

# Instrukcja Zestawu *therascreen*<sup>®</sup> MGMT Pyro<sup>®</sup>



Wersja 1

**IVD**

Do użytku diagnostycznego in vitro



**REF**

971061



1061267EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R4

**MAT**

1061267EN



# Technologie Badań i Analiz Firmy QIAGEN

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

## **QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:**

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

Naszą misją jest umożliwienie Wam osiągnięcia znakomitych i przełomowych wyników w prowadzonych badaniach. Więcej informacji można znaleźć na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Spis Treści

<b>Przeznaczenie Zestawu</b>	5
<b>Streszczenie i Wyjaśnienia</b>	6
<b>Zasada Procedury</b>	7
Kontrole	7
<b>Materiały Dostarczone</b>	8
Zawartość zestawu	8
<b>Materiały Wymagane, ale Niedostarczone</b>	9
Zalecane wytrząsarki płytek	10
<b>Ostrzeżenia i Uwagi</b>	10
Informacje bezpieczeństwa	10
Uwagi ogólne	11
<b>Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami</b>	12
<b>Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami</b>	12
<b>Procedura</b>	13
Izolacja DNA i konwersja wodorosiarczynem	13
Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24	14
Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie <i>therascreen</i> MGMT Pyro	16
Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)	19
Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24	21
Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24	25
Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24	27
<b>Interpretacja Wyników</b>	28
Rozwiązywanie problemów	30
<b>Kontrola Jakości</b>	32
<b>Ograniczenia</b>	32
<b>Charakterystyka Wydajności</b>	33
Limit dla próby ślepej (LOB)	33
Liniowość	33

Precyzja	35
Ocena diagnostyczna	37
<b>Literatura</b>	<b>40</b>
<b>Symbole</b>	<b>41</b>
<b>Informacje Kontaktowe</b>	<b>41</b>
<b>Dodatek A: Przygotowanie reakcji MGMT</b>	<b>42</b>
<b>Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory</b>	<b>43</b>
<b>Informacje Dotyczące Zamawiania</b>	<b>44</b>

## Przeznaczenie Zestawu

Zestaw *therascreen* MGMT Pyro jest testem *in vitro* opartym na detekcji sekwencji kwasów nukleinowych i wykorzystującym technologię pirosekwencjonowania<sup>®</sup> do ilościowej detekcji statusu metylacji eksonu 1 ludzkiego genu MGMT w DNA genomowym pozyskanym z tkanek ludzkich.

Zestaw *therascreen* MGMT Pyro ma na celu, w połączeniu z innymi czynnikami prognostycznymi, dostarczenie klinicystom informacji pomocnych w postępowaniu z pacjentami nowotworowymi, którzy mogą odnieść korzyść ze stosowania chemioterapii. Do użytku diagnostycznego *in vitro*.

Wyłącznie do użytku na systemie PyroMark<sup>®</sup> Q24. Systemy PyroMark Q24 zawierają:

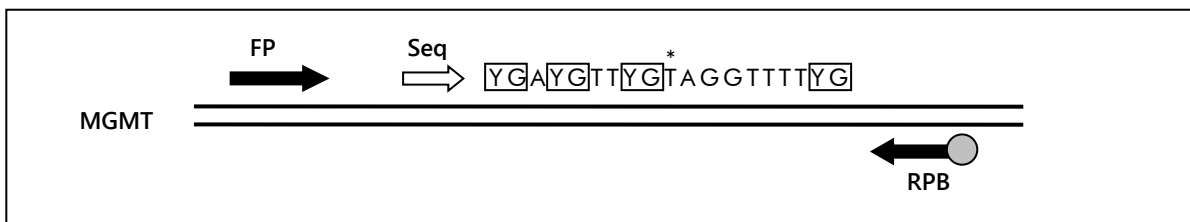
- Urządzenie PyroMark Q24 oraz PyroMark Q24 MDx.
- Stacja próżniowa (Vacuum Workstation) PyroMark Q24 oraz PyroMark Q24 MDx.
- Oprogramowanie PyroMark Q24 (wersja 2.0) oraz PyroMark Q24 MDx (wersja 2.0).

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

## Streszczenie i Wyjaśnienia

Zestaw *therascreen* MGMT Pyro służy do ilościowej oceny metylacji w czterech pozycjach CpG (CpG sites) w eksonie 1 ludzkiego genu MGMT (sekwencja genomowa na chromosomie 10 od 131.265.519 do 131.265.537: CGACGCCCGCAGGTCCTCG). Genomowe DNA po konwersji wodorosiarczynem (bisulfite converted genomic DNA) zostaje amplifikowane przy pomocy PCR, a następnie sekwencjonowane w zdefiniowanym obszarze w orientacji do przodu (forward; Rysunek 1). Sekwencje otaczające zdefiniowany obszar służą jako sygnały (piki) referencyjne i normalizacyjne do oceny jakościowej i ilościowej analizy.

Produkt składa się z mieszaniny starterów PCR oraz startera sekwencyjnego, dwie probówki każdego. Startery są dostarczane jako roztwór, gdzie każda probówka zawiera 24 µl każdego ze starterów lub mieszaniny starterów. Zestaw zawiera startery i odczynniki potrzebne do amplifikacji genów, a ponadto bufony, startery i odczynniki do ilościowej detekcji metylacji w czasie rzeczywistym przy wykorzystaniu technologii pirosekwencjonowania na systemie PyroMark Q24.



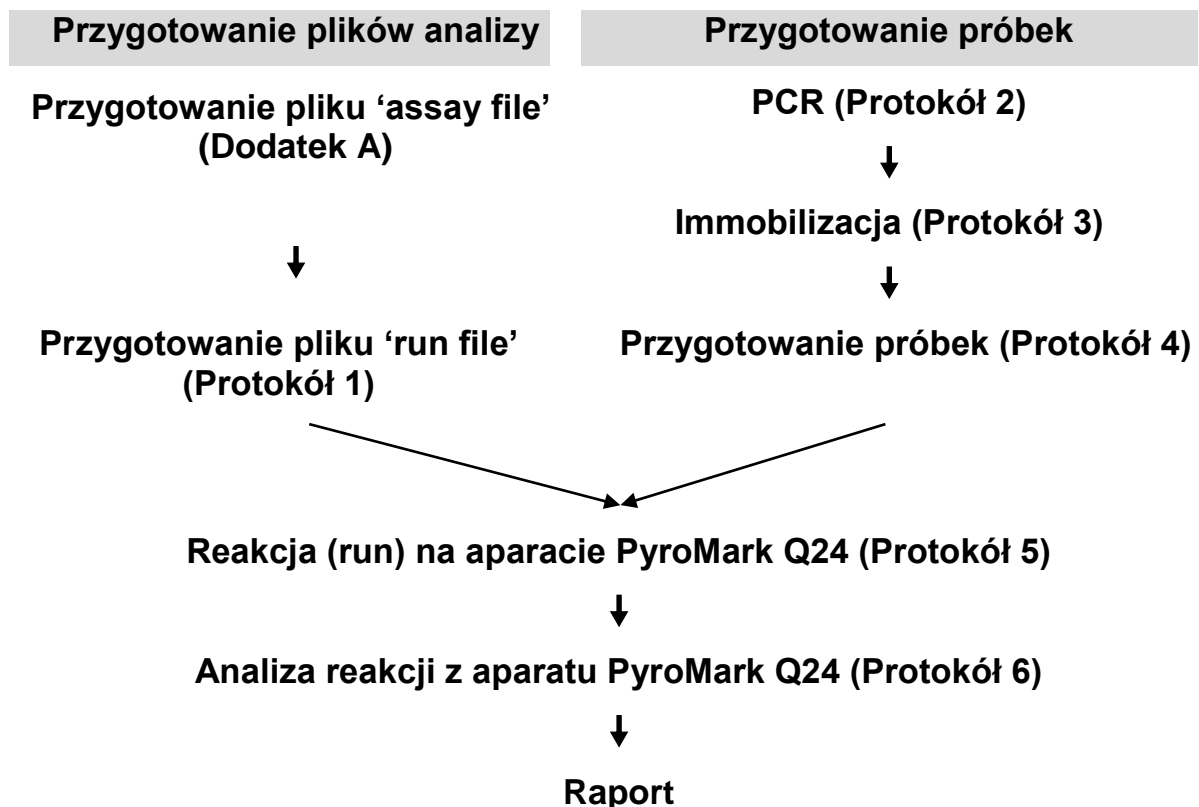
**Rysunek 1. Schemat analizy dla MGMT.** Pokazana sekwencja jest sekwencją analizowaną po konwersji wodorosiarczynem. Y oznacza miejsca potencjalnie metylowane, a ramki oznaczają analizowane pozycje CpG. Gwiazdka wskazuje miejsce kontroli konwersji wodorosiarczynem. **FP**: Startery przednie (forward) PCR; **RPB**: Startery wsteczne (reverse) PCR (B oznacza biotynylację); **Seq**: Startery sekwencyjne.

