

# PyroMark<sup>®</sup> Q24 Validering Oligo - Håndbog



Version 1



Til funktionskontrol af PyroMark Q24 MDx-systemet

Til in vitro-diagnostisk brug



979304



1057426DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1057426DA

## **QIAGEN prøve- og analyse-teknologier**

QIAGEN er den førende leverandør af innovative prøve- og analyse-teknologier, der muliggør isolation og påvisning af indholdet i enhver biologisk prøve. Vore avancerede højkvalitetsprodukter og -service garanterer succes fra prøve til resultat.

### **QIAGEN sætter standarder i:**


- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nucleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-undersøgelser og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyse-teknologier

Vor opgave er at bringe Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. For yderligere information, se [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).












# Indhold

<b>Kit-indhold</b>	<b>4</b>
<b>Symboler</b>	<b>4</b>
<b>Opbevaring</b>	<b>5</b>
<b>Anvendelse</b>	<b>5</b>
<b>Begrænsninger ved produktanvendelsen</b>	<b>5</b>
<b>Kvalitetskontrol</b>	<b>6</b>
<b>Teknisk service</b>	<b>6</b>
<b>Advarsler og forholdsregler</b>	<b>6</b>
<b>Indledning</b>	<b>7</b>
Princip og procedure	7
Beskrivelse af protokoller	8
<b>Udstyr og reagenser, som leveres af bruger</b>	<b>9</b>
<b>Protokol 1: Opsætning af en PyroMark Q24 Validering Oligo-analyse</b>	<b>10</b>
<b>Protokol 2: Kørselsopsætning for funktionstest af PyroMark Q24 MDx-systemet</b>	<b>11</b>
<b>Protokol 3: Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo Fortyndingsserie</b>	<b>13</b>
<b>Protokol 4: Bestemmelse af linearitet, uensartethed og repetérbarhed</b>	<b>16</b>
<b>Protokol 5: Analyse af linearitet</b>	<b>22</b>
<b>Protokol 6: Analyse af Bias og Repetérbarhed</b>	<b>26</b>
<b>Fejlsøgning</b>	<b>28</b>
<b>Appendiks A: Klargøring af PyroMark Q24 MDx Vakuüm-arbejdsstation</b>	<b>32</b>
<b>Appendiks B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere</b>	<b>33</b>
<b>Referencer</b>	<b>35</b>
<b>Bestillingsinformation</b>	<b>36</b>

## Kit-indhold

<b>PyroMark Q24 Validering Oligo</b>	
<b>Katalognr.</b>	<b>979304</b>
<b>Antal analyser</b>	<b>3</b>
PyroMark Q24 Validering Oligo 5 % (20 µm)	70 µl
PyroMark Q24 Validering Oligo 95 % (20 µm)	70 µl
Fortyndingsbuffer	2 x 1,7 ml
Håndbog	 1

## Symboler

 <N>	Indeholder reagenser til <N> tests
	Holdbar indtil
	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
	Katalognummer
	Lot-nummer
	Materialenummer
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
	Natriumhydroxid
	Globalt varenummer



Temperaturbegrænsninger



Ansvarlig producent



Der henvises til de informationer, der gives i håndbogen



Vigtig oplysning

## Opbevaring

PyroMark Q24 Validering Oligo bør opbevares ved  $-30$  til  $-15$  °C ved ankomst. Gentagne optøninger og genfrysninger ( $>4$  x) bør undgås. Ved opbevaring under disse forhold er PyroMark Q24 Validering Oligo stabil indtil udløbsdatoen.

## Anvendelse

PyroMark Q24 Validering Oligo er et middel til kontrol af PyroMark Q24 MDx-systemets funktion ved in vitro-diagnostiske Pyrosequencing®-applikationer.

## Begrænsninger ved produktanvendelsen

Ved vitro-diagnostisk brug må PyroMark Q24 MDx-systemet kun betjenes af

- personale, der har fået speciel uddannelse og træning med hensyn til procedurer, der anvender in vitro-diagnostisk medicinsk udstyr, og
- godkendte medicinske forsøgslaboratorier.

Alle funktioner skal udføres i henhold til systemvejledningen til PyroMark Q24 MDx som anvist via dialogmeddelelser, der vises på skærmen af PyroMark Q24 MDx, de tilhørende brugervejledninger, håndbøger og teknisk support fra QIAGEN og inden for de grænser, der er fastlagt af de tekniske specifikationer.

Materialer til prøveklargøring før pyrosekvenseringsanalyse er ikke inkluderet i produktet.

Produktet er udelukkende beregnet til brug på PyroMark Q24 MDx-systemet.

Det er nødvendigt nøje at følge brugervejledningen til instrumentet og denne håndbog for at opnå optimale resultater. Fortyndning af reagenser på anden måde end beskrevet i denne håndbog anbefales ikke og vil medføre tab af ydelse.

Bemærk nøje udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på æsken og etiketterne til alle komponenter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

Resultater fra PyroMark Q24 MDx-systemet skal fortolkes i sammenhæng med alle relevante kliniske og laboratoriefund.

## Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af PyroMark Q24 Validering Oligo efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

## Teknisk service

QIAGENs tekniske service leverer høj kvalitet og er altid til rådighed. De tekniske serviceafdelinger er bemandede med erfarne videnskabsfolk med omfattende praktisk og teoretisk erfaring inden for prøve- og analyseteknologier og i brugen af QIAGEN®s produkter. Kontakt os i tilfælde af spørgsmål eller vanskeligheder vedrørende PyroMark Q24 Validering Oligo eller QIAGENs produkter generelt.

QIAGENs kunder er en vigtig kilde til information om avancerede eller specialiserede anvendelser af vore produkter. Denne information er en hjælp for andre videnskabsfolk, såvel som for forskerne ved QIAGEN. Vi vil derfor opfordre dig til at kontakte os, hvis du har forslag omkring produktdeevne eller nye anvendelser og teknikker.

For teknisk service og yderligere information henvises til vort tekniske supportcenter på [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), eller henvendelse kan rettes til en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Advarsler og forholdsregler

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, éngangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Yderligere informationer findes i de relevante sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS). De findes online i bekvemt og kompakt PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), hvor sikkerhedsdatabladene for hvert QIAGEN-kit og hver kit-komponent kan læses og udskrives.

# Indledning

PyroMark Q24 Validering Oligo er et middel til kontrol af PyroMark Q24 MDx-systemets funktion.

## Princip og procedure

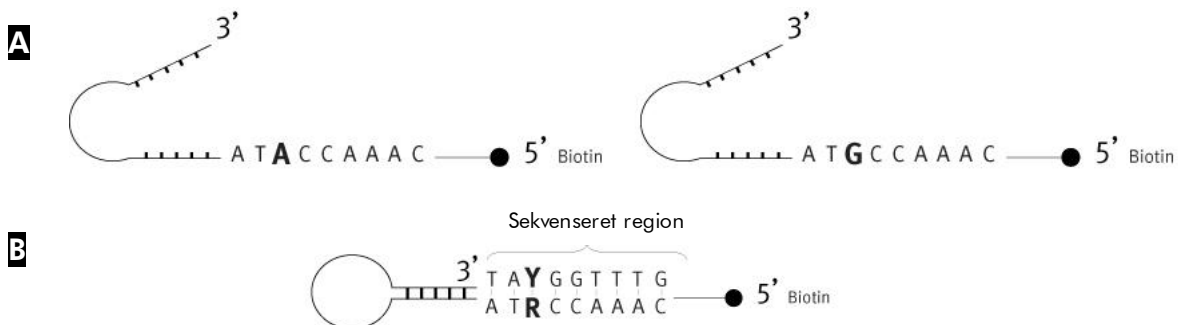
Produktet består af 2 biotinylerede oligonucleotider, som adskiller sig i sekvens i en position, syntetiseret som A eller G. En variabel position genereres ved at blande de 2 oligonucleotider i forskellige proportioner. C eller T inkorporeres efter sekvensering, og den variable position analyseres som % C.

Replika af blandingerne anvendes til at bestemme linearitet, uensartethed og repetérbarhed. Disse bestemmelser udgør funktionstesten af systemet.\*

Grænserne for proportionerne af de 2 blandinger, 5 % og 95 %, er omhyggeligt valgt, så de falder sammen med de generelt accepterede grænser for pålidelig kvantificering bestemt ved in-house evaluering og offentliggjorte data (2–8).

Funktionstesten er gyldig for hele PyroMark Q24 MDx-systemet, idet blandingerne er præpareret via PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstationen før analyse i PyroMark Q24 MDx-instrumentet.

Begge oligonucleotider kan danne en intern stem-loop struktur. Denne struktur muliggør selv-priming af oligonucleotiderne med henblik på udvidelse af DNA-polymerase og eliminerer behovet for en sekvenseringsprimer i pyrosekvenseringsreaktionen. Figur 1 viser oligonucleotidernes struktur.



