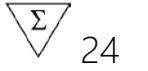


# therascreen<sup>®</sup> UGT1A1 Pyro<sup>®</sup> Kit Kullanım Kılavuzu



Versiyon 1



İn vitro diagnostik kullanım için



**REF** 971540

**HB** 1061270EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R3 **MAT** 1061270EN



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN, her türlü biyolojik örnek içeriğinin izolasyonunu ve deteksiyonununa olanak tanıyan, yenilikçi örnek ve tahlil teknolojilerinde lider bir sağlayıcıdır. Bizim gelişmiş, üstün kaliteli ürünlerimiz ve servislerimiz örnekten sonuca kadar başarıyı garanti eder.

### QIAGEN aşağıdaki hususlarda standartlar oluşturur:

- DNA, RNA, ve proteinlerin saflaştırma
- Nükleik asit ve protein tahlilleri
- microRNA araştırmaları ve RNAi
- Örnek ve tahlil teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz sizlerin önemli ve göze çarpan başarılar kazanmanıza olanak sağlamak. Daha fazla bilgi için [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sitesini ziyaret ediniz.

# İçindekiler

<b>Kullanım Amacı</b>	<b>5</b>
<b>Özet ve Açıklama</b>	<b>5</b>
<b>Prosedür Prensipleri</b>	<b>6</b>
Kontroller	7
<b>Sağlanan Materyaller</b>	<b>8</b>
Kit İçerikleri	8
<b>İstenen Ancak Sağlanmayan Materyaller</b>	<b>10</b>
Önerilen plaka karıştırıcıları	11
<b>Uyarı ve Önlemler</b>	<b>12</b>
Güvenlik Bilgisi	12
Genel Önlemler	13
<b>Ayıraç Depolama ve Ambalajlama</b>	<b>14</b>
<b>Numune Depolama ve Ambalajlama</b>	<b>14</b>
<b>Prosedür</b>	<b>15</b>
DNA izolasyonu	15
Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için çalışma kurulumu	16
Protokol 2: <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit ile sağlanan ayıraçları PCR kullanma	18
Protokol 3: PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose Yüksek Performans küreciklerine Hareketsizleştirilmesi	21
Protokol 4: PyroMark Q24 üzerinde Pyrosequencing analizlerinden önce numunelerin hazırlanması	22
Protokol 5: PyroMark Q24'ün Çalıştırılması	27
<b>Sonuçların Yorumlanması</b>	<b>31</b>
Arıza Giderme Kılavuzu	33
<b>Kalite Kontrol</b>	<b>37</b>
<b>Sınırlamalar</b>	<b>37</b>

<b>Performans Özellikleri</b>	<b>37</b>
Hassasiyet	37
Tanılama Değerlendirmesi	38
<b>Referanslar</b>	<b>40</b>
<b>Semboller</b>	<b>42</b>
<b>İletişim Bilgileri</b>	<b>42</b>
<b>Ek A: thescreen UGT1A1 Pyro dizisinin ayarlanması</b>	<b>43</b>
<b>Ek B: Atık Kutusu ve Haznelerin Boşaltılması</b>	<b>44</b>
<b>Sipariş Bilgileri</b>	<b>46</b>

## Kullanım Amacı

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit biyolojik insan doku numunelerinden gelen genomik DNA'daki insan UGT1A1'in 6\* ve 28\* alel değişkenlerinin genotiplenmesi için Pyrosequencing®e dayalı bir in vitro nükleik asit sıra bazlı algılama testidir.

*therascreen* UGT1A1 azaltılmış UDP-glukronosilat transferaz etkinliği için daha büyük riskli hastaların seçimine yardım için klinisyenlerle birlikte bilgi sağlama amacındadır. In vitro diagnostik kullanım içindir.

Yalnızca PyroMark® Q24 sisteminde kullanmak için. PyroMark Q24 sistemleri aşağıdakileri içermektedir:

- PyroMark Q24 cihazı ve PyroMark Q24 MDx cihazı.
- PyroMark Q24 Vakum İş İstasyonu ve PyroMark Q24 MDx Vakum İş İstasyonu.
- PyroMark Q24 Yazılımı (versiyon 2.0) ve PyroMark Q24 MDx Yazılımı (versiyon 2.0)

Bu ürünler teknisyenler ve doktorlar gibi in vitro diagnostik işlemler, moleküler biyolojik teknikler ve PyroMark Q24 sistemleri konusunda eğitilmiş profesyoneller tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

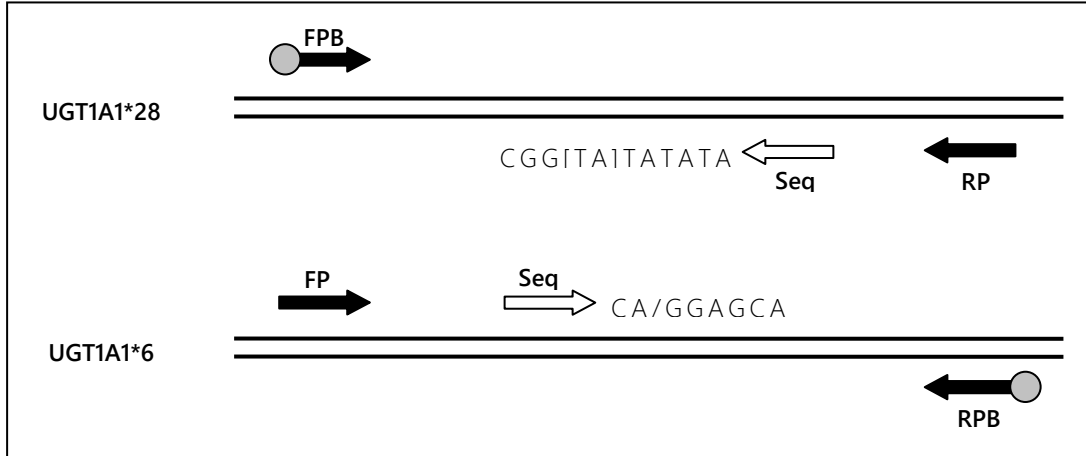
## Özet ve Açıklama

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit insan UGT1A1 geninin alel değişken \*6 ( G ve A genotipi arasındaki belirtici için) ve alel değişken \*28'in ( 6 ve 7TA tekrarları arasındaki belirtici için) genotiplenmesi için kullanılır. Kit iki deneyden oluşur: biri alel değişken \*28'in genotiplenmesi için ve ikincisi alel değişken \*6'nın genotiplenmesi için (Şekil 1). İki bölge PCR ile ayrı ayrı genişletilir ve belirtilen bölge üzerinden sıralanır. Sıralar normalleştirme işlevi görerek belirtilen pozisyonları ve genotiplenme için referans pikleri ve analizlerin kalite değerlendirmesini çevreler.

Alel değişken \*28 ters yönde ve alel değişken \*6 ileri yönde sıralanır.

Ürün bir PCR primer karıştıricıdan oluşur ve her deney için primeri sıralar.

Primerler çözeltiye aktarılır. Her vial primer karıştıricının ya da her primerin 24 µl'sini içerir.



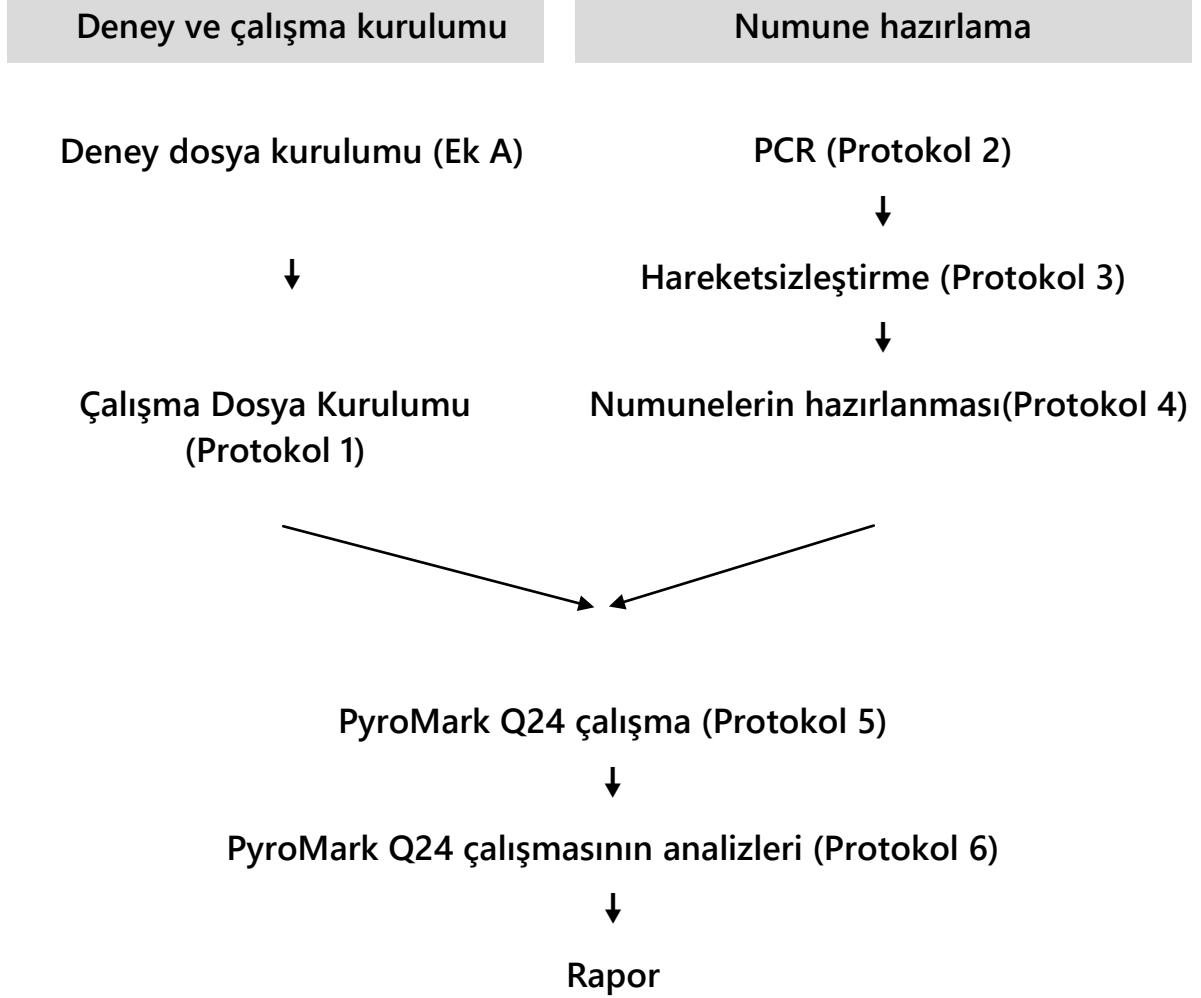
**Şekil 1. theascreen UGT1A1 deneylerinin çizimi.** Gösterilen sıra köşeli ayraç ya da kesme işareti ile gösterilen polimorfik nükleotidler ile analiz edilmiş sıradır. UGT1A1 \*28 deneyiyle analiz edilen TA tekrarlarının bir bölümü sıralı primerlerle örtülüdür. **FP, FPB:** İleri PCR primerleri (B biyotinlemeyi gösterir); **RP, RPB:** Ters PCR primerleri (B biyotinlemeyi gösterir); **Seq:** Sıralı primerler.

