

Instrukcja Zestawu *therascreen*[®] UGT1A1 Pyro[®]



Wersja 1

IVD

Do użytku diagnostycznego in vitro



REF

971540



1061270EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R3

MAT

1061270EN



Technologie badań i analizy firmy QIAGEN

Firma QIAGEN jest wiodącym dostawcą innowacyjnych technologii oczyszczania próbek i ich analizy, umożliwiając izolację i wykrywanie zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane, wysokiej jakości produkty i usługi zapewniają sukces na każdym etapie - od chwili pobrania próbki do uzyskania wyniku.

QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:

- oczyszczania DNA, RNA i białek
- analizy kwasów nukleinowych i białek
- badań nad mikroRNA oraz RNAi
- automatyzacji technologii obróbki próbek i ich analizy

Naszą misją jest umożliwienie Wam osiągnięcie znakomitych i przełomowych wyników w prowadzonych badaniach. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Spis treści

Przeznaczenie Zestawu	5
Streszczenie i Wyjaśnienia	5
Zasada Procedury	6
Kontrole	7
Materiały Dostarczone	8
Zawartość zestawu	8
Materiały Wymagane, ale Niedostarczone	10
Zalecane wytrząsarki płytek	11
Ostrzeżenia i Uwagi	11
Informacje bezpieczeństwa	11
Uwagi ogólne	12
Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami	14
Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami	14
Procedura	15
Izolacja DNA	15
Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24	16
Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w zestawie <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	18
Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)	21
Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24	23
Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24	27
Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24	30
Interpretacja Wyników	31
Rozwiązywanie problemów	33
Kontrola Jakości	36
Ograniczenia	36
Charakterystyki Wydajności	36
Precyzja	36
Ocena diagnostyczna	37

Literatura	39
Symbole	40
Informacje Kontaktowe	40
Dodatek A: Przygotowanie reakcji <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	41
Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory	42
Informacje Dotyczące Zamawiania	43

Przeznaczenie Zestawu

Zestaw *therascreen* UGT1A1 Pyro jest testem *in vitro* opartym na detekcji sekwencji kwasów nukleinowych i wykorzystującym technologię pirosekwencjonowania[®] w genotypowaniu wariantów alleli *28 i *6 ludzkiego genu UGT1A1 w DNA genomowym pochodzącym z tkanek ludzkich.

Zestaw *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit ma na celu dostarczenie klinicytom informacji mogących ułatwić właściwą selekcję pacjentów ze zwiększonym ryzykiem występowania obniżonej aktywności UDP-glukuronylotransferazy. Wyłącznie do użytku diagnostycznego *in vitro*.

Wyłącznie do użytku na aparacie PyroMark[®] Q24. System PyroMark Q24 zawiera:

- Urządzenie PyroMark Q24 oraz PyroMark Q24 MDx.
- Stacja próżniowa (Vacuum Workstation) PyroMark Q24 oraz PyroMark Q24 MDx.
- Oprogramowanie PyroMark Q24 (wersja 2.0) oraz PyroMark Q24 MDx (wersja 2.0).

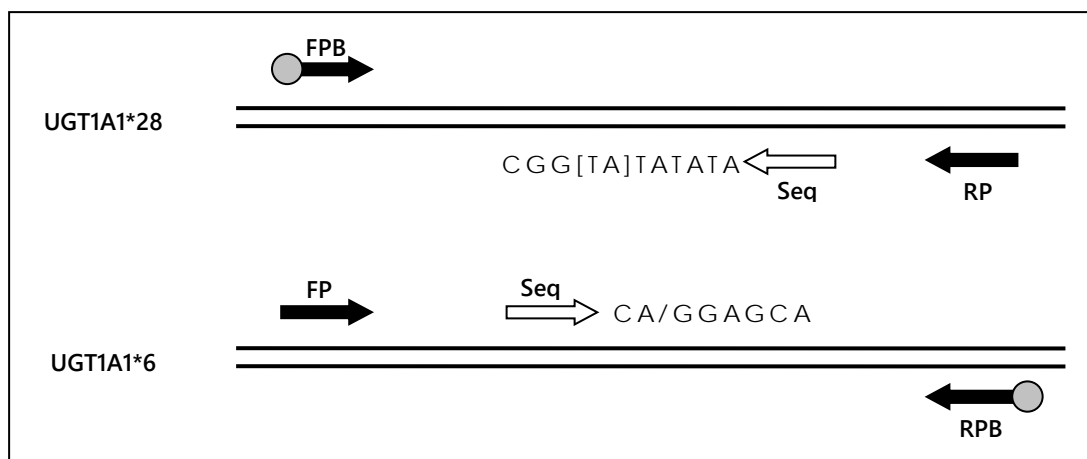
Produkt ten jest przeznaczony dla wykwalifikowanych użytkowników, takich jak technicy oraz lekarze przeszkoleni w tematyce procedur diagnostycznych *in vitro*, technik biologii molekularnej oraz obsługi aparatu PyroMark Q24.

Streszczenie i Wyjaśnienia

Zestaw *therascreen* UGT1A1 Pyro służy genotypowaniu wariantów allela *28 (odróżnianie powtórzeń 6 oraz 7 TA) oraz wariantów allela *6 (odróżnianie genotypów G oraz A) ludzkiego genu UGT1A1. Na zestaw składają się dwie analizy: jedna do genotypowania wariantu allela *28 oraz druga do genotypowania wariantu allela *6 (Rysunek 1). Te dwa rejony są amplifikowane oddzielnie przy pomocy PCR, a następnie sekwencjonowane w zdefiniowanym obszarze. Sekwencje otaczające zdefiniowany obszar służą, jako sygnały (piki) referencyjne dla genotypowania oraz oceny jakościowej przeprowadzanej analizy.

Wariant allela *28 jest sekwencjonowany w orientacji wstecznej (reverse), natomiast wariant allela *6 w orientacji do przodu (forward).

Produkt składa się z mieszaniny starterów PCR oraz startera sekwencyjnego dla każdej reakcji. Startery są dostarczane jako roztwór, gdzie każda próbówka zawiera 24 µl każdego ze starterów lub mieszaniny starterów.



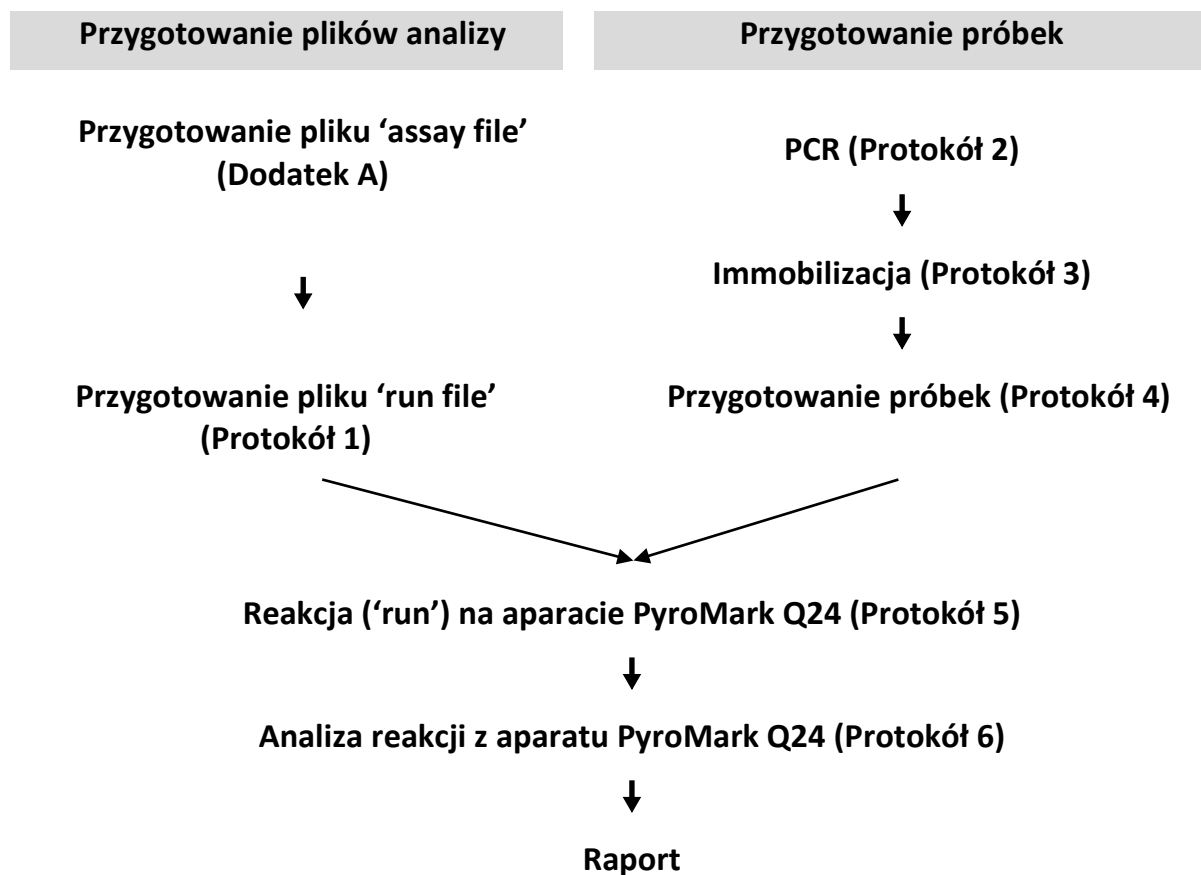
Rysunek 1. Schemat analizy *therascreen* UGT1A1. Pokazana sekwencja jest sekwencją analizowaną z nukleotydami polimorficznymi, zaznaczonymi kwadratowymi nawiasami lub ukośnikiem. Część powtórzeń TA analizowanych reakcją dla UGT1A1 *28 jest zawartych w rejonie objętym przez starter sekwencyjny. **FP, FPB:** Startery przednie PCR (B oznacza biotynylację); **RP, RPB:** Startery wsteczne PCR (B oznacza biotynylację); **Seq:** Startery sekwencyjne.