**Figur 1. Strukturen af PyroMark Q24 Validering Oligo.** **A** Oligonucleotidernes åbne struktur. **B** Oligonucleotidernes selv-primede struktur med angivelse af den analyserede sekvens.

\* Terminologien for funktionsparametrene er definitioner tilpasset ud fra referencen 1 (se "Referencer", side 35).

**Linearitet:** Evnen til, inden for et givet måleinterval, at give måleresultater, som er direkte proportionale med værdien af %C i prøven.

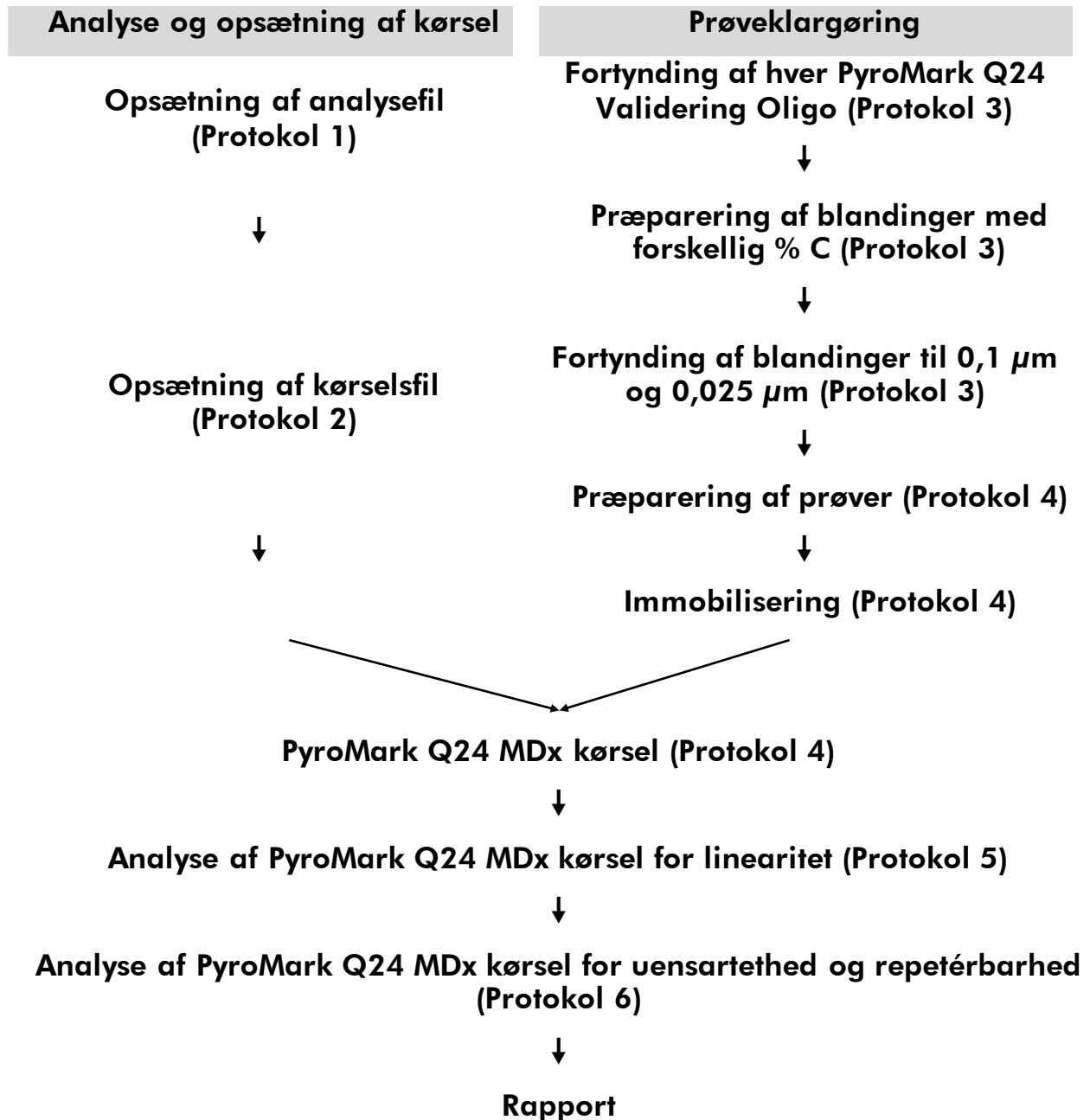
**Uensartethed:** Forskel mellem resultaterne af målingen og en sand værdi af %C.

**Repetérbarhed:** Præcision af successive måleresultater for %C udført under essentielt uændrede målebetingelser (for eksempel replika).

## Beskrivelse af protokoller

Arbejdsgangen nedenfor illustrerer analyseproceduren.

### Arbejdsgangen i PyroMark Q24 Validering Oligo-proceduren





## Udstyr og reagenser, som leveres af bruger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, éngangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDSs), som kan fås hos den pågældende leverandør.

### Til brug på PyroMark Q24 MDx

- PyroMark Q24 MDx (kat. nr. 9001513)\*†
- PyroMark Q24 MDx-software (kat. nr. 9019063)†
- PyroMark Q24 Plade (kat. nr. 979301)†
- PyroMark Q24-beholder (kat. nr. 979302)†
- PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation (kat. nr. 9001515 or 9001517)\*†
- PyroMark Gold Reagenser (kat. nr. 971802)†
- Pipetter (justerbare)\*
- Sterile pipettespidser med filtre
- PyroMark Bindende buffer (kat. nr. 979306)†
- PyroMark Denatureringsopløsning (kat. nr. 979307)†
- PyroMark Vaskebufferkoncentrat (kat. nr. 979308)†
- PyroMark Afhærdningsbuffer (kat. nr. 979309)†
- Streptavidin Sepharose High Performance; (GE Healthcare, kat. nr. 17-5113- 01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- Plademikser\* til immobilisering til kugler
- Varmeblok\* som kan nå op på 80 °C
- 24-brøndes PCR-plade eller strips
- Strip-hætter
- 1,5 ml eller 2 ml mikrocentrifugerør til fortynding af PyroMark Q24 Validering Oligo
- Vandfast tusch til etikettering af rør
- Ultra-rent vand (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm eller tilsvarende)
- Ethanol (70 %)

\* Sørg for at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens angivelser.


† CE-IVD-mærket i overensstemmelse med EU Direktivet 98/79/EU. Alle andre angivne produkter er ikke CE-IVD-mærket baseret på EU Direktivet 98/79/EU.

# Protokol 1: Opsætning af en PyroMark Q24 Validering Oligo-analyse


## **Vigtigt punkt før start**

- For yderligere information om, hvordan man opretter en Analyseopsætning og en Kørselsopsætning, se *Brugervejledningen til PyroMark Q24 Analyse-software*.

## Procedure

1. Opsætning af en analyse til PyroMark Q24 Validering Oligo ved hjælp af PyroMark Q24 MDx-software.
2. Klik på  i værktøjslinjen og vælg "New AQ assay" (ny AQ-analyse).
3. Indtast følgende sekvens i "Sequence to Analyze" (sekvens der skal analyseres).

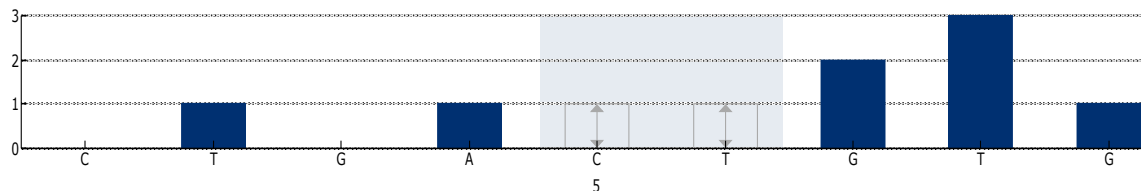
**TAYGGTTGA**

-  For yderligere information om, hvordan man opretter en Analyseopsætningsfil, se *Brugervejledningen til PyroMark Q24 Analyse-software*.

4. Klik på ikonet "Generate Dispensation Order" (generer dispenseringsrækkefølge) for at få følgende nucleotid-dispenseringsrækkefølge:

**AQ: CTGACTGTG**

**CpG: ATGATCGTG**



**Figur 2. Histogram for AQ-mode. Første og tredje** nucleotid-tilføjelse er tomme dispenseringer og fungerer som negative kontroller. Femte og sjette dispenserung udgør den variable position oprettet ved blanding af de 2 oligonucleotider.

5. **Bemærk:** Klik på  i værktøjslinjen for at gemme analysen.

