

PyroMark[®] Q24 MDx-software- brugervejledning

Version 1

Til brug sammen med PyroMark Q24 MDx-systemet.

Til in vitro-diagnostisk brug



9019063



1063400DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

MAT

1063400DA



QIAGEN® prøve- og analyse-teknologier

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

QIAGEN sætter standarder i:

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

Vor opgave er at bringe Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. For yderligere information, se www.qiagen.com.

Indhold

Symboler	5
Anvendelse	5
Begrænsninger ved produktanvendelsen	5
Produktgaranti og tilfredshedsgaranti	6
Teknisk service	6
Indledning	8
Om denne brugervejledning	8
PyroMark Q24 MDx-software	9
Analyseformer	9
Genvejs-browser	10
Hovedmenu og værktøjslinjer	11
Histogram	15
Pyrogram	16
Vælg brønde	18
Start softwaren	19
Opsæt en AQ- eller CpG-analyse	19
Arbejdsgang	19
Indlæs den sekvens, der skal analyseres	20
Generer dispenseringsrækkefølge	22
Tilføj eller fjern bisulfitbehandlingskontroller (CpG-analyse)	24
Opstil de variable positioner	24
Redigere analyse-parametre	26
Opsætning af en SQA-analyse	31
Arbejdsgang	31
Indtast dispenseringsrækkefølge	32
Edit analysis parameters	32
Opsæt en kørsel	34
Arbejdsgang	34
Indlæs kørselsparametrene	35
Tilføj analysefiler til pladen	36
Indlæsning af prøve-ID'er og noter	36

Kopiere eller slette indhold fra celler	37
Udskriv eller eksporter pladeindstilling som billede	38
Definere prøve-ID og note eksternt	38
Kontrol af pladeindstilling	40
Behandl kørslen på PyroMark Q24 MDx-instrumentet	41
Arbejdsgang	41
Analyser kørslen	42
Workflow	42
Analysering af alle eller udvalgte brønde	42
Vis analyseresultaterne	43
Redigere analyse-parametre	47
Redigere kvalitetsvurderinger	49
Redigere base-kaldte sekvenser	49
Vise, udskrive og gemme analyserapporter	50
Analysestatistikrapport	51
Analyseresultatrapport	52
Pyrogramrapport	54
Fuld rapport	56
SNP Overview Report (oversigtsrapport).	57
Administrer instrumentmetoder	58
Metodeparametre	58
Almene råd og tips	59
Validering af analyser	59
Analyse-log	59
Beskyttelse af filer	59
Beskyttelse af analyseresultater	59
Fejlsøgning	60
Appendiks A: Meddelelser i PyroMark Q24 MDx-software	61
Referencer	72

Symboler



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



CE-mærke – i overensstemmelse med EU-direktivet vedrørende In vitro-diagnostisk medicinsk udstyr (IVD) 98/79/EU



Katalognummer



Materialenummer



Ansvarlig producent



Der henvises til de informationer, der gives i håndbogen



Vigtig oplysning

Anvendelse

PyroMark Q24 MDx-software er driftssoftwaren for PyroMark Q24 MDx, der bruges til at detektere ændringer changes i specificerede variable positioner i DNA, som kan være klinisk relevante.

PyroMark Q24 MDx er beregnet til in vitro-diagnostisk brug i Europa.

Begrænsninger ved produktanvendelsen

PyroMark Q24 MDx-software er beregnet til at blive brugt af professionelle brugere såsom teknikere og læger, der er oplært i molekylærbiologiske teknikker og betjening af PyroMark Q24 MDx-systemet.

Alle funktioner skal udføres i henhold til denne håndbog og som anvist via dialogmeddelelser, der vises på skærmen af PyroMark Q24 MDx i overensstemmelse med Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx, afhængigt af anvendelse i henhold til håndbøgerne til QIAGEN-kits, der er indikeret til anvendelse sammen med PyroMark Q24 MDx og teknisk support fra QIAGEN og inden for de grænser, der er fastlagt af de tekniske specifikationer.

Materialer til prøveklargøring før pyrosekvenseringsanalyse er ikke inkluderet i produktet.

Produktet er udelukkende beregnet til brug på PyroMark Q24 MDx.

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

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

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

Produktgaranti og tilfredshedsgaranti

QIAGEN garanterer kvaliteten af alle produkter, således som de er beskrevet i vor produktlitteratur. Køber skal afgøre produktets egnethed til dets specifikke anvendelse. Skulle et produkt ikke fungere tilfredsstillende af årsager, som ikke skyldes misbrug, ombytter QIAGEN det uden beregning eller refunderer købsprisen. Vi forbeholder os ret til at udskifte, ændre eller modificere ethvert produkt for at forbedre dets kvalitet og design. Såfremt et QIAGEN-produkt ikke opfylder forventningerne, kan man rette henvendelse til den lokale afdeling for teknisk service eller forhandleren. Vi krediterer kontoen eller ombytter produktet efter ønske. Særlige betingelser gælder for QIAGENS videnskabelige instrumenter, serviceprodukter og for produkter, der forsendes på tøris. Yderligere information fås efter anmodning.