Zasada Procedury

Schemat na stronie 7 ilustruje przebieg procedury. Po reakcji PCR z użyciem starterów dla wariantów alleli *28 i *6, amplikony zostają immobilizowane na kulkach sefarozy opłaszczonych streptawidyną (Streptavidin Sepharose® High Performance beads). Przygotowane zostaje jednoniciowe DNA, do którego przyłączają się odpowiednie startery sekwencyjne. Następnie próbki zostają analizowane (sekwencjonowane) na aparacie PyroMark Q24 przy pomocy zaprogramowanych wcześniej protokołów ('assay setup files' oraz 'run file').

Uwaga: Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24* (patrz 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 23).

Zarys procedury *therascreen* UGT1A1 Pyro



Kontrole

W zestawie zawarte jest ludzkie DNA kontrolne, które służy jako kontrola pozytywna dla PCR oraz sekwencjonowania. To DNA kontrolne posiada homozygotyczny genotyp TA6/TA6 i G/G dla analizy wariantów alleli odpowiednio *28 i *6.

Dodatkowo, kontrola negatywna (bez matrycy DNA) powinna być również uwzględniona w każdej analizie PCR, przynajmniej dla jednej reakcji.


Materiały Dostarczone

Zawartość zestawu

Zestaw *therascreen* UGT1A1 Pyro (pudełko 1/2)

Zestaw <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	(24)
Numer katalogowy	971540
Ilość reakcji	24
PCR Primer Mix UGT1A1 *28 (startery PCR)	24 µl
PCR Primer Mix UGT1A1 *6 (startery PCR)	24 µl
Seq Primer UGT1A1 *28 (starter sekwencyjny)	24 µl
Seq Primer UGT1A1 *6 (starter sekwencyjny)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (mieszanka do PCR)	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Human Control DNA, 2 ng/µl (ludzkie DNA kontrolne)	100 µl

Bufory i odczynniki *therascreen* (pudełko 2/2)

Bufory i odczynniki <i>therascreen</i>		
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)		10 ml
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny)		10 ml
PyroMark Denaturation Solution* (roztwór denaturujący)		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (bufor płuczący)		25 ml
Enzyme Mixture (mieszanina enzymów)		1 vial
Substrate Mixture (mieszanina substratów)		1 vial
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Instrukcja zestawu (anglojęzyczna)		1

* Zawiera wodorotlenek sodu.

Materiały Wymagane, ale Niedostarczone

Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami bezpieczeństwa materiałów (safety data sheets), dostępnymi u producentów lub dostawców produktów.

- Zestaw do izolacji DNA (patrz 'Izolacja DNA', strona 15)
- Pipety (nastawne)*
- Sterylne końcówki do pipet (do PCR, z filtrami)
- Mikrowirówka stołowa*
- Termocykler* oraz odpowiednie probówki PCR
- Sefaroza opłaszczona streptawidyną (Streptavidin Sepharose High Performance; GE Healthcare, nr kat. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Aparat PyroMark Q24 (nr kat. 9001513 lub 9001514)*†
- Oprogramowanie PyroMark Q24 (nr kat. 9019063 lub 9019062)†
- Płytki PyroMark Q24 (nr kat. 979301)†
- Kartridże PyroMark Q24 (nr kat. 979302)†
- Pompa próżniowa PyroMark Q24 (Vacuum Workstation; nr kat. 9001515 lub 9001517)*†
- Wytrząsarka do płytek* do immobilizacji na sefarozie (patrz 'Zalecane wytrząsarki płytek' strona 11)
- Blok grzejny* zdolny do osiągnięcia 80°C
- 24-dołkowe płytki lub paski PCR (24-well plates/strips)
- Zatyczki paskowe (strip caps)
- Woda o wysokiej czystości (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm lub ekwiwalent)
Uwaga: Zestaw zawiera ilość wody wystarczającą do PCR, immobilizacji DNA oraz do rozpuszczania mieszanin enzymów i substratów. Dodatkowa ilość wody o wysokiej czystości jest potrzebna do rozcieńczenia buforu PyroMark Wash Buffer, 10x.
- Etanol (70%)‡

* Upewnij się, że urządzenia zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producentów.

† Oznakowanie CE-IVD zgodne z Dyrektywą Unii Europejskiej (EU Directive 98/79/EC). Wszystkie pozostałe wymienione produkty nie posiadają certyfikacji CE-IVD opartej na Dyrektywie UE 98/79/EC.

‡ Nie używaj alkoholu denaturowanego, który zawiera niepożądane substancje, takie jak metanol czy metyloketony.

Zalecane wytrząsarki płytek

Wytrząsarki płytek przedstawione w Tabeli 1 są rekomendowane do użycia z zestawem *therascreen* UGT1A1 Pyro.

Tabela 1. Wytrząsarki płytek rekomendowane do użycia z zestawem *therascreen* UGT1A1 Pyro

Producent	Produkt	Numer kat.
Eppendorf	Thermomixer comfort (model podstawowy)	5355 000.011
	Termoblok do MTP	5363 000.012
	Adapter płytkowy na probówki PCR (96 x 0,2 ml) oraz 96-dołkowe płytki PCR	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Ostrzeżenia i Uwagi

Do użytku diagnostycznego in vitro

Informacje bezpieczeństwa

Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami bezpieczeństwa materiałów (safety data sheets) dostępnymi w internecie w postaci plików PDF pod adresem www.qiagen.com/safety, gdzie można znaleźć, obejrzeć i wydrukować karty dla każdego zestawu oraz poszczególnych komponentów zestawów QIAGEN.

Następujące oświadczenia ostrzegawcze odnoszą się do komponentów zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro.

PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący)



Uwaga! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne podrażnienia oczu. Może powodować korozję metali. Wycieraj wycieki, aby zapobiec uszkodzeniom materiałów. Przechowuj wyłącznie w oryginalnych opakowaniach. Noś ochronne rękawiczki / odzież / ochronę oczu / ochronę twarzy.

PyroMark Enzyme Mixture (mieszanina enzymów)



Zawiera: (R*,R*)-1,4-Dimerkaptobutano-2,3-diol; kwas octowy. Niebezpieczeństwo! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne podrażnienia oczu. **PO DOSTANIU SIĘ DO OCZU:** Przemyj wodą przez kilka minut. Wyjmij szkła kontaktowe (o ile są) jeśli to możliwe i nadal płucz. W przypadku kontaktu lub wątpliwości: Dzwoń do centrum zatruc lub do lekarza/szpitala. Zdejmij zanieczyszczoną odzież i oczyść przed ponownym użyciem. Noś ochronne rękawiczki / odzież / ochronę oczu / ochronę twarzy.

PyroMark Substrate Mixture (mieszanina substratów)



Zawiera: kwas octowy. Otrzeźwienie! Powoduje podrażnienia skóry. Powoduje poważne podrażnienia oczu. Jeśli podrażnienie oczu nie ustępuje poszukaj pomocy medycznej. Zdejmij zanieczyszczoną odzież i oczyść przed ponownym użyciem. Noś ochronne rękawiczki / odzież / ochronę oczu / ochronę twarzy.

Uwagi ogólne

Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę jak następuje.

- Ścisłe przestrzeganie instrukcji użytkowania jest wymagane dla optymalnych wyników. Rozcieńczanie odczynników inne niż podane w niniejszej instrukcji nie jest zalecane i może powodować spadek wydajności.
- Procedura została nieznacznie zmodyfikowana (patrz 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 23) względem *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.
- Komponenty tego zestawu wystarczają na wykonanie 24 reakcji podzielonych na maksymalnie 5 niezależnych analiz.

- Używaj sterylnych końcówek (z filtrami) do pipet (do przygotowania PCR).
- Przechowuj i izoluj materiały pozytywne (próbki, kontrole pozytywne i amplikony) odseparowane od innych odczynników i dodawaj ich do mieszanin reakcyjnych w specjalnie do tego celu przeznaczonym pomieszczeniu.
- Przed przystąpieniem do procedury dobrze rozmroź wszystkie komponenty w temp. pokojowej (15–25°C).
- Po rozmrożeniu wymieszaj komponenty przez pipetowanie lub worteksowanie, a następnie krótko zwiruj.
- Wyniki nieudanej analizy nie mogą być podstawą do oceny genotypu.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami

Zestaw *therascreen* UGT1A1 Pyro jest dostarczany w dwóch pudełkach. Pudełko 1/2 zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro jest dostarczane w suchym lodzie. PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, DNA kontrolne oraz wszystkie startery muszą być przechowywane po dostarczeniu w -30°C do -15°C .

Pudełko 2/2 z buforami i odczynnikami *therascreen* zawierające bufor, mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów, nukleotydy (dATP α S, dCTP, dGTP oraz dTTP) – odczynniki do analizy pirosekwencjonowaniem – są dostarczane z wkładami chłodzącymi. Te komponenty powinny być przechowywane po dostarczeniu w $2-8^{\circ}\text{C}$. Aby zminimalizować ryzyko spadku aktywności, zaleca się przechowywanie mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów w oryginalnych probówkach.