# Protokol 2: Kørselsopsætning for funktionstest af PyroMark Q24 MDx-systemet

## **Vigtige anvisninger før start**

- For vejledning i, hvordan man opretter en ny Kørselsopsætning, se Brugervejledningen til PyroMark Q24 Analyse-software.
- Det anbefales at opstille prøverne i et vilkårligt mønster i PyroMark Q24-pladen. Et eksempel på et vilkårligt mønster er vist i Tabel 1 og Tabel 2, hvor bogstaverne henviser til blandingerne i Tabel 3 (se "Protokol 3: Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo Fortyndingsserie"). Indtast % C som Prøve-ID.
- Der er klargjort to kørselsfiler for hver test: En for 0,5 picomol og en for 2 picomol.


## Procedure

### 1. Opret 2 Kørselsopsætninger til linearitetsbestemmelse ved at importere analyseparametrene til det passende antal plader og brønde som vist i Tabel 1. Gem analyserne som "Linearity\_0.5picomol" og "Linearity\_2picomol".

For at tilføje en analyse til en brønd kan man enten:

- Højreklik på brønden og vælg "Load Assay" (hent analyse) i kontekstmenuen
- Vælg analysen i genvejsoversigten og klik på analysen og træk analysen til brønden.

En brønd er farvekodet efter den analyse, der er anbragt i brønden.

 For yderligere information om, hvordan man opretter en Kørselsopsætningsfil, se Brugervejledningen til PyroMark Q24 Analyse-software.


**Tabel 1. Pladeopsætning til linearitetsbestemmelse**

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A	C	–	F	B	E	–	G
B	D	G	C	D	F	B	C	D
C	A	F	E	A	B	E	–	G

2. Opret 2 Kørselsopsætninger til uensartetheds- og repetérbarhedsbestemmelse ved at importere analyseparametrene til det passende antal plader og brønde som vist i Tabel 2. Gem analyserne som "BiasRepeatability\_0.5picomol" and "BiasRepeatability\_2picomol".

**Tabel 2. Pladeopsætning til uensartetheds- og repetérbarhedsbestemmelse**

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	C	A	B	B	C	C	A	B
B	A	C	A	B	B	C	A	B
C	C	A	B	A	C	B	C	A

3. Gem Kørselsopsætningerne på en USB-hukommelsesnøgle (følger med ved leveringen af PyroMark Q24 MDx-systemet).
4. Udskriv en liste over de nødvendige voluminer af enzymblanding, substratblanding og nucleotider samt pladeopsætning for hver kørselsfil. Vælg "Pre Run Information" (information før kørsel) i menuen "Tools" (Værktøjer), og når rapporten vises, klik på .

# Protokol 3: Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo Fortyndingsserie

## **Vigtige anvisninger før start**


- Nøjagtig afpipettering er vigtigt for at opnå de rette blandinger. Nedenstående beskrevne metode involverer successiv blanding af lige mængder af opløsningerne. Derved reduceres fejl i afpipetteringen. Det er stadig vigtigt, at der anvendes samme pipetteringsteknik for alle blandinger for at sikre, at der rent faktisk dispenseres lige mængder.
- Den buffer, der leveres sammen med PyroMark Q24 Validering Oligo, indeholder et middel, som effektivt eliminerer adsorption af oligonucleotider til plastoverflader, som kan have en negativ indvirkning på funktionen. Det er vigtigt at anvende denne buffer, hvor det er specificeret. PyroMark Q24 Validering Oligo er i sig selv opbevaret i denne buffer.

## **Procedure**

- 1. Den fortyndingsbuffer, der følger med PyroMark Q24 Validering Oligo ved levering, skal fortyndes før brug. Klargør 1x fortyndingsbuffer ved at blande 600  $\mu$ l 10x fortyndingsbuffer med 5400  $\mu$ l ultra-rent vand.**

 Midlet kan forårsage bobledannelse under afpipetteringen.

- 2. Klargør 1,5 ml eller 2 ml mikrocentrifugerør til fortyndingsserierne. Mærk rørene som følger:  
A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1  
A0.1, B0.1, C0.1, D0.1, E0.1, F0.1, G0.1  
A0.025, B0.025, C0.025, D0.025, E0.025, F0.025, G0.025**
- 3. Afpipetter 30  $\mu$ l PyroMark Q24 Validering Oligo 5 % (20  $\mu$ m) i det rør, der er mærket "A1".**
- 4. Afpipetter 30  $\mu$ l PyroMark Q24 Validering Oligo 95 % (20  $\mu$ m) i det rør, der er mærket "B1".**
- 5. Tilsæt 570  $\mu$ l af hver af fortyndingsbufferne 1x (fra trin 1) til rør "A1" og "B1" for at generere 1  $\mu$ m opløsning af hver PyroMark Q24 Validerings Oligo. Bland ved at pipettere op og ned.**

 For at sikre sammenlignelige fortyndinger anbefaler vi stærkt at pipettere de 30  $\mu$ l alikvoter og 570  $\mu$ l uden at ændre nogen indstillinger på pipetten mellem blandingerne.

6. Klargør opløsninger til rørene "C1" til og med "G1" som vist i Tabel 3.

**Tabel 3. Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo-blandinger med forskelligt % C-indhold**

Røretiket	Bland sammen		Endeligt volumen	%C
A1	–	–	600 µl	5 %
B1	–	–	600 µl	95 %
C1	200 µl A1	200 µl B1	400 µl	50 %
D1	100 µl A1	100 µl C1	200 µl	27,5 %
E1	100 µl A1	100 µl D1	200 µl	16,3 %
F1	100 µl B1	100 µl C1	200 µl	72,5 %
G1	100 µl B1	100 µl F1	200 µl	83,8 %

7. Klargør opløsninger til rørene "A0.1" til og med "G0.1" ved at fortynde hver opløsning "A1" til og med "G1" til 0.1 µm som vist i Tabel 4.

**Tabel 4. Fortynding af PyroMark Q24 Validering Oligo-blandinger til rør "A0.1" til og med "G0.1"**

Komponent	Volumen	Koncentration
Opløsninger "A1" til og med "G1" (fra trin 6)	30 µl	1 µm
Fortyndingsbuffer 1x*	270 µl	–
<b>Opløsninger "A0.1" til og med "G0.1"</b>	<b>300 µl</b>	<b>0,1 µm</b>

\* Sørg for, at den 10x fortyndingsbuffer, der fulgte med PyroMark Q24 Validering Oligo, fortyndes med ultra-rent vand før brug. Se trin 1.

8. Klargør opløsninger til rørene "A0.025" til og med "G0.025" ved at foretage en ekstra fortynding af hver opløsning "A0.1" til og med "G0.1" til 0.025  $\mu\text{m}$  som vist i Tabel 5.

**Tabel 5. Fortynding af PyroMark Q24 Validering Oligo-blandinger til rør "A0.025" til og med "G0.025"**

Komponent	Volumen	Koncentration
Opløsninger "A0,1" til og med "G0,1" (fra trin 7)	60 $\mu\text{l}$	0,1 $\mu\text{m}$
Fortyndingsbuffer 1x*	180 $\mu\text{l}$	–
<b>Opløsninger "A0.025" til og med "G0.025"</b>	<b>240 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>0,025 <math>\mu\text{m}</math></b>

\* Sørg for, at den 10x fortyndingsbuffer, der fulgte med PyroMark Q24 Validering Oligo, fortyndes med ultra-rent vand før brug. Se trin 1.



De resterende voluminer af PyroMark Q24 Validering Oligo i rør "A1" til og med "G1" kan opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$  i op til 1 måned. Gentagne optøninger og genfrysninger (>4 x) bør undgås.

## Protokol 4: Bestemmelse af linearitet, uensartethed og repetérbarhed

### Ting, der skal gøres før start

- Følg anvisningerne i *Brugervejledningen til PyroMark Q24* for at installere PyroMark Q24 MDx-systemet.
- Anbring 4 PyroMark Q24 Pladeholdere på en varmeblok ved 80 °C til brug i trin 26.
- Lad alle reagenser og opløsninger nå stuetemperatur (15–25 °C) før start.
- Etiketter 4 PyroMark Q24-plader som følger:  
*Plade 1, Plade 2, Plade 3, Plade 4*

### Procedure

1. Ryst forsigtigt flasken med højtydende Streptavidin Sepharose, til der opnås en homogen opløsning.
2. Klargør en master-blanding til DNA-immobilisering i henhold til Tabel 6. Klargør et volumen, som er mindst 10 % større end det, der kræves for at udføre det samlede antal reaktioner.

Denne protokol kræver  $4 \times 24 = 96$  reaktioner.

Tabel 6. Master-blanding til DNA-immobilisering

Antal prøver	1	110*
Højtydende Streptavidin Sepharose	2 $\mu$ l	220 $\mu$ l
PyroMark Bindende buffer	40 $\mu$ l	4,4 ml
Ultra-rent vand	18 $\mu$ l	1,98 ml
<b>Totalt volumen</b>	<b>60 <math>\mu</math>l</b>	<b>6,60 ml</b>

\* Giver en tilstrækkelig mængde til de krævede  $4 \times 24 = 96$  prøver.