Et eksemplar af QIAGENS vilkår og betingelser kan fås ved henvendelse og er også trykt på bagsiden af vore fakturaer. Hvis der er spørgsmål om produktspecifikationer eller -ydeevne, kontaktes QIAGENS tekniske service eller den lokale forhandler (se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Teknisk service

QIAGENS tekniske service leverer høj kvalitet og er altid til rådighed. De tekniske serviceafdelinger er bemandede med erfarne videnskabsfolk med omfattende praktisk og teoretisk erfaring inden for prøve- og analyse-teknologier og i brugen af QIAGENS produkter. Kontakt os i tilfælde af spørgsmål eller vanskeligheder vedrørende PyroMark Q24 MDx-systemet eller QIAGENS produkter generelt.

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

For teknisk service og yderligere information henvises til vort tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, eller henvendelse kan rettes til en

af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Indledning

Om denne brugervejledning

Denne brugervejledning giver informationer om PyroMark Q24 MDx-softwarens funktioner og indhold. Se *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx* for komplet information om korrekt pleje, vedligeholdelse og brug af PyroMark Q24 MDx-instrumentet og *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx* vakuum-arbejdsstation.

Denne brugervejledning beskriver funktionen af softwaren og de tilhørende værktøjer og gør det muligt for brugeren at administrere og ændre filer og analyser.

Denne brugervejledning giver informationer om PyroMark Q24 MDx-softwaren i følgende afsnit:

- Indledning
- PyroMark Q24 MDx-software
- Start softwaren
- Opsæt en AQ- eller CpG-analyse
- Opsæt en SQA-analyse
- Opsæt en kørsel
- Behandl kørslen på PyroMark Q24 MDx-instrumentet
- Analyser kørslen
- Vis, udskriv og gem analyserapporter
- Administrer instrumentmetoder
- Almene råd og tips
- Fejlfindingsvejledning

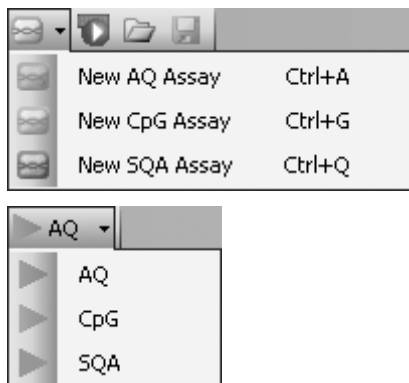
PyroMark Q24 MDx-software

PyroMark Q24 MDx-system er en komplet løsning, der omfatter instrument, vakuum-arbejdsstation, kemi og software.

De væsentligste fordele ved systemet er følgende:

- Højopløselig kvantificering af di-, tri- eller tetra-allele mutationer
- Gentypebestemmelse og kvantificering af InDels
- AQ- og CpG-analyser benytter sekvens-kontekst som indbygget kvalitetskontrol
- Analyse af methylering ved tilstedeværelse af SNP'er
- Indbygget kvalitetskontrol for biosulfitbehandling ved methyleringsanalyser
- Base-kald med kvalitetsvurdering

Analyseformer



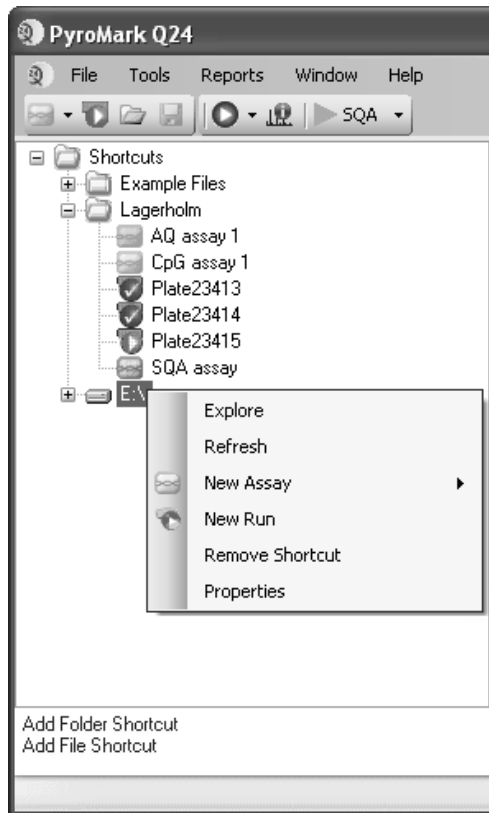
PyroMark Q24 MDx-software har tre analyseformer:

- AQ: En variant af kvantificeringsundersøgelser og gentypeanalyse af SNP'er og InDels.
- CpG: Methyleringsanalyse af flere på hinanden følgende CpG-lokaliteter.
- SQA: Base-kald af ukendte sekvenser.







De tre forskellige analysetyper kan udføres på den samme PyroMark Q24-plade. For at skifte mellem analyseformerne i analyseoversigten vælges "AQ", "CpG" eller "SQA" i værktøjslinjen.

Genvejs-browser

Genvejs-browseren er en hurtig og nem måde at få adgang til mapeindhold og almindeligt anvendte analyse- og kørselsfiler på.



Følgende ikoner anvendes til at vise oplysninger om filerne:

-  AQ-analysefil
-  CpG-analysefil
-  SQA-analysefil
-  En kørselsfil, som ikke er blevet behandlet
-  En kørselsfil, der er blevet behandlet
-  Afbrudt genvej. Dette kan skyldes, at entværksserver midlertidigt ikke er tilgængelig, eller at filen eller mappen er flyttet, omdøbt eller slettet uden for softwaren.

