστε καθένα από τα μείγματα λυοφιλιωμένων ενζύμων και υποστρώματος σε 620 μl νερό (H<sub>2</sub>O, παρέχεται).**
2. **Αναμειξτε περιστρέφοντας προσεκτικά το φιαλίδιο.Μη στροβιλίζετε!**  
Για να διασφαλιστεί η πλήρης διάλυση του μείγματος, αφήστε το σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για 5–10 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι το διάλυμα δεν είναι θολερό πριν από την πλήρωση του φυσίγγιου PyroMark Q24. Αν τα αντιδραστήρια δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν αμέσως, τοποθετήστε τα φιαλίδια αντιδραστηρίων σε πάγο\* ή σε ψυγείο.
3. **Αφήστε τα αντιδραστήρια και το φυσίγγιο PyroMark Q24 να περιέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20–25°C).**
4. **Τοποθετήστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 με την ετικέτα στραμμένη προς το μέρος σας.**
5. **Γεμίστε το φυσίγγιο PyroMark Q24 με τον απαιτούμενο όγκο μειγμάτων νουκλεοτιδίων, ενζύμων και υποστρώματος σύμφωνα με την Εικόνα 4.**  
Βεβαιωθείτε ότι δεν μεταφέρονται φουσαλίδες αέρα από την πιπέτα στο φυσίγγιο.

\* Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.



**Εικόνα 4. Απεικόνιση φυσιγγίου PyroMark Q24 όπως φαίνεται από το πάνω μέρος.** Οι ενδείξεις αντιστοιχούν στην ετικέτα στα φιαλίδια αντιδραστηρίων. Προσθέστε το μείγμα ενζύμων (E), το μείγμα υποστρώματος (S) και τα νουκλεοτίδια (A, T, C, G) σύμφωνα με τις πληροφορίες όγκου που παρέχονται στην αναφορά πληροφοριών πριν από την εκτέλεση, στο μενού “Tools” (Εργαλεία) στη ρύθμιση εκτέλεσης.

6. **Ανοίξτε το διάφραγμα του φυσιγγίου και εισαγάγετε το γεμάτο φυσίγγιο αντιδραστηρίου με την ετικέτα προς τα έξω. Πιέστε το φυσίγγιο εντελώς προς τα μέσα και, στη συνέχεια, πιέστε το προς τα κάτω.**
7. **Βεβαιωθείτε ότι η γραμμή είναι ορατή μπροστά από το φυσίγγιο και κλείστε το διάφραγμα.**
8. **Ανοίξτε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και τοποθετήστε την πλάκα στη μονάδα θέρμανσης.**
9. **Κλείστε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και το καπάκι του οργάνου.**
10. **Εισαγάγετε το USB stick (που περιέχει το αρχείο εκτέλεσης) στη θύρα USB στο μπροστινό μέρος του οργάνου.**  
Μην αφαιρείτε το USB stick από τη θύρα πριν ολοκληρωθεί η εκτέλεση.
11. **Επιλέξτε “Run” (Εκτέλεση) στο κύριο μενού (χρησιμοποιώντας τα πλήκτρα οθόνης ▲ και ▼) και πατήστε “OK”.**
12. **Επιλέξτε το αρχείο εκτέλεσης χρησιμοποιώντας τα πλήκτρα οθόνης ▲ και ▼.**  
Για να προβάλετε τα περιεχόμενα ενός φακέλου, επιλέξτε το φάκελο και πατήστε “Select” (Επιλογή). Για να επιστρέψετε στην προηγούμενη προβολή, πατήστε “Back” (Πίσω).
13. **Όταν έχει επιλεγεί το αρχείο εκτέλεσης, πατήστε “Select” (Επιλογή), για να ξεκινήσει η εκτέλεση.**
14. **Όταν ολοκληρωθεί η εκτέλεση και το όργανο επιβεβαιώσει ότι το αρχείο εκτέλεσης έχει αποθηκευτεί στο USB stick, πατήστε “Close” (Κλείσιμο).**
15. **Αφαιρέστε το USB stick.**
16. **Ανοίξτε το καπάκι του οργάνου.**
17. **Ανοίξτε το διάφραγμα του φυσιγγίου και αφαιρέστε το φυσίγγιο αντιδραστηρίων ανασηκώνοντάς το και τραβώντας το προς τα έξω.**
18. **Κλείστε το διάφραγμα.**
19. **Ανοίξτε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και αφαιρέστε την πλάκα από το τη μονάδα θέρμανσης.**
20. **Κλείστε το πλαίσιο που συγκρατεί την πλάκα και το καπάκι του οργάνου.**

- 21. Απορρίψτε την πλάκα και καθαρίστε το φυσίγγιο σύμφωνα με τις οδηγίες στο δελτίο προϊόντος που συνοδεύει το φυσίγγιο.**
- 22. Εκτελέστε την ανάλυση της εκτέλεσης σύμφωνα με το “Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24”, σελίδα 30.**

## Πρωτόκολλο 6: Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιγράφει την ανάλυση της γωιδιακής αποτύπωσης μιας ολοκληρωμένης εκτέλεσης *therascreen* UGT1A1 με τη βοήθεια του λογισμικού PyroMark Q24.