## Zasada Procedury

Poniższy schemat ilustruje przebieg procedury. Po reakcji PCR z użyciem starterów dla zdefiniowanego regionu eksonu 1, amplikony zostają immobilizowane na kulkach sefarozy opłaszczonych streptawidyną (Streptavidin Sepharose® High Performance beads). Przygotowane zostaje jednoniciowe DNA, do którego przyłączają się odpowiednie startery sekwencyjne. Następnie próbki zostają sekwencjonowane na aparacie PyroMark Q24 przy pomocy zaprogramowanych wcześniej protokołów ('assay setup files' oraz 'run file').

**Uwaga:** Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24* (patrz 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 21).

### Zarys procedury *therascreen* MGMT Pyro



## Kontrole

Metylowane DNA kontrolne będące częścią zestawu służy jako kontrola pozytywna reakcji PCR i sekwencjonowania. To DNA kontrolne jest wysoce metylowane i poddane konwersji wodorosiarczynem. Dla celów porównawczych zaleca się również uwzględnienie próbki DNA wyizolowanego z krwi zdrowego dawcy w każdej analizie pirosekwencjonowania. Dodatkowo należy umieścić kontrolę negatywną (bez matrycy DNA) w każdym nastawieniu reakcji PCR.


# Materiały Dostarczone

## Zawartość zestawu

### Zestaw *therascreen* MGMT Pyro (pudełko 1/2)

<b>Zestaw <i>therascreen</i> MGMT Pyro</b>	<b>(48)</b>
<b>Numer katalogowy</b>	<b>971061</b>
<b>Ilość reakcji</b>	<b>48</b>
PCR Primer Mix MGMT (starter PCR)	2 x 24 µl
Seq Primer MGMT (starter sekwencyjny)	2 x 24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (mieszanka do PCR)	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x (koncentrat buforu)	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Methylated Control DNA (metylowane DNA kontrolne) 10 ng/µl	100 µl

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

<b>Bufory i odczynniki <i>therascreen</i> Pyro</b>	
PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydyzacyjny)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution* (roztwór denaturujący)	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (bufor płuczający)	25 ml
Enzyme Mixture (mieszanka enzymów)	1 vial
Substrate Mixture (mieszanka substratów)	1 vial
dATP $\alpha$ S	1180 µl
dCTP	1180 µl
dGTP	1180 µl
dTTP	1180 µl
Instrukcja (anglojęzyczna)	 1

\* Zawiera wodorotlenek sodu.



## Materiały Wymagane, ale Niedostarczone

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

- Zestaw do izolacji DNA (patrz 'Izolacja DNA i konwersja wodorosiarczynem', strona 13)
  - Odczynniki do konwersji DNA wodorosiarczynem (patrz 'Izolacja DNA i konwersja wodorosiarczynem', strona 13)
  - Pipety (nastawne)\*
  - Sterylne końcówki do pipet (do PCR, z filtrami)
  - Mikrowirówka stołowa\*
  - Termocykler\* oraz odpowiednie próbki PCR
  - Sefaroza opłaszczona streptawidyną (Streptavidin Sepharose High Performance; GE Healthcare, nr kat. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
  - Aparat PyroMark Q24 (nr kat. 9001513 lub 9001514)\*†
  - Oprogramowanie PyroMark Q24 Software (nr kat. 9019063 lub 9019062)†
  - PyroMark Q24 Plate (płytki reakcyjne; nr kat. 979201)†
  - PyroMark Q24 Cartridge (kartridże; nr kat. 979202)†
  - PyroMark Q24 Vacuum Workstation (pompa próżniowa; nr kat. 9001515 lub 9001517)\*†
  - Wytrząsarka do płytek\* do immobilizacji na sefarozie (patrz 'Zalecane wytrząsarki płytek', strona 10)
  - Blok grzejny\* zdolny do osiągnięcia 80°C
  - 24-dołkowe płytki lub paski do PCR
  - Zatyczki paskowe
  - Woda o wysokiej czystości (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm lub ekwiwalent)
- Uwaga:** Zestaw zawiera ilość wody wystarczającą do PCR, immobilizacji DNA oraz do rozpuszczania mieszanin enzymów i substratów. Dodatkowa ilość wody o wysokiej czystości jest potrzebna do rozcieńczenia buforu PyroMark Wash Buffer, 10x
- Etanol (70%)\*‡

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

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

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

## Zalecane wytrząsarki płytek

Wytrząsarki płytek przedstawione w Tabeli 1 są rekomendowane do użycia z Zestawem *therascreen* MGMT Pyro.

**Tabela 1. Wytrząsarki płytek rekomendowane do użycia z Zestawem *therascreen* MGMT Pyro**

Producent	Produkt	Numer kat.
Eppendorf	Thermomixer comfort (Basic device)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter na próbówki PCR 96 x 0,2 ml kompatybilny z blokiem płytkowym	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V=51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V=51110 U)

## Ostrzeżenia i Uwagi

Do użytku diagnostycznego in vitro

## Informacje bezpieczeństwa

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

Następujące oświadczenia ostrzegawcze odnoszą się do komponentów Zestawu *therascreen* MGMT Pyro.

### **PyroMark Denaturation Solution (roztwór denaturujący)**



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

### **PyroMark Enzyme Mixture (mieszanka enzymów)**



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

### **PyroMark Substrate Mixture (mieszanka substratów)**



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

## **Uwagi ogólne**

**Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę jak następuje.**

- Ścisłe przestrzeganie instrukcji użytkowania jest wymagane dla optymalnych wyników. Rozcieńczanie odczynników inne niż podane w niniejszej instrukcji nie jest zalecane i może powodować spadek wydajności.
- Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24* (patrz 'Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24', strona 21).
- Komponenty tego zestawu wystarczają na wykonanie 48 reakcji podzielonych na maksymalnie 5 niezależnych analiz.
- Używaj sterylnych końcówek (z filtrami) do pipet (do przygotowania PCR).

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

## Przechowywanie i Obchodzenie się z Odczynnikami

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

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

Rozpuszczone mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów są stabilne przez co najmniej 10 dni w 2–8°C. Rozpuszczone mieszaniny enzymów i mieszaniny substratów mogą być zamrażane i przechowywane w –30°C do –15°C. Zamrożone odczynniki nie powinny być poddawane więcej niż 6 cyklom zamrażania-rozmrażania.

**Uwaga:** Nukleotydy nie powinny być zamrażane.

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

## Przechowywanie i Obchodzenie się z Próbkami

Wszystkie próbki muszą być traktowane, jako materiał potencjalnie zakaźny.

Materiał próbek stanowi ludzkie DNA (po konwersji wodorosiarczynem) wyizolowane z krwi lub skrawków tkanek zatopionych w bloczkach parafinowych (FFPE – ang. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded).

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

## Procedura

### Izolacja DNA i konwersja wodorosiarczynem

Wydajność systemu została określona przy wykorzystaniu zestawów EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue Kit i QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit do pozyskania ludzkiego DNA z próbek nowotworowych (FFPE). W przypadku systemu QIAamp DSP DNA Blood Mini, wydajność została określona z wykorzystaniem próbek krwi zdrowego dawcy, częściowo z dodatkiem komórek nowotworowych.

Zestawy QIAGEN<sup>®</sup> przedstawione w Tabeli 2 są zalecane do izolacji DNA z wymienionych typów ludzkich próbek przy wykorzystaniu Zestawu *therascreen* MGMT Pyro. Izolację DNA należy przeprowadzić zgodnie z instrukcjami dla odpowiednich zestawów.

Do przeprowadzenia konwersji wodorosiarczynem zalecane są zestawy EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite Kit (nr kat. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (nr kat. 59144) lub EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (nr kat. 59124) firmy QIAGEN.

**Tabela 2. Zestawy do izolacji DNA rekomendowane do użytku z Zestawem *therascreen* MGMT Pyro**

<b>Materiał próbki</b>	<b>Zestaw do izolacji kw. nukleinowego</b>	<b>Numer kat. (QIAGEN)</b>
Tkanka (FFPE)	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Krew	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit <sup>†</sup>	61104

\* Postępuj zgodnie z instrukcją dla tkanek (FFPE). Zestaw EZ1 DNA Tissue powinien być użytkowany w połączeniu z aparatem EZ1 Advanced (nr kat. 9001410 lub 9001411) oraz kartą EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018298) lub z aparatem EZ1 Advanced XL (nr kat. 9001492) oraz kartą EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9018700) lub z aparatem BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (nr kat. 9000705; już niedostępny w ofercie) oraz kartą EZ1 DNA Paraffin Section Card (nr kat. 9015862).

<sup>†</sup> Oznakowanie CE-IVD zgodne z Dyrektywą EU 98/79/EC.

# Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24


## Ważna informacja przed rozpoczęciem

- Jeśli jest to wymagane, LOB (limit próby ślepej) może zostać potwierdzony z użyciem próbki krwi zdrowego i wygenerowanie całej płytki wyników. Więcej informacji w publikacji CLSI Guideline EP17-A 'Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline' (Protokół do określania limitów detekcji i limitów pomiaru ilościowego; zatwierdzony przewodnik).

