

„*therascreen*[®] UGT1A1 Pyro[®] Kit“ vadovas



1 versija



Skirtas „in vitro“ diagnostikai



971540



1061270LT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA

R3



1061270LT



QIAGEN mėginių ir tyrimų technologijos

QIAGEN yra pirmaujanti inovacinių mėginių ir tyrimų technologijų, leidžiančių išskirti ir aptikti bet kokių biologinių mėginių turinį, tiekėja. Pažangūs, aukštos kokybės mūsų produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio iki rezultato.

QIAGEN nustato standartus šiose srityse:

- DNR, RNR ir baltymų gryninimas
- Nukleino rūgščių ir baltymų tyrimai
- mikroRNR tyrimai ir RNRi
- Mėginių ir tyrimų technologijų automatizavimas

Mūsų tikslas – leisti jums pasiekti sėkmę ir laimėjimus. Daugiau informacijos rasite svetainėje www.qiagen.com.

Turinys

Numatytoji paskirtis	5
Suvestinė ir paaiškinimas	5
Procedūros principas	6
Kontrolės	7
Pateikiamos medžiagos	8
Rinkinio turinys	8
Būtinės, bet nepateikiamos priemonės	10
Rekomenduojami plokštelių maišytuvai	11
Perspėjimai ir atsargumo priemonės	11
Saugos informacija	11
Bendrosios atsargumo priemonės	12
Reagentų laikymas ir naudojimas	12
Mėginių naudojimas ir laikymas	13
Procedūra	13
DNR išskyrimas	13
1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos nustatymas	14
2 protokolas: PGR naudojant su „ <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit“ pateikiamus reagentus	16
3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas streptavidino „Sepharose High Performance“ rutuliukuose	19
4 protokolas: mėginių paruošimas prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema	21
5 protokolas: „PyroMark Q24“ tyrimas	25
6 protokolas: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė	27
Rezultatų aiškinimas	28
Trikčių šalinimo vadovas	30
Kokybės kontrolė	33
Apribojimai	33
Efektyvumo charakteristikos	33
Tikslumas	33
Diagnostinis įvertinimas	34
Literatūra	36
Simboliai	37
Kontaktinė informacija	37
A priedas: „<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro“ tyrimo nustatymas	38

B priedas: atliekų konteinerio ir lovelių ištuštinimas	40
Užsakymo informacija	41

Numatytoji paskirtis

„*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ yra „in vitro“ nukleino rūgšties seka pagrįstas aptikimo testas, atliekamas naudojant „Pyrosequencing®“ technologiją ir skirtas genomines DNR, gautos iš žmogaus audinių mėginių, žmogaus UGT1A1 geno alelio variantų *28 ir *6 genotipavimui.

„*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ turėtų gydytojams suteikti informacijos, padėsiančios atrinkti pacientus, kuriems yra didelė UDP gliukuronosiltransferazės aktyvumo rizika. Skirtas „in vitro“ diagnostikai.

Skirtas naudoti tik „PyroMark® Q24“ sistemoje. „PyroMark Q24“ sistemas sudaro:

- „PyroMark Q24“ instrumentas ir „PyroMark Q24 MDx“ instrumentas.
- „PyroMark Q24“ vakuuminė darbo stotis ir „PyroMark Q24 MDx“ vakuuminė darbo stotis.
- „PyroMark Q24“ programinė įranga (2.0 versija) ir „PyroMark Q24 MDx“ programinė įranga (2.0 versija).

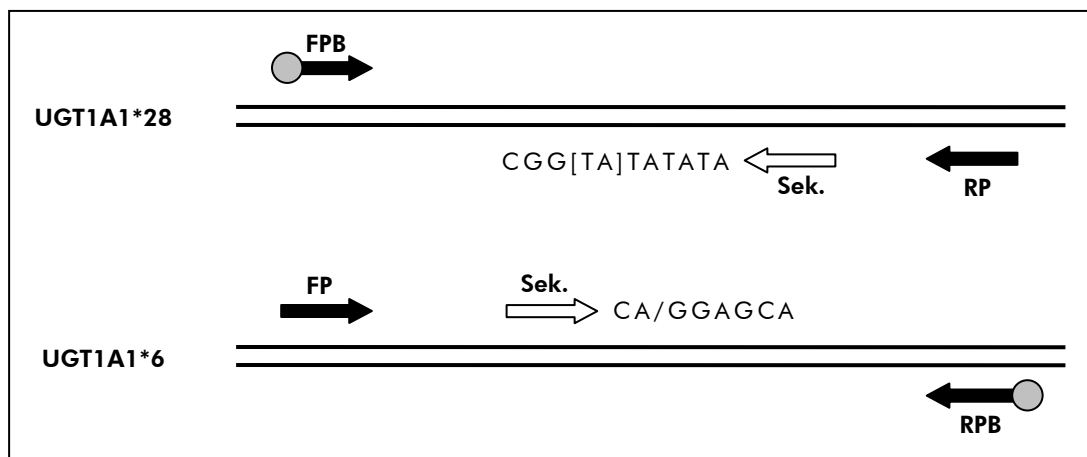
Produktą turi naudoti tik specialistai, pvz., technikai ir gydytojai, išmokyti atlikti „in vitro“ diagnostikos procedūras, naudoti molekulinės biologijos metodus ir dirbti „PyroMark Q24“ sistema.

Suvestinė ir paaiškinimas

„*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ naudojamas žmogaus UGT1A1 geno alelio varianto *28 (norint atskirti 6 ir 7 TA pasikartojimus) ir alelio varianto *6 (norint atskirti G ir A genotipus) genotipavimui. Rinkinį sudaro du tyrimai: vienas skirtas alelio varianto *28 genotipavimui, o antras – alelio varianto *6 genotipavimui (1 pav.). Šie du regionai amplifikuojami atskirai naudojant PGR ir sekvenuojami apibrėžtame regione. Nurodytas vietas supančios sekos naudojamos kaip tyrimo genotipavimo ir kokybinio vertinimo normalizavimo ir nuorodinės viršūnės.

Alelio variantas *28 sekvenuojamas atvirkštine tvarka, o alelio variantas *6 – tiesiogine.

Gaminį sudaro kiekvieno tyrimo PGR pradmenų mišinys ir sekvenavimo pradmuo. Pradmenys pateikiami tirpale. Kiekviename buteliuke yra 24 µl kiekvieno pradmens ar pradmenų mišinio.



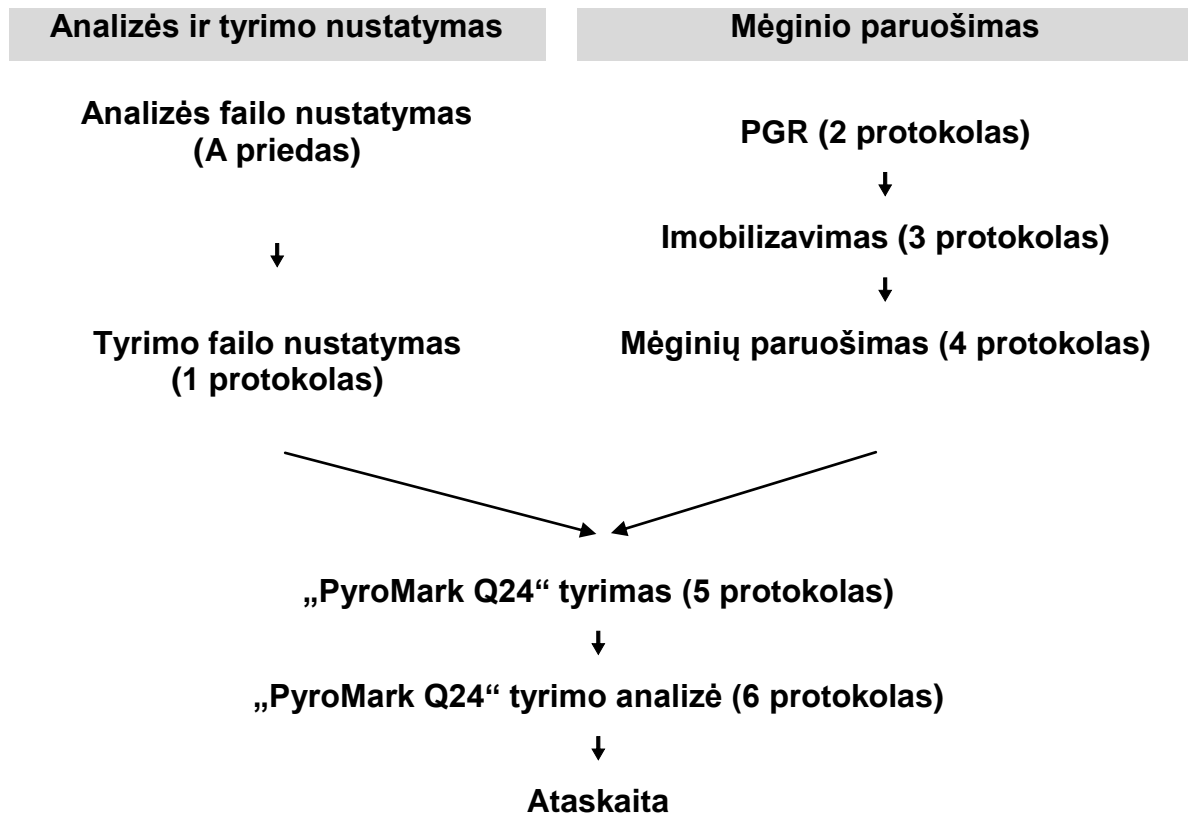
1 pav. „therascreen UGT1A1“ tyrimų iliustracija. Nurodyta seka yra išanalizuota seka su polimorfiniais nukleotidais, pažymėtis stačiakampiais skliaustais arba pasviruoju brūkšniu. Dalis TA pasikartojimų, išanalizuotų naudojant UGT1A1 *28 tyrimą, yra padengta sekvenavimo pradmeniu. **FP**, **FPB**: tiesioginės PGR pradmenys (B nurodo biotiniliaciją); **RP**, **RPB**: atvirkštinės PGR pradmenys (B nurodo biotiniliaciją); **Sek.**: sekvenavimo pradmenys.