3. Tilsæt 60  $\mu$ l af masterblandingen til alle de 24 brøndes PCR-plader. Mærk pladerne som følger.  
*Plade 1, Plade 2, Plade 3, Plade 4*
4. Plade 1: Pipetter 20  $\mu$ l af hver PyroMark Q24 Validering Oligo-blanding 0,025  $\mu$ m (rør "A0.025" til og med "G0.025" fra "Protokol 3: Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo Fortyndingsserie") i tre kopier til "Plade 1" i det samme mønster som i Kørselsopsætningen til "Linearity\_0.5picomol" (se Pre Run



**Information-rapporten fra "Protokol 2: Kørselsopsætning for funktionstest af PyroMark Q24 MDx-systemet").**

**i** De 3 resterende brønde kan bruges som negative kontroller. Tilsæt 20 µl 1x fortyndingsbuffer i stedet for oligonucleotider.

**i** Det totale volumen per brønd skal være 80 µl efter tilsætning af PyroMark Q24 Validering Oligo-blandingerne.

- 5. Plade 1: Pipetter 20 µl af hver PyroMark Q24 Validering Oligo-blanding 0,1 µm (rør "A0.1" til og med "G0.1" fra "Protokol 3: Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo Fortyndingsserie") i tre kopier til "Plade 2" i det samme mønster som i Kørselsopsætningen til "Linearity\_2picomol" (se Pre Run Information-rapporten fra "Protokol 2: Kørselsopsætning for funktionstest af PyroMark Q24 MDx-systemet").**

**i** De 3 resterende brønde kan bruges som negative kontroller. Tilsæt 20 µl 1x fortyndingsbuffer i stedet for oligonucleotider.

**i** Det totale volumen per brønd skal være 80 µl efter tilsætning af PyroMark Q24 Validering Oligo-blandingerne.

- 6. Plade 3: Pipetter 20 µl af de første 3 PyroMark Q24 Validering Oligo-blandinger 0,025 µm (rør "A0.025" til og med "C0.025" fra "Protokol 3: Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo Fortyndingsserie") i otte kopier til "Plade 3" i det samme mønster som i Kørselsopsætningen til "BiasRepeatability\_0.5picomol" (se Pre Run Information-rapporten fra "Protokol 2: Kørselsopsætning for funktionstest af PyroMark Q24 MDx-systemet").**

**i** Det totale volumen per brønd skal være 80 µl efter tilsætning af PyroMark Q24 Validering Oligo-blandingerne.

- 7. Plade 4: Pipetter 20 µl af de første 3 PyroMark Q24 Validering Oligo-blandinger 0,1 µm (rør "A0.1" til og med "C0.1" fra "Protokol 3: Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo Fortyndingsserie") i otte kopier til "Plade 4" i det samme mønster som i Kørselsopsætningen til "BiasRepeatability\_2picomol" (se Pre Run Information-rapporten fra "Protokol 2: Kørselsopsætning for funktionstest af PyroMark Q24 MDx-systemet").**

**i** Det totale volumen per brønd skal være 80 µl efter tilsætning af PyroMark Q24 Validering Oligo-blandingerne.

- 8. Forsegel PCR-pladerne ("Plade 1" til og med "Plade 4") med strip-hætter.**

**9. Ryst "Plade 1" ved stuetemperatur (15–25 °C) i 5 min. ved 1400 rpm.**

**i** Sepharose-kugler sedimenteres hurtigt. Hvis der er gået mere end 1 min, siden pladen blev rystet, rystes igen i 1 min, før kuglerne opfanges.

**i** Under dette trin klargøres PyroMark Q24 MDx vakuum-arbejdsstation til prøveklargøring (se Appendiks A, side 32).

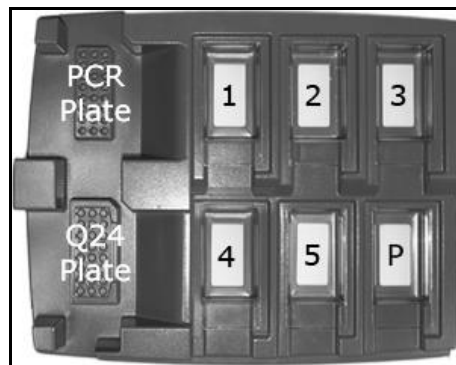
**10. Tilsæt 25 µl af PyroMark afhærdningsbuffer til hver brønd på PyroMark Q24 Plade 1.**

**i** Opbevar en af PyroMark Q24 Pladeholderne (leveres sammen med PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation) ved stuetemperatur (15-25 °C) og brug den som støtte ved klargøring og flytning af pladerne.

**i** Da oligonucleotider er selv-primede, kræves der ingen sekvenserings-primer. Kuglerne frigives i PyroMark afhærdningsbuffer.

**11. Anbring PCR "Plade 1" og en PyroMark Q24-plade på PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation's arbejdsbord (se Figur 3).**

**i** Kontroller, at pladen vender samme vej, som da prøverne blev isat.



**Figur 3. Placering af PCR-plade og PyroMark Q24-plade på PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation.** De markerede positioner indeholder 70 % ethanol (1), PyroMark Denatureringsopløsning (2), PyroMark vaskebuffer (3) og ultra-rent vand (4, 5). P: Parkeringsposition.

**12. Sæt vakuum på vakuumværktøjet ved at åbne vakuumkontakten.**

**13. Sænk forsigtigt filterproberne ned i PCR-pladen for at opfange kuglerne, der indeholder immobiliseret skabelon. Hold proberne på plads i 15 sek. Vær forsigtig, når værktøjet samles op.**

**i** Sepharose-kugler sedimenteres hurtigt. Hvis der er gået mere end 1 min, siden pladen blev rystet, rystes igen i 1 min, før kuglerne opfanges.

**14. Overfør værktøjet til beholderen med 70 % ethanol (beholder 1). Skyl filterproberne i 5 sek.**

**15. Overfør værktøjet til beholderen med PyroMark denatureringsopløsning (beholder 2). Skyl filterproberne i 2 sek.**

16. Overfør værktøjet til beholderen med PyroMark vaskebuffer (beholder 3). Skyl filterproberne i 10 sek.
17. Løft værktøjet op og tilbage til over 90° lodret i 5 sek. for at dræne væsken fra filterproberne (se Figur 4).





Figur 4. Illustration af vakuumværktøjet løftet til over 90° lodret.

18. Luk vakuumkontakten på værktøjet (Off), mens værktøjet holdes over PyroMark Q24-pladen.
19. Frigør kuglerne i pladen med 25  $\mu$ l PyroMark afhærdningsbuffer ved at ryste værktøjet forsigtigt fra side til side. Lad filterproberne hvile på bunden af brøndene.
20. Overfør værktøjet til den første beholder med ultra-rent vand (beholder 4) og ryst værktøjet i 10 sek.
21. Vask filterproberne ved at sænke proberne ned i den anden beholder med ultra-rent vand (beholder 5) og sætte vakuum på. Skyl proberne med 70 ml ultra-rent vand.
22. Løft værktøjet op og tilbage til over 90° lodret i 5 sek. for at dræne væsken fra filterproberne (se Figur 4).
23. Luk vakuumkontakten på værktøjet (Off) og sæt værktøjet i parkeringsstilling (P).
24. Gentag trin 9–23 for de resterende PCR-plader ("Plade 2", "Plade 3", "Plade 4").
25. Sluk for vakuumpumpen.  

**i** Når arbejdsdagen er slut, skal flydende affald og eventuelle resterende opløsninger kasseres, og PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation skal kontrolleres for støv og spild, se Appendiks B, side 33.
26. Opvarm 4 PyroMark Q24-plader med prøverne til 80°C i 2 min. ved hjælp af en varmeblok og de forvarmede PyroMark Q24-pladeholdere.
27. Fjern PyroMark Q24-pladerne fra pladeholderne og lad prøverne køle ned til stuetemperatur (15–25 °C) i mindst 5 min.
28. Isæt en PyroMark Q24-beholder med passende mængder af PyroMark Gold Q24-reagenser som angivet i Pre Run Information-

**rapporten for "Linearity\_0.5picomol" fra "Protokol 2: Kørselsopsætning for funktionstest af PyroMark Q24 MDx-systemet".**

Pre Run informationsrapporten, der findes under menuen "Tools" ved opstilling af kørslen (se Brugervejledningen til PyroMark Q24 Analyse-software), giver information om mængden af nucleotider, enzymblanding og substratblanding, der er nødvendig for en specifik analyse.