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem


- Zaprogramuj analizę (Assay Setup) jak to opisano w Dodatek A, strona 42. Czynność ta musi zostać wykonana tylko raz, przed pierwszym rozpoczęciem analizy Zestawem *therascreen* MGMT Pyro.

## Procedura

1. **Na pasku narzędzi wybierz .** Stworzony zostaje nowy plik reakcyjny 'run file'.
2. **Wprowadź parametry analizy (patrz 'Parametry analizy', strona 15).**
3. **Zaprogramuj układ płytki przez dodawanie analiz do studzienek (pól) korespondujących z próbkami do analizy.**

**Uwaga:** Kontrola negatywna (bez matrycy DNA) powinna być również uwzględniona w każdej reakcji PCR.

**Uwaga:** Dla celów porównawczych zaleca się również uwzględnienie próbki DNA wyizolowanego z krwi zdrowego dawcy w każdej analizie pirosekwencjonowania. Próbka kontrolna z 'Methylated Control DNA' może zostać uwzględniona jako kontrola pozytywna w reakcjach PCR oraz pirosekwencjonowania (patrz 'Kontrole', strona 7).

4. **Gdy reakcja jest zaprogramowana i gotowa do rozpoczęcia na systemie PyroMark Q24, wydrukuj listę potrzebnych objętości mieszaniny enzymów, mieszaniny substratów, nukleotydów oraz ustawień dla płytki. Wybierz 'Pre Run Information' (informacja przed-reakcyjna) z menu 'Tools' (narzędzia), a gdy pojawi się raport, celem wydrukowania wybierz .**
5. **Zamknij 'run file' (plik reakcji) i skopiuj na nośnik USB (dostarczony wraz z aparatem) używając narzędzia Windows® Explorer.**

Wydrukowana 'Pre Run Information' (informacja przed-reakcyjna) może być użyta jako szablon do przygotowania reakcji (patrz 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)', strona 19).

Aby rozpocząć reakcję na aparacie PyroMark Q24 - patrz 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 25.

## Parametry analizy

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

## Przypisywanie plików analizy

Aby przypisać plik analizy do dołka reakcyjnego należy:

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

Każdemu polu studzienki zostaje przyporządkowany kolor odpowiadający określonej analizie.

## Wprowadzanie nazw próbek oraz notatek

Aby wprowadzić nazwę próbki lub notatkę, wybierz odpowiednie pole i wpisz požądane informacje.

Celem dalszej edycji wybierz pole (bierząca zawartość zostanie zaznaczona) lub kliknij dwukrotnie odpowiednie pole.

## **Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie *therascreen* MGMT Pyro**

Niniejszy protokół dotyczy amplifikacji PCR obszaru DNA po konwersji wodorosiarczynem przy użyciu Zestawu *therascreen* MGMT Pyro.

### **Ważne informacje przed rozpoczęciem**

- Polimeraza HotStarTaq<sup>®</sup> zawarta w zestawie PyroMark PCR Master Mix wymaga etapu aktywacji przez 15 minut w 95°C.
- Przygotuj wszystkie mieszaniny reakcyjne w obszarze odseparowanym fizycznie od tego, gdzie izoluje się DNA, dodaje matrycy DNA, analizuje produkty PCR oraz przygotowuje próbki do analizy pirosekwencjonowaniem.
- Używaj jednorazowych końcówek pipet z filtrami hydrofobowymi, aby zminimalizować ryzyko kontaminacji krzyżowej.
- W charakterze DNA matrycowego musi zostać użyte DNA po konwersji wodorosiarczynem. Rekomendowane zestawy to EpiTect Bisulfite Kit (nr kat. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (nr kat. 59144) lub EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (nr kat. 59124) firmy QIAGEN.

### **Czynności do wykonania przed rozpoczęciem**

- Przed otwarciem probówek ze starterami do PCR, zwiruj je krótko celem zebrania zawartości na dnie.
- Jeśli potrzeba, doprowadź stężenie DNA kontrolnego oraz próbek do wartości 2-10 ng/μl.

### **Procedura**

#### **1. Rozmroź wszystkie niezbędne odczynniki.**

Przed użyciem dobrze wymieszaj.

#### **2. Przygotuj mieszaninę reakcyjną dla każdego zestawu starterów zgodnie z Tabelą 3.**

Typowo, mieszanina reakcyjna zawiera wszystkie składowe niezbędne do PCR, poza próbką.

Przygotuj mieszaninę reakcyjną w objętości nieco większej niż potrzebna do wykonania wymaganej ilości reakcji PCR.



**Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

<b>Składowa</b>	<b>Objętość/reakcję (µl)</b>
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x (koncentrat buforu)	2,5
PCR Primer Mix MGMT (starter PCR)	1,0
Water (H <sub>2</sub> O, zawarta w zestawie)	4,0
<b>Objętość całkowita</b>	<b>20,0</b>

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

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

**4. Dodaj 5 µl matrycy DNA po konwersji wodorosiarczynem (10–50 ng DNA genomowego zgodnie z pomiarem przed konwersją) do poszczególnych próbek PCR (patrz Tabela 4) i dobrze wymieszaj.**

**Uwaga:** Próbką stanowiącą kontrolę negatywną (bez matrycy DNA) powinna być uwzględniona w każdej reakcji PCR.

**Uwaga:** Dla celów porównawczych zaleca się również uwzględnienie próbki DNA wyizolowanego z krwi zdrowego dawcy w każdej analizie pirosekwencjonowania. Próbka z 'Methylated Control DNA' może zostać uwzględniona jako kontrola pozytywna w reakcjach PCR oraz pirosekwencjonowania (patrz 'Kontrole', strona 7).

**Tabela 4. Przygotowanie PCR**

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

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

**Tabela 5. Zoptymalizowany protokół PCR**

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

6. Umieść probówki PCR w termocyklerze i rozpocznij program.
7. Po zakończonej amplifikacji przejdź do 'Protokół 3: Immobilizacja produktów PCR do cząsteczek streptawidyny (Streptavidin Sepharose High Performance beads)', strona 19.

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

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

### Ważne informacje przed rozpoczęciem

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

### Procedura

1. Delikatnie wstrząśnij butelką zawierającą ‘Streptavidin Sepharose High Performance’ do momentu uzyskania homogennego roztworu.
2. Przygotuj mieszaninę ‘master mix’ do immobilizacji DNA zgodnie z Tabelą 6.

Przygotuj objętość o 10 % większą niż wymagana dla planowanej ilości reakcji.

Tabela 6. Mieszanina ‘master mix’ do immobilizacji DNA

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

3. Dodaj 70 µl mieszaniny ‘master mix’ do dołków 24-dołkowej płytki PCR lub pasków zgodnie z predefiniowanym planem reakcji ‘run setup’ (patrz ‘Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24’, strona 14).
4. Dodaj 10 µl biotynylowanego produktu PCR do dołków 24-dołkowej płytki PCR lub pasków zgodnie z predefiniowanym planem reakcji ‘run setup’ (patrz ‘Protokół 2: PCR z użyciem odczynników zawartych w Zestawie *therascreen* MGMT Pyro’, strona 16).

Po dodaniu mieszaniny ‘master mix’ oraz produktu PCR, całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej w każdym dołku powinna wynosić 80 µl.

5. Zaklej płytkę PCR (lub paski) przy użyciu zamknięć paskowych. Upewnij się, że przeciekanie pomiędzy dołkami nie jest możliwe.

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

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

**7. Przejdź niezwłocznie do ‘Protokół 4: Przygotowanie próbek do reakcji pirosekwencjonowania na aparacie PyroMark Q24’, strona 21.**

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

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

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

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

### Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Dodaj starter sekwencyjny zgodnie ze wzorcem predefiniowanych ustawień analizy (run setup) dla używanej płytki (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 14).
- Procedura została nieznacznie zmodyfikowana względem *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24* (krok 18). Nie należy skracać czasu schładzania próbek po uprzedniej inkubacji w 80°C.
- Regularnie przeprowadzaj test funkcjonowania końcówek filtrujących (filter probes) oraz wymieniaj je na nowe tak jak to opisano w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.

### Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

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

### Procedura

- 1. Rozcieńcz wystarczającą ilość startera sekwencyjnego (Seq Primer MGMT) w buforze hybrydyzacyjnym (PyroMark Annealing Buffer) jak przedstawiono w Tabeli 7.**

Przygotuj rozcieńczony starter sekwencyjny w objętości większej od wymaganej dla liczby analizowanych próbek (dla wymaganej ilości próbek + jednej dodatkowo).

**Tabela 7. Przykładowe rozcieńczanie startera sekwencyjnego**

<b>Składowa</b>	<b>Objętość/próbkę (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Objętość dla 9 + 1 reakcji (<math>\mu</math>l)</b>
Seq Primer MGMT (starter sekwencyjny)	0,8	8,0
PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny)	24,2	242,0
<b>Objętość całkowita</b>	<b>25,0</b>	<b>250,0</b>

- Add 25  $\mu$ l of diluted sequencing primer to each well of the PyroMark Q24 Plate according to the run setup (see ‘Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24’, strona 14).**

Miej przygotowany jeden ze statywów do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder) dostarczony wraz ze stacją próżniową (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) w temp. pokojowej (15–25°C) i używaj jako statywu podczas przygotowywania i przenoszenia płytki.