## Prosedür Prensipleri

Sayfa 7'deki iş akışı deney işlemini gösterir. PCR, alel değişkenleri \*28 ve \*6'yı hedefleyen primerleri kullandıktan sonra ampliconlar Streptavidin Sepharose® Yüksek Performans kürecikleri üzerinde hareketsizleştirilir. Monokataner DNA hazırlanır ve uygun sıralaman primerleri DNA'ya tavllanır. Numuneler daha sonra bir deney çalışma dosyası ve deney kurulum dosyaları kullanan PyroMark Q24 sistemi üzerinde analiz edilir.

**Not:** İş akışı *PyroMark Q24 Kullanıcı kılavuzuna nazaran* ("Protokol 4: PyroMark Q24 üzerinde Pyrosequencing analizlerinden önce numunelerin hazırlanması", sayfa 22).

## therascreen UGT1A1 Pyro İşleminin İş Akışı



### Kontroller

İnsan Kontrol DNA PCR ve sıralama reaksiyonları için pozitif kontrol olarak kiti kapsar. Bu kontrol DNA'sı sırasıyla alel değişkenleri \*28 ve \*6 için analiz edildiğinde bir homozigöz TA6/TA6 ve G/G genotipine sahiptir.

Bir negatif kontrol (şablon DNAsız) en az bir deney için her PCR kurulumuna dahil edilmelidir.

# Sağlanan Materyaller


## Kit İçerikleri

### therascreen UGT1A1 Pyro Kit (kutu 1/2)

<b>therascreen UGT1A1 Pyro Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>Katalog no.</b>	<b>971540</b>
<b>Reaksiyonların sayısı</b>	<b>24</b>
PCR Primer Mix UGT1A1 *28	24 µl
PCR Primer Mix UGT1A1 *6	24 µl
Seq Primer UGT1A1 *28	24 µl
Seq Primer UGT1A1 *6	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x [PyroMark PCR Master Karışım, 2x]	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x [CoralLoad® Konsantre, 10x]	1.2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1.9 ml
Human Control DNA, 2 ng/µl [İnsan Kontrol DNA, 2 ng/µl]	100 µl



## therascreen tamponlar ve ayıraçlar (kutu 2/2)

<b>therascreen tamponlar ve ayıraçlar</b>		
PyroMark Binding Buffer [PyroMark Bağlama Tamponu]		10 ml
PyroMark Annealing Buffer [PyroMark Tavlama Tamponu]		10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		250 ml
[PyroMark Denatürasyon Çözelti*]		
PyroMark Wash Buffer, 10x		25 ml
[PyroMark Yıkama Tamponu, 10x]		
Enzyme Mixture [Enzim Karışımı]		1 vial
Substrate Mixture [Substrat Karışımı]		1 vial
dATP $\alpha$ S		1180 $\mu$ l
dCTP		1180 $\mu$ l
dGTP		1180 $\mu$ l
dTTP		1180 $\mu$ l
Handbook		1
[Kullanım Kılavuzu]		

\* Sodyum hidroksit içerir.

## İstenen Ancak Sağlanmayan Materyaller

Kimyasallarla çalışırken her zaman uygun bir laboratuvar ceketi, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen ürün sağlayıcısından elde edilebilen uygun güvenlik bilgi formuna (GBF) başvurunuz.

- DNA izolasyon kit (bakınız "DNA ", sayfa 15)
- Pipetler (ayarlanabilir)\*
- Steril pipet uçları (PCR kurulumu için filtrelerle birlikte)
- Tezgah üstü mikrosantrifüj \*
- Termal döngüleyici\* ve uygun PCR tüpleri
- Streptavidin Sepharose Yüksek Performans (GE Healthcare, katalog no. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (katalog no. 9001514 ya da 9001513)\*<sup>†</sup>
- PyroMark Q24 Yazılım (katalog no. 9019062 ya da 9019063)<sup>†</sup>
- PyroMark Q24 Plaka (katalog no. 979301)<sup>†</sup>
- PyroMark Q24 Kartuş (katalog no. 979302)<sup>†</sup>
- PyroMark Q24 Vakum İş İstasyonu (katalog no. 9001515 ya da 9001517)\*<sup>†</sup>
- Küreciklerin hareketsizleştirilmesi için plaka karıştırıcı (bakınız "Önerilen plaka karıştırıcıları", sayfa 11)
- 80°C'ye ulaşabilen ısı bloğu\*
- 24 hazneli PCR plaka ya da şeritler
- Şerit kapakları
- Yüksek saflıkta su ( Milli-Q® 18.2 MΩ x cm ya da eşdeğer)

**Not:** PCR, DNA hareketsizleştirilmesi ve Enzim Karışımını eritme ve Substrat Karışımı için ürünün içinde yeterli su önerilir; ek olarak PyroMark Yıkama Tamponunu dilüe etmek için yüksek saflıkta su gereklidir, 10x.

## ■ Etanol (70%)<sup>‡</sup>

\* Cihazların üretici tavsiyelerine göre kontrol edildiğinden ve kalibre edildiğinden emin olun.

<sup>†</sup> EU Direktif 98/79/EC'ye göre CE-IVD işaretli. Listelenen diğer bütün ürünler EU Direktif 98/79/EC temelinde CE-IVD işaretli değil.

<sup>‡</sup> Metanol ya da metiletilketon gibi diğer maddeleri içeren denature alkol kullanmayın.

## Önerilen plaka karıştırıcıları

Tablo 1'de gösterilen plaka karıştırıcıları *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit ile kullanmak için önerilir.

**Tablo 1. *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit ile kullanmak için önerilen plaka karıştırıcıları**

Üretici	Ürün	Katalog numarası
Eppendorf	Thermomixer comfort (Basic device)	5355 000.011
	[Termomikser konfor (Temel cihaz)]	
	Thermoblock for MTP [MTP için Termoblok]	5363 000.012
	Mikrotiter plakaları bloklara yerleştirmek için 96 x 0.2 ml PCR tüpler için adaptör	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag <sup>®</sup> Teleshake	51410 (115 V=51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V=51110 U)

# Uyarı ve Önlemler

In Vitro Diagnostik Kullanım içindir.

## Güvenlik Bilgisi

Kimyasallar ile çalışırken her zaman uygun laboratuvar giysileri, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, lütfen uygun materyalin güvenlik bilgi formlarına (GBF) başvurun. Bunlar pratik bir şekilde çevrim içi olarak ve kompakt PDF formatında [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) adresinde bulabilir, görüntüleyebilir ve her bir QIAGEN® kiti ve kit bileşeni için GBF'leri yazdırabilirsiniz.

Aşağıdaki risk ve güvenlik ifadeleri *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit'in bileşenlerine uygulanır.

### PyroMark Denatürasyon Çözelti



Uyarı! Cilt tahrişine neden olur. Ciddi derecede göz tahrişine neden olur. Metaller için aşındırıcı olabilir. Malzemenin hasar görmesini önlemek için döküntüyü eminiz. Sadece orijinal konteynırda saklayın. Koruyucu eldiven / koruyucu giysi / göz koruması / yüz koruması takın.

### PyroMark Enzim Karışımı



İçeriği: (R \*, R \*) - 1,4-Dimerkaptobütan-2,3-diol; asetik asit. Tehlike! Cilt tahrişine neden olur. Ciddi göz hasarına neden olur. GÖZDE İSE: Birkaç dakika dikkatlice suyla yıkayın. Varsa ve mümkünse kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin. Maruz kaldıysanız veya endişeleniyorsanız: Bir ZEHİR MERKEZİNİ veya doktor/hekimi arayın. Kirlenmiş elbiseleri çıkarın ve tekrar kullanmadan önce yıkayın. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması takın.

## PyroMark Substrat Karışımı



İçeriğinde asetik asit bulunur. Uyarı! Cilt tahrişine neden olur. Ciddi derecede göz tahrişine neden olur. Göz tahrişi devam ederse: Tıbbi yardım/tavsiye alın. Kirlenmiş elbiseleri çıkarın ve tekrar kullanmadan önce yıkayın. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması takın.

## Genel Önlemler

Kullanıcı aşağıdakilere her zaman dikkat etmelidir.

- Optimal sonuçlar için kullanıcı kılavuzuyla birlikte katı uyumluluk gereklidir. Ayraçların dilüsyonu bu kılavuzda tanımlananın dışında önerilmez ve performans kaybıyla sonuçlanacaktır.
- İş akışı PyroMark Q24 Kullanıcı Kılavuzuna nazaran biraz değiştirilir (bakınız "Protokol 4: PyroMark Q24 üzerinde Pyrosequencing analizlerinden önce numunelerin hazırlanması", sayfa 22)
- Bu ürünün bileşenleri 5 bağımsız çalışmaya kadar 24 reaksiyon gerçekleştirmek için yeterlidir.
- Steril pipet uçları kullanın (PCR için filtreler ile birlikte).
- Diğer bütün ayraçlardan ayrı olarak pozitif materyalleri depolayın ve çıkartın (numuneler, pozitif kontroller ve amplikonlar) ve onları uzaysal olarak ayrılmış yerde reaksiyon karışımına ekleyin.
- Deneye başlamadan önce tüm bileşenleri oda sıcaklığında eritin(15-25°C).
- Bütün bileşenleri oda sıcaklığında tamamen eritin (aralıksız olarak yukarı aşağı pipetleyerek ya da darbe vortekslemesiyle) ve kısaca santrifüjleyin.
- Başarısız sonuçlar genotipin neticesi için bir esas değildir.

## Ayıraç Depolama ve Ambalajlama

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit iki kutuda sevk edilir. *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit ( kutu 1/2) kuru buz üzerinde sevk edilir. PyroMark PCR Master Karışım, CoralLoad Konsantre, kontrol DNA ve bütün primerler varlığında -15'den -25°C'ye kadar depolanmalıdır.

Tamponları, Enzim Karışımlarını, Substrat Karışımlarını, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP ve dTTP (Pyrosequencing analizleri için ayıraçlar) içeren Pyro tamponlar ve ayıraçlar (kutu 2/2) soğuk paketlerde sevk edilir. Bu bileşenler varlığında 2-8°C'de depolanmalıdır. Aktivite kaybını en aza indirmek için hem Enzim Karışımını hem de Substrat Karışımını sağlanan viyallerin içinde tutulması tavsiye edilir.