29. **Åbn beholderåbningen og indsæt den fyldte PyroMark Q24-beholder med etiketten vendende udad. Skub beholderen helt ind og tryk den derefter nedad.**
30. **Kontroller, at stregen er synlig fortil på beholderen, og luk lemmen.**
31. **Åbn den ramme, der holder pladen, og anbring PyroMark Q24-pladen ("Plade 1") på varmeblokken.**
32. **Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.**
33. **Indsæt USB-hukommelsesnøglen (indeholdende kørselsfilen) i USB-porten på instrumentets front.**
  -  Fjern ikke USB-nøglen, før kørslen er færdig.
34. **Vælg "Run" (Kør) i hovedmenuen ved hjælp af ▲ og ▼ skærmknapperne og tryk på "OK".**
35. **Vælg kørselsfilen "Linearity\_0.5picomol" ved hjælp af ▲ og ▼ skærmknapperne.**
  -  For at se indholdet af en mappe vælges mappen, og der trykkes på "Select" (Vælg). For at vende tilbage til det foregående billede trykkes på "Back" (Tilbage).
36. **Når kørselsfilen er valgt, trykkes på "Select" for at starte kørslen.**
37. **Når kørslen er færdig, og instrumentet bekræfter, at kørselsfilen er gemt på USB-nøglen, trykkes på "Close" (Afslut).**
38. **Åbn instrumentlåget.**
39. **Åbn beholderåbningen og tag PyroMark Q24-beholderen ud ved at løfte den op og trække den ud.**
40. **Luk lemmen.**
41. **Åbn den ramme, der holder pladen, og tag PyroMark Q24-pladen ud fra varmeblokken.**
42. **Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.**
43. **Rengør PyroMark Q24-beholderen (se *PyroMark Gold Q24 Reagenser Håndbog* ).**
44. **Genfyld PyroMark Q24-beholderen med passende mængder af PyroMark Gold Q24-reagenser som angivet i Pre Run Information-rapporten for "Linearity\_2picomol" fra "Protokol 2: Kørselsopsætning for funktionstest af PyroMark Q24 MDx-systemet".**

Pre Run informationsrapporten, der findes under menuen "Tools" ved opstilling af kørslen (se Brugervejledningen til PyroMark Q24 Analyse-software), giver information om mængden af nucleotider, enzymblanding og substratblanding, der er nødvendig for en specifik analyse.

**45. Åbn beholderåbningen og indsæt den fyldte PyroMark Q24-beholder med etiketten vendende udad. Skub beholderen helt ind og tryk den derefter nedad.**

**46. Kontroller, at strengen er synlig fortil på beholderen, og luk lemmen.**

**47. Åbn den ramme, der holder pladen, og anbring PyroMark Q24-pladen ("Plade 2") på varmeblokken.**

**48. Luk den ramme, der holder pladen, og instrumentets låg.**

**49. Indsæt USB-hukommelsesnøglen (indeholdende kørselsfilen) i USB-porten på instrumentets front.**



Fjern ikke USB-nøglen, før kørslen er færdig.

**50. Vælg "Run" i hovedmenuen ved hjælp af ▲ og ▼ skærmknapperne og tryk på "OK".**

**51. Vælg kørselsfilen "Linearity\_2picomol" ved hjælp af skærmknapperne 5 og 6.**



For at se indholdet af en mappe vælges mappen, og der trykkes på "Select". For at vende tilbage til det foregående billede trykkes på "Back".

**52. Når kørselsfilen er valgt, trykkes på "Select" for at starte kørslen.**

**53. Når kørslen er færdig, og instrumentet bekræfter, at kørselsfilen er gemt på USB-nøglen, trykkes på "Close".**

**54. Gentag trin 38–53 for de resterende PyroMark Q24-plader ("Plade 3", "Plade 4").**



For "Plade 3" bruges den kørselsfil, der er gemt som "BiasRepeatability \_0.5picomol".



For "Plade 4" bruges den kørselsfil, der er gemt som "BiasRepeatability \_2picomol".

**55. Fjern USB-hukommelsesnøglen.**

**56. Kassér PyroMark Q24-pladerne og rengør PyroMark Q24-beholderen (se PyroMark Gold Q24 Reagenser Håndbog).**

## Protokol 5: Analyse af linearitet



Analysens linearitet kan testes på 2 niveauer:

- I henhold til Clinical Laboratory Standards Institute Guideline EP6-A<sup>9</sup>, som anbefalet af Standard EN-13612<sup>10</sup> og ved hjælp af valideret software, eller
- ved simpel lineær regressionsanalyse.

### Krævet ydelse for både CpG- og AQ-funktion i henhold til EP6-A

For 0.5–2 picomol af PyroMark Q24 Validering Oligo ved hjælp af den metode, der er beskrevet her, metoden er påvist at være lineær fra 5 % til 95 % C inden for en tilladt nonlinearitet på 3 %-enheder i dette interval.

### Lineariter i henhold til CLSI EP6-A (i henhold til IVD)

Denne metode involverer tilpasning af lineære og polynomielligninger til data. Metoden bestemmer derefter, om tilpasningen af polynomielligningen er signifikant bedre end den lineære ligning, i hvilket tilfælde data er nonlinear. Der kan dog fastsættes acceptgrænser for nonlinearitet, der passer til analysens praktiske behov. Disse er inkluderet i analysen af dataene for at bestemme, om en nonlinearitet, der detekteres, er acceptabel.

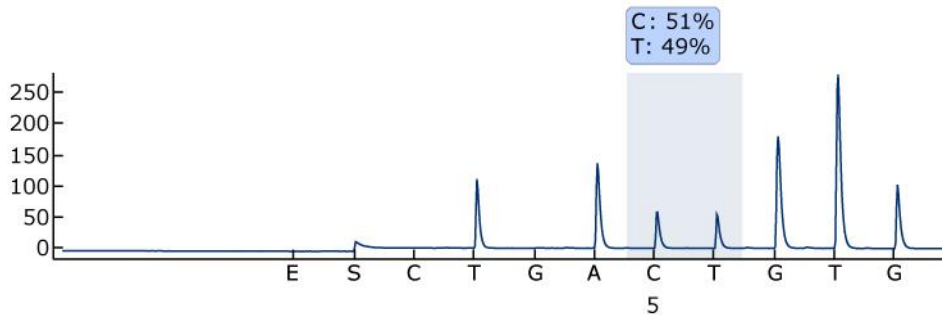
Der findes en række software-produkter på markedet til analyse af data i henhold til EP6-A<sup>10</sup>. Analyse-softwaren kan valideres ved hjælp af for eksempel datasæt fra National Institute of Standards and Technology, USA ([www.nist.gov](http://www.nist.gov)).

### Procedure

- 1. Åbn kørselsfilerne for "Linearity\_0.5picomol" og "Linearity\_2picomol" i PyroMark Q24 MDx-software og analyser alle brønde.**



Alle brønde med undtagelse af de negative kontroller skal gives kvaliteten "Passed", der vises som en blå bjælke i den nederste del af brønden, og med indikationen %C angivet i et blåt rektangel i Pyrogram<sup>®</sup>-udskriften.



**Figur 5. Eksempel på AQ-analyseresultat fra en 50 % blanding (rør "C0.1").**

## 2. Bestem de enkelte spidshøjder

**i** Ideelt skal spidserne være mellem  $30 \pm 10$  RLU for prøver med 0.5 picomol skabelon og over  $120 \pm 40$  RLU for prøver med 2 picomol skabelon.

**i** Vælg "Export Peak Heights" (eksporter spidshøjder) i menuen "Tools" for at få spidshøjdeværdierne. Gem data i et egnet format (\*.csv eller \*.tsv). Åbn denne fil i Microsoft® Excel (Afgrænset), og beregn den gennemsnitlige enkelte spidshøjde og baggrund for hver brønd som beskrevet nedenfor.

**3. Vælg "AQ/CpG Analysis Results" i menuen "Reports" for at åbne analyseresultatrapporten.**

**4. Gem data i et egnet format (\*.csv eller \*.tsv).**

**5. Åbn datafilen i analyse-softwaren.**

**6. Opret en tabel med de forventede og faktiske værdier.**

Et eksempel er vist i Tabel 7 på side 24.