Rozpuszczone mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów są stabilne przez co najmniej 10 dni w $2-8^{\circ}\text{C}$. Rozpuszczone mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów mogą być zamrażane i przechowywane w -30°C do -15°C . Zamrożone odczynniki nie powinny być poddawane więcej niż trzem cyklom zamrażania-rozmrażania.

Uwaga: Nukleotydy nie powinny być zamrażane.

Zestaw *therascreen* UGT1A1 Pyro jest stabilny do końca terminu przydatności pod warunkiem przechowywania w zalecanych powyżej warunkach.

Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami

Wszystkie próbki muszą być traktowane, jako materiał potencjalnie zakaźny.

Materiał próbek stanowi ludzkie DNA wyizolowane ze skrawków tkanek zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE – ang. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded).

Próbki od osób poddawanych terapii heparynowej nie powinny być używane w tym teście. Próbki krwi pobranej do probówek z heparyną jako antykoagulantem nie powinny być używane w tym teście. Heparyna zaburza reakcję PCR.

Procedura

Izolacja DNA

Wydajność systemu została określona przy wykorzystaniu zestawów EZ1[®] DNA Tissue i QIAamp[®] DNA FFPE Tissue do pozyskania ludzkiego DNA z próbek guza utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE). W przypadku zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini, wydajność została określona z wykorzystaniem próbek krwi zdrowego dawcy, częściowo z dodatkiem komórek nowotworowych.

Zestawy QIAGEN[®] przedstawione w Tabeli 2 są zalecane do izolacji DNA z wymienionych typów ludzkich próbek przy wykorzystaniu zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro. Izolację DNA należy przeprowadzić zgodnie z instrukcjami dla odpowiednich zestawów.

Tabela 2. Zestawy do izolacji DNA rekomendowane do użytku z zestawem *therascreen* UGT1A1 Pyro

Materiał próbki	Zestaw do izolacji DNA	Numer kat. (QIAGEN)
Krew	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit*	61104
Skrawki tkanek zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE)	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48) [†]	953034

* Oznakowanie CE-IVD zgodne z Dyrektywą EU 98/79/EC.



[†] Postępuj zgodnie z instrukcją dla materiałów FFPE. Zestaw EZ1 DNA Tissue powinien być użytkowany w połączeniu z aparatem EZ1 Advanced (nr kat. 9001410 lub 9001411) oraz kartą EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018298) lub z aparatem EZ1 Advanced XL (nr kat. 9001492) oraz kartą EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018700) lub z aparatem BioRobot[®] EZ1 (nr kat. 9000705; już niedostępny w ofercie) oraz kartą EZ1 DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9015862).

Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Zaprogramuj analizę (Assay Setup) jak to opisano w 'Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* UGT1A1 Pyro', strona 41. Czynność ta musi zostać wykonana tylko raz, przed pierwszym rozpoczęciem analizy zestawem *therascreen* UGT1A1 Pyro.

Procedura

- 1. Na pasku narzędzi wybierz .**
Stworzony zostaje nowy plik 'run file'.
- 2. Wprowadź parametry analizy (patrz "Parametry analizy", strona 17).**
- 3. Zaprogramuj układ płytki przez dodawanie analiz dla wariantów allela *28 oraz *6 do studzienek korespondujących z próbkami do analizy.**
Uwaga: Kontrola negatywna (bez matrycy DNA) powinna być również uwzględniona w każdej reakcji PCR, przynajmniej dla jednej reakcji.
Uwaga: Próbka kontrolna z 'Human Control DNA' może być uwzględniona w każdej analizie jako kontrola pozytywna reakcji PCR i sekwencjonowania (patrz 'Kontrola', strona 7).
- 4. Gdy reakcja jest zaprogramowana i gotowa do rozpoczęcia na aparacie PyroMark Q24, wydrukuj listę potrzebnych objętości mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów, nukleotydów oraz ustawień dla płytki. Wybierz 'Pre Run Information' (informacja przed-reakcyjna) z menu 'Tools' (narzędzia), a gdy pojawi się raport, celem wydrukowania wybierz .**
- 5. Zamknij 'run file' (plik reakcji) i skopiuj na nośnik USB (dostarczony wraz z aparatem) używając narzędzia Windows® Explorer.**
Wydrukowana 'Pre Run Information' (informacja przed-reakcyjna) może być użyta jako szablon do przygotowania reakcji (patrz 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)', strona 21).
Aby rozpocząć reakcję na aparacie PyroMark Q24 - patrz 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 27.

Parametry analizy

Nazwa reakcji (Run name)	Nazwa reakcji zostaje wyświetlona po zapisaniu pliku. Zmiana nazwy pliku zmienia także nazwę reakcji.
Metoda aparatu (Instrument method)	Wybierz metodę aparatu zgodnie z kartridżem, który ma zostać użyty do reakcji. Patrz instrukcje dotyczące poszczególnych produktów.
Nazwa płytki (Plate ID)	Opcjonalnie: Wprowadź nazwę płytki dla PyroMark Q24.
Kod kreskowy (Bar code)	Opcjonalnie: Wprowadź dane kodu kreskowego dla płytki lub, jeśli dysponujesz czytnikiem kodów kreskowych podłączonym do komputera, kliknij na pole tekstowe dla kodu kreskowego i zeskanuj kod kreskowy.
Nazwa odczynników (Reagent ID)	Opcjonalnie: Wprowadź numer partii (lot) używanego zestawu <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro dla pudełek 1 oraz 2. Numery partii znajdują się na etykietach produktów. Uwaga: Zaleca się wprowadzanie numeru partii (lot) zestawu, co może być pomocne przy rozwiązywaniu ewentualnych problemów związanych z używaniem zestawu <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro.
Notatka reakcji (Run note)	Opcjonalnie: Wprowadź notatkę dotyczącą zawartości i celu danej reakcji.

Przypisywanie plików analizy

Aby przypisać plik analizy dla dołka należy:

- Kliknąć kratkę odpowiadającą wybranemu dołkowi prawym przyciskiem myszy i wybrać 'Load Assay' (załaduj reakcję) z menu kontekstowego.
LUB
- Wybrać odpowiednią reakcję poprzez menu oprogramowania, a następnie zaznaczyć i przeciągnąć ją do wybranej kratki odpowiadającej dołkowi.

Każdej kratce studzienki zostaje przyporządkowany kolor odpowiadający określonej analizie.

Wprowadzanie nazw próbek oraz notatek

Aby wprowadzić nazwę próbki lub notatkę, wybierz odpowiednią kratkę i wpisz požądane informacje.

Celem dalszej edycji wybierz lub kliknij dwukrotnie odpowiednią kratkę.

Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w zestawie *therascreen* UGT1A1 Pyro

Niniejszy protokół dotyczy amplifikacji PCR obszaru dla genotypowania wariantu allele *28 oraz osobno amplifikacji PCR obszaru dla genotypowania wariantu allele *6 przy użyciu zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Polimeraza HotStarTaq[®] zawarta w zestawie PyroMark PCR Master Mix wymaga etapu aktywacji przez 15 minut w 95°C.
- Przygotuj wszystkie mieszaniny reakcyjne w obszarze odseparowanym fizycznie od tego, gdzie izoluje się DNA, dodaje matrycy DNA, analizuje produkty PCR oraz przygotowuje próbki do analizy pirosekwencjonowaniem.
- Używaj jednorazowych końcówek pipet z filtrami hydrofobowymi, aby zminimalizować ryzyko kontaminacji krzyżowej.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem probówek ze starterami do PCR, zwiruj je krótko celem zebrania zawartości na dnie.
- Jeśli potrzeba, doprowadź stężenie DNA kontrolnego oraz próbek do wartości 0,4–2 ng/μl.

Uwaga: Stężenie kontrolnego DNA 'Human Control DNA' zawartego w zestawie wynosi 2 ng/μl.

Procedura

- 1. Rozmroź wszystkie niezbędne odczynniki.**
Przed użyciem wymieszaj.
- 2. Przygotuj mieszaninę reakcyjną dla każdego zestawu starterów zgodnie z Tabelą 3.**
Typowo, mieszanina reakcyjna zawiera wszystkie składowe niezbędne do PCR, poza próbką.
Przygotuj mieszaninę reakcyjną w objętości nieco większej niż potrzebna do wykonania wymaganej ilości reakcji PCR.

Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla każdej mieszaniny starterów PCR

Składowa	Objętość/reakcję (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer mix UGT1A1 wariant allela *28 lub PCR Primer mix UGT1A1 wariant allela *6	1,0
Woda (H ₂ O, zawarta w zestawie)	4,0
Objętość całkowita	20,0

3. Dobrze wymieszaj mieszaninę reakcyjną i dodaj po 20 µl do każdej próbki PCR.

Z uwagi na brak aktywności polimerazy HotStarTaq DNA w temperaturze pokojowej, trzymanie próbek PCR na lodzie nie jest konieczne.

4. Dodaj 5 µl matrycy DNA (2–10 ng DNA genomowego) do poszczególnych próbek PCR (patrz Tabela 4) i dobrze wymieszaj.

Uwaga: Próbką stanowiącą kontrolę negatywną (bez matrycy DNA) powinna być uwzględniona w każdej reakcji PCR, przynajmniej dla jednej analizy.

Uwaga: Próbką kontrolną z 'Human Control DNA' może być uwzględniona w każdej analizie jako kontrola pozytywna reakcji PCR i sekwencjonowania (patrz 'Kontrola', strona 7).