Yeniden yapılandırılmış enzim ve substrat karışımları 2-8°C'de en az 10 gün dayanır. Yeniden yapılandırılmış enzim ve substrat karışımları dondurulabilir ve -15'den -25°C'ye kadar viyallerinin içinde depolanabilir. Donmuş ayıraçlar 6'dan fazla donma-erime çevrimine tabi tutulmamalıdır.

**Not:** Nükleotidler dondurulmamalıdır.

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit bu koşullar altında saklandığında kit son kullanım tarihine kadar dayanıklıdır.

## Numune Depolama ve Ambalajlama

Bütün numuneler potansiyel olarak bulaşıcı materyal gibi işlenmelidir.

Örnek materyal kandan ya da formalinle fikse edilmiş parafinde bloklanmış (FFPE) numunelerden çıkarılan insan DNA'larıdır.

İnsan süregelen heparin tedavisinden örnekler kullanılmamalıdır. Tüplerin içine toplanarak kan sulandırıcı olarak heparin içeren kan örnekleri kullanılmamalıdır. Heparin PCR'yi etkiler.

## Prosedür

### DNA izolasyonu

Sistem performansı formalinle fikse edilmiş parafinde bloklanmış tümör numunelerinden insan DNA'sının çıkarılması için QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit ve EZ1® DNA Tissue Kit kullanarak oluşturulmuştur. QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sistemi için, performans tümör hücreli kısmen tırnaklı sağlıklı donör kan numunelerini kullanarak oluşturulmuştur.

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit ile kullanmak için gösterilen insan numune tiplerinden DNA saflaştırması için kitler Tablo 2'de gösterilen QIAGEN'den önerilir. DNA saflaştırmasını kit kullanım kılavuzundaki yönergelere göre yapın.

**Tablo 2. *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit ile kullanmak için önerilen DNA saflaştırma kitleri**

Numune Materyali	Nükleik asit izolasyon kiti	katalog numarası (QIAGEN)
Kan	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit*	61104
	[QIAamp DSP DNA Kan Mini Kit*]	
Parafinle bloklanmış doku	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	[QIAamp DNA FFPE Doku Kiti (50)]	953034
	EZ1 DNA Doku Kiti (48) <sup>†</sup>	
	[EZ1 DNA Tissue Kit (48) <sup>†</sup> ]	

\* EU Direktif 98/79/EC ile uyumlu CE-IVD işaretli.



<sup>†</sup> Parafinle bloklanmış doku ile kullanım için protokolü takip edin. EZ1 DNA Doku Kiti EZ1 DNA Parafin Bölüm Kartı (katalog no. 9015862) ve BioRobot® EZ1 (katalog no. 9000705; artık mevcut) ile ya da EZ1 Advanced XL DNA Parafin Bölüm Kartı (katalog no. 9018700) ve EZ1 Advanced XL (katalog no. 9001492) ile ve EZ1 Advanced DNA Parafin Bölüm Kartı (katalog no. 9018298) ve EZ1 Advanced (katalog no. 9001410 ya da 9001411) ile kombinasyon halinde kullanılmalıdır.

# Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için çalışma kurulumu

## Başlamadan önce yapılması gerekenler

- "Ek A: thescreen UGT1A1 Pyro dizisinin ayarlanması", sayfa 43'de tanımlandığı gibi bir deney kurulumu oluşturun. Bu, ilk defa yapılan *thescreen* UGT1A1 Pyro deneylerinin çalışmasından önce sadece bir kere yapılma ihtiyacı duyar.

## Prosedür

- 1. Araç çubuğundaki  işaretine tıklayın.**  
Yeni bir çalışma dosyası oluşturulur.
- 2. Çalışma parametrelerine girin (bakınız "Çalışma Parametreleri", sayfa 17).**
- 3. Analiz için numunelere karşılık gelen haznelere alel değişken\*6 ve alel değişken \*28 için deneyleri ekleyerek plakayı kurun.**  
**Not:** Negatif bir kontrol numunesi (şablon DNAsız) en az bir deney için her PCR kurulumuna eklenmelidir.  
**Not:** İnsan kontrol DNA'lı bir numune sıralama reaksiyonları ve PCR için pozitif kontrol olarak her deneye dahil edilebilir (bakınız "Kontroller", sayfa 7).
- 4. Çalışma kurulduğunda ve PyroMark Q24 üzerinde çalışmak için hazır olduğunda, plaka kurulumu, nükleotidler, substrat karışımı ve enzim karışımının istenilen hacimlerinin bir listesini yazdırın. "Araçlar" menüsünden "Ön Çalışma Bilgisi" ni seçin ve rapor görüldüğünde ye tıklayın.**
- 5. Çalışma dosyasını kapatın ve Windows® Explorer kullanarak bir USB belleğe (sistemle sağlanır) kopyalayın.**  
Yazdırılmış Ön Çalışma Bilgisi numune kurulumu için şablon olarak kullanılabilir (bakınız "Protokol 3: PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose Yüksek Performans küreciklerine Hareketsizleştirilmesi", sayfa 21).  
Plakayı PyroMark Q24 üzerinde çalıştırmak için bakınız, sayfa 27 Protokol 5: PyroMark Q24'ün Çalıştırılması.



## Çalışma Parametreleri

- Çalışma adı: Çalışmanın adı dosya kaydedildiğinde verilir. Dosyayı yeniden adlandırma aynı zamanda çalışmanın da ismini değiştirir.
- Cihaz Metodu: Çalışma için kullanılacak kartuşa göre alet metodunu seçin. Ürünle sağlanan yönergelere bakın.
- Plaka ID: **Opsiyonel:** PyroMark Q24 plakanın ID'sini girin.
- Barkod: **Opsiyonel:** Plaka için barkot numarasını girin ya da bilgisayarınıza bağlı barkot okuyucunuz varsa fare imlecini "Barkot" metin kutusuna yerleştirin ( kutuya tıklayarak) ve barkodu tarayın.
- Ayıraç ID: **Opsiyonel:** *therascreen* UGT1A1 Pyro Kit kutu 1 ve kutu 2 için kullanılacak lot numaralarını girin. Lot numaraları ürün etiketinin üzerinde bulunabilir. **Not:** Biz lot numaralarının girilmesini öneririz böylece *therascreen* ile ilgili herhangi bir beklenmedik problem izlenebilir.
- Çalışma notu: **Opsiyonel:** Çalışmanın amacı ya da içeriği hakkında bir not girin.

## Deney dosyalarını ekleme

Hazneye bir deney eklemek için:

- Kutucuğa sağ tıkla ve içerik menüsünden "Deney Yükle"yi seç.
- Kısayol tarayıcısındaki deneyi seç ve deneyi tıkla ve kutucuğa sürükle.

Kutucuk deneyin kutucuğa yüklenmesine göre renk kodlanır.

## Numune IDleri ve notları girme

Bir numune ID'si ya da not girmek için hücreyi seç ve metni gir.

Bir numune ID'si ya da notu eklemek için ya hücreyi seç ( mevcut içerikler seçilecektir) ya da hücreye iki kere tıkla.

## Protokol 2: theascreen UGT1A1 Pyro Kit ile sağlanan ayıracıları PCR kullanma

Bu protokol *theascreen* UGT1A1 Pyro Kit kullanarak alel değişken\*6'nın genotiplemesi için bir bölgenin ayrı PCR amplifikasyonu ve alel değişken\*28'in genotiplemesi için bir bölgenin PCR amplifikasyonu içindir.

### Başlamadan önce önemli noktalar

- PyroMark PCR Master Karışımın içindeki HotStarTaq® DNA polimeraz 95°C'de 15 dakika etkinleştirme adımı gerektirir.
- Pyrosequencing analizlerinden önce numunelerin hazırlanmasına, PCR ürün analizlerine ya da PCR'ye şablon DNA ekleyerek DNA saflaştırmasından ayrı bir alanda bütün reaksiyon karışımlarını kurun.
- Ters kontaminasyonu azaltmak için hidrofobik filtreler içeren tek kullanımlık uçlar kullanın.

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Tüpleri PCR primerleri ile açmadan önce tüplerin dibindeki içerikleri toplamak için kısaca santrifüjleyin.
- Eğer gerekliyse DNA numunesinin konsantrasyonunu 0.4-2 ng/µl'e ayarlayın.

**Not:** Kitin içine dahil edilen İnsan Kontrol DNA'sı 2 ng/ µl'in konsantrasyonunda sağlanır.

### Prosedür

#### 1. Gerekli bütün bileşenleri eritin.

Kullanmadan önce iyice karıştırın.

#### 2. Tablo 3'e göre her bir PCR primer set için bir reaksiyon karışımı hazırlayın.

Reaksiyon karışımı genellikle numune hariç PCR için gerekli olan bileşenlerin hepsini içerir.

Oluşturulacak PCR deneylerinin toplam sayısı için istenilenden daha büyük bir reaksiyon karışım hacmi hazırlayın.

**Tablo 3. Her bir PCR primer karışımı için reaksiyon karışımının hazırlanması**

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x [PyroMark PCR Master Karışım, 2x]	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x [CoralLoad Konsantre, 10x]	2.5
PCR Primer karışım UGT1A1 alel değişken*28 [PCR Primer mix UGT1A1 allele variant *28] <b>ya da</b> PCR Primer mix UGT1A1 allele variant *6 [PCR Primer karışım UGT1A1 alel değişken*6]	1.0
Water (H <sub>2</sub> O, supplied) [Su (H <sub>2</sub> O, sağlandı)]	4.0
<b>Toplam hacim</b>	<b>20.0</b>

**3. Reaksiyon karışımını iyice karıştırın ve her PCR tüpünün içine 20 µl dağıtın.**

PCR tüplerini buz üzerinde tutmak önemli değil çünkü HotStarTaq DNA polimeraz oda sıcaklığında inaktiftir.

**4. Ayrı PCR tüplerine 5 µl şablon DNA ekleyin (Genomik DNA'nın 2-10 ng'si) ve iyice karıştırın (bakınız Tablo 4).**

**Not:** Negatif bir kontrol numunesi (DNA şablonsuz) en az bir deney için her PCR kurulumuna dahil edilmelidir.

**Not:** İnsan Kontrol DNA'lı bir numune sıralama reaksiyonları ve PCR için pozitif bir kontrol olarak her bir deneye dahil edilebilir (bakınız "Kontroller", sayfa 7).

**Tablo 4. PCR'nin hazırlanması**

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
Reaction mix [Reaksiyon karışımı]	20
Sample DNA [Numune DNA]	5
<b>Toplam hacim</b>	<b>25</b>

5. Tablo 5'te özetlenen koşulları kullanarak üreticinin talimatlarına göre ısı döngüleyicisini programlama.

**Tablo 5. Optimize edilen periyodik işletme protokolü**

			Yorumlar
İlk etkinleştirme adımı:	15 dakika	95°C	HotStarTaq DNA polimeraz bu ısıtma adımıyla etkinleştirilir.
<b>3-adım döngüleme:</b>			
Denatürasyon	20 saniye	95°C	
Tavlama	30 saniye	53°C	
Uzatma	20 saniye	72°C	
Siklusların sayısı	42		
<b>Son uzatma:</b>	5 dakika	72°C	

6. Isı döngüleyicisinin içine PCR tüplerini yerleştirin ve periyodik işleme programını başlatın.
7. Amplifikasyondan sonra "Protokol 3: PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose Yüksek Performans küreciklerine Hareketsizleştirilmesi", sayfa 21'e devam edin.