### Διαδικασία

1. Εισαγάγετε στη θύρα USB του υπολογιστή το USB stick που περιέχει το αρχείο της διεξαχθείσης εκτέλεσης.
2. Μεταφέρετε το αρχείο εκτέλεσης από το USB stick στην επιθυμητή θέση στον υπολογιστή με τη βοήθεια της εφαρμογής Windows Explorer.
3. Ανοίξτε το αρχείο εκτέλεσης στον τρόπο λειτουργίας AQ του λογισμικού PyroMark Q24 είτε επιλέγοντας “Open” (Ανοιγμα) στο μενού “File” (Αρχείο) είτε με διπλό κλικ στο αρχείο (✓) στο φυλλομετρητή συντομεύσεων.
4. Για να εκτελέσετε την ανάλυση της εκτέλεσης και να λάβετε μια επισκόπηση των αποτελεσμάτων, κάντε κλικ σε ένα από τα κουμπιά ανάλυσης.



Ανάλυση όλων των φρεατίων.



Ανάλυση του επιλεγμένου φρεατίου.

Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης μιας εκτέλεσης, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*.

5. Για να δημιουργήσετε μια αναφορά, επιλέξτε “SNP Full Report” (Πλήρης αναφορά SNP) ή “SNP Analysis Results” (Αποτελέσματα ανάλυσης SNP) από το μενού “Reports”.

**Σημείωση:** Για αξιόπιστα αποτελέσματα συνιστούμε ύψη μονής κορυφής άνω των 30 RLU. Ρυθμίστε την τιμή 30 RLU ως “required peak height for passed quality” (απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα) στη ρύθμιση ανάλυσης (βλ. *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24* και “Παράρτημα Α: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* UGT1A1 Pyro”, σελίδα 42).

**Σημείωση:** Το Pyrogram<sup>®</sup> (χρωματογράφημα πυρόλυσης) πρέπει πάντα να συγκρίνεται με το ιστόγραμμα το οποίο μπορεί να εμφανίζεται με δεξί κλικ στο παράθυρο του χρωματογραφήματος πυρόλυσης. Οι μετρούμενες κορυφές πρέπει να ταιριάζουν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος.

## Ερμηνεία αποτελεσμάτων

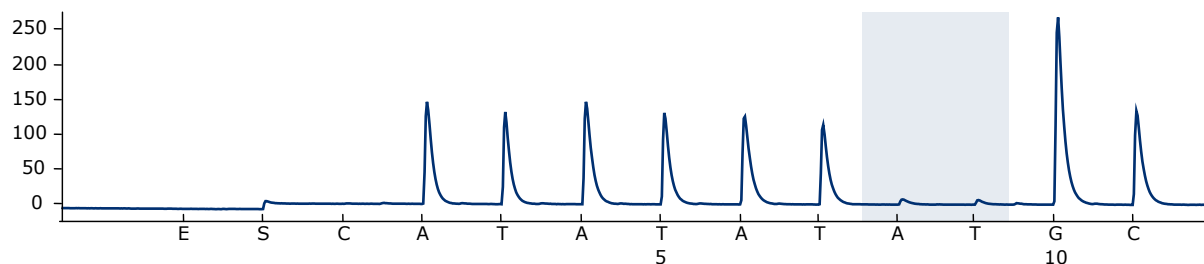
Το συμπεριλαμβανόμενο πρότυπο ελέγχου ανθρώπινου DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Αυτό το πρότυπο ελέγχου DNA έχει ένα ομόζυγο TA6/TA6 και γονότυπο G/G όταν αναλύονται για τις παραλλαγές αλληλόμορφου \*28 και \*6, αντίστοιχα.

Η ανάλυση γονιδιακής αποτύπωσης εκτελείται αυτόματα από το λογισμικό Q24 PyroMark και να παρέχεται στο “SNP Full Report” και “SNP Overview Report”.

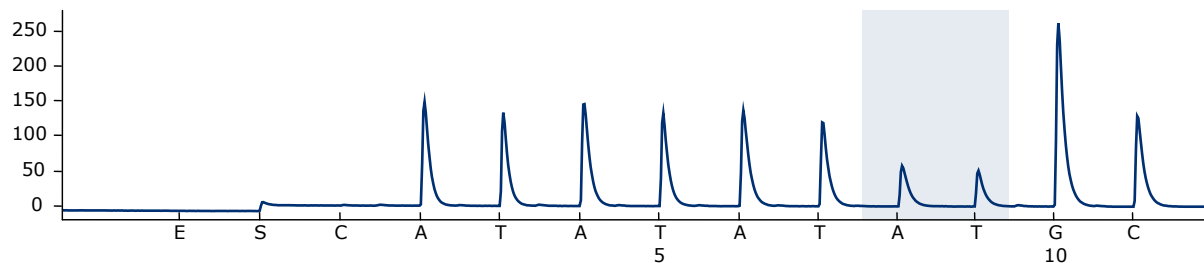
**Σημείωση:** Η αξιολόγηση της ποιότητας και προειδοποιήσεις που δημιουργούνται στις αναφορές SNP είναι σχετικές για ανάλυση γονιδιακής αποτύπωσης. Επιπλέον αξιολογήσεις ποιότητας και προειδοποιήσεις που δημιουργούνται σε λειτουργία AQ του λογισμικού Q24 PyroMark μπορούν να αγνοηθούν.