Tabela 4. Przygotowanie PCR

Składowa	Objętość/reakcję (µl)
Mieszanina reakcyjna	20
Próbka DNA	5
Objętość całkowita	25

5. Zaprogramuj termocykler zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu parametrów opisanych w Tabeli 5.

Tabela 5. Zoptymalizowany protokół PCR

			Komentarze
Aktywacja wstępna:	15 minut	95°C	Polimeraza HotStarTaq DNA jest aktywowana na tym etapie
Cykle 3-etapowe:			
Denaturacja	20 sekund	95°C	
Hybrydyzacja	30 sekund	53°C	
Wydłużanie	20 sekund	72°C	
Ilość cykli	42		
Wydłużanie końcowe:	5 minut	72°C	

6. Umieść probówki PCR w termocyklerze i rozpocznij program.
7. Po zakończonej amplifikacji przejdź do 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)', strona 21.

Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)

Niniejszy protokół ma na celu immobilizację matrycowego DNA do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance; GE Healthcare) przed rozpoczęciem analizy na systemie PyroMark Q24.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem pozwól wszystkim potrzebnym odczynnikom na osiągnięcie temperatury pokojowej (15–25°C).

Procedura

1. Delikatnie wstrząsaj butelką zawierającą ‘Streptavidin Sepharose High Performance’ do momentu uzyskania homogennego roztworu.
2. Przygotuj mieszaninę ‘master mix’ do immobilizacji DNA zgodnie z Tabelą 6. Przygotuj objętość o 10 % większą niż wymagana dla planowanej ilości reakcji.

Tabela 6. Mieszanina ‘master mix’ do immobilizacji DNA

Składowa	Objętość/reakcję (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)	40
Woda (H ₂ O, zawarta w zestawie)	28
Objętość całkowita	70

3. Dodaj 70 µl mieszaniny ‘master mix’ do dołków 24-dołkowej płytki PCR lub pasków zgodnie z predefiniowanym planem reakcji ‘run setup’ (patrz ‘Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24’, strona 16).
4. Do każdego dołka zawierającego mieszaninę ‘master mix’ dodaj 10 µl biotynylowanego produktu PCR z Protokołu 2 zgodnie z predefiniowanym planem reakcji ‘run setup’ (patrz ‘Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w zestawie *therascreen* UGT1A1 Pyro’, strona 18).
Po dodaniu mieszaniny ‘master mix’ oraz produktu PCR, całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej w każdym dołku powinna wynosić 80 µl.
5. Zaklej płytkę PCR (lub paski) przy użyciu zamknięć paskowych. Upewnij się, że przeciekanie pomiędzy dołkami nie jest możliwe.

6. Wytrząsaj płytkę PCR w temp. pokojowej (15–25°C) przez 5–10 minut przy 1400 obr/min (rpm).

Podczas tego etapu przygotuj stację próżniową (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) do przygotowywania próbek zgodnie z opisem zawartym w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

7. Przejdź niezwłocznie do ‘Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24’, strona 23.

Uwaga: Cząsteczki sefarozy szybko opadają (sedymentują) – ich pobranie powinno nastąpić natychmiast po zakończeniu wytrząsania płytki (lub pasków).

Jeśli od wytrząsania minęła więcej niż 1 minuta – wytrząsaj dodatkowo przez 1 minutę i natychmiast przejdź do pobrania cząsteczek sefarozy.

Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24

Niniejszy protokół służy do preparatyki jednoniciowego DNA oraz hybrydyzacji starterów sekwencyjnych do matrycy przed rozpoczęciem analizy pirosekwencjonowaniem na aparacie PyroMark Q24.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem próbek ze starterami sekwencyjnymi zwróć uwagę na krótko przed rozpoczęciem zebrania zawartości na dnie.
- Dodaj 2 różne startery sekwencyjne w takiej samej kolejności zgodnej ze wzorcem predefiniowanych ustawień analizy (run setup) dla używanej płytki (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 16) i w zależności od analizowanego regionu (wariant allele *28 lub *6).
- Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24* (krok 18). Nie należy skracać czasu schładzania próbek po uprzedniej inkubacji w 80°C.
- Regularnie przeprowadzaj test funkcjonowania końcówek filtrujących (filter probes) oraz wymieniaj je na nowe tak jak to opisano w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Umieść jeden adapter do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder) na nagrzanym do 80°C bloku grzejnym – do użytku w kroku 17. Drugi adapter do płytek pozostaw w temp. pokojowej (15–25°C) do użytku w kroku 18.
- Bufor płuczący (PyroMark Wash Buffer) jest dostarczany jako koncentrat (10x). Przed pierwszym użyciem rozcieńcz go do stężenia roboczego (1x) poprzez dodanie 225 ml wody o wysokiej czystości do 25 ml koncentratu (10x PyroMark Wash Buffer) – do uzyskania końcowej objętości 250 ml.
Bufor płuczący o stężeniu roboczym (1x PyroMark Wash Buffer) jest stabilny w 2–8°C do końca oznaczonego terminu ważności.

Procedura

- 1. Rozcieńcz wystarczającą ilość każdego ze starterów sekwencyjnych - UGT1A1 *28 oraz UGT1A1 *6, w buforze hybrydyzacyjnym (PyroMark Annealing Buffer) jak przedstawiono w Tabeli 7.**

Przygotuj rozcieńczone startery sekwencyjne w objętościach większych od wymaganych dla liczby analizowanych próbek (dla wymaganej ilości próbek + jednej dodatkowo).

Tabela 7. Przykładowe rozcieńczanie starterów sekwencyjnych

Składowa	Objętość/próbkę (μl)	Objętość dla 9 + 1 reakcji (μl)
Seq Primer UGT1A1 *28 lub Seq Primer UGT1A1 *6	0,8	8,0
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydyzacyjny)	24,2	242,0
Objętość całkowita	25,0	250,0

- 2. Dodaj 25 μ l rozcieńczonego startera sekwencyjnego do każdego dołka na płytce (PyroMark Q24 Plate) zgodnie ze wzorcem predefiniowanych ustawień analizy 'run setup' (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 16).**
Miej przygotowany jeden z adapterów do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder) dostarczony wraz ze stacją próżniową (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) w temp. pokojowej (15–25°C) i używaj jako statywu podczas przygotowywania i przenoszenia płytki.
- 3. Umieść płytkę/paski PCR przygotowane w Protokole 3 oraz płytkę (PyroMark Q24 Plate) na stole roboczym stacji próżniowej (Rysunek 2).**
Upewnij się, że płytka jest w tej samej orientacji, jak podczas dodawania próbek.



Rysunek 2. Umieszczanie płytki PCR PyroMark Q24 (lub pasków) na stacji próżniowej.

- 4. Włącz ssanie w narzędziu próżniowym przy pomocy znajdującego się na nim włącznika.**

- 5. Ostrożnie zbliż końcówki filtrujące (filter probes) narzędzia próżniowego do dołków płytki PCR (lub pasków) celem zebrania (przyssania) cząsteczek sefarozy zawierających immobilizowaną martycę. Przytrzymaj końcówki w tej pozycji przez 15 sekund. Ostrożnie podnieś narzędzie próżniowe.**

Uwaga: Cząsteczki sefarozy szybko opadają (sedymentują) i ich pobranie musi nastąpić natychmiast po ich wcześniejszym wymieszaniu.

Jeśli od wytrząsania płytki (pasków) minęła więcej niż 1 minuta – wytrząsaj dodatkowo przez 1 minutę i natychmiast przejdź do pobrania cząsteczek sefarozy.

- 6. Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 40 ml 70% etanolu (Rysunek 2). Płucz końcówki filtrujące przez 5 sekund.**
- 7. Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 40 ml roztworu denaturującego (Denaturation Solution; Rysunek 2). Płucz końcówki filtrujące przez 5 sekund.**
- 8. Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki zawierającej 50 ml buforu płuczającego (Wash Buffer; Rysunek 2). Płucz końcówki filtrujące przez 10 sekund.**
- 9. Unieś narzędzie próżniowe i ustaw w pozycji takiej, aby końcówki filtrujące były uniesione lekko w górę, tak jak to pokazano na Rysunku 3, a następnie przytrzymaj przez 5 sekund celem odessania płynu z filtrów.**



Rysunek 3. Narzędzie próżniowe uniesione celem odessania całego płynu z filtrów.

- 10. Ostrożnie przenieś narzędzie próżniowe nad płytkę (PyroMark Q24 Plate), a następnie zamknij ssanie przełącznikiem na narzędziu próżniowym (pozycja 'Off').**
- 11. Obniż narzędzie próżniowe tak, aby końcówki filtrujące znalazły się w dołkach płytki (PyroMark Q24 Plate) zawierających rozcieńczony starter sekwencyjny, a następnie delikatnie poruszaj narzędziem**

próżniowym na boki celem uwolnienia cząsteczek sefarozy do roztworu.

Uważaj, aby nie uszkodzić/zarysować powierzchni płytki końcówkami filtrującymi.