Tilføjelse og fjernelse af genveje, opdatering af indholdet i en mappe og visning af fil- og mappegenskaber:

- Tilføj en genvej til en mappe eller et drev ved at klikke på "Add Folder Shortcut" (tilføj genvej til mappe) eller højre klikke på mappen "Shortcuts" og vælge "Add Folder Shortcut" (tilføj genvej til mappe) i kontekstmenuen.
- Tilføj en genvej til en fil ved at klikke på "Add File Shortcut" (tilføj genvej til fil) eller højre klikke på mappen "Shortcuts" og vælge "Add File Shortcut" (tilføj genvej til fil) i kontekstmenuen.
- Fjern en genvej ved at højreklikke på genvejen og vælge "Remove Shortcut" (fjern genvej) i kontekstmenuen. (Filer og undermapper i en genvejsmappe kan ikke fjernes separat).
- Opdater indholdet af en mappe ved at højreklikke på den og vælge "Refresh" (opdater) i kontekstmenuen.
- Vis fil- eller mappe-egenskaber (f.eks. kørselsparametre) ved at højreklikke på filen eller mappen og vælge "Properties" (egenskaber) i kontekstmenuen.

Bemærk: Hvis musemarkøren er placeret over en fil i genvejs-browseren, viser et tooltip analysenoten for analysefiler og plade-ID for kørselsfiler (hvis de er indlæst).

Oprette, åbne og kopiere filer og vise kørselslog for en foretaget kørsel:

- Oprette en ny analysefil ved at højreklikke på den ønskede mappe og vælge "New Assay" (ny analyse) og den ønskede analysetype i kontekstmenuen. Indtast filnavn og tryk på "Enter". Se side 19 (AQ eller) eller side 31 (SQA) for at opsætte analysen.
- Opret en ny kørselsfil ved at højreklikke på den ønskede mappe og vælge "New Run" (ny kørsel) i kontekstmenuen. Indtast filnavn og tryk på "Enter". Se side 34 for at opsætte kørslen.

Kopier en behandlet kørselsfil og kør den igen ved at højreklikke på kørselsfilen og vælge "Copy and rerun" ('kopier og kør igen) i kontekstmenuen.

Bemærk: Det er kun kørselens opsætning, ikke kørslen og analysedata, der kopieres.


- Kopier en fil ved at højreklikke på den mappe, der indeholder filen, og vælge "Explore" (undersøge) i kontekstmenuen. Windows® Explorer åbnes. For yderligere oplysninger trykkes på "F1" tasten for at åbne online-hjælp for Windows Explorer.


Bemærk: For at undgå at miste data må man ikke kopiere en fil, der er åben i PyroMark Q24 MDx-software.

- Åbn en fil ved at dobbeltklikke på den eller højreklikke på filen og vælge "Open" (åbn) i kontekstmenuen. For at åbne en behandlet kørsel vælges "Open with" (åbn med) efterfulgt af den ønskede analyseform ("AQ", "CpG" eller "SQA").
- Vis kørselsparametre og en kørsels-log for en behandlet kørselsfil ved at højreklikke på filen og vælge "Run Information" (kørselsinformation) i kontekstmenuen.

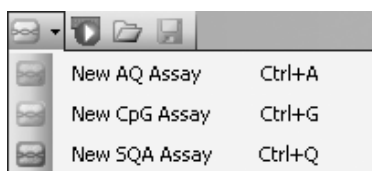
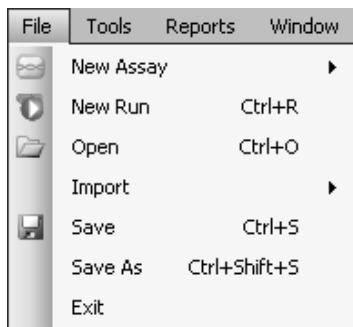
Hovedmenu og værktøjslinjer

Filmenu og værktøjslinjer

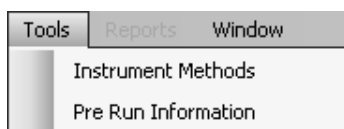
Vælg "New Assay" eller klik på  i værktøjslinjen og vælg den ønskede analyse for at oprette en ny analysefil. Se side 19 (AQ eller CpG) eller side 31 (SQA analyse) for at opsætte analysen.

Vælg "New Run" eller klik på knappen  i værktøjslinjen for at oprette en ny kørselsfil. Se side 34 for at opsætte kørslen.

Vælg "Open" eller klik på knappen  i værktøjslinjen for at



Værktøjsmenu for ubehandlede kørselsfiler




Værktøjsmenu for behandlede kørselsfiler

åbne en gemt analyse eller kørselsfil.

Vælg "Create New Run from Sample Layout File" (opret ny kørsel ud fra prøve-layoutfil) i undermenuen "Import" for at oprette en ny kørsel ved hjælp af et plade-layout for prøve-ID'er og noter (valgfrit) defineret i en tab- eller komma-separeret tekstfil (*.tsv, *.txt eller *.csv); se side 39.


Vælg "Create New AQ/CpG Assay from Assay Design File" (opret ny AQ/CpG-analyse ud fra analyse-designfil) i undermenuen "Import" for at oprette en ny AQ- eller CpG-analyse baseret på en analysefil (*.xml) oprettet med PyroMark Assay Design Software. Softwaren vil importere den sekvens, der skal analyseres, og navnene på de variable positioner.