- Umieść płytkę/paski PCR przygotowane w Protokole 3 oraz płytkę (PyroMark Q24 Plate) na stole roboczym stacji próżniowej (Rysunek 2).** Upewnij się, że płytka jest w tej samej orientacji, jak podczas dodawania próbek.



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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

**Uwaga:** Na koniec dnia roboczego, wszystkie wykorzystane płyny powinny zostać usunięte, a stacja próżniowa (PyroMark Q24 Vacuum Workstation) sprawdzona pod kątem zanieczyszczeń (patrz Dodatek B, strona 43).
17. **Inkubuj płytkę (PyroMark Q24 Plate) z próbkami w 80°C przez 2 minuty na nagrzanym adapterze do płytek (PyroMark Q24 Plate Holder).**
18. **Usuń płytkę (PyroMark Q24 Plate) z podgrzanego adaptera i umieść na drugim adapterze znajdującym się w temp. pokojowej (15–25°C) i pozostaw w takich warunkach przez 10–15 minut celem ostudzenia.**
19. **Przejdź do 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 25.**



## Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24

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

### Ważna informacja przed rozpoczęciem

- Raport przed-reakcyjny (pre run information report) znajdujący się w menu narzędzi (Tools) dla ustawień reakcji (patrz 'Protokół 1: Programowanie eksperymentu na systemie PyroMark Q24', strona 14) dostarcza informacji dotyczących objętości nukleotydów, mieszanin enzymów, substratów oraz buforów wymaganych dla danej reakcji.

### Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

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

### Procedura

- 1. Rozpuść zliofilizowane mieszaniny enzymów i substratów w 620 µl (każdy) wody (H<sub>2</sub>O, zawarta w zestawie).**

- 2. Wymieszaj delikatnie.**

Nie mieszaj przez worteksowanie!

Celem pełnego rozpuszczenia mieszanin, pozostaw je w temp. pokojowej (15–25°C) przez 5–10 minut. Przed użyciem upewnij się, że roztwory nie są mętne przed ich dodaniem do kartridża PyroMark Q24. Jeśli odczynniki nie mają zostać użyte natychmiast, umieść je na lodzie\* lub w lodówce.

- 3. Przed użyciem, zarówno odczynniki, jak i kartridż PyroMark Q24 powinny osiągnąć temp. pokojową (20–25°C).**

- 4. Postaw kartridż PyroMark Q24 etykietą w swoją stronę.**

- 5. Dodaj do kartridża PyroMark Q24 odpowiednie objętości nukleotydów oraz mieszanin enzymów i substratów, zgodnie z Rysunkiem 4.**

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

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




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

6. **Otwórz bramkę kartridża w aparacie PyroMark Q24 i wstaw kartridż napełniony odczynnikami z etykietą zwróconą w kierunku operatora (do siebie). Wsuń kartridż do końca, a następnie dociśnij w dół.**
7. **Upewnij się, że z przodu kartridża jest widoczna linia, po czym zamknij bramkę.**
8. **Otwórz ramkę do blokowania płytki i umieść płytkę PyroMark Q24 Plate na bloku grzejmym aparatu.**
9. **Zamknij ramkę do blokowania płytki oraz pokrywę aparatu.**
10. **Do znajdującego się w przedniej części urządzenia portu USB podłącz nośnik pamięci USB zawierający plik reakcyjny 'run file'.**  
Nie usuwaj nośnika pamięci USB przed zakończeniem reakcji.
11. **W menu głównym wybierz 'Run' (przyciski ▲ oraz ▼) i wciśnij 'OK'.**
12. **Wybierz plik reakcyjny 'run file' (przyciski ▲ oraz ▼).**  
Celem podglądu zawartości folderu, zaznacz go i wybierz 'Select'. Aby wrócić do poprzedniego widoku wybierz 'Back'.
13. **Aby rozpocząć reakcję zaznacz plik 'run file', a następnie wybierz 'Select'.**
14. **Po skończonej reakcji, gdy aparat wyświetli informację o zapisaniu całej analizy na nośniku pamięci USB, wybierz 'Close'.**
15. **Usuń nośnik pamięci USB z aparatu.**
16. **Otwórz pokrywę aparatu.**
17. **Otwórz bramkę zabezpieczającą kartridża i wyjmij kartridż - należy go pociągnąć lekko w górę, a następnie na zewnątrz (do siebie).**
18. **Zamknij bramkę kartridża.**
19. **Otwórz ramkę zabezpieczającą płytkę PyroMark Q24 Plate i usuń płytkę z bloku grzejmego.**
20. **Zamknij ramkę zabezpieczającą płytkę oraz pokrywę aparatu.**
21. **Usuń płytkę i umyj kartridż zgodnie z zaleceniami zawartymi w instrukcji załączonej do kartridża.**
22. **Dokonaj analizy reakcji zgodnie z opisem w 'Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 27.**

## Protokół 6: Analiza wyników reakcji na aparacie PyroMark Q24

Niniejszy protokół przedstawia analizę metylacji po zakończonej reakcji *therascreen* MGMT przy użyciu oprogramowania PyroMark Q24.

### Procedura

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



Analiza wszystkich próbek (dołków).



Analiza wybranych próbek (dołków).

Wyniki analizy (częstość występowania metylacji) oraz ocena jakościowa są przedstawiane powyżej zmiennej pozycji na wykresie pyrogramu.

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

5. Aby wygenerować raport, wybierz opcję 'CpG Full Report' (pełen raport) lub 'CpG Analysis Results' (wyniki analizy) w menu 'Reports'.

**Uwaga:** Dla uzyskania wiarygodnych wyników rekomendowana jest analiza pojedynczych pików o wysokości przynajmniej 30 RLU (relative light units). Ustaw 30 RLU jako 'required peak height for passed quality' w ustawieniach analizy (assay setup) (patrz Dodatek A, strona 42 oraz *Instrukcja Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*).

**Uwaga:** Wyniki z raportu 'CpG Analysis Results' powinny zostać użyte w celu dokumentacji i interpretacji wyników ilościowych występowania metylacji. Wyniki numeryczne przedstawione w pyrogramie są zaokrąglone i nie pokazują dokładnych wyników ilościowych.

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

## Interpretacja Wyników

Dla celów porównawczych zaleca się uwzględnienie próbki DNA wyizolowanego z krwi zdrowego dawcy w każdej analizie pirosekwencjonowania.

Kontrola konwersji DNA (zaznaczona żółtym słupkiem w oknie pyrogramu) pokazuje wydajność konwersji wodorosiarczynem. Sygnał w próbce kontrolnej konwersji wodorosiarczynem może wskazywać na niekompletną konwersję, co może wypaczać pomiar ilościowy metylacji i powodować pojawienie się komunikatu ostrzegawczego.

Wartości LOB odzwierciedlają częstotliwości występowania metylacji uzyskane z próbek krwi pozyskanych od zdrowych dawców z prawdopodobieństwem wynoszącym 95% (patrz Tabela 8 oraz 'Charakterystyka Wydajności', strona 33).

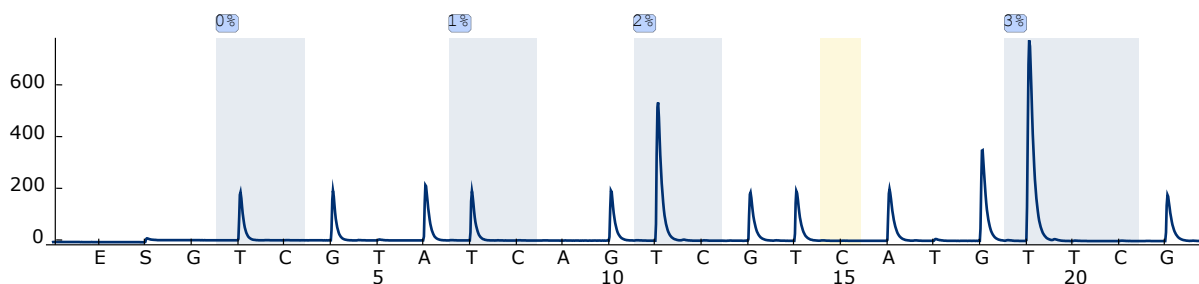
**Tabela 8. Wartości LOB ustalone dla konkretnych pozycji metylacji przy użyciu próbek krwi pozyskanych od zdrowych dawców.**

Pozycja	LOB (%)
CpG pozycja 1	1,5
CpG pozycja 2	1,8
CpG pozycja 3	3,2
CpG pozycja 4	3,4
Średnia dla CpG pozycje 1 do 4	2,1

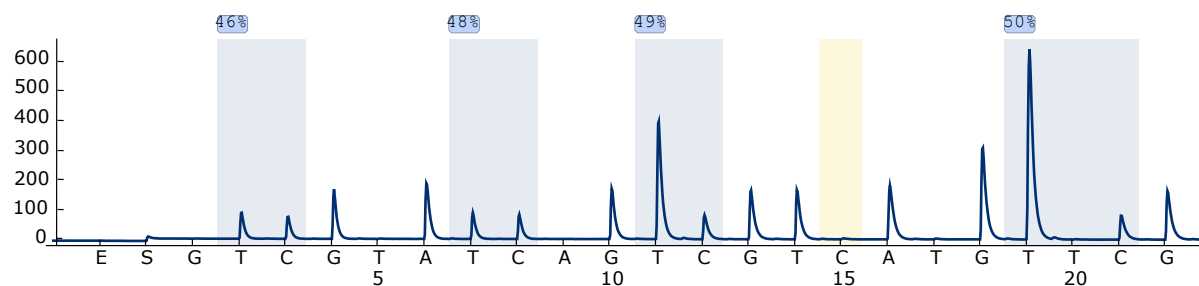
**Uwaga:** Wartości te zostały uzyskane na podstawie analiz z sygnałami wynoszącymi ponad 30 RLU (relative light units), co uzyskuje się rutynowo z 10 ng DNA izolowanego z krwi (pomiar przed konwersją wodorosiarczynem). Zaleca się potwierdzenie wydajności metody w laboratorium.