**7. Analyser lineariteten i henhold til software-instruktionerne.**

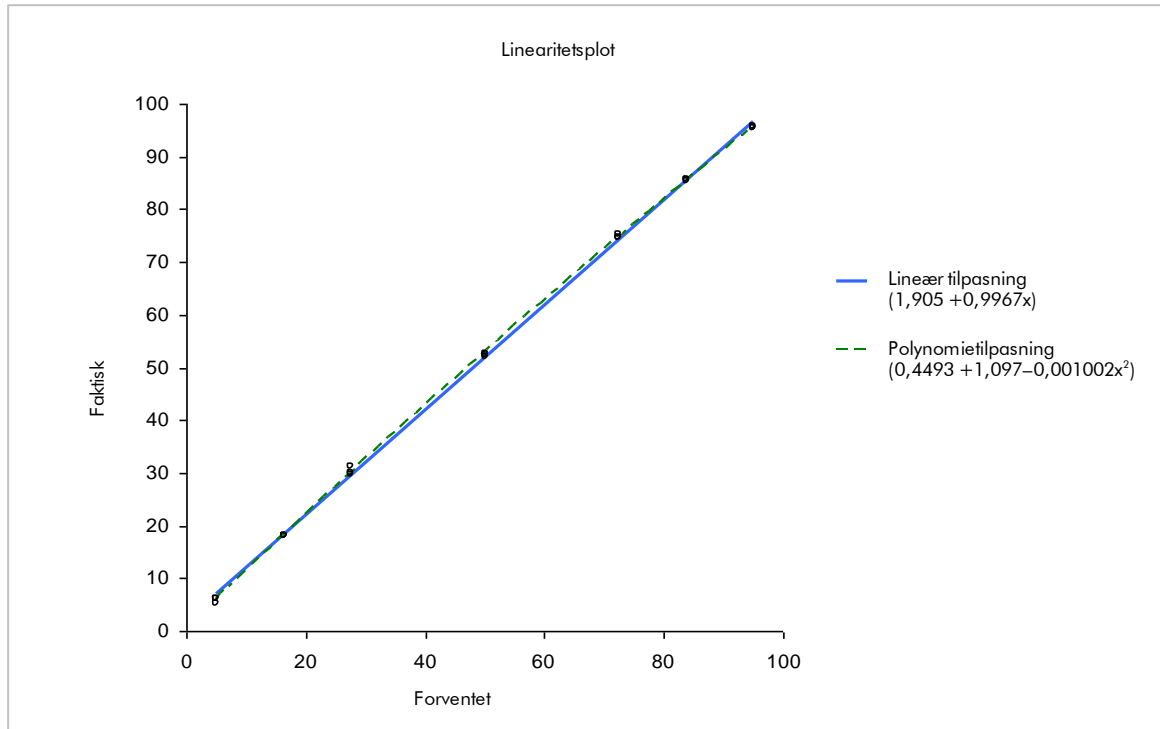
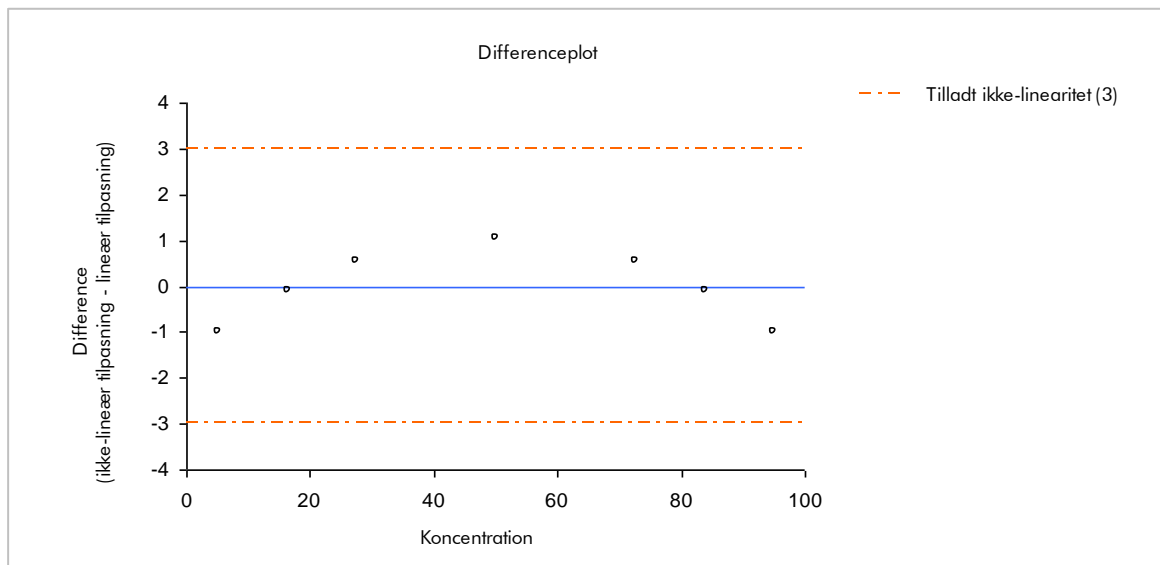
Et eksempel på linearitetsanalyse er vist i Figur 6 på side 25.

**Tabel 7. Forventede og faktiske % C-værdier**

<b>Røretiket</b>	<b>Prøve</b>	<b>Forventet % C</b>	<b>Faktisk % C*</b>
A	1	5	6,22
	2	5	6,17
	3	5	5,06
E	1	16,3	18,20
	2	16,3	17,90
	3	16,3	18,12
D	1	27,5	31,2
	2	27,5	29,89
	3	27,5	29,89
C	1	50	51,88
	2	50	52,62
	3	50	52,27
F	1	72,5	74,76
	2	72,5	74,66
	3	72,5	75,31
G	1	83,8	85,28
	2	83,8	85,53
	3	83,8	85,68
B	1	95	95,30
	2	95	95,40
	3	95	95,73

\* Disse værdier er kun angivet som et eksempel. De faktiske værdier skal bestemmes.



**A****B**

**Figur 6. Eksempel på linearitetsanalyse.** **A** Den lineære tilpasning og polynomietilpasningen er vist grafisk. Polynomietilpasningen er statistisk signifikant. **B** Differenceplottet viser, at data ligger inden for grænserne for den tilladte non-linearitet på 3 procentenheder.

# Protokol 6: Analyse af Bias og Repetérbarhed

## Krævet ydelse for både CpG- og AQ-funktion

For 0.5–2 picomol af PyroMark Q24 Validering Oligo ved hjælp af den metode, der er beskrevet her, er metoden vist sig at give følgende ydelse:

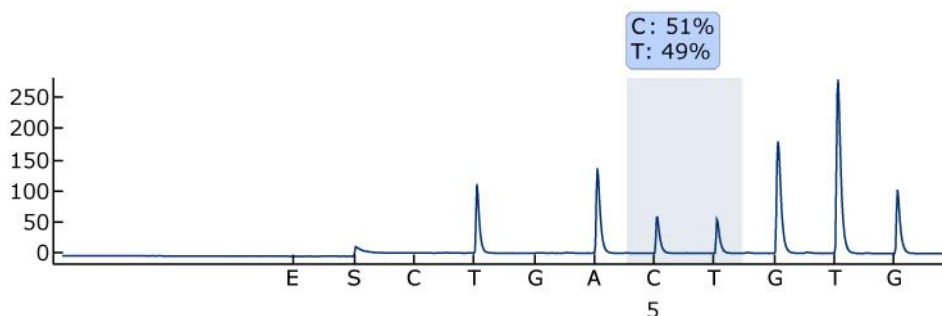
- Repetérbarhed, målt som standardafvigelse for 8 replica, bedre end 3 procentenheder i området 5 % C til 95 % C
- Bias mindre end 5 procentenheder for et gennemsnit på 8 replica i området 5 % C til 95 % C.

Blandingerne "A", "B" og "C" med henholdsvis 5 % C, 95 % C og 50 % C, benyttes til at bestemme repetérbarhed, bias og middel præcision.

## Procedure

1. Åbn kørselsfilerne for "BiasRepeatability\_0.5picomol" og "BiasRepeatability\_2picomol" i PyroMark Q24 MDx-software og analyser alle brønde.

**i** Alle brønde skal gives kvaliteten "Passed", der vises som en blå bjælke i den nederste del af brønden, og med indikationen %C angivet i et blå rektangel i Pyrogram®-udskriften.



Figur 7. Eksempel på AQ-analyseresultat fra en 50 % blanding (rør "C0.1").

2. Bestem de enkelte spidshøjder

**i** Ideelt skal spidserne være mellem  $30 \pm 10$  RLU for prøver med 0.5 picomol skabelon og over  $120 \pm 40$  RLU for prøver med 2 picomol skabelon.

**i** Vælg "Export Peak Heights" i menuen "Tools" for at få spidshøjdeværdierne. Gem data i et egnet format (\*.csv eller \*.tsv). Åbn denne fil i Microsoft Excel (Afgørset), og beregn den gennemsnitlige enkelte spidshøjde og baggrund for hver brønd som beskrevet nedenfor.

3. Vælg "AQ/CpG Analysis Results" i menuen "Reports" for at åbne analyseresultatrapporten.

4. **Gem data i et egnet format (\*.csv eller \*.tsv).**
5. **Åbn datafilen i analyse-softwaren.**
6. **Opret en tabel med de forventede og faktiske værdier.**  
Et eksempel er vist i Tabel 8 på side 27.
7. **De data, der er hentet fra analysen, skal analyseres med valideret statistisk software. Gennemsnit og standardafvigelse for hver blanding beregnes baseret på de 8 replica.**  
Et eksempel på data kan ses i Tabel 8.