Vælg "Save" (gem) eller klik på  i værktøjslinjen for at gemme ændringerne i den aktuelle fil. Hvis filen aldrig er blevet gemt, vælges pladsen, og filnavnet indlæses i den dialogboks, der åbnes.


Vælg "Save As" (gem som) for at gemme en kopi af den aktuelle fil. Vælg plads og indlæs filnavnet i den dialogboks, der åbnes.

Vælg "Exit" (forlad) for at lukke softwaren ned.

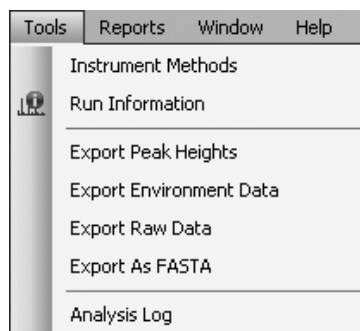
Vælg "Instrument Methods" (instrumentmetoder) for at se indstillingerne for instrumentmetoderne og øm nødvendigt importere eller opsætte nye metoder i henhold til de indstillinger, der leveres af QIAGEN (se Administration af instrumentmetoder, side 58).

Vælg "Pre Run Information" (Information før kørslen) for at få vist pladeopsætning og en liste over de nødvendige voluminer af enzymblanding, substratblanding og nukleotider for den aktuelle kørselsfil. Rapport udskrives ved at klikke på .

Bemærk: For at udskrive "Pre Run Information" rapporten i farver, tilvælges muligheden "Print background colors and images" (udskriv baggrundsfarver og billeder) i Internet Explorer ("Funktioner/Internetindstillinger/Avanceret/Udskrivning").

Vælg "Run Information" (kørselsinformation) for at få vist kørselsparametrene og en kørsels-log for den aktuelle kørselsfil. Rapport udskrives ved at klikke på .

Vælg "Export Peak Heights" (eksporter spidshøjder) for at



gemme spidshøjderne for alle anvendte brønde som tekstfil.

Vælg "Export Environment Data" (eksporter miljødata) for at gemme mixer-hastighed, bloktemperatur og trykaflæsninger som tekstfil. De omgivende temperaturer, proceskammerlåget og køleren er også med på listen.

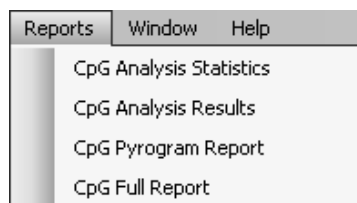
Vælg "Export Raw Data" (gem rå data) for at gemme intensiteter og dispenseringsdata som tekstfil.

Vælg "Export As FASTA" (eksporter som FASTA) for at gemme base-kaldte sekvenser i FASTA-format (kun SQA-analyser). I den dialogboks, der åbnes, vælges de brønde, der skal inkluderes (alle eller udvalgte), sorteringsrækkefølgen for brændene (række eller kolonne) samt baserne i de sekvenser, der skal inkluderes (alle, godkendte, godkendte + check eller kun kvalitetskontrolvindue).

Vælg "Analysis Log" (analyse-log) for at få vist eller gemme log'en med alle analyser, der er udført på den valgte brønd, som en HTML-fil. Hver enkelt analyse logges med de anvendte analyseindstillinger, analyseform (AQ, CpG eller SQA), analyseversion, resultater (inklusive advarsler), dato og klokkeslæt samt hvilken Windows-brugerkonto, der er benyttet til at udføre analysen (se Almene råd og tips, side 59).

Tekstfiler (*.tsv eller *.csv) kan importeres til Microsoft® Excel® eller andre applikationer, der kan håndtere data, der er separeret med semikolon (;) eller tabs. Dette er nyttigt, hvis der skal foretages yderligere beregninger på dataene.

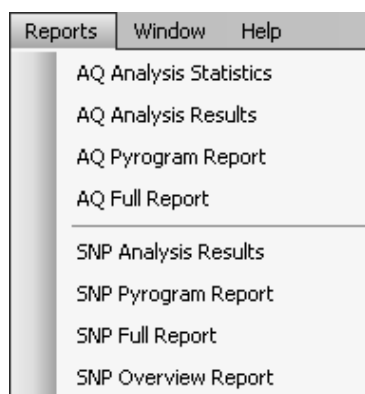
Rapportmenu for CpG-kørsler



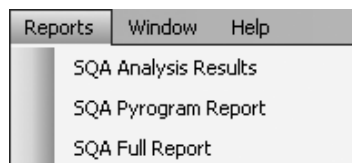
Rapporten "Analysis Statistics" (analysestatistik) indeholder analysestatistikker for alle eller udvalgte brønde.

Rapporten "Analysis Results" (analyseresultater) indeholder brøndinformation og analyseresultater for alle eller udvalgte brønde.