## Reprezentatywne wyniki

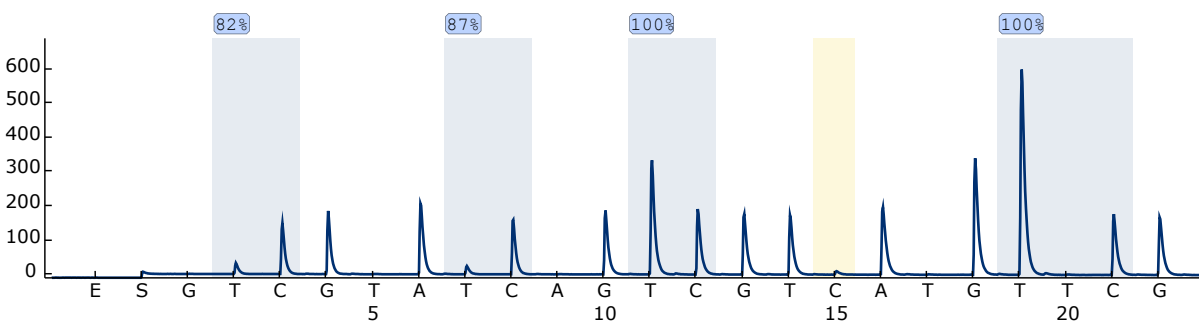
Reprezentatywne wyniki w postaci pyrogramów – Rysunki 5–7.



**Rysunek 5. Pyrogram będący wynikiem analizy niemetylowanego DNA po konwersji wodorosiarczynem, pozyskany z próbki krwi od zdrowego dawcy. Słupek dozowania 15 przedstawia kontrolę wydajności konwersji.**



**Rysunek 6. Pyrogram będący wynikiem analizy metylowanego DNA po konwersji wodorosiarczynem. Słupek dozowania 15 przedstawia kontrolę wydajności konwersji.**



**Rysunek 7. Pyrogram będący wynikiem analizy wysoce metylowanego DNA po konwersji wodorosiarczynem (Methylated Control DNA, dostarczony w zestawie). Słupek dozowania 15 przedstawia kontrolę wydajności konwersji.**

## Rozwiązywanie problemów

Ten przewodnik może być pomocny w przypadku potrzeby rozwiązywania problemów. Więcej informacji dotyczących rozwiązywania problemów można znaleźć na stronie internetowej 'Frequently Asked Questions' (często zadawane pytania) w centrum pomocy technicznej:

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

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

### Komentarze i sugestie

---

#### Sygnal dla kontroli bez matrycy (kontrola negatywna)

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

#### Sekwencja niespodziewana lub o niskiej jakości

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

## Komunikat 'Check' (sprawdź) lub 'Failed' (niepowodzenie)

- a) Niskie piki
- Błędy w przygotowaniu PCR lub przygotowaniu próbek do pirosekwencjonowania mogą prowadzić do powstawania zbyt małych pików. Istotnym jest całkowite pobranie próbek przez narzędzie próżniowe. Upewnij się, że jest ono opuszczane powoli do próbek i że geometria płytki PCR lub pasków używanych do immobilizacji pozwala na całkowite pobranie próbek.
- Przeprowadź test funkcjonowania końcówek filtrujących oraz wymieniaj je na nowe zgodnie z zaleceniami opisanymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.
- W przypadku pojawienia się komunikatu 'Check', uważnie porównaj pyrogram z histogramem (widocznym poprzez wybranie opcji wywołanej kliknięciem prawym przyciskiem myszy na pyrogramie). Jeśli wysokość pików odpowiada wysokości słupków, to wynik jest ważny. W przeciwnym razie zalecana jest powtórna analiza próbki.
- b) Pojawia się ostrzeżenie 'Uncertain/Failed bisulfite conversion at dispensation: 15' (niepewna/nieudana konwersja dla dozowania: 15)
- Upewnij się, że wartość dla 'Allowed percentage for passed quality' oraz 'Allowed percentage for check quality' są ustawione odpowiednio na 7,0 oraz 10,0.
- Uwaga:** Pojawienie się komunikatów jakościowych 'Check' lub 'Failed' oznacza niekompletną konwersję wodorosiarczynem, co może wypaczać wynik ilościowy metylacji.
- Zaleca się używanie zestawów EpiTect Bisulfite Kit (nr kat. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (nr kat. 59144) lub EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (nr kat. 59124) firmy QIAGEN i postępować ściśle z zaleceniami protokołów.
- Wysoki poziom tła**
- a) Niewłaściwe przechowywanie nukleotydów
- Nukleotydy przechowuj w 2–8°C. Przechowywanie w –15 do –25°C może powodować wzrost poziomu tła.

- |  |   |
|--|---|
| b) Krótki czas schładzania próbek przed rozpoczęciem analizy pirosekwencjonowaniem | Trzymaj próbki na statywie 'PyroMark Q24 Plate Holder' w temp. pokojowej przez 10–15 minut. Nie skracaj czasu schładzania.        |
| c) Zanieczyszczenie kartridża  | Ostrożnie oczyść kartridż zgodnie z wytycznymi w instrukcji kartridży. Przechowuj kartridż zabezpieczony przed światłem i kurzem. |

### **Brak sygnałów dla kontroli pozytywnych**

- |   |  |
|---|--|
| a) Niewystarczająca dla wszystkich próbek ilość mieszaniny enzymów lub substratów | Upewnij się, że kartridż aparatu PyroMark Q24 jest napełniony odczynnikami zgodnie z protokołem pre-reakcyjnym (Pre Run Information) z menu 'Tools'.   |
| b) Nieprawidłowe przechowywanie lub rozcieńczanie odczynników                     | Przygotuj odczynniki <i>therascreen</i> zgodnie z instrukcją w 'Protokół 5: Przeprowadzanie reakcji na aparacie PyroMark Q24', strona 25.  |
| c) Niepowodzenie w przygotowaniu PCR lub próbki                                   | Błędy w przygotowaniu reakcji PCR, programowaniu termocyklera lub przygotowaniu próbki do analizy pirosekwencjonowaniem mogą skutkować brakiem sygnału. Przeprowadź test funkcyjny końcówek filtrujących zgodnie z wytycznymi zawartymi w <i>Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24</i> i wymień je na nowe jeśli zachodzi taka potrzeba. Powtórz PCR oraz analizę pirosekwencjonowaniem. |

## **Kontrola Jakości**

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

## **Ograniczenia**

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

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



# Charakterystyka Wydajności

## Limit dla próby ślepej (LOB)

Limit dla próby ślepej (LOB, Tabela 9) został określony dla czterech pozycji CpG przeanalizowanych przy użyciu Zestawu *therascreen* MGMT Pyro oraz próbek DNA pozyskanego z krwi zdrowych dawców, zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A 'Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline' (Protokół ustalania limitów detekcji oraz limitów pomiarów ilościowych; zaaprobowany poradnik). Błędy  $\alpha$  oraz  $\beta$  (odpowiednio, fałszywie pozytywne i fałszywie negatywne) zostały ustalone na 5%.

Wartości LOB odzwierciedlają częstotliwość występowania metylacji na podstawie analizy próbek pozyskanych od zdrowych dawców z prawdopodobieństwem równym 95%.