### Protokol 3: PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose Yüksek Performans küreciklerine Hareketsizleştirilmesi

Bu protokol PyroMark Q24 sistemi üzerinde analizden önce şablon DNA'nın Streptavidin Sepharose Yüksek Performans (GE Healthcare)'a hareketsizleştirilmesi içindir.

#### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Bütün ayraçları ve çözeltileri başlatmadan önce oda sıcaklığına ulaşmasına (15-25°C) olanak sağlayın.

#### Prosedür

1. Streptavidin Sepharose Yüksek Performans içeren şişeyi homojenöz bir çözelti oluncaya kadar yavaşça sallayın.
2. Tablo 6'ya göre hareketsizleştirilmiş DNA için bir master karışım hazırlama.

Oluşturulacak reaksiyonların toplam sayısı için istenilenden %10 daha büyük bir hacim hazırlayın.

**Tablo 6. DNA hareketsizleştirilmesi için master karışım**

Bileşen	Hacim/numune (µl)
Streptavidin Sepharose Yüksek Performans	2
PyroMark Bağlama Tamponu	40
Su (H <sub>2</sub> O, sağlandı)	28
<b>Toplam hacim</b>	<b>70</b>

3. Çalışma kurulumunda önceden tanımlandığı gibi 24-kürecikli PCR plaka (ya da şeritler) in küreciklerine master karışımın 70 µl'sini ekleyin (bakınız "Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için çalışma kurulumu", sayfa 16).
4. Çalışma kurulumunda önceden tanımlandığı gibi master karışımı içeren her bir küreciğe Protokol 2'den biyotinlenmiş PCR ürününün 10 µl'sini ekleyin (bakınız "Protokol 2: theascreen UGT1A1 Pyro Kit ile sağlanan ayıraçları PCR kullanma", sayfa 18).

Her küreciğin toplam hacmi PCR ürünü ve master karışımın eklenmesinden sonra 80 µl olmalıdır.

5. Şerit kapakları kullanarak PCR plakasını (ya da şeritleri) mühürleyin. Kürecikler arasında sızıntı olasılığının olmadığından emin olun.
6. PCR plakasını 1400 rpm'de 5-10 dakika oda sıcaklığında (15-25°C) çalkalayın.

Bu adım boyunca *PyroMark Q24 Kullanıcı Kılavuzunda* tanımlandığı gibi numune hazırlama için PyroMark Q24 Vakum İş İstasyonu hazırlayın.

7. Hemen arkasından "Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için çalışma kurulumu", sayfa 16, ile devam edin.

**Not:** Sepharose kürecikleri çabukça çöker. Küreciklerin yakalanması çalkalamanın hemen arkasından yapılmalıdır.

Plaka (ya da şeritler) çalkalandığı için eğer 1 dakikadan fazla zaman geçerse küreciklerin yakalanmasından önce tekrar 1 dakika çalkalayın.

## Protokol 4: PyroMark Q24 üzerinde Pyrosequencing analizlerinden önce numunelerin hazırlanması

Bu protokol PyroMark Q24 üzerinde Pyrosequencing analizlerinden önce sıralama primerlerini şablona tavlama ve monokataner DNA'nın hazırlanması içindir.

### Başlamadan önce önemli noktalar

- Tüpleri sıralama primerleri ile açmadan önce tüplerin dibindeki içerikleri toplamak için kısaca santrifüjleyin.

- Analiz bölgesine bağılı olarak (alel değişken\*28 ya da alel değişken\*6) çalışma kurulumunda plaka için önceden tanımlandığı gibi aynı modelde 2 farklı sıralama primerini ekleyin (bakınız "Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için çalışma kurulumu", sayfa 16).
- İş akışı *PyroMark Q24 Kullanıcı Kılavuzuna* nazaran biraz değiştirilir (adım 18). Numuneleri 80°C'ye kadar ısıttıktan sonra soğutmak için zamanı kısaltmayın.
- Belirtildiğinde filtre problemlerini değiştir ve düzenli bazisler üzerinde *PyroMark Q24 Kullanıcı Kılavuzunda* tanımlandığı gibi filtre propları için işlev testi oluştur.

### **Başlamadan önce yapılması gerekenler**

- Bir PyroMark Q24 Plaka Pensini 17. adımda kullanmak için 80°C'de önceden ısıtılmış ısıtma bloğuna yerleştirin. PyroMark Q24 Plaka Pensini 18. Adımda kullanmak için oda sıcaklığında (15-25°C) bir saniye bırakın.
- PyroMark yıkama tamponu 10x konsantre olarak sağlanır. İlk kullanımdan önce 250 ml'in son hacmine ulaşmak için 25 ml 10x PyroMark Yıkama Tamponuna yüksek saflıkta su ekleyin ve bir 1x çalışma çözeltisi elde edin. 1x PyroMark Yıkama Tamponu çalışma çözeltisi işaretili son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de dayanır.

### **Prosedür**

- 1. Tablo 7'de gösterildiğı gibi PyroMark Tavlama Tamponunda, Seq Primer UGT1A1 \*6, Seq Primer UGT1A1 \*28, ve her bir sıralama primerinin yeterli miktarını dilüe edin.**

Dilüe edilmiş sıralama primerine sıralanacak numunelerin toplam sayısı için istenilenden daha büyük bir hacim hazırlayın (numunelerin sayısı için + bir tane ekstra).

**Tablo 7. Sıralama primerlerinin dilüsyon örneği**

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim/numune (µl)</b>	<b>9 + 1 reaksiyonlar için hacim (µl)</b>
Seq Primer UGT1A1 *28 <b>ya da</b> Seq Primer UGT1A1 *6	0.8	8.0
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242.0
[PyroMark Tavlama Tamponu]		
<b>Toplam Hacim</b>	<b>25.0</b>	<b>250.0</b>

- Çalışma kurulumuna göre PyroMark Q24 Plaka'nın her bir küreciğine dilüe edilmiş sıralama primerinin 25 µl'sini ekleyin (bakınız "Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için çalışma kurulumu" sayfa 16).**

PyroMark Q24 Plaka Penslerinden (PyroMark Q24 Vakum İş İstasyonu ile birlikte sağlanır) birini oda sıcaklığında (15-25°C) tutun ve hazırlarken ve plakayı çıkarırken destek olarak kullanın.

- Protokol 3'ten ve çalışma masasının üzerindeki PyroMark Q24 Plakasından PCR plakasını (ya da şeritleri) yerleştirin (bakınız Şekil 2).**

Numuneler yüklendiğinde plakanın aynı yönde olduğundan emin olun.





Şekil 2: Vakum iş istasyonu üzerindeki PyroMark Q24 plakası ve PCR plakasının (ya da şeritlerin) yerleştirilmesi.

4. Vakum düğmesini açarak vakum aletine vakum uygulayın.
5. Filtre çubuklarını PCR plakasına (veya şeritlerine) dikkatle indirerek içinde hareketsiz hale gelmiş örneği bulunduran kürecikleri yakalayın. Çubukları burada 15 saniye tutun. Vakum aletini alırken dikkat edin.

**Not:** Sefaroz kürecikleri hızlı bir şekilde çökelirler. Küreciklerin karıştırma sonrasında hemen yakalanması gerekmektedir.

Plakanın (veya şeritlerin) karıştırılmasından sonra 1 dakikadan uzun süre geçerse, kürecikleri yakalamadan önce 1 dakika süre ile karıştırın.

6. Vakum aletini 40 ml %70'lik etanol içeren hazneye koyun (Şekil 2 ). Filtre çubuklarını 5 saniye süreyle çalkalayın.
7. Aleti 40 ml Denşirme Çözeltilisinin olduğu hazneye alın (Şekil 2). Filtre çubuklarını 5 saniye süreyle çalkalayın.
8. Vakum aletini 50 ml Temizleme Maddesi olan hazneye alın (Şekil 2). Filtre çubuklarını 10 saniye süreyle çalkalayın.
9. Vakum aletini arkadan 90°'den fazla dikey açıyla kaldırın, 5 saniye süreyle çubukların üzerinden sıvının süzülmesini bekleyin (Şekil 3).



Şekil 3: Resimde 90°den fazla dikey açıyla kaldırılan vakum aleti görülüyor.

10. Vakum aletini PyroMark Q24 Plakasının üzerinde tutarken vakum anahtarını kapatın (Off konumuna getirin).
11. Filtre çubuklarını seyreltilmiş ardışık astara sokup aleti bir kenardan diğerine yavaşça getirip götürmek suretiyle PyroMark Q24 Plakasının içindeki kürecikleri ayırın.  
Filtre çubukları ile PyroMark Q24 Plakasının yüzeyini çizerek zarar vermemeye dikkat edin.
12. Vakum aletini yüksek saflıktaki su ile dolu hazneye koyun (Şekil 2) ve aleti 10 saniye süre ile çalkalayın.
13. Çubukları yüksek saflıktaki suya sokmak (Şekil 2) ve vakum uygulamak suretiyle yıkayın. Çubukları 70 ml yüksek saflıkta suda çalkalayın.
14. Vakum aletini arkadan 90°den fazla dikey açıyla kaldırın, 5 saniye süreyle çubukların üzerinden sıvının süzülmesini bekleyin (Şekil 3).
15. Vakum anahtarını kapatın (Off konumuna getirin), aleti Park (P) konumunda bırakın.
16. Vakum pompasını kapatın.  
**Not:** Mesai bitiminde sıvı atıkların ve arta kalan çözeltilerin atılması, PyroMark Q24 Vakum İş İstasyonununun toz ve döküntü kontrolünden geçirilmesi gerekmektedir (bakınız "Ek B: Atık Kutusu ve Haznelerin Boşaltılması", sayfa 44).
17. İçinde numunelerin bulunduğu PyroMark Q24 Plakasını önceden ısıtılmış PyroMark Q24 Plaka Tutucusunu kullanarak 2 dakika süreyle 80°C'de ısıtın.

18. PyroMark Q24 Plakasını sıcak durumdaki tutucudan çıkarın ve oda ısısında (15–25 °C) muhafaza edilmiş ikinci bir PyroMark Q24 Plaka Tutucusuna koyun. Numuneler oda ısına gelene kadar 10–15 dakika bekleyin.
19. “Protokol 5: PyroMark Q24’ün Çalıştırılması”, sayfa 27’da bulunan bölümünü uygulayın.

## Protokol 5: PyroMark Q24’ün Çalıştırılması

Bu protokolde PyroMark Gold Q24 ayıraçlarının hazırlanması ve PyroMark Q24 Kartuşuna doldurulması ile *PyroMark Q24*te işlem başlatılması ve bitilmesi tarif edilmektedir. İşlem ayarlarının nasıl yapılacağına ilişkin ayrıntılı açıklamalar PyroMark Q24 Kullanıcı Kitapçığında bulunmaktadır.