**Tabel 8: Resultater af bestemmelse af uensartethed og repetérbarhed**

Forventet % C	Faktisk % C*	Ydelse	
		Standardafvigelse*	Bias*
5	5,2	0,2	0,2
50	52,7	0,7	2,7
95	95,2	0,5	0,2

\* Disse værdier er kun angivet som et eksempel. De faktiske værdier skal bestemmes.

#### **8. Test for mellemstofpræcision.**

Mellemstofpræcision kan testes ved hjælp af de samme blandinger i kombination med det ønskede variationsniveau med hensyn til operatør, instrument og andre reagenser.

## Fejlsøgning





Denne fejlfindingsguide kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden "Frequently Asked Questions" [Hyppigt stillede spørgsmål] hos vort Technical Support Center: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden eller besøg [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

 For generel fejlfinding på instrumentet henvises til Brugervejledningen til PyroMark Q24.

### Kommentarer og forslag




---

#### Dårlig eller ukorrekt sekvens






- |  |  |
|--|--|
| a) PyroMark Q24 Validering<br>Oligo ikke korrekt<br>præpareret       |  Følg vejledningen i protokollerne for klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo. Sørg for at fortynde PyroMark Q24 Validering Oligo i fortyndingsbufferen som beskrevet i protokollerne. Kontroller, at den 10x fortyndingsbuffer, der medfølger, først fortyndes til 1x ved hjælp af ultra-rent vand. |
| b) Ukorrekt sekvens at<br>analysere eller<br>dispenseringsrækkefølge |  Kontroller at den korrekte sekvens er indtastet under Assay Setup (analyseopsætning).  |
| c) Buffere eller reagenser<br>ukorrekt fortyndet eller<br>opbevaret  |  Følg de anvisninger, der følger med reagenserne. Inkluder er tom brønd (som kun indeholder kun afhærdnings-buffer) i kørslen for at kontrollere, om baggrundsspidserne kommer fra nukleotiderne.   |
| d) Dispenseringsfejl (ses for<br>eksempel som delte spidser)         |  Rengør eller udskift PyroMark Q24-beholderen. Hvis problemet vedvarer, kontakt da QIAGENs tekniske service (for kontaktinformation, se bagsiden eller besøg <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a> ).  |

## Kommentarer og forslag

---

- e) Blokeret PyroMark Q24-beholder  Nucleotiderne dispenseres ikke korrekt på grund af en blokeret nål i PyroMark Q24-beholderen. Rengør PyroMark Q24-beholderen og kontroller, at den fungerer korrekt.
- f) Beskadiget PyroMark Q24-beholder  Kasser PyroMark Q24-beholderen i overensstemmelse med alle nationale, regionale og lokale miljøbestemmelser for bortskaffelse af laboratorieaffald.
- g) Afhærdningstid for lang  Foretag afhærdning af korrekt varighed og ved de temperaturer, der er beskrevet i protokollerne.

### Små eller manglende spidser

- a) Utilstrækkelig mængde skabelon til immobilisering  Sørg for at fortynde PyroMark Q24 Validering Oligo korrekt og brug de mængder, der er specificeret i protokollerne.
- b) Ikke tilstrækkeligt enzym eller substrate til alle brønde  Fyld PyroMark Q24-beholderen i henhold til vejledningen i Pre Run Information-rapporten.
- c) Brønde, der er markeret i Run Setup er ikke i overensstemmelse med prøvens placering i pladen  Kontroller, at du har placeret PyroMark Q24-pladen korrekt i henhold til kørselsopsætningen.
- d) Et eller flere af nucleotidrummene i PyroMark Q24-beholderen blev ikke korrekt fyldt med reagenser eller nucleotider  Kontroller, at der tilsættes tilstrækket af reagenserne til PyroMark Q24-enheden. Følg de anvisninger, der følger med produkterne.
- e) Dispenseringsfejl (ses for eksempel som delte spidser)  Rengør eller udskift PyroMark Q24-beholderen. Hvis problemet vedvarer, kontakt da QIAGENS tekniske service (for kontaktinformation, se bagsiden eller besøg [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).


## Kommentarer og forslag

---

- f) Blokeret PyroMark Q24-beholder
- ⓘ Nucleotiderne dispenseres ikke korrekt på grund af en blokeret nål i PyroMark Q24-beholderen. Rengør PyroMark Q24-beholderen og kontroller, at den fungerer korrekt.
- ⓘ Enzymer eller substrater er ikke dispenseret korrekt på grund af en blokeret PyroMark Q24-beholder (som angivet ved et manglende præsekvenseringssignal og ingen spidser i pyrogrammet). Rengør PyroMark Q24-beholderen og kontroller, at den fungerer korrekt.
- g) Beskadiget PyroMark Q24-beholder
- ⓘ Kasser PyroMark Q24-beholderen i overensstemmelse med alle nationale, regionale og lokale miljøbestemmelser for bortskaffelse af laboratorieaffald.
- h) Buffere eller reagenser ukorrekt fortyndet eller opbevaret
- ⓘ Følg de anvisninger, der følger med reagenserne.
- i) PyroMark Q24 Validering Oligo ikke korrekt præpareret
- ⓘ Følg vejledningen i protokollerne for klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo. Sørg for at fortynde PyroMark Q24 Validering Oligo i fortyndingsbufferen som beskrevet i protokollerne. Kontroller, at den 10x fortyndingsbuffer, der medfølger, først fortyndes til 1x ved hjælp af ultra-rent vand.
- j) Kontamineret prøve medfører usædvanlig højt forbrug af substratblanding (noteres som et højt præsekvenseringssignal)
- ⓘ Skift buffere. Brug kun buffere, der er leveret af QIAGEN eller QIAGEN-autoriserede distributører.
- ⓘ Brug zoom i funktionen for at kontrollere, om der er genereret nogen spidser (vælg en sektion af Pyrogrammet med venstre museknap).


### Meget høje spidser

PyroMark Q24 Validering  
Oligo ikke korrekt  
præpareret

 Følg vejledningen i protokollerne for klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo. Sørg for at fortynde PyroMark Q24 Validering Oligo i fortyndingsbufferen som beskrevet i protokollerne. Kontroller, at den 10x fortyndingsbuffer, der medfølger, først fortyndes til 1x ved hjælp af ultra-rent vand.


### Dårlig linearitet

Pipetteringsfejl

 Sørg for omhyggeligt at følge vejledningen i fortynding af PyroMark Q24 Validering Oligo in "Protokol 3: Klargøring af PyroMark Q24 Validering Oligo Fortyndingsserie". For at sikre sammenlignelige fortyndinger anbefaler vi stærkt at pipettere alikvoter af samme volumen uden at ændre nogen indstillinger på pipetten mellem blandingerne.

### Inverteret hældning i linearitetstest

5 % og 95 % C blandinger  
udskiftet

 Sørg for at mærke rørene tydeligt og ikke forveksle rør under fortynding af PyroMark Q24 Validering Oligo.

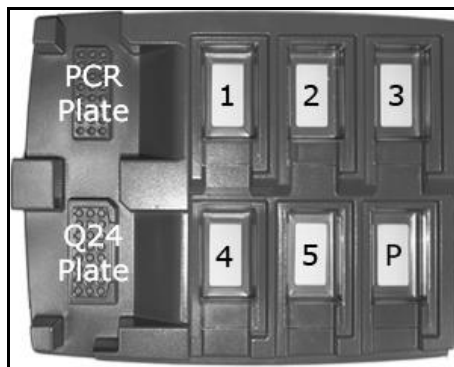
## Appendiks A: Klargøring af PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation

Denne protokol er en beskrivelse af, hvordan PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation skal klargøres før brug til præparering af enkeltstrenget DNA.

### Procedure

1. **Fyld 5 separate beholdere (følger med PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation), som følger:**
  - Cirka 50 ml ethanol (70 %) (1)
  - Cirka 40 ml PyroMark Denatureringsopløsning (2)
  - Cirka 50 ml PyroMark Vaskebuffer (3)
  - Cirka 50 ml ultra-rent vand (4)
  - Cirka 70 ml ultra-rent vand (5)

Et forslag til opsætning er vist i Figur 8. Genopfyld beholderne til disse niveauer, når det er nødvendigt.



Figur 8. Positioner på PyroMark Q24 MDx Vakuum-arbejdsstation.