### Ενδεικτικά αποτελέσματα

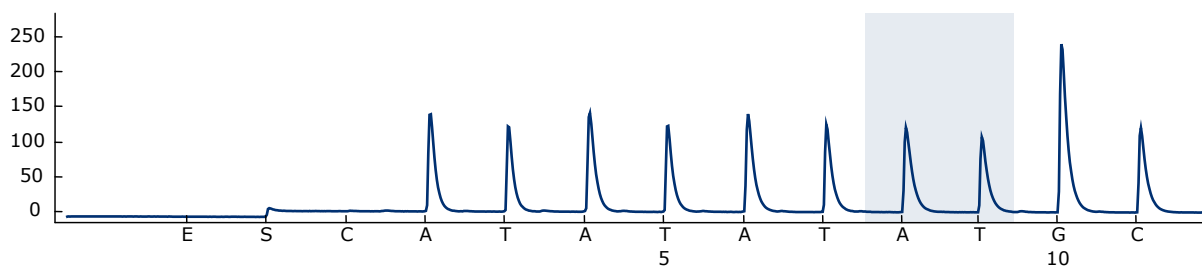
Ενδεικτικά αποτελέσματα του Pyrogram παρουσιάζονται στις εικόνες 5–10.



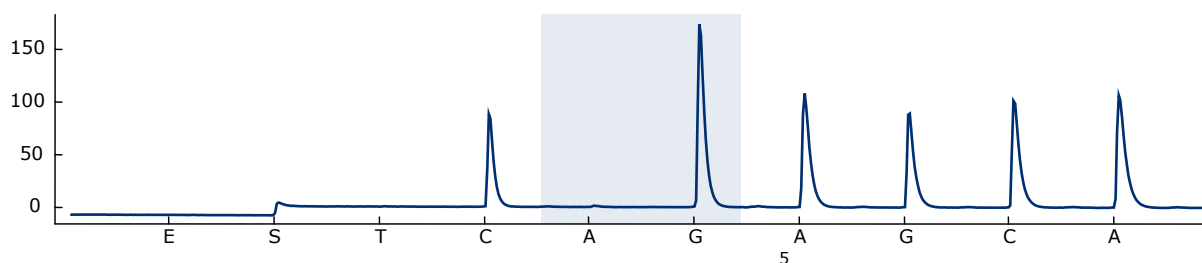
**Εικόνα 5.** Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με  $-/-$  (TA6/TA6) όταν αναλύεται για την παραλλαγή αλληλόμορφου \*28.



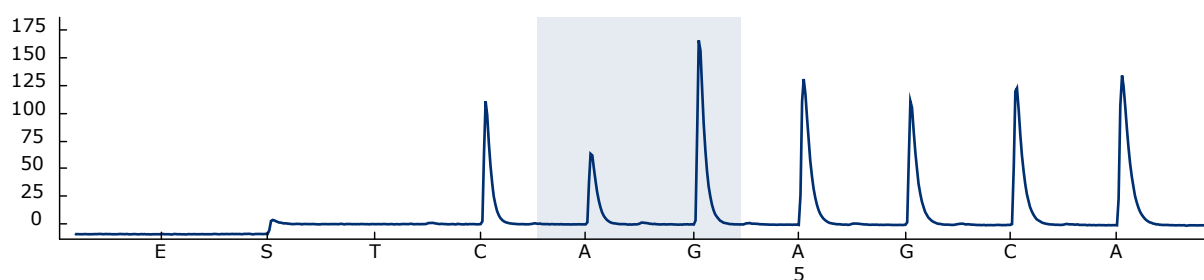
**Εικόνα 6.** Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο  $-/TA$  (TA6/TA7) όταν αναλύεται για την παραλλαγή αλληλόμορφου \*28.



**Εικόνα 7.** Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο TA/TA (TA7/TA7) όταν αναλύεται για την παραλλαγή αλληλόμορφου \*28.

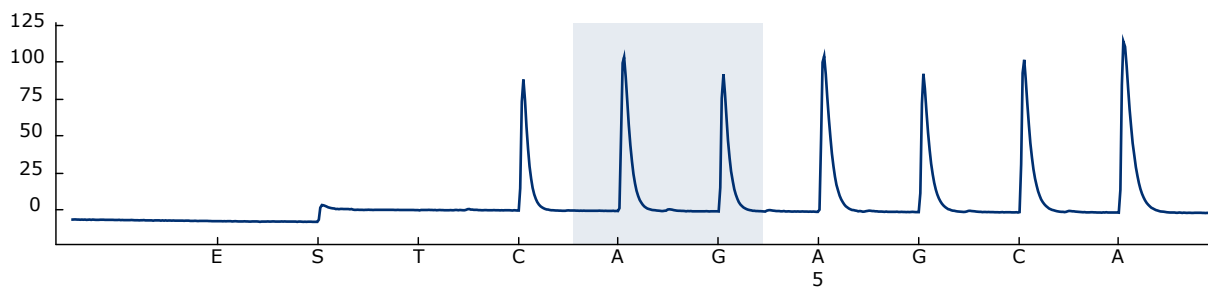


**Εικόνα 8.** Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο G/G όταν αναλύεται για την παραλλαγή αλληλόμορφου \*6.



**Εικόνα 9.** Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο G/A όταν αναλύεται για την παραλλαγή αλληλόμορφου \*6.





**Εικόνα 10.** Ίχνος Pyrogram που προκύπτει από την ανάλυση ενός δείγματος με γονότυπο A/A όταν αναλύεται για την παραλλαγή αλληλόμορφου \*6.

## Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε ερωτήσεις σχετικά με τα πρωτόκολλα αυτού του εγχειριδίου ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. οπίσθιο εξώφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Σημείωση:** Ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24* για γενικές οδηγίες αντιμετώπισης προβλημάτων του οργάνου.

### Σχόλια και προτάσεις

---

#### Σήματα στον πρότυπο ελέγχου χωρίς πρότυπο (αρνητικό πρότυπο ελέγχου)

- α) Παρεμβολές μεταξύ των φρεατίων Το σήμα ενός φρεατίου ανιχνεύθηκε σε παρακείμενο φρεάτιο. Αποφύγετε την τοποθέτηση των δειγμάτων με σήματα υψηλής έντασης δίπλα στα φρεάτια προτύπου ελέγχου χωρίς πρότυπο.
- β) Επιμόλυνση PCR Χρησιμοποιείτε αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο. Αποθηκεύετε και εκχυλίζετε τα υλικά, όπως δείγματα, ορούς ελέγχου και αμπλικόνια, ξεχωριστά από τα αντιδραστήρια PCR.

#### Αλληλουχία χαμηλής ποιότητας ή μη αναμενόμενη αλληλουχία

- α) Χαμηλής ποιότητας γενωμικό DNA Η χαμηλή ποιότητα του γενωμικού DNA είναι πιθανό να προκαλέσει αποτυχία της PCR. Αναλύστε τα δείγματα PCR χρησιμοποιώντας τεχνική ηλεκτροφόρησης (για παράδειγμα, το σύστημα QIAxcel<sup>®</sup> ή ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης).

#### Αποτέλεσμα “Check” (Έλεγχος) ή “Failed” (Αποτυχία) στην αναφορά SNP

- α) Προειδοποίηση: “Αβέβαιο / Απέτυχε λόγω χαμηλού ύψους κορυφής” Τυχόν σφάλματα χειρισμού κατά τη ρύθμιση της PCR ή την προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την ανάλυση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού είναι πιθανό να οδηγήσουν σε χαμηλές τιμές κορυφής.

Είναι σημαντικό ότι τα δείγματα λαμβάνονται πλήρως από το εργαλείο κενού. Προσέξτε ώστε το εργαλείο κενού να κατεβαίνει αργά στα δείγματα και ότι η γεωμετρία της πλάκας PCR ή οι ταινίες που χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση επιτρέπουν την πλήρη παραλαβή από τα δείγματα.

## Σχόλια και προτάσεις

---

Εκτελέστε τη δοκιμή λειτουργίας για καθετήρες με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24* σε τακτά χρονικά διαστήματα και ανταλλάσσετε τους καθετήρες με φίλτρο όταν ενδείκνυται.

Σε περίπτωση μιας προειδοποίησης “Check” (Έλεγχος), συγκρίνετε προσεκτικά το Pyrogram με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορεί να εμφανισθεί με δεξί κλικ στο παράθυρο Pyrogram. Εάν οι μετρούμενες κορυφές ταιριάζουν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος, το αποτέλεσμα είναι έγκυρο. Σε αντίθετη περίπτωση, συνιστάται η επαναληπτική εκτέλεση του δείγματος.

β) Προειδοποίηση:  
“Αβέβαιο / Απέτυχε ο προσδιορισμός γονοτύπου”

Σε περίπτωση μιας προειδοποίησης “Check” (Έλεγχος), συγκρίνετε προσεκτικά το Pyrogram με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορεί να εμφανισθεί με δεξί κλικ στο παράθυρο Pyrogram. Εάν οι μετρούμενες κορυφές ταιριάζουν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος, το αποτέλεσμα είναι έγκυρο. Σε αντίθετη περίπτωση, συνιστάται η επαναληπτική εκτέλεση του δείγματος.

Για την ανάλυση του UGT1A1 \*28, η προειδοποίηση μπορεί να προκληθεί από μεν τη δημοσιονομική διολίσθηση της πολυμεράσης κατά μήκος των επαναλήψεωνTA, που θα μπορούσαν να είναι εντονότερες για δείγματα όγκου FFPE. Βεβαιωθείτε ότι υψηλής ποιότητας DNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο (π.χ., απομονωμένη από δείγματα αίματος) ή αυξήστε την ποσότητα του προτύπου DNA.

γ) Μη αναμενόμενες σπάνιες παραλλαγές αλληλόμορφου

Τα αποτελέσματα ποιοτικής αξιολόγησης “Check” (Έλεγχος) ή “Failed” (Αποτυχία) μπορεί να οφείλονται σε μη αναμενόμενο μοτίβο κορυφών. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει παρουσία μη αναμενόμενης μετάλλαξης, η οποία δεν αναλύεται με την τυπική ρύθμιση “Sequence to Analyze” (Αλληλουχία προς ανάλυση). Τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αναλυθούν χρησιμοποιώντας την εναλλακτική ρύθμιση “Sequence to Analyze” λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία μη αναμενόμενων παραλλαγών αλληλόμορφου.