Procedūros principas

7 puslapyje pateikta darbų eiga iliustruoja tyrimo procedūrą. Atlikus PGR, naudojant į alelio variantus *28 ir *6 nukreiptus pradmenis, amplifikacijos produktai imobilizuojami streptavidino „Sepharose® High Performance“ rutuliukuose. Paruošiama vienos gijos DNR ir atitinkami sekvenavimo pradmenys prisijungia prie DNR. Tada mėginiai analizuojami „PyroMark Q24“ sistema naudojant tyrimo nustatymo failus ir tyrimo failą.

Pastaba: darbų eiga šiek tiek modifikuota, palyginti su „PyroMark Q24“ naudotojo vadovu (žr. „4 protokolai: mėginių paruošimas prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema“, 21 psl.).

„therascreen UGT1A1 Pyro“ procedūros darbo eiga



Kontrolės

Į rinkinį įtraukta žmogaus kontrolinė DNR kaip teigiama PGR ir sekvenavimo reakcijų kontrolė. Ši kontrolinė DNR turi homozigotinius TA6/TA6 ir G/G genotipus, kai atitinkamai analizuojami alelio variantai *28 ir *6.

Į kiekvieną bent vieno tyrimo PGR nustatymą turi būti įtraukta neigiama kontrolė (be DNR matricos).


Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

„*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ (dėžutė 1/2)

<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit	(24)
Katalogo Nr.	971540
Reakijų skaičius	24
PGR pradmenų mišinys UGT1A1 *28	24 µl
PGR pradmenų mišinys UGT1A1 *6	24 µl
Sek. pradmuo UGT1A1 *28	24 µl
Sek. pradmuo UGT1A1 *6	24 µl
„PyroMark“ PGR pagrindinis mišinys, 2 vnt.	850 µl
„CoralLoad [®] “ koncentratas, 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Žmogaus kontrolinė DNR, 2 ng/µl	100 µl

„therascreen“ buferiniai tirpalai ir reagentai (dėžutė 2/2)

„therascreen“ buferiniai tirpalai ir reagentai		
„PyroMark“ susiejimo buferinis tirpalas		10 ml
„PyroMark“ prisijungimo buferinis tirpalas		10 ml
„PyroMark“ denatūracijos tirpalas*		250 ml
„PyroMark“ plovimo buferinis tirpalas, 10x		25 ml
Fermentų mišinys		1 buteliukas
Substrato mišinys		1 buteliukas
dATP α S		1 180 μ l
dCTP		1 180 μ l
dGTP		1 180 μ l
dTTP		1 180 μ l
Vadovas		1

* Yra natrio hidroksido.

Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose Safety Data Sheets (saugos duomenų lapuose) (SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

- DNR išskyrimo rinkinys (žr. „DNR išskyrimas“, 13 psl.)
 - Pipetės (reguliuojamos)*
 - Sterilūs pipečių antgaliai (su PGR nustatymo filtrais)
 - Stalinė mikrocentrifuga*
 - Šiluminio ciklo prietaisas* ir atitinkami PGR mėgintuvėliai
 - Streptavidino „Sepharose High Performance“ („GE Healthcare“, kat. Nr. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
 - „PyroMark Q24“ (kat. Nr. 9001514 arba 9001513)**†
 - „PyroMark Q24“ programinė įranga (kat. Nr. 9019062 arba 9019063)†
 - „PyroMark Q24“ plokštelė (kat. Nr. 979301)†
 - „PyroMark Q24“ kasetė (kat. Nr. 979302)†
 - „PyroMark Q24“ vakuuminė darbo stotis (kat. Nr. 9001515 arba 9001517)**†
 - Plokštelių maišytuvai* rutuliukams imobilizuoti (žr. „Rekomenduojami plokštelių maišytuvai“, 11 psl.)
 - Kaitinimo blokas*, galintis pasiekti 80 °C temperatūrą
 - 24 šulinėlių PGR plokštelė arba juostelės
 - Juostelių dangteliai
 - Labai išgrynintas vanduo („Milli-Q®“ 18,2 MΩ x cm arba atitinkamas)
- Pastaba:** produkte pateikiama pakankamai vandens PGR, DNR imobilizuoti, fermentų mišiniui ir substrato mišiniui ištirpdyti; labai išgryninto vandens papildomai reikia „PyroMark“ plovimo buferiniam tirpalui (10x) atskiesti.
- Etanolis (70 %)[‡]

* Patikrinkite, ar visi instrumentai patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

† Pažymėta CE-IVD, atitinka ES direktyvą 98/79/EB. Visi kiti išvardyti produktai nėra pažymėti CE-IVD remiantis ES direktyva 98/79/EB.

‡ Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletiketono.

Rekomenduojami plokštelių maišytuvai

Su „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ rekomenduojami naudoti 1 lentelėje pateikiami plokštelių maišytuvai.

1 lentelė. Su „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ rekomenduojami naudoti plokštelių maišytuvai

Gamintojas	Produktas	Katalogo numeris
„Eppendorf“	„Thermomixer comfort“ (pagrindinis įrenginys)	5355 000.011
	MTP šiluminis blokas	5363 000.012
	96 x 0,2 ml PGR vamzdelių adapterio plokštelė, skirta įterpti į mikrotitrų plokštelių blokus	5363 007.009
„H+P Labortechnik GmbH“	„Variomag® Teleshake“	51410 (115 V = 51410 U)
	„Variomag Monoshake“	51110 (115 V = 51110 U)

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirtas „in vitro“ diagnostikai

Saugos informacija

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Dar žr. atitinkamus Safety Data Sheets (saugos duomenų lapus) (SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete www.qiagen.com/safety, kur galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN® rinkinio ir jų komponentų SDS.

„*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ komponentams taikomos toliau išvardytos pavojingumo ir atsargumo frazės.

PyroMark Denaturation Solution



Atsargiai! Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Gali ēsdinti metalus. Absorbuoti išsiliejusią medžiagą, siekiant išvengti materialinės žalos. Laikyti tik originalioje talpykloje. Mėvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

PyroMark Enzyme Mixture



Sudėtyje yra: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Pavojinga! Dirgina odą. Smarkiai pažeidžia akis. PATEKUS Į AKIS: Kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: Skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš juos vėl apsivelkant. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

PyroMark Substrate Mixture



Sudėtyje yra: acetic acid. Atsargiai! Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Jei akių dirginimas nepraeina: kreiptis į gydytoją. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš juos vėl apsivelkant. Mūvėti apsaugines pirštines/ dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

Bendrosios atsargumo priemonės

Naudotojas visada turi atkreipti dėmesį:

- Norint gauti optimalius rezultatus, reikia griežtai laikytis naudotojo vadove pateiktų nurodymų. Nerekomenduojama skiesti reagentų kitaip, nei nurodyta šiame vadove, nes gali sumažėti jų veiksmingumas.
- Darbų eiga šiek tiek modifikuota (žr. „4 protokolas: mėginių paruošimas prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema“, 21 psl.), palyginti su „PyroMark Q24“ naudotojo vadovu.
- Šio produkto komponentų užtenka 24 reakcijoms atlikti ne daugiau kaip 5 nepriklausomuose tyrimuose.
- Naudokite sterilius pipečių antgalių (PGR – su filtrais).
- Teigiamas medžiagas (mėginius, teigiamas kontrolines medžiagas ir amplifikacijos produktus) laikykite ir ekstrahuokite atskirai nuo visų kitų reagentų, dėkite juos į reakcijos mišinį erdviškai atskirtoje patalpoje.
- Prieš pradėdami tyrimą visus komponentus gerai atšildykite kambario temperatūroje (15–25 °C).
- Atšildę sumaišykite komponentus (pakartotinai lašindami arba ritmiškai pavartydami) ir trumpai centrifuguokite.
- Genotipo negalima vertinti remiantis nesėkmingais rezultatais.

Reagentų laikymas ir naudojimas

„therascreen UGT1A1 Pyro Kit“ pateikiamas dviejose dėžutėse. „therascreen UGT1A1 Pyro Kit“ (dėžutė 1/2) pristatomas užšaldytas sausame lede. „PyroMark“

PGR pagrindinis mišinys, „CoralLoad“ koncentratas, kontrolinė DNR ir visi pradmenys pristatyti turi būti laikomi nuo –30 iki –15 °C temperatūroje.

„Pyro“ buferiniai tirpalai ir reagentai (dėžutė 2/2), kurie apima buferinius tirpalus, fermentų mišinį, substrato mišinį, dATP α S, dCTP, dGTP ir dTTP („Pyrosequencing“ analizės reagentus), pristatomi šaltose pakuotėse. Šie komponentai pristatyti turi būti laikomi 2–8 °C. Kad nesumažėtų aktyvumas, enzymų mišinį ir substrato mišinį patariama laikyti pateikiamuose buteliukuose.

Atkurti fermentų ir substrato mišiniai yra stabilūs bent 10 dienų laikant 2–8 °C temperatūroje. Atkurtus fermentų ir substrato mišinius galima užšaldyti ir laikyti jų buteliukuose nuo –30 iki –15 °C temperatūroje. Užšaldytus reagentus galima užšaldyti ir atšildyti ne daugiau kaip 6 kartus.

Pastaba: nukleotidų šaldyti negalima.

„*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ yra stabilus iki rinkinio galiojimo laiko pabaigos, jei laikomas tokios temperatūros aplinkoje.

Mėginių naudojimas ir laikymas

Su visais mėginiais turi būti elgiamasi kaip su potencialiai užkrečiama medžiaga.

Mėginio medžiaga yra žmogaus DNR, gauta iš kraujo ar formalinu fiksuotų parafine esančių (FFPE) mėginių.