- 12. Przenieś narzędzie próżniowe do wanienki z wodą o wysokiej czystości (Rysunek 2) i wytrząsaj delikatnie przez 10 sekund.**
- 13. Przepłucz końcówki filtrujące poprzez ich zanurzenie w wodzie o wysokiej czystości (Rysunek 2) i włączenie ssania (próżni). Przepłucz końcówki ok. 70 ml wody o wysokiej czystości.**
- 14. Unieś narzędzie próżniowe i ustaw w pozycji takiej, aby końcówki filtrujące były uniesione lekko w górę, tak jak to pokazano na Rysunek 3, a następnie przytrzymaj przez 5 sekund celem odessania płynu z filtrów.**
- 15. Wyłącz ssanie na narzędziu próżniowym (pozycja 'Off') i umieść je w miejscu spoczynkowym (Parking (P) position).**
- 16. Wyłącz pompę próżniową.**

Uwaga: Na koniec dnia roboczego, wszystkie wykorzystane płyny powinny zostać usunięte, a stacja próżniowa (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) sprawdzona pod kątem zanieczyszczeń (patrz 'Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory', strona 42).
- 17. Inkubuj płytkę (PyroMark Q24 Plate) z próbkami w 80°C przez 2 minuty na nagrzanym adapterze do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder).**
- 18. Usuń płytkę (PyroMark Q24 Plate) z podgrzanego adaptera i umieść na drugim adapterze znajdującym się w temp. pokojowej (15–25°C) i pozostaw w takich warunkach przez 10–15 minut celem ostudzenia.**
- 19. Przejdź do 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 27.**

Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24

Niniejszy protokół przedstawia przygotowanie i ładowanie odczynników PyroMark Gold Q24 do kartridża (PyroMark Q24 Cartridge) oraz rozpoczęcie i zakończenie reakcji na aparacie PyroMark Q24. Więcej szczegółów w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Raport przed-reakcyjny (pre run information report) znajdujący się w menu narzędzi (Tools) dla ustawień reakcji (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 16), dostarcza informacji dotyczących objętości nukleotydów, mieszanin enzymów, substratów oraz buforów wymaganych dla danej reakcji.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Włącz urządzenie PyroMark Q24 - włącznik znajduje się w jego tylnej części.

Procedura

- 1. Rozpuść zliofilizowane mieszaniny enzymów i substratów w 620 µl (każdy) wody (H₂O, zawarta w zestawie).**
- 2. Wymieszaj delikatnie. Nie mieszaj przez worteksovanie!**
Uwaga: Celem pełnego rozpuszczenia mieszanin, pozostaw je w temp. pokojowej (15–25°C) przez 5–10 minut. Przed użyciem upewnij się, że roztwory nie są mętne przed ich dodaniem do kartridża PyroMark Q24. Jeśli odczynniki nie mają zostać użyte natychmiast, umieść je na lodzie* lub w lodówce.
- 3. Przed użyciem, zarówno odczynniki, jak i kartridż PyroMark Q24 powinny osiągnąć temp. pokojową (20–25°C).**
- 4. Postaw kartridż PyroMark Q24 etykietą w swoją stronę.**
- 5. Załaduj kartridż PyroMark Q24 odpowiednimi objętościami nukleotydów oraz mieszanin enzymów i substratów, zgodnie z Rysunkiem 4.**

Uważaj, aby nie przenosić pęcherzyków powietrza z końcówek pipet do studzienek kartridża.

* Podczas pracy z chemikaliami zawsze noś fartuch ochronny, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, zapoznaj się z odpowiednimi kartami

bezpieczeństwa materiałów (safety data sheets), dostępnymi u producentów lub dostawców produktów.



Rysunek 4. Widok kartridża PyroMark Q24 z góry. Widoczne oznaczenia korespondują z oznaczeniami na etykietach odczynników. Dodaj mieszaniny enzymów (E), mieszaniny substratów (S) oraz nukleotydów (A, T, C, G) zgodnie z informacjami zawartymi w raporcie przed-reakcyjnym (pre run information report w menu 'Tools' ustawień reakcji).


6. **Otwórz bramkę kartridża w aparacie PyroMark Q24 i wstaw napełniony odczynnikami z etykietą zwróconą w kierunku operatora. Wsuń kartridż do końca, a następnie dociśnij w dół.**
7. **Upewnij się, że z przodu kartridża jest widoczna linia, po czym zamknij bramkę.**
8. **Otwórz ramkę do blokowania płytki i umieść płytkę na bloku grzejnym aparatu.**
9. **Zamknij ramkę do blokowania płytki oraz pokrywę aparatu.**
10. **Do znajdującego się w przedniej części urządzenia portu USB podłącz nośnik pamięci USB zawierający plik reakcyjny 'run file'.**
Nie usuwaj nośnika pamięci USB przed zakończeniem reakcji.
11. **W menu głównym wybierz 'Run' (używając przycisków ▲ oraz ▼) i wciśnij 'OK'.**
12. **Wybierz plik reakcyjny 'run file' (używając przycisków ▲ oraz ▼).**
Celem podglądu zawartości folderu, zaznacz go i wybierz 'Select'. Aby wrócić do poprzedniego widoku wybierz 'Back'.
13. **Aby rozpocząć reakcję zaznacz plik 'run file', a następnie wybierz 'Select'.**
14. **Po skończonej reakcji, gdy aparat wyświetli informację o zapisaniu całej analizy na nośniku pamięci USB, wybierz 'Close'.**
15. **Usuń nośnik pamięci USB z aparatu.**
16. **Otwórz pokrywę aparatu.**
17. **Otwórz bramkę zabezpieczającą kartridża i wyjmij kartridż - należy go pociągnąć lekko w górę, a następnie na zewnątrz (do siebie).**
18. **Zamknij bramkę kartridża.**
19. **Otwórz ramkę zabezpieczającą płytkę i usuń płytkę z bloku grzejnego.**
20. **Zamknij ramkę zabezpieczającą płytkę oraz pokrywę aparatu.**

- 21. Usuń płytkę i umyj kartridż zgodnie z zaleceniami zawartymi w instrukcji załączonej do kartridża.**
- 22. Dokonaj analizy reakcji zgodnie z opisem w 'Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 30.**

Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24

Niniejszy protokół przedstawia analizę genotypowania ukończonej reakcji *therascreen* UGT1A1 przy użyciu oprogramowania PyroMark Q24.

Procedura

1. Podłącz nośnik pamięci USB (zawierający plik reakcyjny 'run file' po zakończonej reakcji) do portu USB komputera.
2. Przenieś plik 'run file' z nośnika USB do wybranej lokalizacji na komputerze przy użyciu Windows Explorer.
3. Otwórz plik 'run file' w opcji 'AQ mode' w oprogramowaniu PyroMark Q24 wybierając 'Open' w menu 'File' lub klikając dwukrotnie ikonę  na głównym pasku narzędzi.
4. Celem dokonania analizy reakcji i uzyskania podglądu wyników kliknij na jeden z przycisków 'Analize'.



Analiza wszystkich próbek (dołków).



Analiza wybranych próbek (dołków).

Więcej informacji na temat analizy reakcji znajduje się w *Instrukcji Użytkowania Aparatu Q24*.

5. Aby wygenerować raport, wybierz opcję 'SNP Full Report' (pełen raport) lub 'SNP Overview Report' (raport poglądowy) w menu 'Reports'.

Uwaga: Dla uzyskania wiarygodnych wyników rekomendowana jest analiza pojedynczych pików o wysokości przynajmniej 30 RLU (relative light units). Ustaw 30 RLU jako 'required peak height for passed quality' w ustawieniach analizy (assay setup) (patrz: 'Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* UGT1A1 Pyro', strona 41 oraz *Instrukcja Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*).

Uwaga: Pyrogram powinien być zawsze porównywany z histogramem, który może być wyświetlony po wybraniu odpowiedniej opcji po kliknięciu prawym przyciskiem myszy w oknie pyrogramu. Wysokości pików pyrogramu powinny korespondować z wysokością słupków histogramu.

Interpretacja Wyników

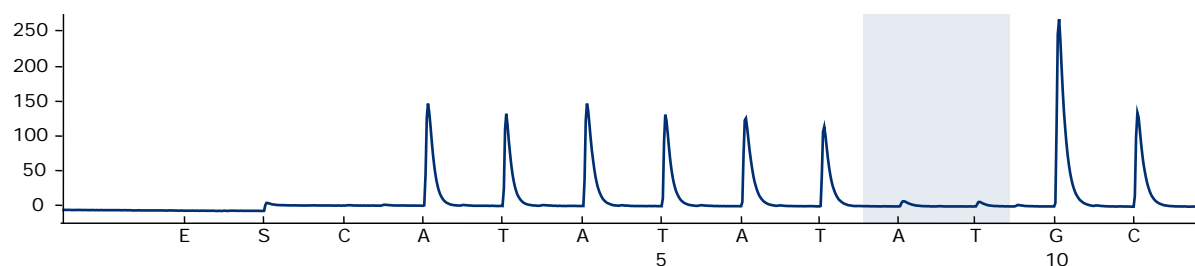
Zawarte w zestawie kontrolne DNA 'Human Control DNA' może zostać wykorzystane do porównania z wynikami prób badanych. To DNA kontrolne cechuje się homozygotycznym genotypem TA6/TA6 oraz G/G odpowiednio dla analizy wariantów alleli *28 i *6.

Analiza genotypowania jest dokonywana automatycznie przez oprogramowanie PyroMark Q24, a jej wyniki są raportowane jako 'SNP Full Report' oraz 'SNP Overview Report'.