## Σχόλια και προτάσεις

---

- δ) Μεγάλη απόκλιση ύψους κορυφής προειδοποιεί για μία διανομή x
- Το Pyrogram θα πρέπει να συγκρίνεται προσεκτικά με το ιστόγραμμα, το οποίο μπορεί να εμφανίζεται με δεξί κλικ στο παράθυρο Pyrogram. Σε περίπτωση που οι μετρούμενες κορυφές δεν ταιριάζουν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος και δεν μπορεί να εξηγηθεί από σπάνιες μεταλλάξεις, συνιστάται η επαναληπτική εκτέλεση του δείγματος.

### Υψηλό υπόβαθρο

- α) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης των νουκλεοτιδίων
- Φυλάσσετε τα νουκλεοτίδια σε θερμοκρασία 2–8°C. Η αποθήκευση σε θερμοκρασία –10 έως –25°C είναι πιθανό να προκαλέσει αύξηση του υπόβαθρου.
- β) Σύντομος χρόνος ψύξης των δειγμάτων πριν από την ανάλυση Pyrosequencing
- Διατηρήστε τα δείγματα σε ένα στήριγμα πλάκας PyroMark Q24 σε θερμοκρασία δωματίου για 10–15 λεπτά. Μη συντομεύετε το χρόνο ψύξης.
- γ) Επιμόλυνση φύσιγγας
- Καθαρίστε προσεκτικά τη φύσιγγα, όπως περιγράφεται στο δελτίο του προϊόντος. Αποθηκεύστε τη φύσιγγα προστατεύοντάς την από το φως και τη σκόνη.

### Απουσία σημάτων στα θετικά πρότυπα ελέγχου

- α) Ανεπαρκής ποσότητα μείγματος ενζύμων ή υποστρώματος για όλα τα φρεάτια
- Βεβαιωθείτε ότι η πλήρωση της φύσιγγας PyroMark Q24 εκτελείται σύμφωνα με το “Pre Run Information” (Πληροφορίες πριν από την εκτέλεση) στο μενού “Tools” (Εργαλεία).
- β) Λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης ή αραίωσης αντιδραστηρίων
- Προετοιμάστε τα αντιδραστήρια *therascreen* σύμφωνα με τις οδηγίες στο “Πρωτόκολλο 5: Εκτέλεση ανάλυσης στο σύστημα PyroMark Q24”, σελίδα 27.
- γ) Αποτυχία προετοιμασίας PCR ή δείγματος
- Λάθη χειρισμού στη ρύθμιση της PCR, στον προγραμματισμό του ανακυκλωτή της PCR, ή στην προετοιμασία του δείγματος πριν από την ανάλυση Pyrosequencing μπορεί να οδηγήσει στην μη εμφάνιση σήματος. Εκτελέστε τη δοκιμή λειτουργίας για τους καθετήρες με φίλτρο, όπως περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24* και ανταλλάξτε τους όταν χρειάζεται. Επαναλάβετε την PCR και την ανάλυση Pyrosequencing.

## Ποιοτικός έλεγχος

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit έχει ελεγχθεί σε ό,τι αφορά τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση σταθερής ποιότητας των προϊόντων.

## Περιορισμοί

Τα οποιαδήποτε διαγνωστικά αποτελέσματα που προκύπτουν πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με άλλα κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα.

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη να επικυρώνει την απόδοση του συστήματος για οποιεσδήποτε διαδικασίες χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες απόδοσης της QIAGEN.

## Χαρακτηριστικά απόδοσης

### Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακριβείας επιτρέπει τον προσδιορισμό της συνολικής μεταβλητότητας της ανάλυσης σε σχέση με τη σωστή γονιδιακή αποτύπωση των παραλλαγών αλληλόμορφων \*28 και \*6. Πλασμιδία που μεταφέρουν τις παραλλαγές αλληλόμορφου αναμίχθηκαν σε αναλογίες (0, 50, 100%) που αντιπροσωπεύουν τους ομο - και ετερόζυγους γονότυπους (\*28 TA6/TA6, TA6/TA7 και TA7/TA7, \*6 G/G, G /, και A/A). Κάθε μείγμα αναλύθηκε σε επτά Pyrosequencing εκτελέσεις με τρεις επαναλήψεις κάθε μία με ποικίλες παρτίδες στα όργανα *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit, PyroMark Q24, διαφορετικούς χειριστές, διαφορετικές ημέρες και διαφορετικά εργαστήρια.

Η ακρίβεια εκφράζεται ως Correct Call Rate (δηλαδή, το ποσοστό των αναλυθέντων δειγμάτων με σωστό αποτέλεσμα γονιδιακής αποτύπωσης). Οι δοκιμές για ανάλυση γονιδιακής αποτύπωσης των παραλλαγών αλληλόμορφων \*28 και \*6 που απαριθμούνται στον πίνακα 8 και 9, αντίστοιχα, έδειξαν ένα Correct Call Rate 100% των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

### Πίνακας 8. Ακρίβεια για τη γονιδιακή αποτύπωση των παραλλαγών αλληλόμορφου \*28

Γονότυπος*	Αριθμός δειγμάτων	Σωστά αποτελέσματα
Ομόζυγος TA6/TA6	21	21
Ετερόζυγος TA6/TA7	21	21
Ομόζυγος TA7/TA7	20	20

\* Εκπροσωπούμενος από 0, 50 και 100% μείγματα πλασμιδίου βασιζόμενη στη μέτρηση OD<sub>260</sub>.