### Başlamadan önce dikkat edilmesi gereken önemli husus

- İşlem ayarlarındaki “Aletler” menüsünde bulunan İşlem Öncesi bilgi raporunda (16. sayfada bulunan (bakınız “Protokol 1: PyroMark Q24 sistemi için çalışma kurulumu”, sayfa 16), belirli işlemler için gereken nükleotid, enzim ve alt madde tampon hacimleri verilmiştir.

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- PyroMark Q24 cihazını açma-kapama anahtarını açık konuma getirin. Açma-Kapama anahtarı cihazın arkasında bulunmaktadır.

### Prosedür

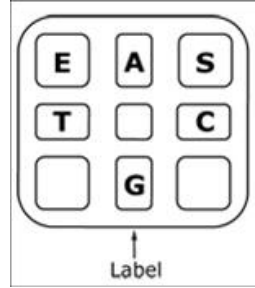
1. **Dondurulmuş ve kurutulmuş enzim ve alt madde karışımlarının her birini 620’şer µl suda (temin edilen H<sub>2</sub>O) çözün.**
2. **Şişeyi nazikçe döndürerek çalkalayın. Girdap oluşturmayın!**

Karışımın tam olarak çözüldüğünden emin olmak için oda sıcaklığında (15–25 °C) 5–10 dakika bekletin. PyroMark Q24 Kartuşuna doldurmadan önce çözeltinin bulanık olmadığından emin olun. Ayıraçlar hemen kullanılmayacaksa buzda veya soğutucuda muhafaza edilen şişelere koyun (\*).
3. **Ayıraçların ve PyroMark Q24 Kartuşunun ortam sıcaklığına (20–25 °C) gelmesini bekleyin.**

4. **PyroMark Q24 Kartuşunun size bakan tarafını etiketleyin.**
5. **PyroMark Q24 Kartuşuna Şekil 4'e göre uygun miktarda nükleotid, enzim ve alt madde karışımı koyun.**

Pipetten kartuşa hava kabarcığı geçmemesine dikkat edin.

\* Kimyasallarla çalışırken uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürünün tedarikçisinden edinebileceğiniz ilgili güvenlik bilgi formu (GBF) dokümanına bakınız.



**Şekil 4: Şekilde PyroMark Q24 Kartuşu görülmektedir.** Harfler ayıraç şişelerindeki etiketlere karşılık gelmektedir. E enzim karışımı ekleyin, S alt madde karışımı ekleyin anlamına gelmekte, (A, T, C, G) ise işlem ayarları "Aletler" menüsünün altındaki Ön İşlem bilgi raporunda verilen hacim bilgilerini ifade etmektedir.

6. **Kartuş kapağını açın ve dolu ayıraç kartuşunu etiketi dışarı bakacak şekilde içeriye yerleştirin. Kartuşu sonuna kadar itin ve aşağıya doğru bastırın.**
7. **Kartuşun ön tarafındaki çizginin görüldüğünden emin olan ve kapağı kapatın.**
8. **Plaka çerçevesini açın ve plakayı ısıtma bloğunun üstüne koyun.**
9. **Plaka çerçevesini ve cihazın kapağını kapatın.**
10. **USB belleği cihazın ön tarafında bulunan USB girişine takın.**

İşlem tamamlanmadan önce USB belleği çıkarmayın.
11. **Ana menüden (▲ ve ▼ ekran düğmelerini kullanarak) "Çalıştır" ("Run") komutunu seçin ve "OK" komutuna basın".**
12. **▲ ve ▼ ekran düğmelerini kullanarak işlem dosyası (run file) komutunu seçin.**

Klasörün içeriğini görmek için klasörü seçin ve "Seç" ("Select") komutuna basın. Bir önceki görünüme dönmek için "Geri" ("Back") komutuna basın.
13. **İşlem dosyası komutunu seçtikten sonra işlemi başlatmak için "Seç" ("Select") komutuna basın.**

14. İşlem bitip, cihaz işlem dosyasının USB belleğe kaydedildiğini teyit ettikten sonra, "Kapat" ("Close") komutuna basın.
15. USB belleği çıkarın.
16. Cihaz kapağını açın.
17. Kartuş kapağını açın ve ayıraç kartuşunu kaldırıp dışarı çekmek suretiyle çıkarın.
18. Kapağı kapatın.
19. Plaka çerçevesini açın ve plakayı ısıtma bloğunun üzerinden alın.
20. Plaka çerçevesini ve cihaz kapağını kapatın.
21. Plakayı atın ve kartuşla beraber gelen ürün açıklamalarına uygun şekilde kartuşu temizleyin.
22. "Protokol 6: PyroMark İşleminin Analiz Edilmesi", sayfa 30'da bulunan bölüme göre analiz edin.

## Protokol 6: PyroMark İşleminin Analiz Edilmesi

Bu protokolda tamamlanmış bir *therascreen* UGT1A1 işleminin PyroMark Q24 Yazılımı kullanılarak genotip analizinin yapılması anlatılmaktadır.

### Prosedür

1. (İşlem görmüş işlem dosyasının kayıtlı olduğu) USB belleği bilgisayarın USB girişine takın.
2. USB bellekteki işlem dosyasını Windows Explorer programıyla bilgisayarın istenilen yerine aktarın.
3. İşlem dosyasını PyroMark Q24 Yazılımı AQ kipindeyken ya "Dosya" ("File") menüsündeki "Aç" ("Open") komutunu seçerek ya da kısayol tarayıcıdaki (✓) simgesini çift tıklayarak açın.
4. İşlemi analiz etmek ve sonuçların genel bir görünümünü almak için aşağıdaki Analiz düğmelerinden birini tıklayın.



Tüm hazneleri analiz et.



Seçili hazneyi analiz et.

İşlemin analiz edilmesiyle ilgili daha fazla bilgiyi *PyroMark Q24 Kullanıcı Kitapçığı*nda bulabilirsiniz.

5. Rapor almak için "Raporlar" ("Reports") menüsünden "Tam SNP Raporu" ("SNP Full Report") veya "Genel SNP Raporu" ("SNP Overview Report") seçeneklerinden birini seçiniz.

**Not:** Sonuçların güvenilir olması amacıyla tekli tepe yüksekliklerin 30 RLU'nun üzerinde olmasını tavsiye ederiz. Deney ayarlarında "geçer kalite için gereken tepe yüksekliğini" 30 RLU olarak ayarlayınız (Bakınız "Ek A: *therascreen* UGT1A1 Pyro dizisinin ayarlanması", sayfa 43 ve *PyroMark Q24 Kullanıcı Kitapçığı*na bakınız).

**Not:** Pyrogram® Pyrogram penceresine sağ tıklanarak görüntülenebilen çubuklu grafik ile her zaman karşılaştırılmalıdır. Ölçülen tepe değerler çubuklu grafikteki çubukların yüksekliği ile eşleşmelidir.

## Sonuçların Yorumlanması

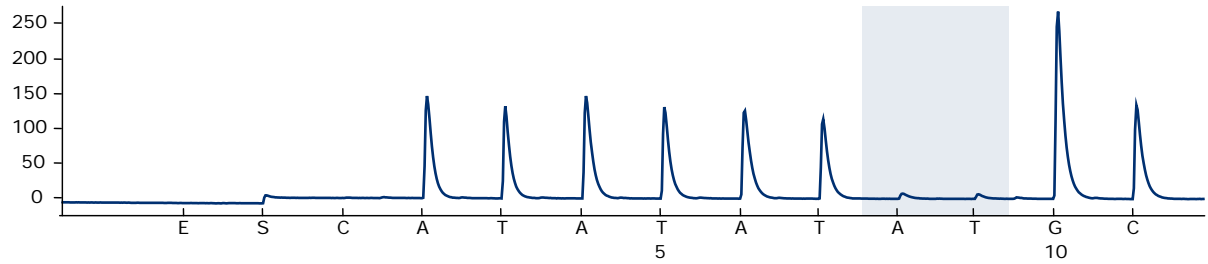
Sonuçların karşılaştırılması için dâhili İnsan Kontrol DNA'sı kullanılabilir. Söz konusu kontrol DNA'sı \*28 ve \*6 gen çifti varyantlarına yönelik analiz edildiğinde sırasıyla homozigöz TA6/TA6 ve G/G genotipine sahiptir.

Genotip analizi PyroMark Q24 Yazılımı ile otomatik olarak yapılmakta, "Tam SNP Raporu" ve "Genel SNP Raporunda" verilmektedir".

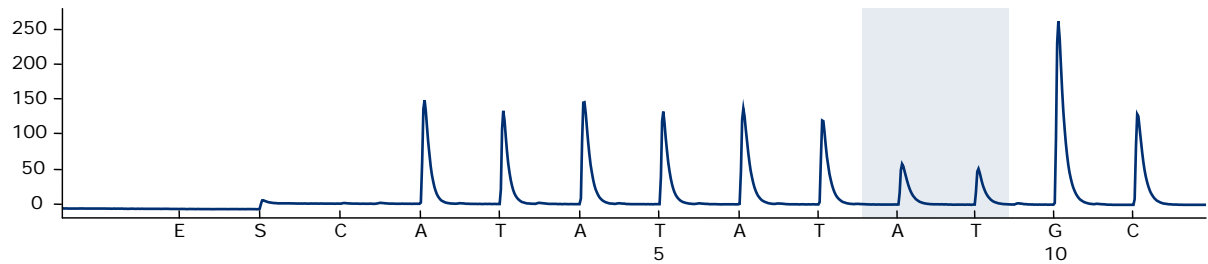
**Not:** SNP raporlarında verilen nitelik değerlemeleri ve uyarılar genotip analizine ilişkindir. AQ kipindeki PyroMark Q24 Yazılımının ürettiği ilave nitelik değerlemeleri ve uyarıları önemsenmeyebilir.

### Temsil niteliğindeki sonuçlar

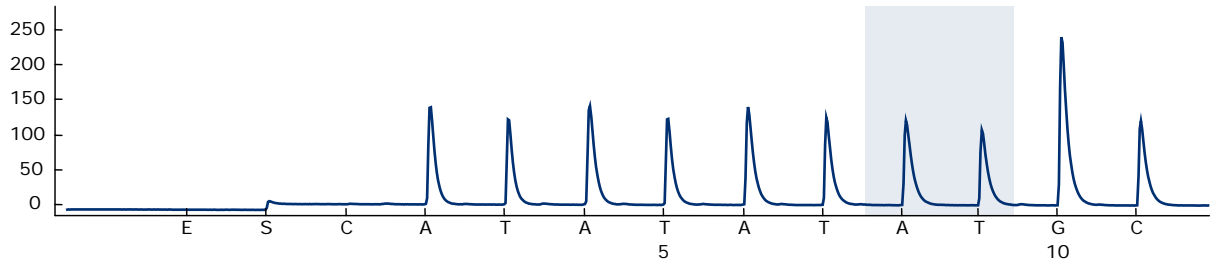
Temsil Niteliğindeki Pyrogram sonuçları Şekil 5-10'da gösterilmiştir.