**Tabela 9. LOB ustalony dla specyficznych pozycji metylacji przy użyciu próbek pozyskanych z krwi zdrowych dawców**

Pozycja	LOB (%)
CpG pozycja 1	1,5
CpG pozycja 2	1,8
CpG pozycja 3	3,2
CpG pozycja 4	3,4
Średnia dla CpG pozycje 1 do 4	2,1

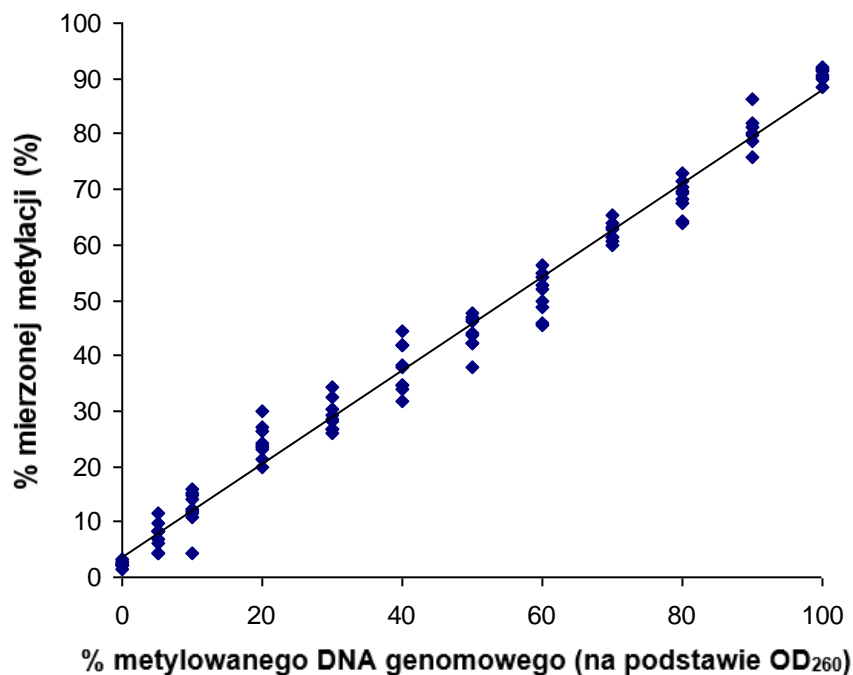
**Uwaga:** Zaleca się potwierdzenie wydajności metody w laboratorium.

## Liniowość

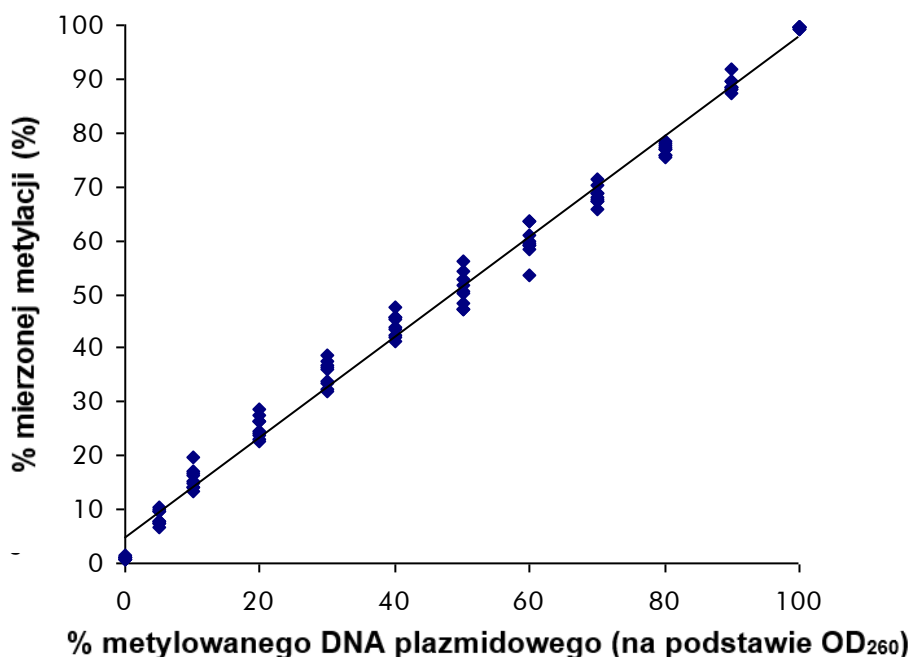
Liniowość została zmierzona z użyciem mieszanin niemetylowanego i metylowanego DNA po konwersji wodorosiarczynem oraz zestawu EpiTect PCR Control DNA set (nr kat. 59104) oraz równolegle z użyciem mieszanin plazmidów niosących odpowiednie sekwencje po konwersji wodorosiarczynem próbek niemetylowanych i metylowanych (np. niosące nukleotydy, odpowiednio C i T w pozycjach CpG). Próbki DNA genomowego oraz plazmidów zostały zmieszane w proporcjach dających 12 poziomów metylacji (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 i 100%). Każda mieszanina została przeanalizowana z użyciem trzech różnych partii (lot) Zestawu *therascreen* MGMT Pyro w 3 reakcjach pirosekwencjonowania, każda w 3 powtórzeniach.

Wyniki (n = 9 dla każdego poziomu mutacji) zostały przeanalizowane zgodnie z wytycznymi CLSI Guideline EP6-A 'Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline' (Ocena liniowości w procedurach pomiarów ilościowych: podejście statystyczne; zaaprobowany poradnik) z użyciem oprogramowania Analyse-it® Software v2.21 (patrz Rysunki 8 i 9) dla średniej metylacji CpG pozycji 1 do 4 przy użyciu, odpowiednio DNA genomowego lub plazmidowego jako matrycy.

Wyniki były liniowe w zakresie dopuszczalnej nieliniowości 5 % w testowanym zakresie poziomu metylacji 0 - 100% dla każdej indywidualnej pozycji metylacji oraz dla średniej z czterech pozycji metylacji.



Rysunek 8. Liniowość dla średniej metylacji CpG pozycje 1 do 4 przy użyciu mieszanin 'Epitect control DNA'.



**Rysunek 9. Liniowość dla średniej metylacji CpG pozycje 1 do 4 przy użyciu mieszanin DNA plazmidowego.**

## Precyzja

Dane dotyczące precyzji pozwalają na określenie całkowitej zmienności analiz i zostały uzyskane na trzech różnych poziomach poprzez analizę wyżej wymienionych mieszanin DNA genomowego i plazmidowego w trzech powtórzeniach dla każdego.

Powtarzalność (w ramach jednego zestawu oraz jako zmienna pomiędzy partiami) była obliczona na podstawie danych określających liniowość (trzy analizy tego samego dnia przy użyciu różnych partii Zestawu *therascreen* MGMT Pyro). Uśredniona precyzja (precyzja wewnątrzlaboratoryjna) była określona podczas trzech analiz w tym samym laboratorium w trzech różnych dniach i wykonanych przez różnych operatorów, na różnych aparatach PyroMark Q24 i różnych partiach Zestawu *therascreen* MGMT Pyro. Odtwarzalność (zmienność międzylaboratoryjna) była obliczona na podstawie danych z dwóch analiz z każdego z laboratoriów – wewnętrznego jak i zewnętrznego – przy użyciu różnych partii Zestawów *therascreen* MGMT Pyro.

Szacunkowa precyzja jest wyrażona, jako odchylenie standardowe zmierzonej częstotliwości metylacji CpG pozycje 1 do 4 w % (Tabele 10 i 11).

Powtarzalność, uśredniona precyzja oraz odtwarzalność przy użyciu mieszanin DNA genomowego była odpowiednio w zakresach 0,5-4,3, 0,4-4,0, oraz 0,4-4,4 %, w testowanym zakresie poziomu metylacji 0-100%. Podobne wyniki zostały uzyskane z użyciem mieszanin DNA plazmidowego (patrz Tabela 11).

**Tabela 10. Precyzja dla średniej metylacji CpG pozycje 1 do 4 przy użyciu mieszanin ‘EpiTect control DNA’\***

% metylowanego EpiTect control DNA†	Powtarzalność		Uśredniona precyzja		Odtwarzalność	
	Średnia	SD‡	Średnia	SD	Średnia	SD
0	2,4	0,5	2,2	0,4	2,6	0,7
5	7,1	2,7	7,7	2,5	9,3	3,9
10	12,8	2,2	12,9	2,3	15,3	3,3
20	23,7	2,3	23,6	2,2	24,2	2,6
30	29,8	2,6	31,0	2,6	30,4	3,0
40	36,7	3,3	37,0	3,6	38,1	3,7
50	44,1	2,9	44,8	3,6	44,2	2,7
60	51,3	3,6	52,4	3,5	51,2	3,3
70	62,3	1,9	62,8	2,1	61,2	2,9
80	68,6	3,1	69,4	3,1	66,9	3,4
90	80,6	3,3	79,5	2,2	77,0	4,3
100	90,8	1,2	91,7	2,1	90,0	1,9

\* Wszystkie wartości podane są w jednostkach procentowych [%].

† Na podstawie pomiarów OD<sub>260</sub>.

‡ SD: odchylenie standardowe (n=9 dla powtarzalności i uśrednionej precyzji, n=12 dla odtwarzalności).

**Tabela 11. Precyzja dla średniej metylacji CpG pozycje 1 do 4 przy użyciu mieszanin DNA plazmidowego\***

Miesznanina DNA plazmidowego (%) <sup>†</sup>	Powtarzalność		Uśredniona precyzja		Odtwarzalność	
	Średnia	SD <sup>‡</sup>	Średnia	SD	Średnia	SD
0	1,1	0,2	1,0	0,1	1,1	0,3
5	8,6	1,4	8,3	1,1	10,2	3,0
10	15,7	1,9	15,1	2,8	18,8	3,2
20	25,3	2,1	25,5	3,1	28,4	3,6
30	35,2	2,3	34,3	3,2	36,2	2,5
40	44,1	2,0	43,7	3,3	42,8	2,4
50	50,3	3,2	51,8	2,9	52,1	2,5
60	60,2	2,2	60,9	2,8	59,3	2,3
70	68,4	1,7	68,7	1,5	66,9	2,7
80	76,9	1,1	77,4	0,8	75,7	2,1
90	88,9	1,3	88,8	1,7	85,1	4,6
100	99,5	0,1	99,5	0,2	99,0	0,8

\* Wszystkie wartości podane są w jednostkach procentowych [%].