2. Tænd for vakuumpumpen.
3. Sæt vakuum på værktøjet ved at åbne på vakuumkontakten.
4. Vask filterproberne ved at sænke proberne ned i ultra-rent vand (beholder 5). Skyl proberne med 70 ml ultra-rent vand. Sørg for, at vandet overføres til affaldsbeholderen. Er dette ikke tilfældet, så kontroller, at slangerne er korrekt forbundet og ikke har nogen brud. Knækkede slanger skal udskiftes, se "Udskiftning af slanger" i Brugervejledningen til PyroMark Q24.
5. Kontroller, at affaldsfilteret er tørt. Hvis filteret er vådt, skal det udskiftes, se "Udskiftning af affaldsfilter" i Brugervejledningen til PyroMark Q24.
6. Genfyld beholder 5 med 70 ml ultra-rent vand.



7. Luk vakuumkontakten på værktøjet (Off) og sæt værktøjet i parkeringsstilling (P). Close the vacuum switch on the tool (Off) and place the tool in the Parking (P) position.

## Appendiks B: Tømning af affaldsbeholder og beholdere

<b>ADVARSEL</b> 	<b>Sundhedsfarlige kemikalier</b> PyroMark denatureringsopløsning, der anvendes sammen med PyroMark Vakuum-arbejdsstation, indeholder natriumhydroxid, som virker irriterende på øjne og hud. Benyt altid sikkerhedsbriller, handsker og en laboratoriekittel. Den ansvarlige person (for eksempel laboratorielederen) skal træffe de nødvendige forholdsregler for at sikre, at den omgivende arbejdsplads er sikker, og at de, der betjener instrumentet, ikke udsættes for sundhedsfarlige niveauer af giftige stoffer (kemiske eller biologiske) som defineret i de relevante sikkerhedsdatablade (SD'er) eller OSHA*-, ACGIH <sup>†</sup> - eller COSHH <sup>‡</sup> -dokumenter. Udluftning af gasser og bortskaffelse af affald skal ske ifølge alle gældende nationale, regionale og lokale sundheds- og sikkerhedsregler og love.
--	---

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Arbejdssikkerheds- og Sundhedsadministrationen, USA).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Amerikansk Konference for Statslige Industrihygienikere, USA).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrol af sundhedskadelige stoffer, UK).

Bemærk: Sørg for at overholde alle EU, nationale, regionale og lokale miljøbestemmelser for bortskaffelse af laboratorieaffald.

Følgende artikel er påkrævet:

- Ultra-rent vand (Milli-Q 18,2 MΩ x cm [www.millipore.com](http://www.millipore.com), eller tilsvarende)

### Procedure

1. **Kontroller, at der ikke sættes vakuum på vakuumværktøjet, vakuumkontakten skal være lukket (Off), og der skal være slukket for vakuumpumpen.**
2. **Kasser eventuelle opløsninger, der er tilbage i beholderne.**
3. **Skyl beholderne med ultra-rent vand eller udskift dem om nødvendigt.**

#### 4. Tøm affaldsbeholderen



Hætten kan tages af uden at afbryde slangen.

5. Hvis PyroMark Q24 Vakuum-arbejdsstation skal rengøres (for støv eller spild), følges anvisningerne i afsnittet "Rengøring af PyroMark Q24 Vakuum-arbejdsstation" i Brugervejledningen til PyroMark Q24.

## Referencer

QIAGEN opretholder en stor, opdateret online-database over videnskabelige publikationer, der benytter QIAGENS produkter. Omfattende søgemuligheder gør det nemt at finde de artikler, der er brug for, enten ved en enkel søgning på nøgleord eller ved at specificere anvendelse, forskningsområde, titel, etc.

En fuldstændig referenceliste kan fås ved at besøge QIAGENS reference-database online på [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) eller kontakte QIAGENS tekniske service eller den lokale forhandler.

### Citerede referencer

1. SS-ISO 5725-1 Nøjagtighed (ægted og præcision) af målemetoder og resultater – Del 1: Generelle principper og definitioner.
2. White, H.E., Durston, V.J., Harvey, J.F., and Cross, N.C. (2006) Clin. Chem. **52**, 1005.
3. Tost, J., Dunker, J., and Gut, I.G. (2003) Biotechniques **35**, 152.
4. Colella, S., Shen, L., Baggerly, K.A., Issa, J.P., and Krahe, R. (2003) Biotechniques **35**, 146.
5. Uhlmann, K., Brinckmann, A., Toliat, M.R., Ritter, H., and Nürnberg, P. (2002) Electrophoresis **23**, 4072.
6. Neve, B., Frougel, P., Corset, L., Vaillant, E., Vatin, V., and Boutin, P. (2002) Biotechniques **32**, 1138.
7. Wasson, J., Skolnick, G., Iov-Gregory, L., and Permutt, M.A. (2002) Biotechniques **32**, 1144.
8. Gruber, J.D., Colligan, P.B., and Wolford, J.K. (2002) Hum. Genet. **110**, 395.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute dokument EP6-A: Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. (Evaluering af lineariteten ved kvantitative måleprocedurer: En statistisk metode, godkendte retningslinjer)
10. EN 13612: Ydeevnebedømmelse af in vitro diagnostisk medicinsk udstyr  
Europæisk komité for standardisering.

## Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat. nr.
PyroMark Q24 Validering Oligo	Til funktionskontrol af system	979304
<b>Tilbehør</b>		
PyroMark Gold Q24 Reagenser (5 x 24)	Til 5 x 24 prøver til brug på PyroMark Q24 MDx: Enzymblanding, Substratblanding og Nucleotider	971802
PyroMark Afhædningsbuffer (250 ml)	Til afhærdning af sekvenserings-primer til enkeltstrenget PCR-produkt og til pyrosekvenseringsreaktion	979309
PyroMark Bindende buffer (200 ml)	Til binding af biotinyleret PCR-produkt til Sepharose-kugler	979306
PyroMark Denatureringsopløsning (500 ml)	Til denaturering af dobbeltstrenget PCR-produkt til enkeltstrenget skablon-DNA	979307
PyroMark Vaskebufferkoncentrat (200 ml)	Til vask af enkeltstrenget DNA	979308
PyroMark Q24-plade (100)	24 brøndes sekvenseringsreaktionsplade	979301
PyroMark Q24-beholder (3)	Beholdere til dispensering af nucleotider og reagenser	979302
<b>Relaterede produkter</b>		
PyroMark Q24 MDx	Sekvensbaseret detektionsplatform til pyrosekvensering af 24 prøver parallelt	9001513
PyroMark Q24 MDx-software	Applikations-software	9019063
PyroMark Q24 MDx Vakuump-arbejdsstation	Vakuump-arbejdsstation (220 V) til præparering af 24 prøver parallelt ud fra PCR-produkt til enkeltstrenget skabelon	9001515* 9001517†

\* Til resten af verden (ikke UK).

† Til UK.

<b>Produkt</b>	<b>Indhold</b>	<b>Kat. nr.</b>
PyroMark Vakuum Præp.- filterprobe (100)	Genbrugsfilterprober til PyroMark Vakuum Arbejdsstation Q96 og Q24	979010
PyroMark Kontrol Oligo	Til installationskontrol af system	979303

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller brugervejledning. QIAGEN kit-håndbøger og brugervejledninger kan findes på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan rekvireres fra QIAGENS tekniske serviceafdeling eller den lokale leverandør.

Denne side er med vilje tom

Denne side er med vilje tom





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

#### **Aftale om begrænset licens**

Brug af dette product betyder, at enhver køber eller bruger af PyroMark Q24 Validering Oligo accepterer følgende vilkår:

1. PyroMark Gold Q24 Validering Oligo må kun bruges i overensstemmelse med Reagenshåndbogen til PyroMark Q24 Validering Oligo og kun til brug sammen med komponenter, der er indeholdt i produktet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkorporere komponenterne i dette produkt med komponenter, der ikke er inkluderet i dette produkt, undtagen som beskrevet i Brugervejledningen til PyroMark Q24 Validering Oligo og yderligere protokoller, som er tilgængelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Udover de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette produkt, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette produkt og dens komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af produktet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbudene i denne begrænsede licensaftale i enhver ret, og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med produktet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises til [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes

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

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

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

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

**Brazil** ( Orders 0800-557779 ( Fax 55-11-5079-4001 ( Technical 0800-557779

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

**China** ( Orders 021-3865-3865 ( Fax 021-3865-3965 ( Technical 800-988-0325

**Denmark** ( Orders 80-885945 ( Fax 80-885944 ( Technical 80-885942

**Finland** ( Orders 0800-914416 ( Fax 0800-914415 ( Technical 0800-914413

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

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

**Hong Kong** ( Orders 800 933 965 ( Fax 800 930 439 ( Technical 800 930 425

**Ireland** ( Orders 1800 555 049 ( Fax 1800 555 048 ( Technical 1800 555 061

**Italy** ( Orders 02-33430-420 ( Fax 02-33430-426 ( Technical 800-787980

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Switzerland** ( Orders 055-254-22-11 ( Fax 055-254-22-13 ( Technical 055-254-22-12

**UK** ( Orders 01293-422-911 ( Fax 01293-422-922 ( Technical 01293-422-999

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