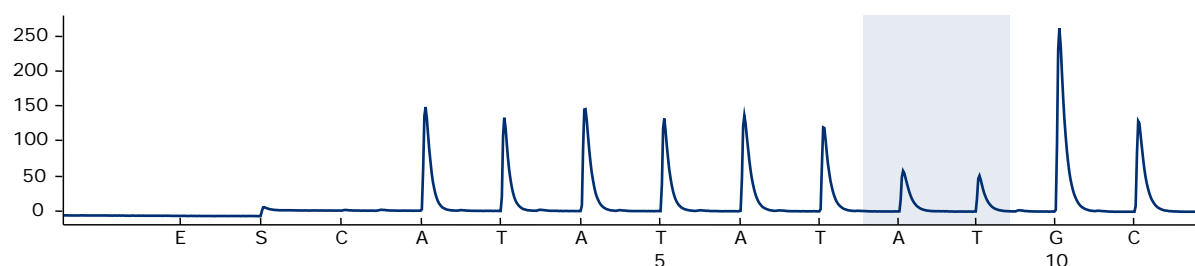
Uwaga: Oceny oraz ostrzeżenia dotyczące jakości wyników wygenerowane w raportach SNP odpowiadają wynikom analizy genotypowania. Dodatkowe oceny oraz ostrzeżenia dotyczące jakości wyników wygenerowane w trybie 'AQ' oprogramowania PyroMark Q24 mogą zostać zignorowane.

Reprezentatywne wyniki

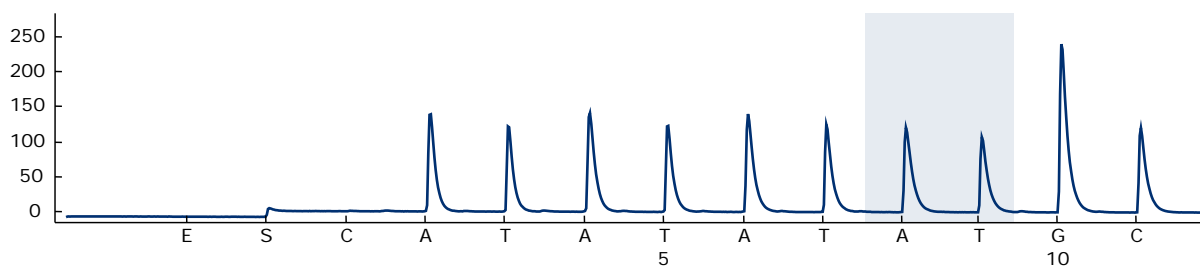
Reprezentatywne wyniki w postaci pyrogramów – Rysunki 5–10.



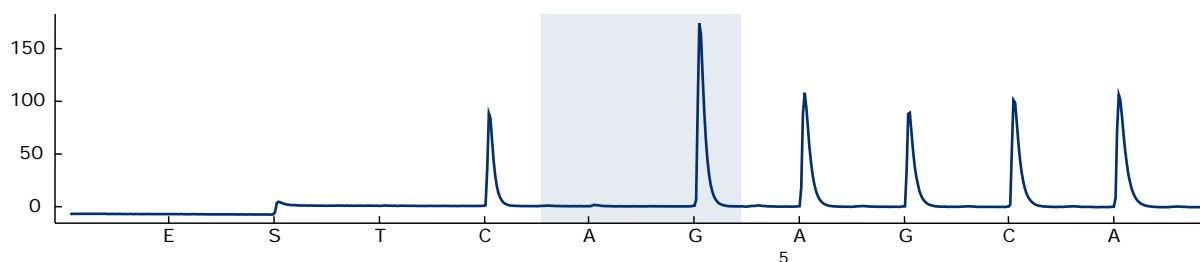
Rysunek 5. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie $-/-$ (TA6/TA6) dla wariantu allela *28.



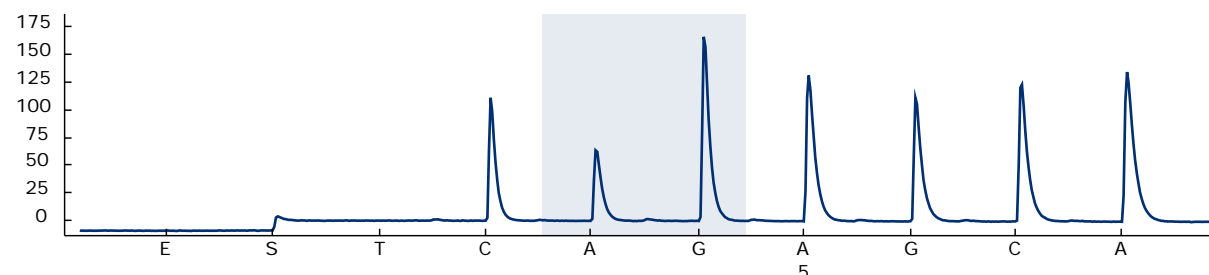
Rysunek 6. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie $-/TA$ (TA6/TA7) dla wariantu allela *28.



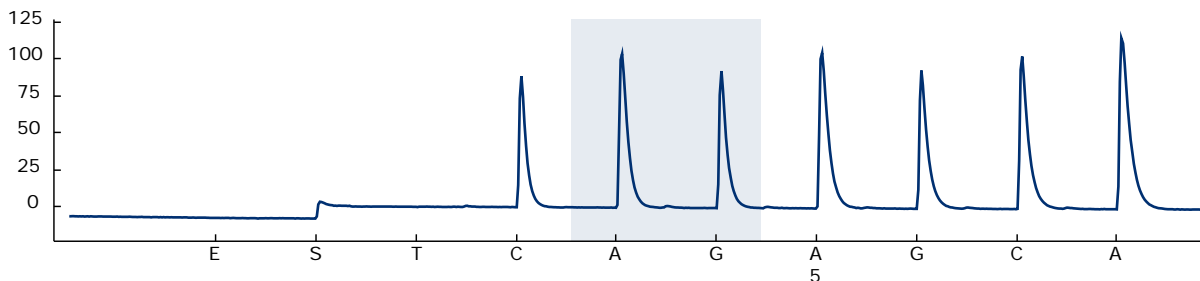
Rysunek 7. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie TA/TA (TA7/TA7) dla wariantu allele *28.



Rysunek 8. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie G/G dla wariantu allele *6.



Rysunek 9. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie G/A dla wariantu allele *6.



Rysunek 10. Pyrogram będący wynikiem analizy próbki o genotypie A/A dla wariantu allele *6.

Rozwiązywanie problemów

Więcej informacji dotyczących rozwiązywania problemów można znaleźć na stronie internetowej 'Frequently Asked Questions' (często zadawane pytania) w centrum pomocy technicznej: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Specjaliści w centrum pomocy technicznej QIAGEN są zawsze gotowi udzielić wszelkich informacji dotyczących zarówno treści niniejszej instrukcji, jak i innych problemów związanych z rozwiązaniami QIAGEN – od próbki do wyniku. Więcej informacji kontaktowych dostępnych jest na ostatniej stronie niniejszej instrukcji oraz pod adresem: www.qiagen.com.

Uwaga: Ogólne informacje dotyczące rozwiązywania problemów związanych z aparatem PyroMark Q24 mogą być znalezione w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

Komentarze i sugestie

Sygnal dla kontroli bez matrycy (kontrola negatywna)

- a) Przenikanie sygnału pomiędzy dołkami Sygnal z jednego dołka jest wykrywany w sąsiednim dołku. Unikaj umieszczania próbek o wysokiej intensywności sygnału obok próbek bez matrycy.
- b) Zanieczyszczenie PCR Używaj sterylnych końcówek pipet z filtrami. Izoluj i przechowuj materiały takie jak próbki, kontrole i amplikony z dala od odczytników PCR.

Sekwencja niespodziewana lub o niskiej jakości

- a) DNA genomowe o niskiej jakości DNA genomowe o niskiej jakości może być przyczyną nieudanego PCR. Analizuj próbki PCR używając technik elektroforetycznych (np. QIAxcel® Advanced System lub elektroforeza w żelu agarozowym).

Komentarze i sugestie

Komunikat 'Check' (sprawdź) lub 'failed' (niepowodzenie) w raporcie SNP

- a) Ostrzeżenie 'Uncertain / Failed due to low peak height' związane z obecnością niskich pików
- Błędy w przygotowaniu PCR lub przygotowaniu próbek do pirosekwencjonowania mogą prowadzić do powstawania zbyt małych pików. Istotnym jest całkowite pobranie próbek przez narzędzie próżniowe. Upewnij się, że jest ono opuszczane powoli do próbek i że geometria płytki PCR lub pasków używanych do immobilizacji pozwala na całkowite pobranie próbek. Regularnie przeprowadzaj test funkcjonowania końcówek filtrujących oraz wymieniaj je na nowe zgodnie z zaleceniami opisanymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.
- W przypadku pojawienia się komunikatu 'Check', uważnie porównaj pyrogram z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). Jeśli wysokość pików odpowiada wysokości słupków, to wynik jest ważny. W przeciwnym razie zalecana jest powtórna analiza próbki.
- b) Ostrzeżenie 'Uncertain / Failed genotype determination'
- W przypadku pojawienia się komunikatu 'Check', uważnie porównaj pyrogram z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). Jeśli wysokość pików odpowiada wysokości słupków, to wynik jest ważny. W przeciwnym razie zalecana jest powtórna analiza próbki.
- Przy analizie UGT1A1 *28 ostrzeżenie może być spowodowane 'ślizganiem się' polimerazy na powtórzeniach TA, co może być szczególnie widoczne w próbkach nowotworowych FFPE. Używaj DNA wysokiej jakości jako matrycy (np. izolowanego z krwi) lub zwiększ ilość DNA.