### Πίνακας 9. Ακρίβεια για τη γονιδιακή αποτύπωση των παραλλαγών αλληλόμορφου \*6

Γονότυπος*	Αριθμός δειγμάτων	Σωστά αποτελέσματα
Ομόζυγος G/G	21	21
Ετερόζυγος G/A	21	21
Ομόζυγος A/A	21	21

\* Εκπροσωπούμενος από 0, 50 και 100% μείγματα πλασμιδίου βασιζόμενη στη μέτρηση OD<sub>260</sub>.

## Διαγνωστική αξιολόγηση

Το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit αξιολογήθηκε σε σύγκριση με την αλληλουχία Sanger. Το DNA εκχυλίστηκε από 100 δείγματα όγκων μονιμοποιημένα σε φορμόλη, εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE), από μη-μικροκύτταρο καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) και αναλύθηκε για παραλλαγές αλληλόμορφων \*28 και \*6.

Το DNA απομονώθηκε με το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Η ανάλυση Pyrosequencing πραγματοποιήθηκε με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit στο PyroMark Q24 και η αλληλουχία Sanger πραγματοποιήθηκε στο ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Από 100 δείγματα που αναλύθηκαν με την αλληλουχία Sanger, ο γονότυπος προσδιορίστηκε σε 95 και 99 δείγματα για τις παραλλαγές αλληλόμορφων \*28 και \*6, αντίστοιχα. Με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit, ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί ο γονότυπος σε 98 και 99 δείγματα για τις παραλλαγές αλληλόμορφων \*28 και \*6, αντιστοίχως.

Και οι δύο μέθοδοι ανέφεραν είκοσι εννέα, 49, και 12 δείγματα ότι έχουν γονότυπο TA6/TA6, TA6/TA7 και TA7/TA7, αντίστοιχα. Τέσσερα επιπλέον δείγματα, έδειξαν

γονότυπο TA6/TA6 χρησιμοποιώντας το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit ενώ η αλληλουχία Sanger εντόπισε γονότυπο TA6/TA7 (Πίνακας 10).

Εκτός από τα δείγματα που απέτυχαν στη μία ή και οι δύο μεθόδους, το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit και η αλληλουχία Sanger έδειξαν 96% συνάφεια στα αποτελέσματα για τη γονιδιακή αποτύπωση των παραλλαγών αλληλόμορφου \*28 (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10. Αποτελέσματα γονιδιακής αποτύπωσης για τις παραλλαγές αλληλόμορφου \*28 σε δείγματα προέλευσης λευκής ράτσας**

		Αλληλουχία Sanger				Σύνολο
		TA6/ TA6	TA6/ TA7	TA7/ TA7	Άγνωστο	
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit	TA6/TA6	29	4	0	2	35
	TA6/TA7	0	49	0	2	51
	TA7/TA7	0	0	12	0	12
	Άγνωστο	0	1	0	1	2
	Σύνολο	29	54	12	5	100

Όλα τα δείγματα, έδειξαν ένα γονότυπο ομόζυγο G/G για την παραλλαγή αλληλόμορφου \*6, χρησιμοποιώντας την αλληλουχία Sanger και το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με τις πρόσφατες βασικές γνώσεις ότι οι γονότυποι A/G και A/A είναι ουσιαστικά απώντες από πληθυσμούς του Καύκασου. Ως εκ τούτου, απομονώθηκε DNA από πρόσθετα 26 στοματικά δείγματα επιχρίσματος που συλλέχθηκαν από ασιατικά άτομα χρησιμοποιώντας το QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit στο QIAcube® και αναλύθηκαν για παραλλαγές αλληλόμορφου \*6.

Αναφέρθηκαν δεκαπέντε, εννέα, και δύο δείγματα και από τις δύο μεθόδους που έχουν γονότυπο G/G, G/A και A/A, αντίστοιχα (Πίνακας 11).

Εκτός από τα δείγματα που απέτυχαν στη μία ή και στις δύο μεθόδους, το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit και η αλληλουχία Sanger έδειξε 100% συνάφεια στα αποτελέσματα για τις παραλλαγές αλληλόμορφου \*6 (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11. Αποτελέσματα γονιδιακής αποτύπωσης για τις παραλλαγές αλληλόμορφου \*6 σε δείγματα που προέρχονται από ασιατική καταγωγή**

		Αλληλουχία Sanger				Σύνολο
		G/G	G/A	A/A	Άγνωστο	
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit	G/G	15	0	0	0	15
	G/A	0	9	0	0	9
	A/A	0	0	2	0	2
	Άγνωστο	0	0	0	0	0
	Σύνολο	15	9	2	0	26

**Σημείωση:** Σε όλες τις εκτελέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών απόδοσης, το σήμα ήταν πάνω από 30 RLU, ως συνήθως προερχόμενο από 10 ng του DNA που απομονώθηκε από ιστό μονιμοποιημένο σε φορμόλη, εγκλεισμένο σε παραφίνη.

## Αναφορές

Η QIAGEN διατηρεί στο διαδίκτυο μια μεγάλη, ενημερωμένη βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε, είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού είτε ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κ.λπ.

Για έναν πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε τη βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN (Reference Database) στο διαδίκτυο στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ή επικοινωνήστε με τα τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.