<sup>†</sup> Na podstawie pomiarów OD<sub>260</sub>. Wartości 0–100% oznaczają proporcje plazmidów niosących nukleotydy C w pozycjach CpG (metylowane nukleotydy C) w mieszaninie z plazmidami niosącymi nukleotydy T (niemetylowane nukleotydy C).

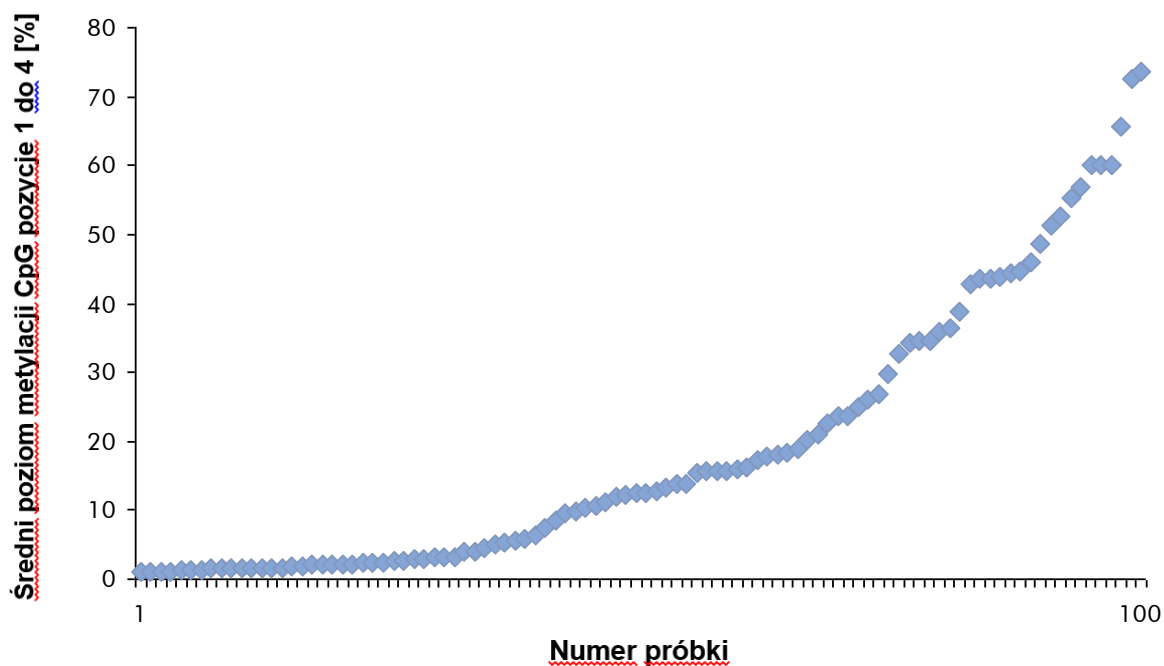
<sup>‡</sup> SD: odchylenie standardowe (n=9 dla powtarzalności i uśrednionej precyzji, n=12 dla odtwarzalności).

## Ocena diagnostyczna

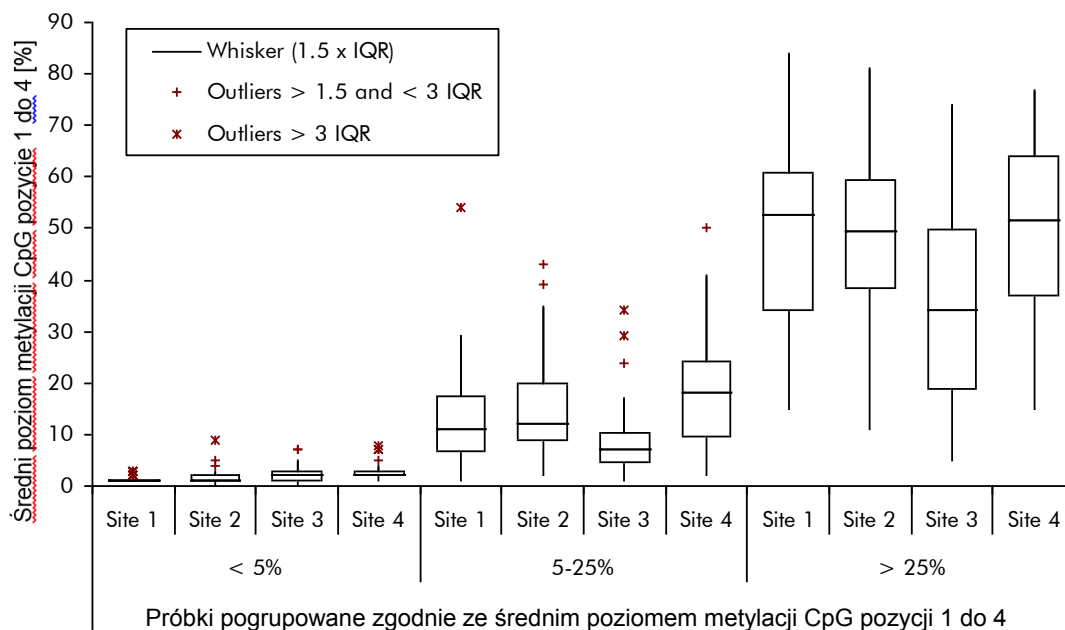
Zestaw *therascreen* MGMT Pyro został przetestowany w porównaniu do sekwencjonowania Sangera. DNA zostało wyizolowane ze 100 próbek nowotworowych glejaka a następnie przetestowane pod kątem metylacji w czterech pozycjach CpG przy użyciu Zestawu *therascreen* MGMT Pyro.

DNA zostało wyizolowane przy użyciu zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit i konwertowane wodorosiarczynem przy użyciu zestawu Epitect Bisulfite Kit. Analiza pirosekwencjonowaniem została przeprowadzona przy pomocy Zestawu *therascreen* MGMT Pyro na aparacie PyroMark Q24 oraz sekwencjonowaniem Sangera na aparacie ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Na 100 próbek przeanalizowanych sekwencjonowaniem Sangera, status metylacji został określony w 49 przypadkach, natomiast użycie Zestawu *therascreen* MGMT Pyro pozwoliło na określenie statusu metylacji we wszystkich przypadkach. Średnie poziomy metylacji od 1 do 74 % zostały wykryte w 100 próbkach metodą pirosekwencjonowania (Rysunek 10). Dystrybucja poziomów metylacji dla poszczególnych pozycji jest pokazana na Rysunku 11.



**Rysunek 10. Średni poziom metylacji CpG pozycje 1 do 4 uzyskane dla 100 próbek glejaka przy użyciu Zestawu *therascreen* MGMT Pyro. Próbki są uporządkowane wraz ze wzrastającym poziomem metylacji.**



**Rysunek 11. Dystrybucja metylacji poszczególnych pozycji CpG dla 100 próbek glejaka z użyciem Zestawu *therascreen* MGMT Pyro.** Próbki są pogrupowane zgodnie ze średnią metylacją pozycji CpG 1 do 4. Prostokąty przedstawiają dolne i górne kwartyle (percentyle 25-ty oraz 75-ty) odseparowane przez średnią (50-ty percentyl, linia horyzontalna). Dane poza tym zakresem są przedstawione jako Wąsy (Whisker) i Wyniki Odstające (Outlier) jak oznaczono w legendzie wykresu skrzynkowego. IQR: zakres międzykwartyłowy. Site: pozycja (CpG).

Dla porównania metod, wynikom analizy pirosekwencjonowania został przypisany status metylowany oraz niemetylowany przy użyciu 5 % średniej metylacji CpG pozycje 1 do 4 jako próg odcięcia (cut-off), natomiast wynikom z sekwencjonowania Sangera został ręcznie przypisany status metylowany lub niemetylowany.

Metoda Sangera pozwoliła na określenie 32 próbek jako metylowane. We wszystkich przypadkach wyniki te zostały odtworzone z użyciem Zestawu *therascreen* MGMT Pyro. Dwie dodatkowe próbki zostały raportowane jako metylowane metodą pirosekwencjonowania, podczas gdy metylacja dla nich nie została wykryta metodą Sangera. Spośród 19 próbek określonych jako niemetylowane metodą Sangera, taki sam wynik został wygenerowany dla 17 próbek z użyciem Zestawu *therascreen* MGMT Pyro. Wyniki zostały zilustrowane w Tabeli 12.

Pomijając próbki, których analiza metodą Sangera nie powiodła się, metody z wykorzystaniem Zestawu *therascreen* MGMT Pyro oraz sekwencjonowanie Sangera wykazały 96% zbieżność wyników (Tabela 12).