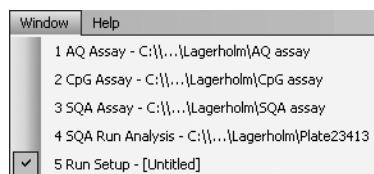
Rapportmenu for AQ-kørsler



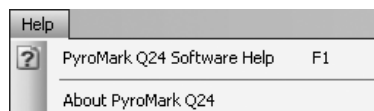
Rapportmenu for SQA-kørsler



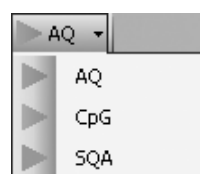
Window-menu



Help-menu



Analyse-værktøjslinje



“Pyrogram Report” (pyrogramrapport) indeholder brøndinformation og Pyrogram[®] for alle eller udvalgte brønde.

“Full Report” (fuldstændig rapport) indeholder parametre, kørselslog, brøndinformation og analyseresultater (inklusive pyrogram) for alle eller udvalgte brønde.


“SNP Overview Report” (SNP oversigtsrapport) indeholder genotyper og kvalitetsvurderinger for alle SNP'er og InDels. Informationen vises som pladeoversigter med en plade per positionsnummer.



Rapportmulighederne er kun tilgængelige for behandlede kørsler. For yderligere information om rapporter, se side 50.

Bemærk: For at kunne se de rapporter, der genereres, i PDF-format skal der være installeret en PDF-læser på computeren. Adobe[®] Reader[®] kan downloades fra www.adobe.com.

Skift mellem åbne filer i softwaren via “Window”-menuen.

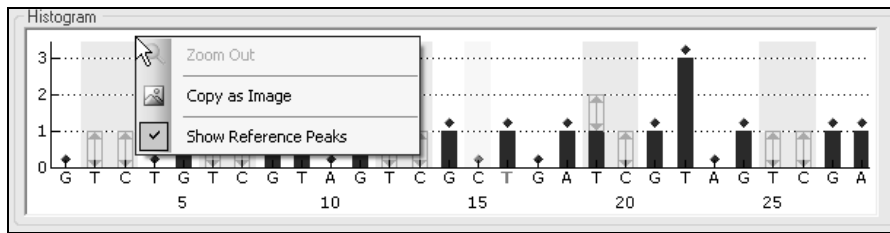
Vælg “PyroMark Q24 Software Help” eller tryk på “F1”-tasten for at åbne denne brugervejledning.

Klik på  og vælg “Analyze All Wells” (analyser alle brønde) eller “Analyze Selected Wells” (analyser udvalgte brønde) (se Vælg brønde, side 18) for aktuelle kørselsfil.

Klik på  for at få vist kørselsparametrene og en kørselslog for den aktuelle kørselsfil. Rapport udskrives ved at klikke på .

For at skifte mellem analyseformerne vælges “AQ”, “CpG” eller “SQA” i værktøjslinjen.

Histogram



Histogram der viser et teoretisk CpG-analyseresultat.

Ved opsætning af en AQ- eller CpG-analyse vises den teoretiske fremstilling af det forventede Pyrosequencing® spidsmønster i "Histogram" området. Følgende ikoner og farver anvendes i histogrammet:

- Variable positioner fremhæves med en blågrå baggrundsfarve.
- Ved visning af referencespidser vises der blå ruder over referencespidserne
- Bisulfitbehandlingskontroller fremhæves med en gul baggrundsfarve. Ved visning af referencespidser vises der orange ruder over bisulfitbehandlingskontrollerne (kun CpG-analyser).

Zoom-histogram

Det er muligt at zoome ind på histogrammet ved at vælge en del af det med venstre museknop.

Zoom ud ved enten at højreklikke i histogram-området og vælge "Zoom Out" i kontekstmenuen (zoom indstilles til det foregående niveau) eller ved at dobbeltklikke i histogram-området (zoom sættes til 100 %).

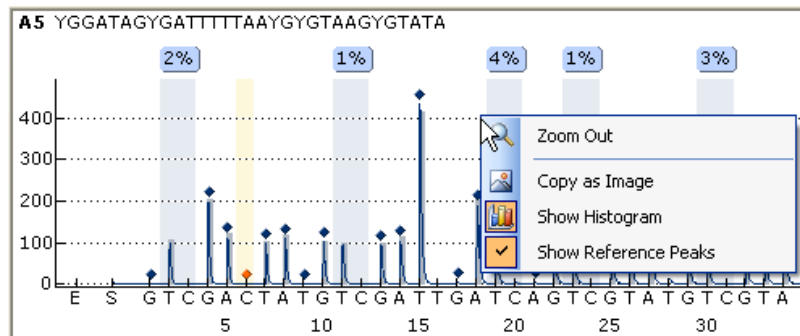
Eksporter histogrammet som billede

Histogrammet kan kopieres som billede til udklipsholderen ved at højreklikke på histogrammet og vælge "Copy as image" (kopier som billede) i kontekstmenuen. Billedet kan klistres ind i applikationer, der understøtter Enhanced Metafile (EMF)-billeder.

Pyrogram

Pyrogrammet er den graf, der er resultatet af en sekvenseringsreaktion udført med pyrosekvenseringsteknologi. Inkorporerede nukleotider vises som spidser i pyrogrammet.