Negalima naudoti mėginių, gautų iš žmonių, kurie gydomi heparinu. Negalima naudoti kraujo mėginių, surinktų mėgintuvėliuose, kuriuose yra heparino kaip antikoagulianto. Heparinas turi įtakos PGR.

Procedūra

DNR išskyrimas

Sistemos efektyvumas nustatytas naudojant „EZ1[®] DNR Tissue Kit“ ir „QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit“, skirtus ekstrahuoti žmogaus DNR iš formaline fiksuotų ir parafine esančių auglio mėginių. „QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit“ sistemos efektyvumas nustatytas naudojant sveikų kraujo donorų mėginius su pridėtomis auglio ląstelėmis.

Norint išgryninti iš nurodytų žmonių mėginių tipų gautą DNR, skirtą naudoti su „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“, rekomenduojama naudoti 2 lentelėje pateiktus QIAGEN rinkinius. DNR gryninkite laikydamiesi rinkinio vadove pateiktų nurodymų.

2 lentelė. DNR gryninimo rinkiniai, rekomenduojami naudoti su „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“

Mėginio medžiaga	Nukleino rūgšties išskyrimo rinkinys	Katalogo numeris (QIAGEN)
Kraujas	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit*	61104
Parafine esantis audinys	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) EZ1 DNA Tissue Kit (48) [†]	56404 953034

* Pažymėta CE-IVD, atitinka ES direktyvą 98/79/EB.



[†] Laikykites parafine esančių audinių naudojimo protokolo. „EZ1 DNA Tissue Kit“ turi būti naudojamas kartu su „EZ1 Advanced“ (kat. Nr. 9001410 arba 9001411) ir „EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card“ (kat. Nr. 9018298), su „EZ1 Advanced XL“ (kat. Nr. 9001492) ir „EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card“ (kat. Nr. 9018700) arba su „BioRobot[®] EZ1“ (kat. Nr. 9000705; nebetiekama) ir „EZ1 DNA Paraffin Section Card“ (kat. Nr. 9015862).

1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos nustatymas

Prieš pradėdant atliekami veiksmai

- Sukurkite tyrimo nustatymą, kaip aprašyta „A priedas: „therascreen UGT1A1 Pyro“ tyrimo nustatymas“, 38 psl. Tai reikia atlikti tik vieną kartą prieš pradėdant pirmą „therascreen UGT1A1 Pyro“ tyrimą.

Procedūra

- Įrankių juostoje spustelėkite .**
Sukuriamas naujas tyrimo failas.
- Įveskite tyrimo parametrus (žr. „Tyrimo parametrai“, 15 psl.)**
- Nustatykite plokštelę pridėdami alelio varianto *28 ir alelio varianto *6 tyrimą prie šulinėlių, atitinkančių analizuojamus mėginius.**
Pastaba: į kiekvieną bent vieno tyrimo PGR nustatymą turi būti įtrauktas neigiamos kontrolės mėginys (be DNR matricos).
Pastaba: kaip teigiamą PGR ir sekvenavimo reakcijų kontrolę galima įtraukti mėginį su žmogaus kontroline DNR (žr. „Kontrolės“, 7 psl.).
- Kai tyrimas nustatytas ir parengtas paleisti naudojant „PyroMark Q24“, išspausdinkite fermentų mišinio, substrato mišinio ir nukleotidų reikiamų tūrių sąrašą. Iš meniu „Tools“ (įrankiai) pasirinkite „Pre Run Information“ (išankstinio tyrimo informacija) ir pasirodžius ataskaitai spustelėkite .**
- Uždarykite tyrimo failą ir naudodami „Windows[®] Explorer“ nukopijuokite į USB atmintinę (pateikiamą su sistema).**
Išspausdintą išankstinio tyrimo informaciją galima naudoti kaip nustatymo pavyzdį (žr. „3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas streptavidino „Sepharose High Performance“ rutuliukuose“, 19 psl.).
Informacijos apie plokštelės tyrimą „PyroMark Q24“ rasite „5 protokolas: „PyroMark Q24“ tyrimas“, 25 psl.

Tyrimo parametrai

„Run name“ (tyrimo pavadinimas)	Tyrimo pavadinimas suteikiamas įrašant failą. Pervardijus failą, pakeičiamas ir tyrimo pavadinimas.
„Instrument method“ (instrumento metodas)	Pasirinkite instrumento metodą pagal tyrime naudojamą kasetę. Žr. su produktais pateikiamas instrukcijas.
„Plate ID“ (plokštelės ID)	Pasirinktina: įveskite „PyroMark Q24“ plokštelės ID.
„Bar code“ (brūkšninis kodas)	Pasirinktina: įveskite plokštelės brūkšninio kodo numerį arba, jei turite prie kompiuterio prijungtą brūkšninių kodų skaitytuvą, pelės žymiklį perkeltkite į teksto lauką „Barcode“ (brūkšninis kodas) ir nuskaitykite brūkšninį kodą.
„Reagent ID“ (reagento ID)	Pasirinktina: įveskite naudojamų „ <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit“ 1 ir 2 dėžučių partijų numerius. Partijų numerius galima rasti ant gaminio etiketės. Pastaba: rekomenduojame įvesti partijų numerius, kad būtų galima stebėti, ar nekyla nenumatytų „ <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit“ problemų.
„Run note“ (tyrimo pastaba)	Pasirinktina: įveskite pastabą apie tyrimo turinį ir tikslą.

Tyrimo failų pridėjimas

Norėdami prie šulinėlio pridėti tyrimą, galite atlikti vieną iš šių veiksmų:

- Dešiniuuoju pelės mygtuku spustelėkite šulinėlį ir iš kontekstinio meniu pasirinkite „Load Assay“ (įkelti tyrimą).

- Nuorodų meniu pasirinkite tyrimą, spustelėkite ir nuvilkite jį prie šulinėlio.

Šulinėlis nuspalvintas spalva, atitinančia į šulinėlį įkeltą tyrimą.

Mėginių ID ir pastabų įvedimas

Norėdami įvesti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite langelį ir įveskite tekstą.

Norėdami redaguoti mėginio ID ar pastabą, pasirinkite langelį (bus pažymėtas dabartinis turinys) arba dukart jį spustelėkite.

2 protokolas: PGR naudojant su „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ pateikiamus reagentus

Šis protokolas skirtas alelio varianto *28 genotipavimo regiono PGR amplifikacijai ir atskirai alelio varianto *6 genotipavimo regiono PGR amplifikacijai naudojant „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“.

Svarbi informacija prieš pradedant

- „PyroMark“ PGR pagrindiniame mišinyje esančiai „HotStarTaq[®]“ DNR polimerazei būtinas **15 minučių aktyvinimo 95 °C temperatūroje** veiksmas.
- Visus reakcijos mišinius nustatykite srityje, atskirtoje nuo tos, kurioje gryninama DNR, į PGR pridedama DNR matrica, atliekama PGR produkto analizė arba ruošiami mėginiai prieš „Pyrosequencing“ analizę.
- Kad būtų išvengta kryžminio užterštumo, naudokite vienkartinius antgalius su hidrofobiniais filtrais.

Prieš pradedant atliekami veiksmai

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su PGR pradmenimis, trumpai centrifuguokite, kad būtų surinktas turinys nuo mėgintuvėlių dugno.
- Jei reikia, nustatykite, kad mėginio DNR koncentracija būtų 0,4–2 ng/μl.
Pastaba: į rinkinį įtraukta žmogaus kontrolinė DNR pateikiama 2 ng/μl koncentracijos.

Procedūra

1. Atšildykite visus reikalingus komponentus.

Prieš naudodami gerai išmaišykite.

2. Paruoškite kiekvieno PGR pradmens rinkinio reakcijos mišinį, kaip nurodyta 3 lentelėje.

Pagrindiniame mišinyje paprastai yra visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

Reakcijos mišinio paruoškite daugiau nei iš viso reikia visiems PGR tyrimams atlikti.

3 lentelė. Kiekvieno PGR pradmens mišinio reakcijos mišinio paruošimas

Komponentas	Tūris / reakcija (μl)
„PyroMark“ PGR pagrindinis mišinys, 2 vnt.	12,5
„CoralLoad“ koncentratas, 10x	2,5
PGR pradmenų mišinio UGT1A1 alelio variantas *28 arba PGR pradmenų mišinio UGT1A1 alelio variantas *6	1,0
Vanduo (H ₂ O, pateikiamas)	4,0
Bendrasis tūris	20,0

3. Reakcijos mišinį gerai sumaišykite ir paskirstykite po 20 μl į kiekvieną PGR mėgintuvėlį.

PGR mėgintuvėlių nereikia laikyti lede, nes „HotStarTaq“ DNR polimerazė kambario temperatūroje yra neaktyvi.

4. Į atskirus PGR mėgintuvėlius pridėkite 5 μl DNR matricos (2–10 ng genominės DNR) (žr. 4 lentelę) ir gerai sumaišykite.

Pastaba: į kiekvieną bent vieno tyrimo PGR nustatymą turi būti įtrauktas neigiamos kontrolės mėginys (be DNR matricos).

Pastaba: kaip teigiamą PGR ir sekvenavimo reakcijų kontrolę galima įtraukti mėginį su žmogaus kontroline DNR (žr. „Kontrolės“, 7 psl.).