Komentarze i sugestie

- c) Niespodziewane rzadkie warianty alleli Komunikat oceny jakości wyniku 'Check' lub 'Failed' może być spowodowany niespodziewanym wzorem wykresu. Może to wskazywać na obecność niespodziewanego wariantu allela, który nie jest analizowany w ramach zadanej sekwencji do analizy (Sequence to Analyze). Takie próbki powinny być analizowane z użyciem alternatywnej sekwencji do analizy uwzględniającej niespodziewane warianty alleli.
- d) Ostrzeżenie sygnalizujące duże odchylenie wysokości pików 'High peak height deviation' dla dozowania (dispensation) x Pyrogram powinien zostać uważnie porównany z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). W przypadku gdy zmierzona wysokość pików nie odpowiada wysokości słupków histogramu i nie może to być przypisane rzadkimi wariantom alleli, to zalecana jest powtórna analiza próbki.

Wysoki poziom tła

- a) Niewłaściwe przechowywanie nukleotydów Nukleotydy przechowuj w 2–8°C. Przechowywanie w –15 do –25°C może powodować wzrost poziomu tła.
- b) Krótki czas schładzania próbek przed rozpoczęciem analizy pirosekwencjonowaniem Trzymaj próbki na statywie 'PyroMark Q24 Plate Holder' w temp. pokojowej przez 10–15 minut. Nie skracaj czasu schładzania.
- c) Zanieczyszczenie kartridża Ostrożnie oczyść kartridż zgodnie z wytycznymi w instrukcji kartridży. Przechowuj kartridż zabezpieczony przed światłem i kurzem.

Brak sygnałów dla kontroli pozytywnych

- a) Niewystarczająca dla wszystkich próbek ilość mieszaniny enzymów lub substratów Upewnij się, że kartridż aparatu PyroMark Q24 jest napełniony odczynnikami zgodnie z protokołem pre-reakcyjnym (Pre Run Information) z menu 'Tools'.
- b) Nieprawidłowe przechowywanie lub rozcieńczanie odczynników Przygotuj odczynniki *therascreen* zgodnie z instrukcją w 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 27.

Komentarze i sugestie

- c) Niepowodzenie w przygotowaniu PCR lub próbki
- Błędy w przygotowaniu reakcji PCR, programowaniu termocyklera lub przygotowaniu próbki do analizy pirosekwencjonowaniem mogą skutkować brakiem sygnału. Przeprowadź test funkcyjny końcówek filtrujących zgodnie z wytycznymi zawartymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24* i wymień je na nowe jeśli zachodzi taka potrzeba. Powtórz PCR oraz analizę pirosekwencjonowaniem.

Kontrola Jakości

Zgodnie z wymaganiami certyfikatu zarządzania jakością ISO firmy QIAGEN, każda partia produktu *therascreen* UGT1A1 Pyro jest testowana względem predeterminowanych specyfikacji, celem zapewnienia stałej jakości produktu.

Ograniczenia

Wszelkie wygenerowane wyniki diagnostyczne muszą być interpretowane w powiązaniu z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi.

Sprawdzenie wydajności systemu jest odpowiedzialnością użytkownika w kontekście procedur stosowanych w jego laboratorium, a które nie są objęte testami wykonywanymi przez QIAGEN.

Charakterystyki Wydajności

Precyzja

Dane dotyczące precyzji pozwalają na określenie całkowitej zmienności analizy w odniesieniu do prawidłowego genotypowania wariantów alleli *28 oraz *6. Plazmidy niosące warianty alleli zostały zmieszane w proporcjach (0, 50, 100%) reprezentujących genotypy homo- oraz heterozygotyczne (*28 TA6/TA6, TA6/TA7 oraz TA7/TA7; *6 G/G, G/A oraz A/A). Każda mieszanina została poddana analizie w siedmiu reakcjach pirosekwencjonowania, każda w trzech powtórzeniach i przy użyciu różnych partii zestawów *therascreen* UGT1A1 Pyro, a także różnych aparatów PyroMark Q24, operatorów, w różnych dniach i laboratoriach.

Precyzja jest wyrażona jako częstość prawidłowych wyników (Correct Call Rate; np. proporcja analizowanych próbek z prawidłowym wynikiem genotypowania). Reakcje analizy genotypowania wariantów alleli *28 oraz *6 wymienione odpowiednio w Tabelach 8 i 9, przedstawiają częstość prawidłowych wyników dla analizowanych próbek na poziomie 100%.

Tabela 8. Precyzja genotypowania wariantów allele *28

Genotyp*	Ilość próbek	Prawidłowe wyniki
Homozygota TA6/TA6	21	21
Heterozygota TA6/TA7	21	21
Homozygota TA7/TA7	20	20

* Reprezentowane przez mieszaniny plazmidów 0, 50 i 100% na podstawie pomiarów OD₂₆₀.

Tabela 9. Precyzja genotypowania wariantów allele *6

Genotyp*	Ilość próbek	Prawidłowe wyniki
Homozygota G/G	21	21
Heterozygota G/A	21	21
Homozygota A/A	21	21

* Reprezentowane przez mieszaniny plazmidów 0, 50 i 100% na podstawie pomiarów OD₂₆₀.

Ocena diagnostyczna

Zestaw *therascreen* UGT1A1 Pyro został przetestowany w porównaniu do sekwencjonowania Sangera. DNA zostało wyizolowane ze 100 próbek nowotworowych skóry zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE), a następnie przetestowane pod kątem genotypowania wariantów allele *28 i *6.

DNA zostało wyizolowane przy użyciu zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue. Analiza pirosekwencjonowaniem została przeprowadzona przy pomocy zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro i aparatu PyroMark Q24 oraz sekwencjonowaniem Sangera na aparacie ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Na 100 próbek przeanalizowanych sekwencjonowaniem Sangera, genotyp został określony w 95 i 99 próbkach odpowiednio dla wariantów allele *28 oraz *6. Przy użyciu zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro genotyp został określony w 98 i 99 próbkach odpowiednio dla wariantów allele *28 oraz *6.

Obie metody pozwoliły na określenie statusu 29, 49 i 12 próbek odpowiednio dla genotypów TA6/TA6, TA6/TA7 oraz TA7/TA7. Cztery dodatkowe próbki wykazały genotyp TA6/TA6 przy użyciu zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro podczas gdy sekwencjonowanie Sangera wykazało genotyp TA6/TA7 (Tabela 10).

Poza próbkami, których analiza skończyła się niepowodzeniem dla jednej lub obu metod, analiza zestawem *therascreen* UGT1A1 Pyro i sekwencjonowanie Sangera wykazały 96% zgodność wyników dla genotypowania wariantów allele *28 (Tabela 10).

Tabela 10. Wyniki genotypowania wariantów allele *28 w próbkach pochodzenia kaukaskiego.

		Sekwencjonowanie Sangera				Razem
		TA6/ TA6	TA6/ TA7	TA7/ TA7	Nieznane	
Zestaw <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	TA6/TA6	29	4	0	2	35
	TA6/TA7	0	49	0	2	51
	TA7/TA7	0	0	12	0	12
	Nieznane	0	1	0	1	2
	Razem	29	54	12	5	100

Wszystkie próbki wykazały genotyp homozygotyczny G/G dla wariantu allele *6 zarówno przy użyciu sekwencjonowania Sangera, jak i zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro. Wynik ten jest zgodny z najnowszą wiedzą stwierdzającą praktycznie całkowity brak genotypów A/G oraz A/A w populacjach kaukaskich. W związku z tym, DNA pozyskane z dodatkowych 26 wymazów z jamy ustnej pobranych od osób rasy azjatyckiej zostało wyizolowane przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA Blood Mini na aparacie QIAcube® i przeanalizowane pod kątem wariantów allele *6.

Obie metody wykazały dla 15, 9 i 2 próbek odpowiednio genotypy G/G, G/A oraz A/A (Tabela 11).

Poza próbkami, których analiza skończyła się niepowodzeniem dla jednej lub obu metod, analiza zestawem *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit i sekwencjonowanie Sangera wykazały 100% zgodność wyników dla genotypowania wariantów allele *6 (Tabela 11).

Tabela 11. Wyniki genotypowania wariantów allele *6 w próbkach pochodzenia azjatyckiego

		Sekwencjonowanie Sangera				Razem
		G/G	G/A	A/A	Nieznane	
Zestaw <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	G/G	15	0	0	0	15
	G/A	0	9	0	0	9
	A/A	0	0	2	0	2
	Nieznane	0	0	0	0	0
	Razem	15	9	2	0	26

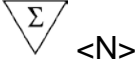













Uwaga: We wszystkich analizach oceniających charakterystykę wydajności, sygnał wynosił ponad 30 RLU, co odpowiada rutynowym wynikom przy 10 ng DNA wyizolowanego z tkanek zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE).

Literatura

QIAGEN prowadzi dużą i aktualną bazę danych publikacji naukowych zawierających dane dotyczące produktów QIAGEN. Zaawansowane opcje wyszukiwania pozwalają na znalezienie pożądaných publikacji i informacji z wykorzystaniem słów kluczowych lub przez określenie zastosowania, obszaru badawczego, tytułu etc.

Kompletną listę literatury można znaleźć w bazie danych 'QIAGEN Reference Database' pod adresem www.qiagen.com/RefDB/search.asp albo kontaktując się z pomocą techniczną QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem.