AQ- og CpG-analyser



Følgende informationer, ikoner og farver vises og anvendes i pyrogramområdet for en AQ- eller CpG-analyse:

- Brøndnavnet og den sekvens, der skal analyseres, vises i det øverste venstre hjørne.
 - Analyseresultatet (allelfrekvenserne eller metyleringsprocenten) vises over den enkelte variabelposition, for eksempel

TT	56%
AT	44%

 (InDel) og

96%

. Kvalitetsvurderingen vises af resultatets baggrundsfarve; se farveoversigten på side 45. Hvis en kvalitetsvurdering er blevet redigeret af brugeren, vises dette ved en kant omkring analyseresultatet, for eksempel

44%

. Hvis musemarkøren er placeret over analyseresultatet, viser et tooltip positionsnummeret og analyseadvarslene.
- Bemærk:**

--

 (i hvidt) = Fravalgt af brugeren.

N/A

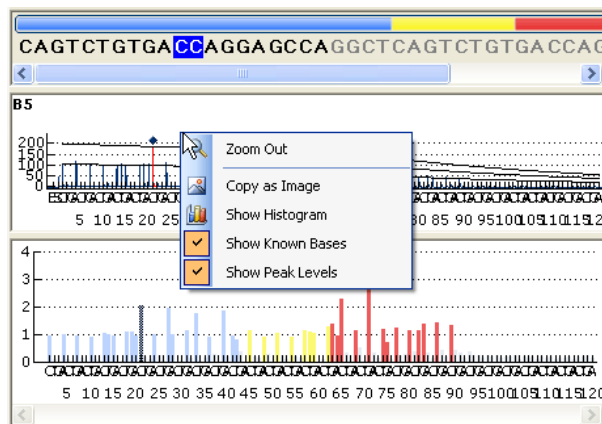
 (i hvidt) = Softwaren understøtter ikke analyse, for eksempel analyse af SNP i CpG-funktion.

N/A

 (i rødt) = Ikke muligt at analysere på grund af manglende data.
- Variable positioner fremhæves med en blågrå baggrundsfarve.
 - Ved visning af referencespidser vises der blå ruder over referencespidserne
 - Bisulfitbehandlingskontroller fremhæves med en lysgul baggrundsfarve. Ved visning af referencespidser vises der orange ruder over bisulfitbehandlingskontrollerne (kun CpG-analyser).
 - Højden af en spids vises ved at placere musemarkøren over toppen af spidsen. Et tooltip viser højden.
 - Når histogrammet vises, vises histogrammet i gråt over spidserne. Det vises bedst, når der er zoomet ind.

Bemærk: Når der højreklikkes på Pyrogram-området, er det muligt at skifte mellem at vise og skjule histogrammet og referencespidserne.

SQA-analyser



Når der vises en base i den base-kaldte sekvens, fremhæves den tilsvarende spids i begge pyrogramområder og vice versa.

Følgende informationer, ikoner og farver vises og anvendes i pyrogramområdet for en SQA-analyse:

- Brøndnavnet vises i det øverste venstre hjørne.
- Højden af en spids vises ved at placere musemarkøren over toppen af spidsen. Et tooltip viser højden.
- Når histogrammet vises, vises et kompenseret pyrogram i gråt over spidserne i pyrogrammet. Det vises bedst, når der er zoomet ind.
- Ved visning af kendte baser er spidser med kendte baser markeret med blå ruder i pyrogrammet.
- Ved visning af spidsniveauer er beregnede spidsniveauer vist i pyrogrammet.
- I det kompenserede pyrogram i det nederste område er spidserne farvet efter deres kvalitetsvurderinger (se farveoversigt, side 45).

Bemærk: Når der højreklikkes på Pyrogram-området, er det muligt at skifte mellem at vise og skjule histogrammet, kendte baser og spidsniveauer.

Zoom Pyrogram

Det er muligt at zoome ind på pyrogrammet ved at vælge en del af det med venstre museknap.

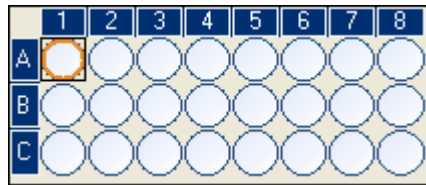
Zoom ud ved enten at højreklikke i pyrogram-området og vælge "Zoom Out" i kontekstmenuen (zoom indstilles til det foregående niveau) eller ved at dobbeltklikke i pyrogram-området (zoom sættes til 100 %).

Eksporter Pyrogram som billede

Pyrogrammet kan kopieres som billede til udklipsholderen ved at højreklikke på pyrogrammet og vælge "Copy as image" i kontekstmenuen. Billedet kan klistres ind i applikationer, der understøtter Enhanced Metafile (EMF)-billeder.

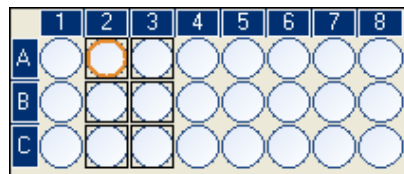
Vælg brønde

For at vælge en enkelt brønd klikker man blot på den.

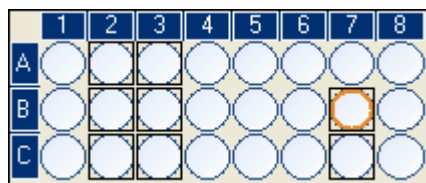


For at vælge en rektangulær gruppe af brønde, for eksempel A2-A3, B2-B3 og C2-C3:

- Tryk på venstre museknap og hold den nede, mens musemarkøren trækkes fra brønd A2 til C3 eller
- Vælg brønd A2 og tryk på "Shift"-tasten og hold den nede, mens brønd C3 vælges, eller
- Vælg brønd A2 og tryk på "Shift"-tasten og hold den nede, mens der trykkes en gang på højre piltast og to gange på piltast ned.