4 lentelė. PGR paruošimas

Komponentas	Tūris / reakcija (μl)
Reakcijos mišinys	20
DNR matrica	5
Bendrasis tūris	25

5. Užprogramuokite šiluminio ciklo prietaisą pagal gamintojo nurodymus naudodami 5 lentelėje pateiktas sąlygas.

5 lentelė. Optimizuotas ciklų protokolai

			Komentariai
Pradinis aktyvinimo veiksmas:	15 minučių	95 °C	„HotStarTaq“ DNR polimerazė suaktyvinama atliekant šį kaitinimo veiksmą.
3 veiksmų ciklai:			
Denatūracija	20 sekundžių	95 °C	
Prisijungimas	30 sekundžių	53 °C	
Išplėtimas	20 sekundžių	72 °C	
Ciklų skaičius	42		
Galutinis išplėtimas:	5 minutės	72 °C	

- Įdėkite PGR mėgintuvėlius į šiluminio ciklo prietaisą ir pradėkite ciklų programą.
- Po amplifikacijos pereikite prie „3 protokolai: PGR produktų imobilizavimas streptavidino „Sepharose High Performance“ rutuliukuose“, 19 psl.

3 protokolas: PGR produktų imobilizavimas streptavidino „Sepharse High Performance“ rutuliukuose

Šis protokolas skirtas DNR matricai imobilizuoti streptavidino „Sepharse High Performance“ („GE Healthcare“) prieš analizuojant „PyroMark Q24“ sistema.

Prieš pradėdant atliekami veiksmai

- Prieš pradėdami palaukite, kol visi reikalingi reagentai ir tirpalai atšils iki kambario temperatūros (15–25 °C).

Procedūra

1. **Atsargiai papurtykite buteliuką su streptavidino „Sepharse High Performance“, kol tirpalas taps vientisas.**
2. **Paruoškite DNR imobilizavimo pagrindinį mišinį, kaip nurodyta 6 lentelėje. Paruoškite 10 % didesnę tūrį nei reikia visoms reakcijoms atlikti.**

6 lentelė. DNR imobilizavimo pagrindinis mišinys

Komponentas	Tūris / mėginys (µl)
Streptavidino „Sepharse High Performance“	2
„PyroMark“ susiejimo buferinis tirpalas	40
Vanduo (H ₂ O, pateikiamas)	28
Bendrasis tūris	70

3. **Pridėkite 70 µl pagrindinio mišinio į 24 šulinėlių PGR plokštelės (ar juostelių) šulinėlius, kaip iš anksto nustatyta tyrimo nustatyme (žr. „1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos nustatymas“, 14 psl.).**
4. **Į kiekvieną šulinėlį, kuriame yra pagrindinio mišinio, pridėkite 10 µl biotiniliuoto PGR produkto iš 2 protokolo, kaip iš anksto nustatyta tyrimo nustatyme (žr. „2 protokolas: PGR naudojant su „therascreen UGT1A1 Pyro Kit“ pateikiamus reagentus“, 16 psl.).**
Pridėjus pagrindinio mišinio ir PGR produkto bendras vieno šulinėlio tūris turi būti 80 µl.
5. **Užsandarinkite PGR plokštelę (ar juosteles) naudodami juostelių dangtelius.**
Užtikrinkite, kad tarp šulinėlių nebūtų nuotėkio.
6. **Plakite PGR plokštelę kambario temperatūroje (15–25 °C) 5–10 minučių 1 400 apsis./min. greičiu.**
Atlikdami šį veiksma parenkite „PyroMark Q24“ vakuuminę darbo stotį mėginio paruošimui, kaip aprašyta „PyroMark Q24“ naudotojo vadove.

7. Iš karto pereikite prie „4 protokolą: mėginių paruošimas prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema“, 21 psl.

Pastaba: „Sepharose“ rutuliukai greitai nusėda. Rutuliukų kaupimas turi vykti iš karto suplakus.

Jei suplakus plokštelę (ar juosteles) praėjo daugiau nei 1 minutę, dar kartą plakite 1 minutę ir tik tada kaupkite rutuliukus.

4 protokolas: mėginių paruošimas prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema

Šis protokolas skirtas vienos gijos DNR paruošti ir sekvenavimo pradmenims prisijungti prie matricos prieš „Pyrosequencing“ analizę „PyroMark Q24“ sistema.

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš atidarydami mėgintuvėlius su sekvenavimo pradmenimis, trumpai centrifuguokite, kad būtų surinktas turinys nuo mėgintuvėlių dugno.
- Atsižvelgdami į analizės regioną (alelio variantas *28 arba alelio variantas *6), pridėkite 2 skirtingus sekvenavimo pradmenis pagal modelį, kuris plokštelei iš anksto nustatytas tyrimo nustatyme (žr „1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos nustatymas“, 14 psl.).
- Darbų eiga šiek tiek modifikuota, palyginti su „*PyroMark Q24*“ naudotojo vadovu (18 veiksmas). Mėginius pakaitinę iki 80 °C, netrumpinkite jų ataušimo laiko.
- Reguliariai tikrinkite filtravimo zondų veikimą, kaip aprašyta „*PyroMark Q24*“ naudotojo vadove, ir, jei reikia, pakeiskite filtravimo zondus.

Prieš pradėdant atliekami veiksmai

- Vieną „PyroMark Q24“ plokštelės laikiklį, kuris bus naudojamas šiame veiksmo, uždėkite ant iki 80 °C pakaitinto kaitinimo bloko 17. Antrą „PyroMark Q24“ plokštelės laikiklį, kuris bus naudojamas 18 veiksmo, palikite kambario temperatūros (15–25 °C) aplinkoje.
- „PyroMark“ plovimo buferinis tirpalas pateikiamas kaip 10x koncentratas. Prieš naudodami pirmą kartą, į 25 ml 10x „PyroMark“ plovimo buferinį tirpalą pridėkite labai išgryninto vandens, kad bendrasis tūris būtų 250 ml ir būtų gautas 1x darbinis tirpalas.
- 1x „PyroMark“ plovimo buferinis tirpalas 2–8 °C temperatūroje yra stabilus iki nurodytos galiojimo pabaigos datos.

Procedūra

- 1. Pakankamą kiekį kiekvieno sekvenavimo pradmens (sek. pradmens UGT1A1 *28 ir sek. pradmens UGT1A1 *6) atskieskite „PyroMark“ prisijungimo buferiniu tirpalu, kaip parodyta 7 lentelėje.**

Atskiesto sekvenavimo pradmens paruoškite daugiau nei reikia bendram mėginių skaičiui sekvenuoti (mėginių skaičius + vienas papildomas).

7 lentelė. Sekvenavimo pradmenų skiedimo pavyzdys

Komponentas	Tūris / mėginys (μl)	Tūris 9 + 1 reakcijai (μl)
Sek. pradmuo UGT1A1 *28 arba sek. pradmuo UGT1A1 *6	0,8	8,0
„PyroMark“ prisijungimo buferinis tirpalas	24,2	242,0
Bendras tūris	25,0	250,0

- Į kiekvieną „PyroMark Q24“ plokštelės šulinėlį pridėkite 25 μl atskiesto sekvenavimo pradmens, kaip nurodyta tyrimo nustatyme (žr. „1 protokolas: „PyroMark Q24“ sistemos nustatymas“, 14 psl.).

Vieną „PyroMark Q24“ plokštelės laikiklį (pateikiamą su „PyroMark Q24“ vakuumine darbo stotimi) laikykite kambario temperatūroje (15–25 °C) ir naudokite kaip atramą ruošdami ir perkeldami plokštelę.

- PGR plokštelę (arba juosteles) iš 3 protokolo ir „PyroMark Q24“ plokštelę padėkite ant darbinio stalo (žr. 2 pav.).

Užtikrinkite, kad įdedant mėginius plokštelių padėtis būtų vienoda.



2 pav. PGR plokštelės (arba juostelių) ir „PyroMark Q24“ plokštelės dėjimas į vakuuminę darbo stotį.

- Įjungę vakuumo jungiklį, vakuuminiame įrankyje sukurkite vakuumą.

5. **Atsargiai nuleiskite filtravimo zondus į PGR plokštelę (arba juosteles), kad būtų sukaupti rutuliukai su imobilizuota matrica. Palaikykite zondus 15 sekundžių. Būkite atsargūs išimdami vakuuminį įrankį.**

Pastaba: „Sepharose“ rutuliukai greitai nusėda. Rutuliukų kaupimas turi vykti iš karto suplakus.

Jei suplakus plokštelę (ar juosteles) praėjo daugiau nei 1 minutė, dar kartą plakite 1 minutę ir tik tada kaupkite rutuliukus.

6. **Vakuuminį įrankį perkeltite į lovelį, kuriame yra 40 ml 70 % etanolio (2 pav.). Filtravimo zondus skalaukite 5 sekundes.**
7. **Įrankį perkeltite į lovelį, kuriame yra 40 ml denatūracijos tirpalo (2 pav.). Filtravimo zondus skalaukite 5 sekundes.**
8. **Įrankį perkeltite į lovelį, kuriame yra 50 ml plovimo buferinio tirpalo (2 pav.). Filtravimo zondus skalaukite 10 sekundes.**
9. **5 sekundėms pakelkite vakuuminį įrankį aukštyn ir atgal, daugiau nei 90° vertikaliai, kad nuo filtravimo zondų nubėgtų skystis (3 pav.).**



3 pav. Vakuuminio įrankio, pakelto daugiau nei 90° vertikaliai, iliustracija.

10. **Kol vakuuminis įrankis laikomas virš „PyroMark Q24“ plokštelės išjunkite ant įrankio esantį vakuumo jungiklį („Off“ (išjungta)).**
11. **Nuleidę filtravimo zondus į atskiestą sekvenavimo pradmenį ir lengvai judindami įrankį į šonus, išlaisvinkite rutuliukus į „PyroMark Q24“ plokštelę.**
Būkite atsargūs, kad filtravimo zondais nesubraižytumėte „PyroMark Q24“ plokštelės paviršiaus.
12. **Perkelkite vakuuminį įrankį į lovelį su labai išgrynintu vandeniu (2 pav.) ir 10 sekundžių skalaukite.**
13. **Filtravimo zondus nuplaukite panardinę juos į labai išgrynintą vandenį (2 pav.) ir naudodami vakuumą. Nuskalaukite zondus 70 ml labai išgryninto vandens.**
14. **5 sekundėms pakelkite įrankį aukštyn ir atgal, daugiau nei 90° vertikaliai, kad nuo filtravimo zondų nubėgtų skystis (3 pav.).**

15. Išjunkite ant įrankio esantį vakuumo jungiklį („Off“ (išjungta)) ir padėkite įrankį į laikymo (P) padėtį.

16. Išjunkite vakuumo siurbį.

Pastaba: darbo dienos pabaigoje skysčių atliekas ir tirpalų likučius reikia išmesti ir patikrinti, ar „PyroMark Q24“ vakuuminėje darbo stotyje nėra dulkių ir išsiliejusių skysčių (žr. „B priedas: atliekų konteinerio ir lovelių ištuštinimas“, 40 psl.).