**Tabela 12. Wyniki analizy metylacji CpG pozycje 1 do 4 dla analizowanych próbek glejaka**

Zestaw <i>therascreen</i> MGMT Pyro	Sekwencjonowanie Sangera			
	Niemetylowane	Metylowane	Nieznane	Razem
Niemetylowane	17	0	18	<b>35</b>
Metylowane	2	32	31	<b>65</b>
Nieznane	0	0	0	<b>0</b>
Razem	<b>19</b>	<b>32</b>	<b>49</b>	<b>100</b>

**Uwaga:** We wszystkich analizach wykonanych celem określenia charakterystyki wydajności, sygnał wynosił ponad 30 RLU, co jest rutynowo otrzymywane dla 10 ng DNA izolowanego z krwi (zgodnie z pomiarem przed konwersją wodorosiarczynem).

## Literatura

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

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



## Symbole



Zawiera odczynniki wystarczające na <N> ilość testów



Użyj do



Do medycznego użytku diagnostycznego in vitro



Numer katalogowy



Numer partii (lot)



Numer materiału



Komponenty (składowe)



Zawiera



Numer



Wodorotlenek sodu



Globalny Numer Handlowy Produktu (Global Trade Item Number)



Ograniczenia temperaturowe



Producent



Zapoznaj się z instrukcją użytkowania



## Informacje Kontaktowe

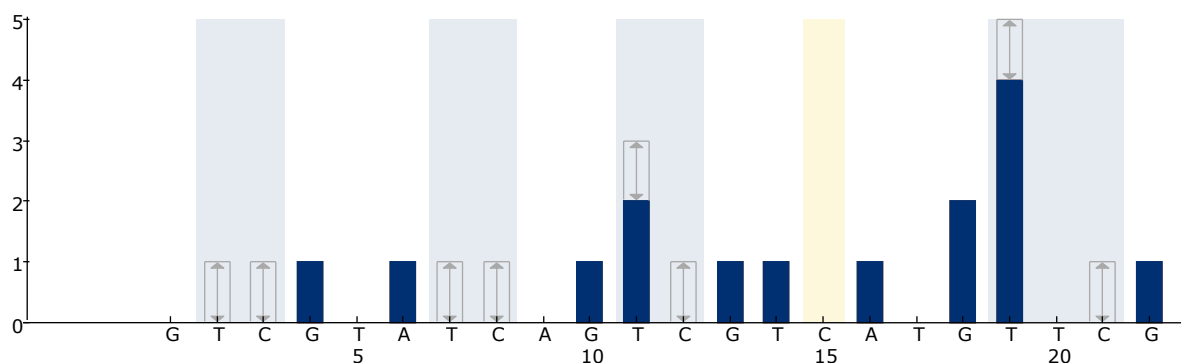
Aby uzyskać pomoc techniczną i znaleźć więcej informacji, zapraszamy do naszego Centrum Pomocy Technicznej [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) lub do kontaktu z Serwisem Pomocy Technicznej QIAGEN bądź do kontaktu z lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub odwiedź [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Dodatek A: Przygotowanie reakcji MGMT

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


### Procedura

1. Kliknij  na pasku narzędzi i wybierz 'New CpG Assay'.
2. W oknie 'Sequence to Analyze' wpisz poniższą sekwencję:  
**YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT**
3. Ręcznie wprowadź następującą kolejność dozowania (Dispensation Order):  
**GTCGTATCAGTCGTCATGTTTCG**
4. Wybierz zakładkę 'Analysis Parameters' (parametry analizy) i zwiększ 'Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:' (odcięcie wysokości piku – wymagana wysokość piku spełniająca kryteria jakości) do 30.
5. W zakładce 'Analysis Parameters' (parametry analizy) ustaw 'Allowed percentage for passed quality' oraz 'Allowed percentage for check quality' odpowiednio na 7,0 oraz 10,0.
6. Kliknij  na pasku narzędzi i zachowaj analizę jako 'MGMT'.



**Rysunek 12. Histogram dla analizy MGMT.** Słupek dozowania 15 przedstawia kontrolę wydajności konwersji wodorosiarczynem.

## Dodatek B: Opróżnianie pojemników na odpady i roztwory

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

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

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

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

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

### Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Niniejszy protokół wymaga użycia wody o wysokiej czystości.

### Procedura

- B1. Upewnij się, że narzędzie próżniowe ma wyłączone ssanie (próżnię; pozycja 'Off') i pompa próżniowa jest wyłączona.**
- B2. Usuń wszystkie roztwory pozostałe w wanienkach.**
- B3. Umyj wanienkę wodą o wysokiej czystości lub jeśli konieczne wymień na nową.**
- B4. Opróżnij butlę na odpady płynne.**
- B5. Pokrywa może zostać odkręcona bez potrzeby odłączania wężyków.**
- B6. Jeśli stacja próżniowa musi zostać umyta (np. z powodu kurzu lub wycieków), postępuj zgodnie z wytycznymi zawartymi w *Instrukcji Użytkowania Aparatu PyroMark Q24*.**

## Informacje Dotyczące Zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit (48)	Na 48 reakcji na systemach PyroMark Q24: Seq Primers (startery sekwencyjne), PCR Primers (startery PCR), Methylated Control DNA (metylowane DNA kontrolne), PyroMark PCR Master Mix (mieszanina PCR), CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer (bufor wiążący), PyroMark Annealing Buffer (bufor hybrydizacyjny), PyroMark Denaturation Solution (bufor denaturujący), PyroMark Wash Buffer (bufor płuczący), Enzyme Mixture (mieszanina enzymów), Substrate Mixture (mieszanina substratów), dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP i H <sub>2</sub> O	971061
<b>Akcesoria</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	24-dołkowa płytką reakcyjną	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kartridże do dozowania nukleotydów i odczynników	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Końcówki filtrujące wielokrotnego użytku do stacji próżniowej PyroMark Vacuum Workstation Q96 oraz Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Odczynnik do sprawdzania działania systemu po instalacji	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Odczynnik do testu wydajności systemu po instalacji	979304
<b>Produkty powiązane</b>		
PyroMark Q24 MDx	Platforma do detekcji sekwencji metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001513
PyroMark Q24	Platforma do detekcji sekwencji metodą pirosekwencjonowania dla 24 próbek jednocześnie	9001514

<b>Produkt</b>	<b>Zawartość</b>	<b>Nr kat.</b>
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Stacja próżniowa (220 V) do preparatyki 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Stacja próżniowa (220 V) do preparatyki 24 próbek jednocześnie, od produktu PCR do jednoniciowej matrycy	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Oprogramowanie aplikacyjne	9019063
PyroMark Q24 Software	Oprogramowanie analityczne	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Zestaw na 50 izolacji DNA: 50 QIAamp MinElute® Columns (kolumny), Proteinase K (proteinaza K), Buffers (bufory), Collection Tubes (2 ml) (próbówki na eluat)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Zestaw na 48 izolacji: Reagent Cartridges (Tissue) (kartridże odczynnikowe; tkanka), Disposable Filter-Tips (jednorazowe końcówki pipet z filtrami), Disposable Tip-Holders (jednorazowe uchwyty do końcówek pipet), Sample Tubes (2 ml) (próbówki), Elution Tubes (1,5 ml) (próbówki na eluat), Buffer G2 (bufor G2), Proteinase K (proteinaza K)	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Zestaw na 50 izolacji: QIAamp Mini Spin Columns (kolumny), Buffers (bufory), Reagents (odczynniki), Tubes (próbówki), VacConnectors (adaptery)	61104
EpiTect Bisulfite Kit	Zestaw na 48 reakcji: EpiTect Bisulfite Spin Columns (kolumny), Reaction Mix (mieszanka reakcyjna), DNA Protect Buffer (bufor DNA Protect), Carrier RNA (RNA nośnikowe), Buffers (bufory)	59104

<b>Produkt</b>	<b>Zawartość</b>	<b>Nr kat.</b>
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit	Zestaw na 48 reakcji: MinElute DNA spin columns (kolumny), Bisulfite mix (mieszanka reakcyjna), DNA Protect Buffer (bufor DNA Protect), Carrier RNA (RNA nośnikowe), Buffers (bufory), Deparaffinization Solution (roztwór deparafinizujący), Lysis Buffer FTB (bufor lizujący)	59144
EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit	Zestaw na 48 reakcji: MinElute DNA spin columns (kolumny), Bisulfite mix (mieszanka reakcyjna), DNA Protect (bufor DNA Protect) Carrier RNA (RNA nosnikowe) , Buffers (bufory)	59124
EpiTect PCR Control DNA Set (100)	Zestaw ludzkiego DNA kontrolnego (zawiera metylowane i niemetylowane DNA po konwersji wodorosiarczynem oraz niekonwertowane niemetylowane DNA) na 100 reakcji PCR	59695

\* Tylko UK.

† Reszta świata.

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

Znaki towarowe: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EpiTect®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ABI™ (Life Technologies); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd., UK); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Florida Scientific Services, Inc.); Windows® (Microsoft Corporation).

### Ograniczona Umowa Licencyjna

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

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

© 2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