Tryk på "Ctrl"-tasten og hold den nede, mens brøndene vælges, for at tilføje brønde til ovenstående valg, for eksempel brøndene B7 og C7.



For at fravælge en brønd trykkes "Ctrl"-tasten ned og holdes nede, mens brønden vælges.

Bemærk: Hvis der vælges flere brønde i pladen, vises informationen for brønden med den orange valgramme (i analysevisning) i området "Well Information" (brøndinformation) etc.

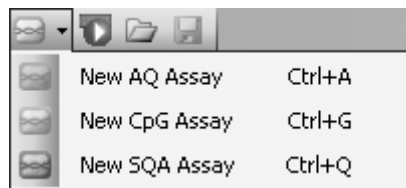
Start softwaren


I Windows "Start" menu vælges "(All) Programs/PyroMark/PyroMark Q24".

Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx-software (denne publikation) kan når som helst nås ved at trykke på "F1" tasten inde fra softwaren.

Opsæt en AQ- eller CpG-analyse


Arbejdsgang



1. Klik på "New Assay"  i værktøjslinjen og vælg "New AQ assay" (ny AQ-analyse) eller "New CpG Assay" (ny CpG-analyse). Der oprettes en ny analysefil.
2. Indlæs den sekvens, der skal analyseres (se side 20).
3. Klik på knappen "Generate Dispensation Order" (generer dispenseringsrækkefølge) (se side 22).
4. Valgfrit: Hvis der oprettes en CpG-analyse, indlæses "Sequence Before Bisulfite Treatment" (sekvens før bisulfitbehandling). Denne information er nyttig ved tilsætning af bisulfitbehandlingskontroller.
5. Anbefalet: Hvis der oprettes en CpG-analyse, tilsæt da bisulfitbehandlingskontroller, helst i begyndelsen af sekvensen (se side 24).
6. Valgfrit: Indlæs information om analysen i tekstboksen "Assay Note" (analysenote).
7. Valgfrit: Opsæt variabelpositioner (se side 24).
8. Før prøverne køres, skal analysen valideres ved hjælp af en reference DNA-prøve (se Appendix B i *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx*).
9. Valgfrit: Hvis det er aktuelt redigeres analyseparametrene under analysevalideringen, se side 26).
10. Valgfrit: Lås analysen for redigering ved at klikke på knappen "Lock Assay" (lås analyse) nederst i analyseopsætningsvinduet. En låst analyse (🔒), der er kørt på PyroMark Q24 MDx-instrumentet, kan ikke låses op (dvs. det vil ikke være muligt at redigere analyseparametre eller resultater efter, at analysen er blevet behandlet).

Bemærk: I genvejsoversigten kan man oprette en ny analysefil ved at højreklikke på den mappe, hvor man ønsker at placere den og vælge "New Assay" efterfulgt af "AQ Assay" eller "CpG Assay" fra kontekstmenuen. Indtast filnavn og tryk på "Enter". For at tilføje en genvej til en mappe eller et drev klikkes på "Add Folder Shortcut".

Bemærk: Ved at placere musemarkøren over analysefilen kan en analysenote blive vist i et tooltip i genvejsoversigten.

Bemærk: Klik på  i værktøjslinjen for at gemme filen. Hvis filen aldrig er blevet gemt, vælges pladsen, og filnavnet indlæses i den dialogboks, der åbnes.

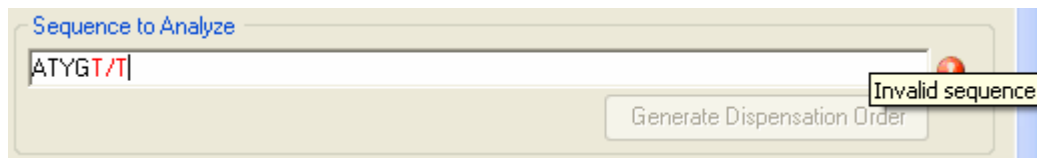
Indlæs den sekvens, der skal analyseres

Indtast eller klistre ind ("Ctrl + V") den sekvens, der skal analyseres i tekstboksen "Sequence to Analyze". Hvis der oprettes en CpG-analyse, indlæses sekvensen efter bisulfitbehandlingen.

Følgende regler gælder ved indlæsning af DNA-sekvens i softwaren:

- De tilladte tegn for indlæsning af sekvens er A, C, G og T samt IUPAC-koder.
- Variable positioner kan indlæses enten ved hjælp af IUPAC-koderne eller en skråstreg (/) som skilletegn mellem de to potentielle baser (f.eks. C/T).
- InDels skal indlæses i kantet parentes "[]" (f.eks. [AT]).
- Sekvensen må ikke indeholde mere end 400 tegn eller 100 variable positioner.
- Variable positioner, der involverer en kombination af SNP'er og InDels skal indlæses ved hjælp af en kombination af "/" eller IUPAC-koder og "[]". For eksempel repræsenterer [T/A] eller [W] en tri-allel polymorfisme, hvor de mulige alleler er et T, et A eller hverken eller (sletning).
- Det er ikke muligt at have en kombination af en SNP og konstante baser inden for en InDel (f.eks. [A/TC]).
- Indlejrede InDels understøttes ikke (f.eks. [ATT[C]G]).