Symbole

	Zawiera odczynniki wystarczające na <N> ilość testów
	Użyj do
	Do medycznego użytku diagnostycznego in vitro
	Numer katalogowy
	Numer partii (lot)
	Numer materiału
	Komponenty (składowe)
	Zawiera
	Numer
	Wodorotlenek sodu
	Globalny Numer Handlowy Produktu (Global Trade Item Number)
	Ograniczenia temperaturowe
	Producent
	Zapoznaj się z instrukcją użytkowania

Informacje Kontaktowe



Aby uzyskać pomoc techniczną i znaleźć więcej informacji, zapraszamy do naszego Centrum Pomocy Technicznej www.qiagen.com/Support lub do kontaktu z Serwisem Pomocy Technicznej QIAGEN bądź do kontaktu z lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub odwiedź www.qiagen.com).

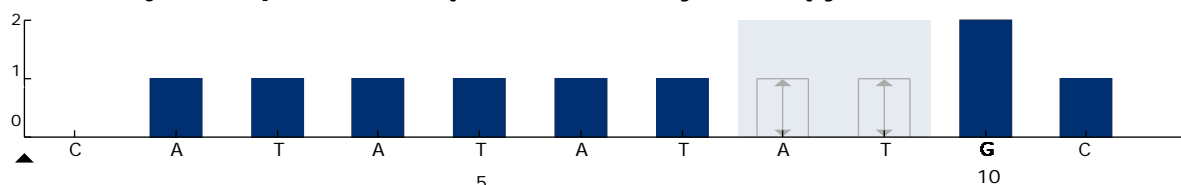
Dodatek A: Przygotowanie reakcji *therascreen* UGT1A1 Pyro

Przed przystąpieniem do analizy z użyciem zestawu *therascreen* UGT1A1 po raz pierwszy, należy zaprogramować plik reakcyjny (assay file). Zaprogramuj reakcję dla wariantów alleli UGT1A1 przy użyciu oprogramowania PyroMark Q24 zgodnie z poniższymi instrukcjami.

Procedura



UGT1A1 *28

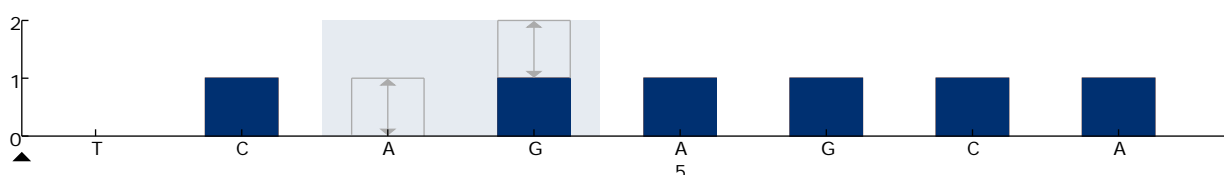
1. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz 'New AQ Assay'.
2. W oknie 'Sequence to Analyze' wpisz poniższą sekwencję:
ATATAT[AT]GGCA
3. Ręcznie wprowadź następującą kolejność dozowania (Dispensation Order):
CATATATGC
4. Wybierz zakładkę 'Analysis Parameters' (parametry analizy) i zwiększ 'Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:' (odcięcie wysokości piku – wymagana wysokość piku spełniająca kryteria jakości) do 30.
5. Kliknij  na pasku narzędzi i zachowaj analizę jako **UGT1A1 *28**.



Rysunek 11. Histogram genotypowania UGT1A1 dla wariantu allela *28.


UGT1A1 *6

1. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz 'New AQ Assay'.
2. W oknie 'Sequence to Analyze' wpisz poniższą sekwencję:
CRGAGCAT
3. Ręcznie wprowadź następującą kolejność dozowania (Dispensation Order):
TCAGAGCA
4. Wybierz zakładkę 'Analysis Parameters' (parametry analizy) i zwiększ 'Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:' (odcięcie wysokości piku – wymagana wysokość piku spełniająca kryteria jakości) do 30.
5. Kliknij  na pasku narzędzi i zachowaj analizę jako **UGT1A1 *6**.



Rysunek 11. Histogram genotypowania UGT1A1 dla wariantu allela *6.

Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory

OSTRZEŻENIE 	Niebezpieczne chemikalia <p>Roztwór denaturujący (Denaturation Solution) używany ze stacją próżniową zawiera działający drażniąco na skórę i oczy wodorotlenek sodu.</p> <p>Zawsze noś okulary ochronne, fartuch i rękawiczki.</p> <p>Osoba lub instytucja odpowiedzialna (np. manager laboratorium) musi zadbać, aby otaczające miejsce pracy było bezpieczne i operatorzy urządzeń nie byli narażeni na niebezpieczne ilości substancji toksycznych (chemicznych i biologicznych), tak jak to zdefiniowano w odpowiednich kartach bezpieczeństwa (Safety Data Sheets - SDS) lub innych dokumentach takich jak OSHA,* ACGIH,† lub COSHH‡.</p> <p>Wietrzenie oparów oraz usuwanie odpadów musi przebiegać w zgodzie ze wszystkimi krajowymi i lokalnymi przepisami dotyczącymi zdrowia i bezpieczeństwa, w tym przepisów BHP.</p>
---	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (United States of America)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (United States of America)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (United Kingdom)

Upewnij się, że przestrzegane są wszelkie krajowe i lokalne przepisy środowiskowe dotyczące pozbywania się odpadów laboratoryjnych.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Niniejszy protokół wymaga użycia wody o wysokiej czystości.

Procedura

- B1. Upewnij się, że narzędzie próżniowe ma wyłączone ssanie (próżnię; pozycja 'Off') i pompa próżniowa jest wyłączona.**
- B2. Usuń wszystkie roztwory pozostałe w wanienkach.**
- B3. Umyj waniенki wodą o wysokiej czystości lub jeśli konieczne wymień na nowe.**
- B4. Opróżnij butlę na odpady płynne.**
Pokrywa może zostać odkręcona bez potrzeby odłączania wężyków.
- B5. Jeśli stacja próżniowa musi zostać umyta (np. z powodu kurzu lub wycieków), postępuj zgodnie z wytycznymi zawartymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.**

Informacje Dotyczące Zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Zestaw <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro (24)	Na 24 reakcje dla systemów PyroMark Q24: Seq Primers (startery sekwencyjne), PCR Primers (startery PCR), Human Control DNA (DNA kontrolne), PyroMark PCR Master Mix (mieszanka do PCR), CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący), PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydyzacyjny), PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący), PyroMark Wash Buffer (bufor płuczący), Enzyme Mixture (mieszanka enzymów), Substrate Mixture (mieszanka substratów), dATPαS, dCTP, dGTP, dTTP i H ₂ O	971540
Akcesoria		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-dołkowa płytki reakcyjna	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kartridże do dozowania nukleotydów i odczynników	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Końcówki filtrujące wielokrotnego użytku do stacji próżniowej PyroMark Vacuum Workstation Q96 oraz Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Odczynnik do sprawdzania działania systemu po instalacji	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Odczynnik do testu wydajności systemu po instalacji	979304
Produkty powiązane		
PyroMark Q24 MDx	Platforma do detekcji sekwencji metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001513
PyroMark Q24	Platforma do detekcji sekwencji metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001514

Produkt	Zawartość	Nr kat.
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (Stacja próżniowa)	Stacja próżniowa (220 V) do preparatyki 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Stacja próżniowa)	Stacja próżniowa (220 V) do preparatyki 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001518
Oprogramowanie PyroMark Q24 MDx	Oprogramowanie aplikacyjne	9019063
Oprogramowanie PyroMark Q24	Oprogramowanie analityczne	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Zestaw na 50 izolacji DNA: 50 QIAamp MinElute® Columns (kolumny), Proteinase K (proteinaza K), Buffers (bufory), Collection Tubes (2 ml) (próbówki na eluat)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Zestaw na 48 izolacji: Reagent Cartridges (Tissue) (kartridże odczynnikowe), Disposable Filter-Tips (jednorazowe końcówki pipet z filtrami), Disposable Tip-Holders (jednorazowe uchwyty do końcówek pipet), Sample Tubes (2 ml) (próbówki), Elution Tubes (1,5 ml) (próbówki na eluat), Buffer G2 (bufor G2), Proteinase K (proteinaza K)	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Zestaw na 50 izolacji: QIAamp Mini Spin Columns (kolumny), Buffers (bufory), Reagents (odczynniki), Tubes (próbówki), VacConnectors (adaptery)	61104

* Tylko UK

† Reszta świata

Aktualne informacje na temat licencji i zastrzeżeń dotyczących konkretnych produktów można uzyskać z podręcznika odpowiedniego zestawu lub z instrukcji obsługi QIAGEN. Podręczniki zestawów QIAGEN i instrukcje obsługi są dostępne na stronie www.qiagen.com. Można je także zamówić w dziale pomocy technicznej firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

Strona celowo pozostawiona pustą

Strona celowo pozostawiona pustą

Strona celowo pozostawiona pustą

Znaki towarowe: 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).

Ograniczona Umowa Licencyjna

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro na następujące warunki:

1. Zestawu *therascreen* UGT1A1 Pyro można używać wyłącznie zgodnie z *Instrukcją obsługi zestawu theascreen UGT1A1* i tylko razem z elementami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji na swoją własność intelektualną w zakresie użytkowania lub włączania dołączonych składników tego zestawu do innych składników, które nie zostały dołączone do tego zestawu, za wyjątkiem przypadków opisanych w *Instrukcji obsługi zestawu theascreen UGT1A1 Pyro* oraz dodatkowych protokołów dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Niniejszy zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN w szczególności odrzuca wszystkie inne licencje, wyrażone lub domniemane, za wyjątkiem licencji wyraźnie podanych w dokumentacji.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodejmowanie ani niepozwalanie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej Umowy Licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

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)