## Σύμβολα

	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> εξετάσεις
	Ημερομηνία λήξης
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός υλικού
	Συστατικά
	Περιεχόμενα
	Αριθμός
	υδροξείδιο του νατρίου
	Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας
	Περιορισμοί θερμοκρασίας
	Νόμιμος κατασκευαστής
	Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης

## Πληροφορίες επικοινωνίας



Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) ή επικοινωνήστε τηλεφωνικά με κάποιο από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπίσθιο εξώφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

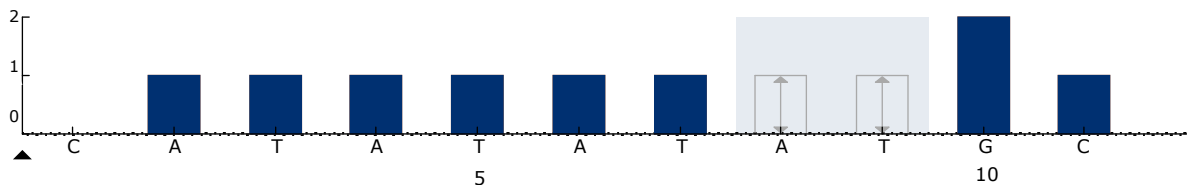
## Παράρτημα A: Ρύθμιση αναλύσεων *therascreen* UGT1A1 Pyro

Πριν από την πρώτη εκτέλεση της ανάλυσης *therascreen* UGT1A1, το αρχείο ανάλυσης πρέπει να ρυθμιστεί. Ρυθμίστε την ανάλυση για τις παραλλαγές αλληλόμορφου UGT1A1 χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyroMark Q24, όπως περιγράφεται παρακάτω.

### Διαδικασία


#### UGT1A1 \*28

1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε “New AQ Assay” (Νέα ανάλυση AQ).
2. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στο “Sequence to Analyze” (Αλληλουχία προς ανάλυση).  
**ATATAT[AT]GGCA**
3. Εισαγάγετε χειροκίνητα το παρακάτω “Dispensation Order” (Σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων).  
**CATATATATGC**
4. Κάντε κλικ στην καρτέλα “Analysis Parameters” (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής - Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα) σε 30.
5. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως **UGT1A1 \*28**.

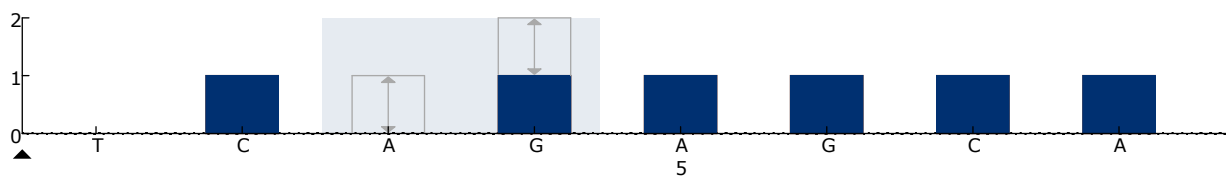


Εικόνα 11. Ιστόγραμμα γονιδιακής αποτύπωσης της παραλλαγής αλληλόμορφου UGT1A1 \*28.

#### UGT1A1 \*6


1. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και επιλέξτε “New AQ Assay” (Νέα ανάλυση AQ).
2. Πληκτρολογήστε την παρακάτω αλληλουχία στο “Sequence to Analyze” (Αλληλουχία προς ανάλυση).  
**CRGAGCAT**
3. Εισαγάγετε χειροκίνητα το παρακάτω “Dispensation Order” (Σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων)  
**TCAGAGCA**
4. Κάντε κλικ στην καρτέλα “Analysis Parameters” (Παράμετροι ανάλυσης) και αυξήστε το “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Τιμή κατωφλίου ύψους κορυφής - Απαιτούμενο ύψος κορυφής για επαρκή ποιότητα) σε 30.

5. Κάντε κλικ στο  στη γραμμή εργαλείων και αποθηκεύστε την ανάλυση ως **UGT1A1 \*6**.



**Εικόνα 12.** Ιστόγραμμα γονιδιακής αποτύπωσης της παραλλαγής αλληλόμορφου UGT1A1 \*6.

## Παράρτημα Β: Εκκένωση περιέκτη αποβλήτων και λεκανών

<p><b>ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ</b></p> 	<p><b>Επικίνδυνα χημικά</b></p> <p>Το διάλυμα μετουσίωσης που χρησιμοποιείται με το σταθμό εργασίας υπό κενό περιέχει υδροξείδιο του νατρίου, το οποίο προκαλεί ερεθισμούς στα μάτια και το δέρμα.</p> <p>Φοράτε πάντοτε προστατευτικά γυαλιά, γάντια και εργαστηριακή ποδιά.</p> <p>Η αρμόδια αρχή (π.χ. ο υπεύθυνος του εργαστηρίου) πρέπει να λαμβάνει τα απαραίτητα μέτρα προφύλαξης, ώστε να διασφαλίζεται ότι ο χώρος εργασίας είναι ασφαλής και ότι οι χειριστές των οργάνων δεν εκτίθενται σε επικίνδυνα επίπεδα τοξικών ουσιών (χημικών ή βιολογικών), όπως καθορίζεται στα ισχύοντα δελτία δεδομένων ασφαλείας υλικών (SDS) ή στα έγγραφα των OSHA*, ACGIH† ή COSHH‡.</p> <p>Ο εξαερισμός για τις αναθυμιάσεις και η απόρριψη των αποβλήτων πρέπει να συμμορφώνεται με τους εθνικούς, κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς και νόμους σχετικά με την υγεία και την ασφάλεια.</p>
---	--

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Ηνωμένο Βασίλειο)

Βεβαιωθείτε ότι τηρούνται οι ομοσπονδιακοί, κρατικοί και τοπικοί περιβαλλοντικοί κανονισμοί σχετικά με την απόρριψη των εργαστηριακών αποβλήτων.