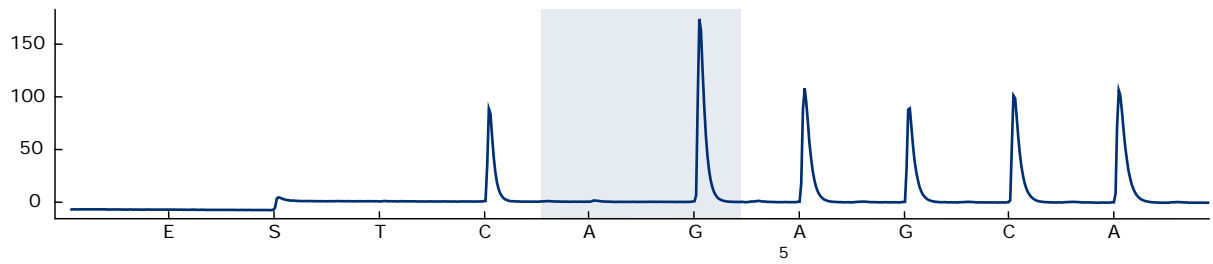
Şekil 5: -/- (TA6/TA6) genotipli numunelerin \*28 gen çifti varyantı ile analiz edilmesinden sonra elde edilen Pyrogram izi.



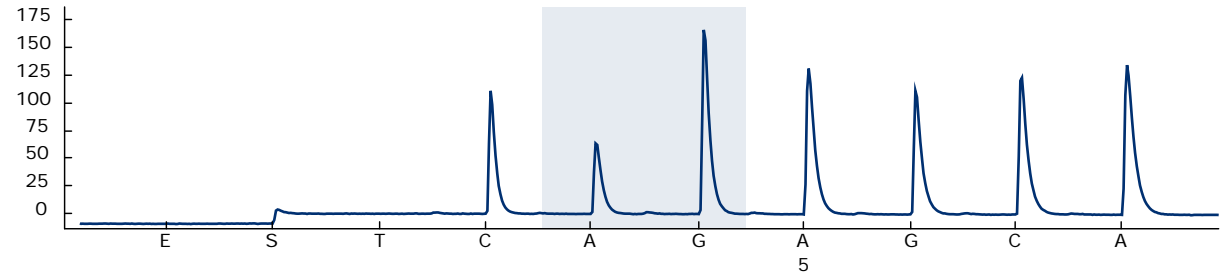
Şekil 6: -/TA (TA6/TA7) genotipli numunelerin \*28 gen çifti varyantı ile analiz edilmesinden sonra elde edilen Pyrogram izi.



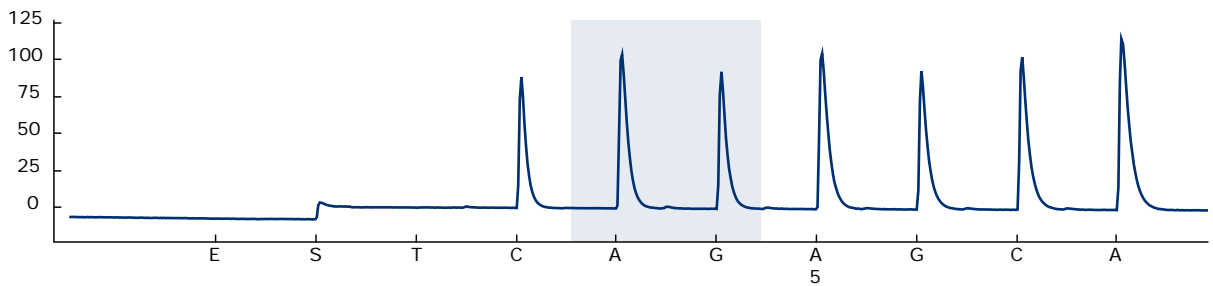
Şekil 7: TA/TA (TA7/TA7) genotipli numunelerin \*28 gen çifti varyantı ile analiz edilmesinden sonra elde edilen Pyrogram izi.



Şekil 8: G/G genotipli numunelerin \*6 gen çifti varyantı ile analiz edilmesinden sonra elde edilen Pyrogram izi.



Şekil 9: G/A genotipli numunelerin \*6 gen çifti varyantı ile analiz edilmesinden sonra elde edilen Pyrogram izi.



Şekil 10: A/A genotipli numunelerin \*6 gen çifti varyantı ile analiz edilmesinden sonra elde edilen Pyrogram izi.



## Arıza Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu meydana gelebilecek sorunların çözülmesine yardımcı olabilecektir. Daha fazla bilgi için lütfen Teknik Destek Merkezinin [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx) adresinde bulunan Sıkça Sorulan Sorular sayfasına bakınız. QIAGEN Teknik Hizmetlerindeki bilim insanları hem bu kitapçığındaki protokol ve bilgilerle hem de numune ve deney teknolojileri ile ilgili sorularınızı cevaplandırmaktan her zaman mutlu olacaklardır (iletişim bilgilerini arka kapakta ve [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde bulabilirsiniz).

**Not:** Cihazda uygulanabilecek sorun giderme yöntemlerini *PyroMark Q24 Kullanıcı Kılavuzunda* bulabilirsimiz.

### Açıklamalar ve öneriler

---

#### Örneksiz kontrol (negatif kontrol) sinyalleri

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| a) Hazneler arası çapraz konuşma  | Hazneden gelen sinyalin yan hazneden tespit edilmesidir. Örneksiz kontrol haznelerinin bitişiğine yüksek sinyal yoğunluğu olan numuneler koymayınız.  |
| b) PCR bulaşması (kontaminasyonu) | Filtrelerde steril pipet uçları kullanınız. Numune, kontrol maddesi ve ampikonlar gibi maddeleri PCR ayıracağılarından ayrı ayrı çıkarıp depolayınız. |

#### Yetersiz veya beklenmeyen dizi

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| Düşük kaliteli genomik DNA | Düşük kaliteli genomik DNA PCR'ın başarısız olmasına neden olabilir. PCR numunelerini elektroforetik tekniği ile analiz ediniz (örneğin, QIAxcel® Sistemi veya agaroz-jel elektroforezi) |
|----------------------------|--|

### SNP Raporunda “Kontrol Edilmesi Gereken” (“Check”) veya “Başarısız” (“Failed”) sonuç olması

a) “Düşük tepe  
yüksekliğinden dolayı  
Belirsiz / Başarısız”  
uyarısı

Pyro dizilimi düşük tepe sonucu vermeden önce PCR ayarında veya numune hazırlığında işleme hataları.

Vakum aletiyle numunelerin tamamının alınması önemlidir. Vakum aletinin numunelerin içine yavaşça girmesine ve hareketsizleştirme için kullanılan PCR plakasının ve şeritlerinin şeklinin numunelerin hepsini alacak şekilde olmasına dikkat ediniz. Filtre çubuklarına PyroMark Q24 Kullanıcı Kitapçığına uygun şekilde düzenli işlev testi yapınız ve ilgili uyarı verildiğinde filtre çubuklarını değiştiriniz.

Nitelik değerlemesinin “Kontrol Edilmesi Gereken” olması durumunda Programı Pyrogram penceresine çift tıklayarak görüntülenebilen çubuklu grafik ile dikkatli bir şekilde karşılaştırınız. Ölçülen tepe değerleri çubuklu grafiğin çubukları ile eşleşiyorsa sonuç geçerli demektir. Aksi takdirde numunenin tekrar işlem görmesi tavsiye edilir.

## Açıklamalar ve öneriler

---

- b) "Genotip Belirlemesi Belirsiz / Başarısız" uyarısı
- Nitelik değerlemesinin "Kontrol Edilmesi Gereken" olması durumunda Pyrogramı Pyrogram penceresine çift tıklayarak görüntülenebilen çubuklu grafik ile dikkatli bir şekilde karşılaştırınız. Ölçülen tepe değerleri çubuklu grafiğin çubukları ile eşleşiyorsa sonuç geçerli demektir. Aksi takdirde numunenin tekrar işlem görmesi tavsiye edilir.
- FFPE tümör örneklerinde daha fazla alınabilen ve UGT1A1 \*28 dizisinde TA tekrarlarında polimeraz kaymasından kaynaklı uyarı alınabilir. Örnekte yüksek kaliteli DNA (örneğin, kan örneklerinden izole edilmiş) kullanıldığından veya örnek DNA miktarını arttırdığınızdan emin olunuz.
- c) Beklenmeyen şekilde seyrek gen çifti varyantları
- Beklenmeyen tepe değerlerin oluşması durumunda Kontrol Edilmesi Gereken" veya "Başarısız" kalite değerlemeleri oluşabilir. Bu durum "Analiz Edilecek Dizi" ile analiz edilmemiş beklenmeyen gen çifti varyantına işaret ediyor olabilir. Böyle örnekler beklenmeyen gen çifti varyantları göz önüne alınarak alternatif "Analiz Edilecek Dizi" ile analiz edilmelidir.

## Açıklamalar ve öneriler

---

- d) X bölümünde yüksek tepe değeri sapma uyarısı
- Pyrogram, Pyrogram penceresine çift tıklayarak görüntülenebilen çubuklu grafik ile dikkatli bir şekilde karşılaştırılmalıdır. Ölçülen tepe değerleri çubuklu grafiğin çubukları ile eşleşmiyorsa ve bu durum seyrek gen çifti varyantları ile açıklanamıyorsa numunenin tekrar işlem görmesi tavsiye edilir.

### Yüksek Arka Plan

- a) Nükleotidlerin yanlış muhafaza edilmesi
- Nükleotidleri 2-8 °C ısıda saklayınız. -15 ila -25 °C ısıda muhafaza edilmesi arka planın artmasına neden olabilir.
- b) Pyro dizilim analizi öncesi numunelerin yeteri süreyle soğutulmaması
- PyroMark Q24 plaka tutucusundaki numuneleri 10-15 dakika süreyle oda ısısında tutunuz. Soğutma süresini kısaltmayınız.
- c) Kartuşun bulaşması (kontaminasyonu)
- Kartuşu ürün dokümanlarından açıklandığı şekilde dikkatle temizleyiniz. Kartuşu ışık ve tozdan uzak tutunuz.

### Pozitif kontrollerde sinyal olmaması

- a) Haznelerin tamamında yetersiz enzim veya alt madde karışımı olması
- PyroMark Q24 Kartuşunun "Aletler" menüsündeki "İşlem Öncesi Bilgilerine" uygun şekilde doldurulmuş olduğundan emin olunuz.
- b) Ayıraçların yanlış muhafaza edilmesi ve seyreltilmesi
- therescreen* ayıraçlarını 27. sayfada bulunan "Protokol 5: PyroMark Q24'ün Çalıştırılması", bölümüne uygun şekilde hazırlayınız.