17. „PyroMark Q24“ plokštelę su mėginiais 2 minutes pakaitinkite 80 °C temperatūroje naudodami pašildytą „PyroMark Q24“ plokštelės laikiklį.

18. Išimkite „PyroMark Q24“ plokštelę iš karšto plokštelės laikiklio ir padėkite ant antro „PyroMark Q24“ plokštelės laikiklio, kuris buvo laikomas kambario temperatūroje (15–25 °C), kad mėginiai 10–15 minučių auštų iki kambario temperatūros.

19. Pereikite prie „5 protokolą: „PyroMark Q24“ tyrimas“, 25 psl.

5 protokolą: „PyroMark Q24“ tyrimas

Šiame protokole aprašomas „PyroMark Gold Q24“ reagentų paruošimas ir įkėlimas į „PyroMark Q24“ kasetę, tyrimo „PyroMark Q24“ pradėjimas ir užbaigimas. Išsamų aprašą, kaip nustatyti tyrimą, rasite „*PyroMark Q24*“ naudotojo vadove.

Svarbi informacija prieš pradędant

- Išankstinio tyrimo informacijos ataskaitoje, kurią galima rasti meniu „Tools“ (įrankiai) tyrimo nustatymo dalyje (žr. „1 protokolą: „PyroMark Q24“ sistemos nustatymas“, 14 psl.), pateikiama informacija apie nukleotidų, fermentų ir substrato buferinio tirpalo tūrį, reikalingą konkrečiam tyrimui atlikti.

Prieš pradędant atliekami veiksmai

- Įjunkite „PyroMark Q24“. Maitinimo jungiklis yra instrumento galinėje dalyje.

Procedūra

1. Atskirai ištirpinkite sausai užšaldytų fermentų mišinį ir substrato mišinį 620 µl vandenyje (H₂O, pateikiama).

2. Sumaišykite lengvai pasūkuriuodami buteliuką. Nevartykite!

Norėdami užtikrinti, kad mišinys visiškai ištirpo, palikite jį 5–10 minučių kambario temperatūroje (15–25 °C). Prieš užpildydami „PyroMark Q24“ kasetę, įsitinkite, kad tirpalas nesudrumstas. Jei reagentai nebus naudojami iš karto, laikykite juos sausame lede* arba šaldytuve.

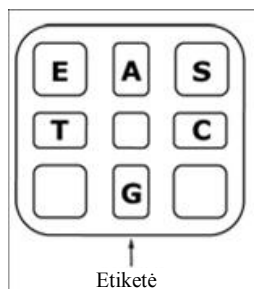
3. Palaukite, kol reagentai ir „PyroMark Q24“ kasetė atšils iki kambario temperatūros (20–25 °C).

4. „PyroMark Q24“ kasetę įdėkite taip, kad etiketė būtų nukreipta į jus.

5. Įkelkite į „PyroMark Q24“ kasetę atitinkamą nukleotidų, fermentų ir substrato mišinio tūrį, kaip nurodyta 4 pav.

Užtikrinkite, kad į kasetę iš pipetės nepatektų oro burbuliukų.

* Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinę pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose Safety Data Sheets (saugos duomenų lapuose) (SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.



4 pav. „PyroMark Q24“ kasetės iliustracija, vaizdas iš viršaus. Komentarai atitinka reagentų buteliukų etiketes. Pridėkite fermentų mišinio (**E**), substrato mišinio (**S**) ir nukleotidų (**A**, **T**, **C**, **G**) pagal tūrio informaciją, pateiktą išankstinio tyrimo informacijos ataskaitoje, kurią galima rasti meniu „Tools“ (įrankiai) tyrimo nustatymo dalyje.

- 6. Atidarykite kasetės sklendę ir įdėkite užpildytą reagentų kasetę, kad etiketė būtų nukreipta į išorę. Visiškai įstūmę kasetę, stumkite ją žemyn.**
- 7. Įsitikinkite, kad kasetės priekyje matyti linija, ir uždarykite sklendę.**
- 8. Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir padėkite plokštelę ant kaitinimo bloko.**
- 9. Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.**
- 10. Įterpkite USB atmintinę (su tyrimo failu) į instrumento priekyje esančią USB jungtį.**
Neištraukite USB atmintinės, kol nesibaigs tyrimas.
- 11. Pagrindiniame meniu pasirinkite „Run“ (tyrimas) (naudodami ▲ ir ▼ ekrano mygtukus) ir paspauskite „OK“ (gerai).**
- 12. Naudodami ▲ ir ▼ ekrano mygtukus pasirinkite tyrimo failą.**
Norėdami peržiūrėti aplanko turinį, pasirinkite aplanką ir paspauskite „Select“ (pasirinkti). Norėdami grįžti į ankstesnį rodinį, paspauskite „Back“ (atgal).
- 13. Pasirinkę tyrimo failą, paspauskite „Select“ (pasirinkti), kad būtų pradėtas tyrimas.**
- 14. Kai tyrimas bus baigtas ir instrumentas patvirtins, kad tyrimo failas išsaugotas USB atmintinėje, paspauskite „Close“ (uždaryti).**
- 15. Ištraukite USB atmintinę.**
- 16. Atidarykite instrumento dangtį.**
- 17. Atidarykite kasetės sklendę ir keldami į viršų reagentų kasetę ją ištraukite.**
- 18. Uždarykite sklendę.**
- 19. Atidarykite plokštelę laikantį rėmą ir išimkite plokštelę iš kaitinimo bloko.**
- 20. Uždarykite plokštelę laikantį rėmą ir instrumento dangtį.**
- 21. Išmeskite plokštelę ir išvalykite kasetę, kaip nurodyta su kasete pateikiamoje produkto instrukcijoje.**
- 22. Išanalizuokite tyrimą, kaip nurodyta „6 protokolais: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė“, 27 psl.**

6 protokolai: „PyroMark Q24“ tyrimo analizė

Šiame protokole aprašoma užbaigto „therascreen“ UGT1A1 tyrimo genotipavimo analizė naudojant „PyroMark Q24“ programinę įrangą.

Procedūra

1. Įterpkite USB atmintinę (su apdorotu tyrimo failu) į kompiuterio USB jungtį.
2. Naudodami „Windows Explorer“ perkeltite tyrimo failą iš USB atmintinės į norimą vietą kompiuteryje.
3. Meniu „File“ (failas) pasirinkę „Open“ (atidaryti) arba dukart spustelėję failą (☑) nuorodų naršyklėje, atidarykite tyrimo failą „PyroMark Q24“ programinės įrangos AQ režimu.
4. Norėdami analizuoti tyrimą ir gauti rezultatų apžvalgą, spustelėkite vieną iš analizavimo mygtukų.



Analizuoti visus šulinėlius.



Analizuoti pasirinktą šulinėlį.

Daugiau informacijos, kaip analizuoti tyrimą, rasite „PyroMark Q24“ naudotojo vadove.

5. Norėdami sugeneruoti ataskaitą, meniu „Reports“ (ataskaitos) pasirinkite „SNP Full Report“ (išsami SNP ataskaita) arba „SNP Overview Report“ (SNP apžvalginė ataskaita).

Pastaba: kad būtų gauti patikimi rezultatai, rekomenduojame naudoti atskiras viršūnes virš 30 RLU. Analizės nustatyme „required peak height for passed quality“ (būtinasis viršūnės aukštis, kad būtų tinkama kokybė) nustatykite 30 RLU (žr. „A priedas: „therascreen UGT1A1 Pyro“ tyrimo nustatymas“, 38 psl., ir „PyroMark Q24“ naudotojo vadovą).

Pastaba: „Pyrogram®“ kreivė visada turi būti lyginama su histograma, kurią galima peržiūrėti dešiniuoju pelės mygtuku spustelėjus lange „Pyrogram“. Išmatuotos viršūnės turi atitikti histogramos stulpelių aukštį.

Rezultatų aiškinimas

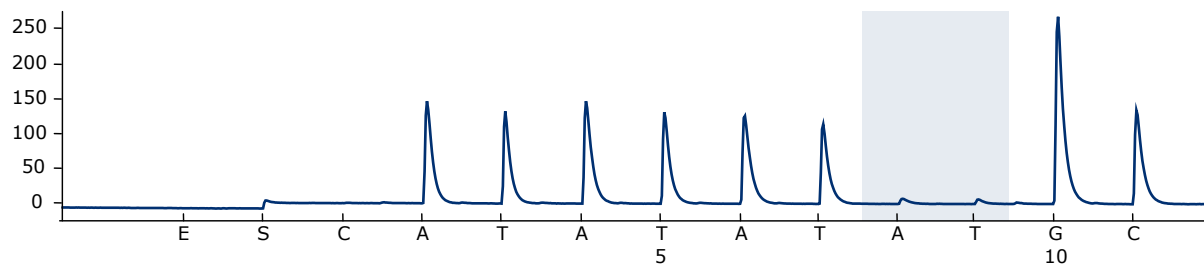
Pridėtą žmogaus kontrolinę DNR galima naudoti norint palyginti rezultatus. Ši kontrolinė DNR turi homozigotinius TA6/TA6 ir G/G genotipus, kai atitinkamai analizuojami alelio variantai *28 ir *6.