### Σημαντική υπόδειξη πριν από την έναρξη

- Το πρωτόκολλο αυτό απαιτεί νερό υψηλής καθαρότητας.

### Διαδικασία

**B1. Βεβαιωθείτε ότι στο εργαλείο κενού δεν εφαρμόζεται κενό. Βεβαιωθείτε ότι η λειτουργία κενού είναι κλειστή (Off) και η αντλία κενού είναι απενεργοποιημένη.**

**B2. Απορρίψτε τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων που υπάρχουν στις λεκάνες.**

**B3. Εκτελέστε έκπλυση των λεκανών με νερό υψηλής καθαρότητας ή αντικαταστήστε τις, αν είναι απαραίτητο.**

**B4. Αδειάστε τον περιέκτη αποβλήτων.**

**Σημείωση:** Το καπάκι μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς αποσύνδεση της σωλήνωσης.

**B5. Αν απαιτείται καθαρισμός του σταθμού εργασίας υπό κενό (για παράδειγμα λόγω σκόνης ή διαρροής), ακολουθήστε τις οδηγίες που παρατίθενται στο *Εγχειρίδιο χρήστη PyroMark Q24*.**

## Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις σε συστήματα PyroMark Q24: Εκκινητές αλληλούχισης, εκκινητές PCR, ορός ελέγχου μη μεθυλιωμένου DNA, κύριο μείγμα PCR PyroMark, συμπύκνωμα CoralLoad, ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης PyroMark, ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού PyroMark, διάλυμα αποδιάταξης PyroMark, ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PyroMark, μείγμα ενζύμων, μείγμα υποστρώματος, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP και H <sub>2</sub> O	971540
<b>Εξαρτήματα</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Πλάκα αντίδρασης αλληλούχισης 24 φρεατίων	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Φυσίγγια για τη διοχέτευση νουκλεοτιδίων και αντιδραστηρίων	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Επαναχρησιμοποιούμενοι καθετήρες με φίλτρο για τους σταθμούς εργασίας υπό κενό PyroMark Q96 και Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Για έλεγχο εγκατάστασης του συστήματος	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Για επιβεβαίωση απόδοσης του συστήματος	979304
<b>Σχετικά προϊόντα</b>		
PyroMark Q24 MDx	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη ανίχνευση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001513
PyroMark Q24	Πλατφόρμα ανίχνευσης βάσει αλληλουχίας για ταυτόχρονη ανίχνευση αλληλουχίας μέσω πυροφωσφορικού 24 δειγμάτων	9001514

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Σταθμός εργασίας υπό κενό (220 V) για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως το μονόκλωνο πρότυπο	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Σταθμός εργασίας υπό κενό (220 V) για την ταυτόχρονη προετοιμασία 24 δειγμάτων, από το προϊόν PCR έως το μονόκλωνο πρότυπο	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Λογισμικό εφαρμογής	9019063
PyroMark Q24 Software	Λογισμικό ανάλυσης	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Για 50 προπαρασκευές DNA: 50 στήλες QIAamp MinElute®, πρωτεΐνάση K, ρυθμιστικά διαλύματα, σωληνάρια συλλογής (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Για 48 προπαρασκευές: Φυσίγγια με αντιδραστήρια (ιστού), ρύγχη με φίλτρο μίας χρήσης, στηρίγματα για ρύγχη μίας χρήσης, σωληνάρια δειγμάτων (2 ml), σωληνάρια έκλουσης (1,5 ml), ρυθμιστικό διάλυμα G2, πρωτεΐνάση K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Για 50 προπαρασκευές: Μίνι στήλες διαχωρισμού QIAamp, ρυθμιστικά διαλύματα, αντιδραστήρια, σωληνάρια, VacConnectors	61104

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας και αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο του kit QIAGEN ή στο εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια του kit QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

\*Αποκλειστικά για το Ηνωμένο Βασίλειο.

† Για τις υπόλοιπες χώρες.

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή



Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, BioRobot®, QIAamp®, QIAcube®, QIAxcel®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ABI™ (Life Technologies); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag (Florida Scientific Services, Inc.); Windows® (Microsoft Corporation).

#### **Άδεια περιορισμένης χρήσης**

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς του αγοραστή ή του χρήστη του *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit των εξής όρων:

1. Το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σύμφωνα με το *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit Handbook και σε συνδυασμό με τα συστατικά που περιέχονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης στο πλαίσιο των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε άλλα συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά στο *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit Handbook και στα πρόσθετα πρωτόκολλα που είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του παρέχονται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η εκ νέου χρήση ή επεξεργασία τους ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit αποδέχονται να μην προβούν ή να μην επιτρέψουν σε άλλα άτομα να προβούν σε ενέργειες που θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα παραπάνω. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας σχετικά με το kit ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, ανατρέξτε στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

[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)