## Açıklamalar ve öneriler

---

c) PCR veya numune hazırlamanın yapılamaması	PCR ayarlarında işleme hataları, PCR döngüleyicinin programlanması veya Pyro dizilimi öncesi numune hazırlanması sinyal alınmamasına yol açabilir. Filtre çubuklarına PyroMark Q24 Kullanıcı Kitapçığına uygun şekilde düzenli işlev testi yapınız ve ilgili uyarı verildiğinde filtre çubuklarını değiştiriniz. PCR ve Pyro dizilim analizini tekrarlayınız.
--	---

## Kalite Kontrol

QIAGEN'in ISO onaylı Kalite Yönetim Sistemine göre her bir theascreen UGT1A1 Pyro Kiti ürün kalite uygunluğunu sağlamak üzere önceden belirlenmiş teknik özelliklere göre test edilir.

## Sınırlamalar

Üretilen tanılama sonuçları diğer klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte yorumlandırılmalıdır.

Laboratuvarında kullandığı QIAGEN performans çalışmaları kapsamında olmayan prosedürlerin sistem performanslarının doğrulanması kullanıcının sorumluluğundadır.

## Performans Özellikleri

### Hassasiyet

Hassasiyet verileri dizinin doğru \*28 ve \*6 gen çifti varyantlarına göre toplam değişkenliğinin belirlenmesini sağlar. Gen çifti varyantlarını taşıyan plasmidler (%0, 50, 100) oranlarında karıştırılmış olup, bunlar homo ve heterozigot genotipleri (\*28 TA6/TA6, TA6/TA7 ve TA7/TA7; \*6 G/G, G/A ve A/A) temsil etmektedir. Her karışım yedi adet Pyro dizilim işlemi ile analiz edilmiştir,

bunlar therascreen UGT1A1 Pyro Kiti, PyroMark Q24 gereçleri, operatörleri, günleri ve laboratuvarlarının farklı lotları ile tekrarlanmıştır.

Hassasiyet Doğru Tahmin Oranı (yani doğru genotip sonucu verecek şekilde analiz edilen numunelerin oranı) olarak ifade edilmektedir. \*28 ve \*6 gen çifti varyantlarının genotip analiz dizilimleri sırasıyla 8 ve 9. tablolarda sıralanmış olup, analiz edilen numunelerin Doğru Tahmin Değeri %100'dür.

**Tablo 8: \*28 gen çifti varyantının genotip hassasiyeti**

Genotip*	Numune sayısı	Doğru tahminler
Homozigot TA6/TA6	21	21
Homozigot TA6/TA7	21	21
Homozigot TA7/TA7	20	20

\* OD<sub>260</sub> ölçümüne göre %0, 50 ve 100 plasmid karışımları ile temsil edilmektedir.

**Tablo 9: \*6 gen çifti varyantının genotip hassasiyeti**

Genotype*	Number of samples	Correct calls
Homozigot G/G	21	21
Homozigot G/A	21	21
Homozigot A/A	21	21

\* OD<sub>260</sub> ölçümüne göre %0, 50 ve 100 plasmid karışımları ile temsil edilmektedir.

## Tanılama Değerlendirmesi

*therascreen* UGT1A1 Pyro Kiti, Sanger dizilimine göre değerlendirilmiştir. 100 adet sabit formalinli parafin gömülü (FFPE) tümör numunesinden DNA alınmış ve \*28 ve \*6 gen çifti varyantına göre analiz edilmiştir.

DNA FFPE Doku Kiti kullanılarak izole edilmiştir. *therascreen* UGT1A1 Pyro Kiti ile ABI™ 3130 Genetik Analizörü üzerindeki PyroMark Q24 ve Sanger dizilimlerinin pyro dizilim analizleri yapılmıştır.

Sanger dizilimi ile analiz edilen 100 numunedan 95 ve 99 numunenin genotipi sırasıyla \*28 ve \*6 gen çifti varyantları için belirlenebilmiştir. *therascreen* UGT1A1 Pyro Kiti ile 98 ve 99 numunenin enotipi sırasıyla \*28 ve \*6 gen çifti varyantları için belirlenmesi mümkün olmuştur.

Her iki yöntemle yirmi dokuz, 49 ve 12 adet numunenin sırasıyla A6/TA6, TA6/TA7 ve TA7/TA7 genotipi olduğu bildirilmiştir. Dört adet ilave numune *therascreen* UGT1A1 Pyro Kiti kullanılarak TA6/TA6 genotipi göstermiştir. Sanger dizilimi ise TA6/TA7 genotipi tespit etmiştir (Tablo 10).

Yöntemlerin birinde veya ikisinde de başarısız olan numuneler ayrı tutulduğunda *therascreen* UGT1A1 Pyro Kiti ve Sanger dizilimi, \*28 gen çifti varyantında %96 oranında birbiri ile uyumlu olmuştur (Tablo 10).

**Tablo 10: Kafkasya orijinli numunelerde \*28 gen çifti varyantına yönelik genotip sonuçları**

		Sanger dizilimi				Toplam
		TA6/TA6	TA6/TA7	TA7/TA7	Bilinmeyen	
therascreen UGT1A1 Pyro Kit	TA6/TA6	29	4	0	2	35
	TA6/TA7	0	49	0	2	51
	TA7/TA7	0	0	12	0	12
	Bilinmeyen	0	1	0	1	2
	Toplam	29	54	12	5	100

Tüm numuneler hem Singer dizilimi hem de *therascreen* UGT1A1 Pyro Kiti kullanılarak \*6 gen çifti varyantında homozigot G/G genotipi göstermiştir. Bun

sonuç en on bilgilerle uyumlu olup, A/G ve A/A genotipleri Kafkasya nüfuslarında adeta yoktur. Bu nedenle, Asyalı kişilerin yanak içinden alınan 26 adet ilave DNA, QIAcube® üzerindeki QIAamp DSP DNA Blood Mini Kiti ile izole edilmiş ve \*6 gen çifti varyantına yönelik analiz edilmiştir.

On beş, dokuz ve iki adet numunenin her iki yöntemle sırasıyla G/G, G/A ve A/A genotipleri olduğu bildirilmiştir (Tablo 11).

Yöntemlerin birinde veya ikisinde de başarısız olan numuneler ayrı tutulduğunda *therascreen* UGT1A1 Pyro Kiti ve Sanger dizilimi, \*6 gen çifti varyantında %96 oranında birbiri ile uyumlu olmuştur (Tablo 11).

**Tablo 11: Asya orijinli numunelerde \*28 gen çifti varyantına yönelik genotip sonuçları**

		Sanger dizilimi				Toplam
		G/G	G/A	A/A	Bilinmeyen	
therascreen UGT1A1 Pyro Kit	G/G	15	0	0	0	15
	G/A	0	9	0	0	9
	A/A	0	0	2	0	2
	Bilinmeyen	0	0	0	0	0
	Toplam	15	9	2	0	26

**Not:** Performans özelliklerinin belirlenmesi için kullanılan tüm işlemlerde sinyal 30 RLU'nun üzerinde idi. Bu sinyaller rutin olarak kandan veya sabit formalinli parafine gömülü dokudan izole edilmiş 10 ng DNA'dan elde edilmiştir.

## Referanslar

QIAGEN kendi ürünleri ile ilgili büyük ve güncel bir bilimsel yayın veritabanı tutmaktadır. İstedığınız makaleleri bulmak için kapsamlı araştırma imkânları bulunmaktadır. Sadece anahtar kelime ile araştırma yapılabilirdiği gibi,



uygulama, araştırma alanı, başlık gibi bilgilere göre de arama yapılabilir.

Referansların tan listesi [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) adresindeki QIAGEB Referans Veritabanındadır. QIAGEN Teknik Hizmetlerinden veya yerel distribtrnzden de alabilirsiniz.

## Semboller

	<N> adet teste yeterli ayıraç içerir
	ile kullanın
<b>IVD</b>	In vitro tanılama tıbbi cihazı
<b>REF</b>	Katalog numarası
<b>LOT</b>	Lot numarası
<b>MAT</b>	malzeme numarası
<b>COMP</b>	İçerir
<b>CONT</b>	İçerik
<b>NUM</b>	Numara
<b>NaOH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>GTIN</b>	Global Ticaret Malzeme Numarası
	Isı Sınırı
	İmalatçı
	Kullanım için talimatlara bakınız

## İletişim Bilgileri



Teknik yardım ve bilgi almak için [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) adresinden Teknik Destek Merkezine başvurunuz veya QIAGEN Teknik Servis Bölümlerini veya yerel distribütörleri arayınız. (arka kapağa bakınız veya [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret ediniz).

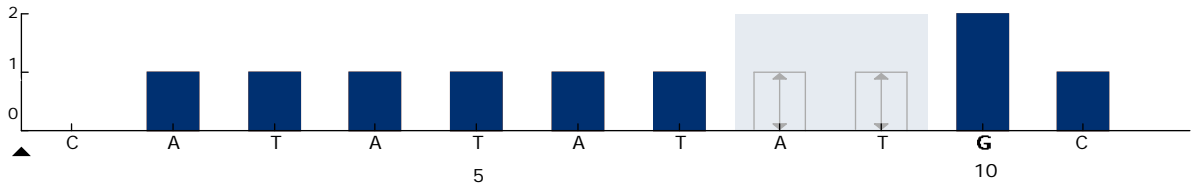
## Ek A: theascreen UGT1A1 Pyro dizisinin ayarlanması

*therascreen* UGT1A1 dizisini ilk defa kullanmadan önce dizi dosyasının düzenlenmesi gereklidir. UGT1A1 gen çifti varyantlarının PyroMark Q24 Yazılımı ile düzenlenmesi aşağıdaki şekildedir.

### Prosedür



#### UGT1A1 \*28

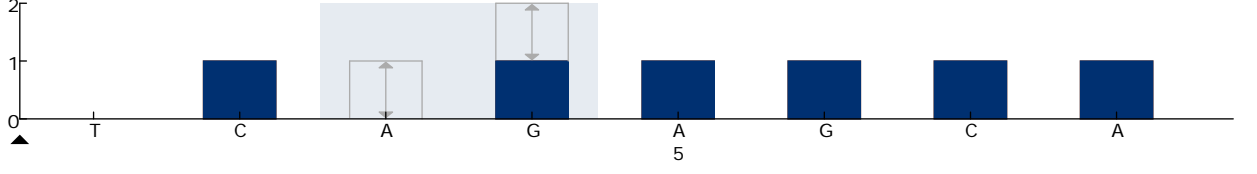
1. Araç çubuğundan  simgesine basın ve "Yeni AQ Dizilimi" seçeneğini seçin".
2. "Analiz Edilecek Dizilim" bölümüne ATATAT[AT]GGCA yazın
3. "Dağılım sırası" bölümüne CATATATGC yazın
4. "Analiz Parametreleri" tabını tıklayın ve "Tepe Yükseklik Eşiği - Geçer kalite için gereken tyepe yüksekliği" değerini 30'a yükseltin.
5. Araç çubuğundan  simgesine basın ve \*28 UGT1A1 dizisini kaydedin.