„PyroMark Q24“ programinė įranga automatiškai atlieka genotipavimo analizę ir pateikia „SNP Full Report“ (SNP išsamią ataskaitą) ir „SNP Overview Report“ (SNP apžvalginę ataskaitą).

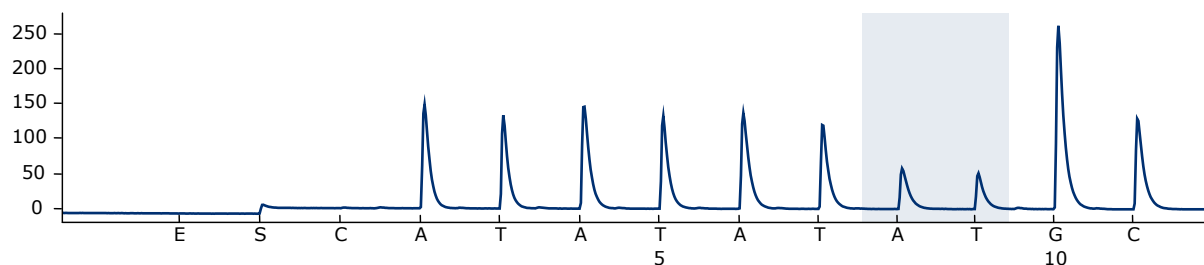
Pastaba: SNP ataskaitose sugeneruotas kokybės įvertinimas ir įspėjimai yra svarbūs genotipavimo analizei. Kitų „PyroMark Q24“ programinės įrangos režimu AQ sugeneruotų kokybės įvertinimų ir įspėjimų galima nepaisyti.

Tipiniai rezultatai

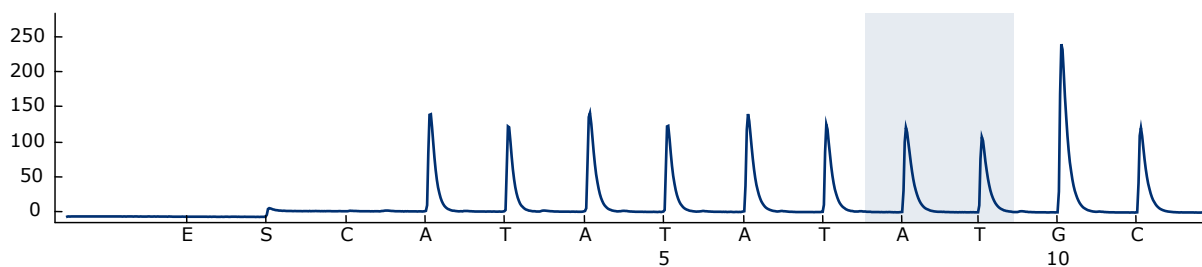
Tipiniai „Pyrogram“ rezultatai pateikiami 5–10 pav.



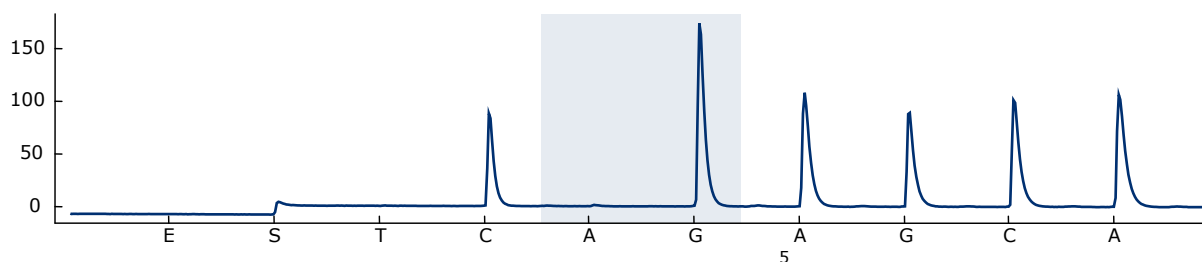
5 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su –/– (TA6/TA6) genotipu, kai analizuojamas alelio variantas *28.



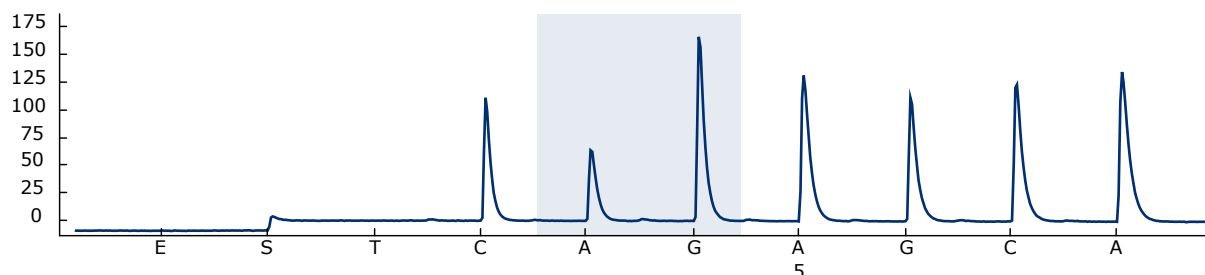
6 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su –/TA (TA6/TA7) genotipu, kai analizuojamas alelio variantas *28.



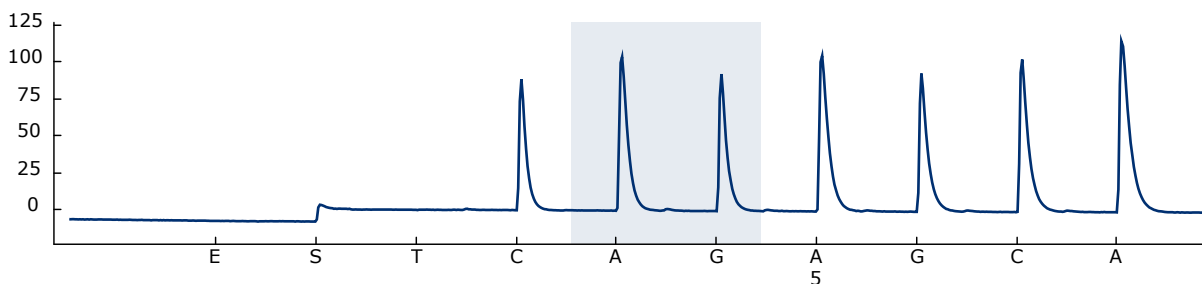
7 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginį su TA/TA (TA7/TA7) genotipu, kai analizuojamas alelio variantas *28.



8 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginius su G/G genotipu, kai analizuojamas alelio variantas *6.



9 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginius su G/A genotipu, kai analizuojamas alelio variantas *6.



10 pav. „Pyrogram“ kreivė, gauta išanalizavus mėginius su A/A genotipu, kai analizuojamas alelio variantas *6.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti sprendžiant iškilusias problemas. Daugiau informacijos rasite mūsų Techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Frequently Asked Questions“ (dažniausiai užduodami klausimai) adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninių tarnybų mokslininkai visada mielai atsako į klausimus apie šiame vadove pateiktą informaciją ir protokolus arba apie mėginių ir tyrimų technologijas (kontaktinė informacija pateikta viršelyje ir svetainėje adresu www.qiagen.com).

Pastaba: bendrus instrumento trikčių šalinimo būdus rasite „PyroMark Q24“ naudotojo vadove.

Pastabos ir pasiūlymai

Signalai kontrolėje be matricos (neigiamoje kontrolėje)

- a) Signalas iš kitų šulinėlių Signalas iš vieno šulinėlio aptinkamas gretimame šulinėlyje. Stenkitės nedėti mėginių su intensyviu signalu šalia šulinėlių, kuriuose yra kontrolė be matricos.

- b) PGR užterštumas Naudokite sterilius pipečių antgalius su filtrais. Medžiagas, pvz., mėginius, kontroles ir amplifikacijos produktus, laikykite ir ekstrahuokite atskirai nuo PGR reagentų.

Bloga arba nenumatyta seka

- Prastos kokybės genominė DNR Dėl prastos kokybės genominės DNR gali nepavykti PGR. PGR mėginius analizuokite naudodami elektroforetinius metodus (pvz., „QIAxcel[®]“ sistemą ar agarozės gelio elektroforezę).

Pastabos ir pasiūlymai

SNP ataskaitos rezultatas „Check“ (patikrinkite) arba „Failed“ (nepavyko)

- a) Įspėjimas „Uncertain / Failed due to low peak height“ (neaišku / nepavyko dėl per mažos viršūnės)
- Mažos viršūnės gali būti dėl PGR nustatymo klaidų apdorojimo arba mėginių ruošimo prieš „Pyrosequencing“.
- Svarbu, kad vakuuminiu įrankiu mėginiai būtų visiškai surinkti. Vakuuminį įrankį stenkitės lėtai nuleisti į mėginius ir pasirūpinkite, kad imobilizavimo PGR plokštelės ar juostelių geometrinė forma leistų visiškai surinkti mėginius. Reguliariai tikrinkite filtravimo zondų veikimą, kaip aprašyta „PyroMark Q24“ naudotojo vadove, ir, jei reikia, pakeiskite filtravimo zondus.
- Jei yra įspėjimas „Check“ (patikrinkite) kokybės įvertinimą, atidžiai palyginkite „Pyrogram“ kreivę su histograma, kurią galima peržiūrėti dešiniuoju pelės mygtuku spustelėjus lange „Pyrogram“. Jei išmatuotos viršūnės atitinka histogramos stulpelių aukštį, rezultatas yra tinkamas. Kitu atveju rekomenduojama pakartotinai ištirti mėginį.
- b) Įspėjimas „Uncertain / Failed genotype determination“ (neaišku / nepavyko nustatyti genotipo)
- Jei yra įspėjimas „Check“ (patikrinkite) kokybės įvertinimą, atidžiai palyginkite „Pyrogram“ kreivę su histograma, kurią galima peržiūrėti dešiniuoju pelės mygtuku spustelėjus lange „Pyrogram“. Jei išmatuotos viršūnės atitinka histogramos stulpelių aukštį, rezultatas yra tinkamas. Kitu atveju rekomenduojama pakartotinai ištirti mėginį.
- Atliekant UGT1A1 *28 tyrimą, įspėjimo priežastis gali būti polimerazės nuslydimas ant TA pasikartojimų, tai daugiau gali būti pastebima naudojant FFPE auglio mėginius. Įsitikinkite, kad kaip matrica naudojama aukštos kokybės DNR (pvz., išskirta iš kraujo mėginių) arba padidinkite DNR matricos kiekį.
- c) Nenumatyti reti alelių variantai
- Įspėjimus „Check“ (patikrinkite) arba „Failed“ (nepavyko) kokybės įvertinimas gali sukelti nenumatytas viršūnių modelis. Tai gali rodyti nenumatytą alelio variantą, neišanalizuotą pagal pateiktą „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką). Šiuos mėginius reikia išanalizuoti naudojant alternatyvią „Sequence to Analyze“ (analizuotiną seką), atsižvelgiant į nenumatytus alelių variantus.

Pastabos ir pasiūlymai

- d) Didelio viršūnės aukščio nuokrypio įspėjimas ties paskirstymu x „Pyrogram“ kreivė turi būti atidžiai palyginta su histograma, kurią galima peržiūrėti dešiniuoju pelės mygtuku spustelėjus lange „Pyrogram“. Jei išmatuotos viršūnės neatitinka histogramos stulpelių aukščio ir to negalima paaiškinti retais alelių variantais, rekomenduojama pakartotinai iširti mėginį.

Didelis fonas

- a) Netinkamai laikomi nukleotidai Nukleotidus laikykite 2–8 °C temperatūroje. Laikant nuo –10 iki –25 °C gali padidėti fonas.
- b) Trumpas mėginių aušinimo laikas prieš „Pyrosequencing“ analizę Mėginius „PyroMark Q24“ plokštelės laikiklyje 10–15 minučių laikykite kambario temperatūroje. Netrumpinkite aušinimo laiko.
- c) Užteršta kasetė Kruopščiai išvalykite kasetę, kaip aprašyta produkto instrukcijoje. Kasetę laikykite vietoje, apsaugotoje nuo šviesos ir dulkių.

Nėra teigiamų kontrolių signalų

- a) Fermentų ir substrato mišinio nepakanka visiems šulinėliams Įsitikinkite, kad „PyroMark Q24“ kasetė pripildyta, kaip nurodyta meniu „Tools“ (įrankiai) dalyje „Pre Run Information“ (išankstinio tyrimo informacija).
- b) Reagentai laikomi arba atskiesti netinkamai „*therascreen*“ reagentus paruoškite, kaip nurodyta instrukcijose, pateiktose „5 protokolas: „PyroMark Q24“ tyrimas“, 25 psl.
- c) PGR ar mėginių paruošimo klaida Signalas gali nebūti dėl PGR nustatymo klaidų apdorojimo, PGR ciklo prietaiso programavimo ar mėginių ruošimo prieš „Pyrosequencing“. Reguliariai tikrinkite filtravimo zondų veikimą, kaip aprašyta „*PyroMark Q24*“ naudotojo vadove, ir, jei reikia, pakeiskite filtravimo zondus. Pakartokite PGR ir „Pyrosequencing“ analizę.

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „therascreen UGT1A1 Pyro Kit“ partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę.

Apribojimai

Visi sugeneruoti diagnostikos rezultatai turi būti aiškinami kartu su kitais klinikiniais ar laboratoriniais rezultatais.

Naudotojas atsako už sistemos efektyvumo tikrinimą, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima QIAGEN efektyvumo tyrimai.

Efektyvumo charakteristikos

Tikslumas

Naudojant tikslumo duomenis galima nustatyti bendrą tyrimo kintamumą *28 ir *6 alelių variantų teisingo genotipavimo atžvilgiu. Alelių variantų turinčios plazmidės buvo sumaišytos proporcijomis (0, 50, 100 %), atspindinčiomis homozigotinius ir heterozigotinius genotipus (*28 TA6/TA6, TA6/TA7 ir TA7/TA7; *6 G/G, G/A ir A/A). Kiekvienas mišinys išanalizuotas atlikus septynis „Pyrosequencing“ tyrimus naudojant tris pakartojimus, kiekvieną tiriant naudojant įvairias „therascreen UGT1A1 Pyro Kit“ partijas, „PyroMark Q24“ instrumentus, operatorius, skirtingomis dienomis ir skirtingose laboratorijose.

Tikslumas yra išreikštas kaip teisingų rezultatų koeficientas (t. y. išanalizuotų mėginių santykis su teisingais genotipavimo rezultatais). *28 ir *6 alelių variantų genotipavimo analizės tyrimai, atitinkamai išvardyti 8 ir 9 lentelėse, pateikė 100 % išanalizuotų mėginių teisingų rezultatų koeficientą.

8 lentelė. *28 alelio variantų genotipavimo tikslumas

Genotipas*	Mėginių skaičius	Teisingas rezultatas
Homozigotinis TA6/TA6	21	21
Heterozigotinis TA6/TA7	21	21
Homozigotinis TA7/TA7	20	20

* Pateikta 0, 50 ir 100 % plazmidžių mišiniais remiantis OD₂₆₀ matavimu.

9 lentelė. *6 alelio variantų genotipavimo tikslumas

Genotipas*	Mėginių skaičius	Teisingas rezultatas
Homozigotinis G/G	21	21
Heterozigotinis G/A	21	21
Homozigotinis A/A	21	21

* Pateikta 0, 50 ir 100 % plazmidžių mišiniais remiantis OD₂₆₀ matavimu.

Diagnostinis įvertinimas

„*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ buvo įvertintas lyginant su Sangerio sekvenavimu. DNR buvo ekstrahuota iš 100 formalinu fiksuotų parafine esančių (FFPE) auglio mėginių ir išanalizuota dėl *28 ir *6 alelių variantų.

DNR buvo išskirta naudojant „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“. „PyroMark Q24“ instrumentu, naudojant „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“, buvo atlikta „Pyrosequencing“ analizė, o naudojant „ABI™ 3130 Genetic“ analizatorių – Sangerio sekvenavimas.

Iš 100 mėginių, išanalizuotų naudojant Sangerio sekvenavimą, genotipą pavyko nustatyti 95 ir 99 mėginiuose, atitinkamai tiriant dėl *28 ir *6 alelių variantų. Naudojant „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“, genotipą pavyko nustatyti 98 ir 99 mėginių atitinkamai tiriant dėl *28 ir *6 alelių variantų.

Abu metodai parodė, kad 29, 49 ir 12 mėginių atitinkamai turėjo TA6/TA6, TA6/TA7 ir TA7/TA7 genotipą. Naudojant „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“, keturi papildomi mėginiai parodė TA6/TA6 genotipą, o naudojant Sangerio sekvenavimą aptiktas TA6/TA7 genotipas (10 lentelė).

Atmetus mėginius, kurių nepavyko išanalizuoti naudojant abu metodus, „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ ir Sangerio sekvenavimo metodo rezultatai genotipuojant *28 alelio variantus atitiko 96 % (10 lentelė).

10 lentelė. *28 alelio variantų genotipavimo rezultatai, tiriant iš Kaukazo regiono gautus mėginius

		Sangerio sekvenavimas				Iš viso
		TA6/ TA6	TA6/ TA7	TA7/ TA7	Nežinoma	
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit	TA6/TA6	29	4	0	2	35
	TA6/TA7	0	49	0	2	51
	TA7/TA7	0	0	12	0	12
	Nežinoma	0	1	0	1	2
	Iš viso	29	54	12	5	100

*6 alelio variantus tiriant tiek Sangerio sekvenavimo metodu, tiek „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“, visi mėginiai parodė homozigotinį G/G genotipą. Šis rezultatas atitinka šiuolaikines žinias, kad A/G ir A/A genotipų Kaukazo populiacijose beveik nėra. Todėl DNR iš papildomų 26 iš azijiečių surinktų burnos ertmės tepinėlių mėginių buvo išskirta naudojant „QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit on the QIAcube®“ ir išanalizuota tiriant *6 alelių variantus.

Penkiolika, devyni ir du mėginiai, ištirti naudojant abu metodus, atitinkamai turėjo G/G, G/A ir A/A genotipą (11 lentelė).

Atmetus mėginius, kurių nepavyko išanalizuoti naudojant abu metodus, „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ ir Sangerio sekvenavimo metodo rezultatai genotipuojant *6 alelio variantus atitiko 100 % (11 lentelė).

11 lentelė. *6 alelio variantų genotipavimo rezultatai, tiriant iš Azijos regiono gautus mėginius

		Sangerio sekvenavimas				Iš viso
		G/G	G/A	A/A	Nežinoma	
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit	G/G	15	0	0	0	15
	G/A	0	9	0	0	9
	A/A	0	0	2	0	2
	Nežinoma	0	0	0	0	0
	Iš viso	15	9	2	0	26






Pastaba: atliekant visus efektyvumo charakteristikų nustatymo tyrimus, signalas buvo virš 30 RLU, įprastai gautas iš 10 ng DNR, išskirtos iš kraujo arba formaline fiksuoto ir parafine esančio audinio.

Literatūra

QIAGEN palaiko didelę, atnaujinamą internetinę mokslinių publikacijų apie QIAGEN produktų utilizavimą duomenų bazę. Naudojant išsamios paieškos parinktį galima rasti reikiamus straipsnius, ieškant tiesiog pagal raktinį žodį arba nurodant pritaikymo sritį, mokslinių tyrimų sritį, pavadinimą ir kt.

Norėdami pamatyti visą literatūros sąrašą, apsilankykite internetinėje QIAGEN literatūros duomenų bazėje adresu www.qiagen.com/RefDB/search.asp arba kreipkitės į QIAGEN technines tarnybas ar vietinį platintoją.