Şekil 11. UGT1A1 \*28 gen çifti varyantı genotip grafiği.


#### UGT1A1 \*6

1. Araç çubuğundan  simgesine basın ve "Yeni AQ Dizilimi" seçeneğini seçin
2. "Analiz Edilecek Dizilim" bölümüne CRGAGCAT yazın
3. "Dağılım sırası" bölümüne TCAGAGCA yazın
4. "Analiz Parametreleri" tabını tıklayın ve "Tepe Yükseklik Eşiği - Geçer kalite için gereken tyepe yüksekliği" değerini 30'a yükseltin.
5. Araç çubuğundan  simgesine basın ve \*6 UGT1A1 dizisini kaydedin.



Şekil 12: UGT1A1 \*6 gen çifti varyantı genotip grafiği.

## Ek B: Atık Kutusu ve Haznelerin Boşaltılması

<p><b>UYARI</b></p> 	<p><b>Tehlikeli Kimyasal Maddeler</b></p> <p>Sodyum hidroksit kullanılan vakum iş istasyonunu ile kullanılan Denşirme Çözeltisi göz ve deriyi tahriş eder.</p> <p>Her zaman güvenlik gözlükleri, eldivenleri ve laboratuvar önlüğü kullanınız</p> <p>Sorumlu kişi (yani laboratuvar yöneticisi) çalışma yerinin güvenliği ve cihaz operatörlerinin tehlikeli seviyede toksik maddeye (kimyasal veya biyolojik) maruz kalmamaları için gerekli önlemleri almakla sorumludur. Bunlar Güvenlik Bilgi Formunda (GBF) veya OSHA,* ACGIH,+ veya COSHH‡ dokümanlarında belirtilmiştir.</p> <p>Havalandırma bacaları ve atık tahliyeleri ulusal ve yerel sağlık ve güvenlik mevzuatına uygun olmalıdır.</p>
---	---

\* OSHA: İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi (Amerika Birleşik Devletleri)

† ACGIH: Amerikan Kamu Endüstri Hijyenistler Birliği (Amerika Birleşik Devletleri)

‡ COSHH: Sağlık İçin Tehlikeli Maddelerin Kontrolü (Birleşik Krallık)

Laboratuvar atığının bertaraf edilmesi için federal, eyalet ve bölgesel çevresel düzenlemelere uyduğunuzdan emin olun.

### Başlamadan önceki önemli hususlar

- Bu protokol yüksek saflıkta su gerektirir.

## Prosedür

**B1. Vakum aletine vakum uygulanmadığından emin olun. Vakumun kapalı olduğundan emin ve pompanın kapalı konumda olduğundan emin olun.**

**B2. Haznelerde kalan çözeltileri atın.**

**B3. Hazneleri yüksek saflıkta su ile durulayın veya gerekiyorsa değiştirin.**

**B4. Atık kutusunu boşaltın.**

Tüpten bağlantısı kesilmeden kapağı çıkarılabilmektedir.

**B5. Vakum iş istasyonunun temizlenmesi gerekiyorsa (örneğin tozlanmışsa veya döküntü olmuşsa) PyroMark Q24 Kullanıcı Kılavuzundaki talimatların uygulayın.**

## Sipariş Bilgileri

Ürün	İçeriği	Kat. no.
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit (24)	PyroMark Q24 sistemleri 24 ayıraçları için: Seq primerleri, PCR Primerleri, İnsan Kontrol DNA, PyroMark PCR Master Karışımı, CoralLoad Konsantresi, PyroMark Bağlama Tamponu, PyroMark Sertleştirme Tamponu, PyroMark Denatürasyon Çözeltisi, PyroMark Yıkama Tamponu, Enzim Karışımı, Substrat Karışımı, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP ve H <sub>2</sub> O	971540
<b>Aksesuarlar</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 Oluklu sekanslama reaksiyon plaka	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Ayıraçlar ve nükleotidler dağıtımı için tüpler	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Promark Vakum Çalışma Yeri için Yeniden kullanılabilen filtre Probları Q96 ve Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Kurulum için sistem kontrolü	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Performans için sistem onayı	979304
<b>İlgili Ürünler</b>		

Ürün	İçeriği	Kat. no.
PyroMark Q24 MDx	Paralelde 24 örneğin Pyrosequencing'i için dizilim temelli deteksiyon platformu	9001513
PyroMark Q24	Paralelde 24 örneğin Pyrosequencing'i için dizilim temelli deteksiyon platformu	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakum Çalışma Yeri (220V) PCR cihazından Monokataner şablona 24 örnek paralelde, hazırlanması	9001517* 9001515 <sup>+</sup>
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakum Çalışma Yeri (220V) PCR cihazından Tek- dizili şablona 24 örnek paralelde, hazırlanması	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Uygulama Yazılımı	9019063
PyroMark Q24 Software	İnceleme Yazılımı	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNA prepler için: 50 QIAamp MinElute® Sütunları, Protenize K, Tamponlar, Koleksiyon Tüpleri (2ml)	56404

Ürün	İçeriği	Kat. no.
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	48 Pres için: Ayıraç tüpleri( Doku) , Tekrar kullanılabilen Filtre uçları, tekrar kullanılabilen uç-tutucuları, örnek tüpleri, elüsyon tüpleri(1.5 ml) , Tampon G2, Proteinaz K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	50 Prepler için: QIAamp Mini Spin Sütunları, Tamponlar, Ayıraçlar, Tüpler, Vac Bağlayıcılar	61104

\* Sadece İngiltere

† Dünyanın geri kalanı

Güncel lisans bilgisi ve ürüne özgü feragatnameler için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kiti kitapçıklarını ve kullanım kılavuzları [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde bulabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri'nden veya yerel distribütörünüzden talep edebilirsiniz.



Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır



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

#### **Sınırlı Lisans Anlaşması**

Bu ürünün kullanılması, *therascreen* UGT1A1 PyroKit Kit ürünlerini satın alan kişinin ya da kullanıcının aşağıdaki koşullarda bir anlaşması anlamına gelir:

1. *therascreen* UGT1A1 PyroKit Kit yalnızca *therascreen* UGT1A1 PyroKit Kit Kullanım Kılavuzu'na göre ve yalnızca bu Kit içinde içeren bileşenlerle birlikte kullanılmak içindir. QIAGEN kendisinin her hangi bir fikri hakları altında bu Kitin içeriğindeki bileşenlerin bu kit içerisinde içerilmeyen her türlü bileşenlerle birlikte kullanımı için bir lisans sunmaz, *therascreen* UGT1A1 PyroKit Kit Kullanım Kılavuzu'nda tanımlanmış olanlar bu hususların dışındadır ve ilave protokoller [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sitesinde mevcuttur.
2. Açıkça ifade edilen lisansların dışında QIAGEN bu Kitin ve/veya onun kullanımının üçüncü kişilerin haklarının çiğnenmeyeceğini garanti vermez.
3. Bu kit ve bileşenler tek bir kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve yeniden satılamaz.
4. QIAGEN belirli bir biçimde açıkça belirtilenler dışındaki diğer lisansları açıkça ya da ima yoluyla onaylamaz.
5. Kitin satın alıcısı ya da kullanıcısı başka bir kişinin yukarıda yasaklanan her hangi bir kuralın hafifletilmesi yönünde bir adım atmasına izin vermemek konusunda anlaşılır. QIAGEN bu Sınırlı Lisans Anlaşmasının yasaklarını herhangi bir Mahkemede uygulatabilir ve avukat ücreti dahil bu Sınırlı Lisans Anlaşması ya da Kit ve/veya bunun bileşenleriyle ilgili tüm araştırma ve Mahkeme masraflarını talep edecektir.

Güncellenmiş lisans koşulları için, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sitesine bakın.

© 2015 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

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

**Avustralya** ■ Siparişler 03-9840-9800 ■ Faks 03-9840-9888 ■ Teknik 1-800-243-066

**Avusturya** ■ Siparişler 0800/28-10-10 ■ Faks 0800/28-10-19 ■ Teknik 0800/28-10-11

**Belçika** ■ Siparişler 0800-79612 ■ Faks 0800-79611 ■ Teknik 0800-79556

**Kanada** ■ Siparişler 800-572-9613 ■ Faks 800-713-5951 ■ Teknik 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**Çin** ■ Siparişler 021-51345678 ■ Faks 021-51342500 ■ Teknik 021-51345678

**Danimarka** ■ Siparişler 80-885945 ■ Faks 80-885944 ■ Teknik 80-885942

**Finlandiya** ■ Siparişler 0800-914416 ■ Faks 0800-914415 ■ Teknik 0800-914413

**Fransa** ■ Siparişler 01-60-920-926 ■ Faks 01-60-920-925 ■ Teknik 01-60-920-930 ■ Teklifler 01-60-920-928

**Almanya** ■ Siparişler 02103-29-12000 ■ Faks 02103-29-22000 ■ Teknik 02103-29-12400

**Hong Kong** ■ Siparişler 800 933 965 ■ Faks 800 930 439 ■ Teknik 800 930 425

**İrlanda** ■ Siparişler 1800-555-049 ■ Faks 1800-555-048 ■ Teknik 1800-555-061

**İtalya** ■ Siparişler 02-33430411 ■ Faks 02-33430426 ■ Teknik 800-787980

**Japonya** ■ Telephone 03-5547-0811 ■ Faks 03-5547-0818 ■ Teknik 03-6890-7300

**Kore (Güney)** ■ Siparişler 1544 7145 ■ Faks 1544 7146 ■ Teknik 1544 7145

**Lüksemburg** ■ Siparişler 8002-2076 ■ Faks 8002-2073 ■ Teknik 8002-2067

**Meksika** ■ Siparişler 01-800-7742-639 ■ Faks 01-800-1122-330 ■ Teknik 01-800-7742-436

**Hollanda** ■ Siparişler 0800-0229592 ■ Faks 0800-0229593 ■ Teknik 0800-0229602

**Norveç** ■ Siparişler 800-18859 ■ Faks 800-18817 ■ Teknik 800-18712

**Singapur** ■ Siparişler 65-67775366 ■ Faks 65-67785177 ■ Teknik 1800-742-4368

**İspanya** ■ Siparişler 91-630-7050 ■ Faks 91-630-5145 ■ Teknik 91-630-7050

**İsveç** ■ Siparişler 020-790282 ■ Faks 020-790582 ■ Teknik 020-798328

**İsviçre** ■ Siparişler 055-254-22-11 ■ Faks 055-254-22-13 ■ Teknik 055-254-22-12

**İngiltere** ■ Siparişler 01293-422-911 ■ Faks 01293-422-922 ■ Teknik 01293-422-999

**ABD** ■ Siparişler 800-426-8157 ■ Faks 800-718-2056 ■ Teknik 800-DNA-PREP (800-362-7737)