Simboliai

 Σ	Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis $\langle N \rangle$ testams atlikti
	Tinka iki
IVD	„In vitro“ diagnostikos medicinos prietaisas
REF	Katalogo numeris
LOT	Serijos numeris
MAT	Medžiagos numeris
COMP	Komponentai
CONT	Sudėtyje yra
NUM	Numeris
NaOH	Natrio hidroksidas
GTIN	Visuotinis prekinio vieneto numeris
	Temperatūros apribojimai
	Gamintojas
	Skaitykite naudojimo instrukcijas

Kontaktinė informacija



Prireikus techninės pagalbos ar papildomos informacijos, apsilankykite mūsų Techninės pagalbos centre adresu www.qiagen.com/Support arba skambinkite vienam iš mūsų QIAGEN Techninio aptarnavimo skyrių ar vietinių platintojų (žr. viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

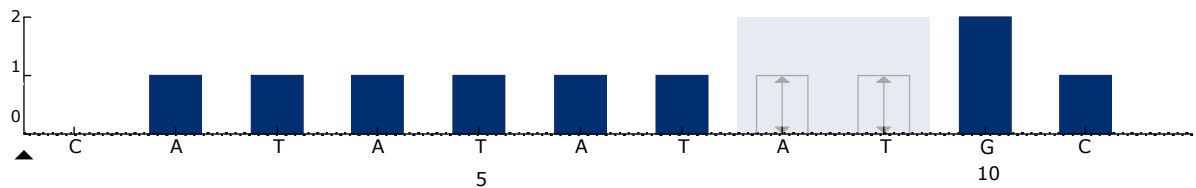
A priedas: „*therascreen* UGT1A1 Pyro“ tyrimo nustatymas

Prieš pirmą kartą atliekant „*therascreen* UGT1A1“ tyrimą, reikia nustatyti analizės failą. Nustatykite UGT1A1 alelio variantų tyrimą naudodami „PyroMark Q24“ programinę įrangą, kaip aprašyta toliau.

Procedūra



UGT1A1 *28

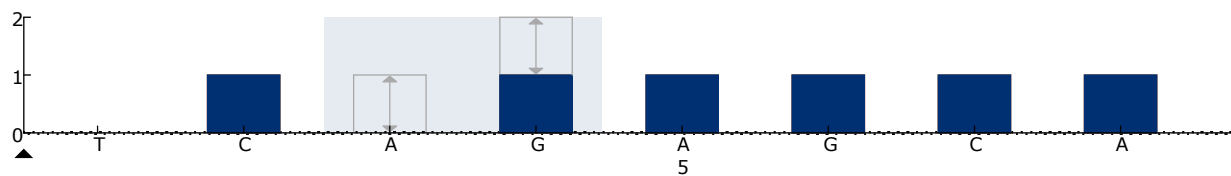
1. Įrankių juostoje spustelėkite  ir pasirinkite „New AQ Assay“ (naujas AQ tyrimas).
2. Lauke „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka) įrašykite:
ATATAT[AT]GGCA
3. Ranka įveskite šią „Dispensation Order“ (paskirstymo tvarką):
CATATATGC
4. Spustelėkite skirtuką „Analysis Parameters“ (analizės parametrai) ir padidinkite „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:“ (viršūnės aukščio riba – būtinas viršūnės auštis, kad būtų tinkama kokybė:) iki 30.
5. Įrankių juostoje spustelėkite  ir išsaugokite tyrimą kaip **UGT1A1 *28**.



11 pav. UGT1A1 alelio varianto *28 genotipavimo histograma.


UGT1A1 *6

1. Įrankių juostoje spustelėkite  ir pasirinkite „New AQ Assay“ (naujas AQ tyrimas).
2. Lauke „Sequence to Analyze“ (analizuotina seka) įrašykite:
CRGAGCAT
3. Ranka įveskite šią „Dispensation Order“ (paskirstymo tvarką):
TCAGAGCA
4. Spustelėkite skirtuką „Analysis Parameters“ (analizės parametrai) ir padidinkite „Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:“ (viršūnės aukščio riba – būtinas viršūnės auštis, kad būtų tinkama kokybė:) iki 30.
5. Įrankių juostoje spustelėkite  ir išsaugokite tyrimą kaip **UGT1A1 *6**.



12 pav. UGT1A1 alelio varianto *6 genotipavimo histograma.

B priedas: atliekų konteinerio ir lovelių ištuštinimas

ĮSPĖJIMAS 	Pavojingi chemikalai <p>Denatūracijos tirpale, naudojamame vakuuminėje darbinėje stotyje, yra natrio hidroksido, kuris dirgina akis ir odą.</p> <p>Visada mėvėkite apsaugines pirštines, dėvėkite apsauginius akinius ir laboratorinį apsiaustą.</p> <p>Atsakingas asmuo (pvz., laboratorijos vadovas) turi imtis būtinų atsargumo priemonių, kad užtikrintų darbo vietos saugą ir apsaugotų instrumento operatorius nuo toksinių medžiagų pavojingų lygių poveikio, kaip nurodyta taikomuose medžiagos saugos duomenų lapuose (SDS) arba OSHA*, ACGIH† ar COSHH‡ dokumentuose.</p> <p>Garų vėdinimas ir atliekų išmetimas turi būti atliekami atsižvelgiant į vietinius ir šalies sveikatos ir saugos reikalavimus ir teisės aktus.</p>
---	--

* OSHA: Profesinės saugos ir sveikatos administracija (Jungtinės Amerikos Valstijos)

† ACGIH: Amerikos vyriausybinių pramonės higienistų konferencija (Jungtinės Amerikos Valstijos)

‡ COSHH: Pavojingų sveikatai medžiagų kontrolė (Jungtinė Karalystė)

Užtikrinkite, kad būtų laikomasi šalies ir vietinių laboratorijos atliekų išmetimo aplinkos apsaugos reikalavimų.

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Šiam protokolui reikalingas labai išgrynintas vanduo.

Procedūra

- B1. Įsitinkite, kad vakuoliniame įrankyje nėra vakuumo. Įsitinkite, kad išjungtas („Off“) vakuumo jungiklis ir išjungtas vakuomo siurblys.**
- B2. Pašalinkite visą loveliuose likusį skystį.**
- B3. Išskalaukite lovelius labai išgrynintu vandeniu arba, jei reikia, juos pakeiskite.**
- B4. Ištuštinkite atliekų konteinerį.**
Dangtelį galima nuimti neatjungus vamzdelių.
- B5. Jei reikia išvalyti vakuuminę darbo stotį (pvz., susikaupus dulkelms ar išsiliejus skysčių), vykdykite „PyroMark Q24“ naudotojo vadove pateiktus nurodymus.**

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit (24)	24 reakcijoms „PyroMark Q24“ sistemomis: sekvenavimo pradmenys, PGR pradmenys, žmogaus kontrolinė DNR, „PyroMark“ PGR pagrindinis mišinys, „CoralLoad“ koncentratas, „PyroMark“ susiejimo buferinis tirpalas, „PyroMark“ prisijungimo buferinis tirpalas, „PyroMark“ denatūracijos tirpalas, „PyroMark“ plovimo buferinis tirpalas, fermentų mišinys, substrato mišinys, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP ir H ₂ O	971540
Priedai		
PyroMark Q24 Plate (100)	24 šulinėlių sekvenavimo reakcijos plokštelė	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Nukleotidų ir reagentų paskirstymo kasetės	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	„PyroMark“ vakuuminės darbo stoties Q96 ir Q24 daugkartiniai filtravimo zondai	979010
PyroMark Control Oligo	Skirta sistemos diegimo patikrai	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Skirta sistemos efektyvumui tikrinti	979304
Susiję produktai		
PyroMark Q24 MDx	24 mėginių lygiagrečiai atliekamos „Pyrosequencing“ analizės seka pagrįsta aptikimo platforma	9001513
PyroMark Q24	24 mėginių lygiagrečiai atliekamos „Pyrosequencing“ analizės seka pagrįsta aptikimo platforma	9001514

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuuminė darbo stotis (220 V), lygiagrečiai paruošianti 24 mėginius nuo PGR produkto iki vienos gijos matricos	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Vakuuminė darbo stotis (220 V), lygiagrečiai paruošianti 24 mėginius nuo PGR produkto iki vienos gijos matricos	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Taikomoji programinė įranga	9019063
PyroMark Q24 Software	Analizės programinė įranga	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR paruoš.: 50 „QIAamp MinElute®“ cilindry, proteinazė K, buferiniai tirpalai, surinkimo mėgintuvėliai (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	48 paruoš.: reagentų kasetės (audinys), vienkartiniai filtrų antgaliai, išmetami antgalių laikikliai, mėginių mėgintuvėliai (2 ml), išplovimo mėgintuvėliai (1,5 ml), buferinis tirpalas G2, proteinazė K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	50 paruoš.: „QIAamp“ sukimo minicilindrai, buferiniai tirpalai, reagentai, mėgintuvėliai, „VacConnector“ jungtys	61104

* Tik JK

† Likusiose pasaulio šalyse

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų produktų garantinių įsipareigojimų atsisakymai pateikti atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove arba naudotojo vadove. QIAGEN rinkinio vadovai arba naudotojo vadovai pateikti adresu www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninių tarnybų ar vietinio platintojo.

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

Ribotoji licencinė sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ pirkėjo ar naudotojo sutikimą su šiomis sąlygomis:

1. „*therascreen* UGT1A1 Pyro Kit“ galima naudoti tik vadovaujantis „*therascreen UGT1A1 Pyro*“ vadovu ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio rinkinio komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus „*therascreen UGT1A1 Pyro Kit*“ vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose www.qiagen.com.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Naujausios licencijos sąlygos pateiktos adresu www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, visos teisės saugomos.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

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

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

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

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

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

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

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

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

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