Hvis den sekvens, der skal analyseres, indeholder en fejl, vises dette med et rødt udråbstegn i slutningen af tekstboksen. Placer musemarkøren over udråbstegnet, så vil et tooltip vise en forklaring af fejlen. Det eller de tegn, der forårsagede fejlen, vil være markeret med rødt i den sekvens, der skal analyseres.



Da T/T ikke er en gyldig variabel position, giver den en "Invalid sequence" (ugyldig sekvens)-fejl.

Bemærk: Hvis der skal analyseres "ikke-standard" methyleringsmønstre, for eksempel methyleringer af C'er, der ikke efterfølges af G'er, kan disse mønstre analyseres i AQ-funktion. For at analysere i CpG-funktion indlæses ekstra G'er i tekstboksen "Sequence to Analyze", og højden af de ekstra G'er sættes til nul (0); se Juster højden af histogram søjler, side 30.

IUPAC-koder

Kode	Beskrivelse	Kode	Beskrivelse
A	Adenin	W	T eller A
C	Cytosin	S	C eller G
G	Guanin	B	C, T eller G (ikke A)
T	Thymin	D	A, T eller G (ikke C)
R	Purin (A eller G)	H	A, T eller C (ikke G)
Y	Pyrimidin (C eller T)	V	A, C eller G (ikke T)
M	C eller A	N	Enhver base (A, C, G eller T)
K	T eller G		

Bemærk: S, B, V og N er ikke gyldige efter bisulfitbehandling.

Gyldige mønstre i en CpG-analyse

Mønstre, der ikke kan eksistere efter bisulfitbehandling, er ikke gyldige i en CpG-analyse. For eksempel er GC/TGAC/G ikke gyldig, da C/TG er et fremadgående CpG-område, og C/G kan ikke eksistere efter bisulfitbehandling.

Følgende CpG-område og SNP'er kan ikke inkluderes i en fremadgående analyse:

- CpG-plads: C/TG
- SNP'er: A/T, A/G, G/T og A/T/G (dvs. C kan ikke inkluderes).

Følgende CpG-plads og SNP'er kan inkluderes i en bagudgående analyse:

- CpG-plads: CG/A
- SNP'er: A/T, A/C, C/T og A/T/C (dvs. G kan ikke inkluderes).

Bemærk: Softwaren understøtter ikke analyse af CpG-områder, der inkluderer en ekstra variabel position, for eksempel A/C/TG. Disse former for SNP'er kan analyseres ved at skrive C/TG i tekstboksen "Sequence to Analyze" og ATCG i tekstboksen "Dispensation Order". Fortsæt med kørslen som sædvanlig. Efter analyse af CpG-områderne skiftes til AQ-funktion, og C/TG ændres til A/C/TG (i tekstboksen "Sequence to Analyze"), analyser dernæst den variable position. På samme måde kan C/TG/A analyseres ved at skrive C/TG i tekstboksen "Sequence to Analyze" og TCGA i tekstboksen "Dispensation Order". Efter analyse af CpG-områderne skiftes til AQ-funktion, og C/TG ændres til C/TG/A (i tekstboksen "Sequence to Analyze"), og den variable position analyseres.

Generer dispenseringsrækkefølge

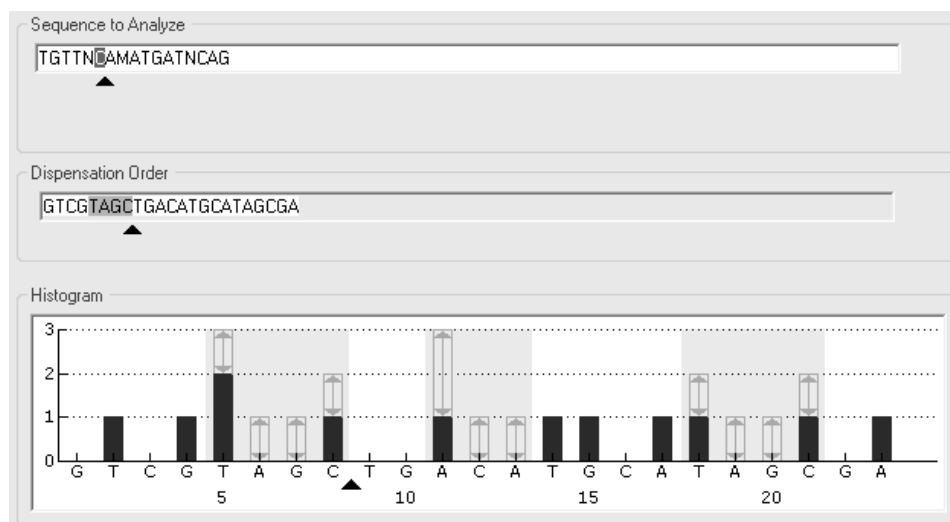
En dispenseringsrækkefølge for den indtastede sekvens, der skal analyseres, genereres af softwaren ved at klikke på knappen "Generate Dispensation Order". Den genererede dispenseringsrækkefølge inkluderer tomme dispenseringsrækker for at sikre, at den korrekte sekvens er nået.

Ced oprettelse af CpG-analyser skal dispenseringsrækkefølgen også inkludere bisulffitbehandlingskontroller. Disse kontroller skal tilføjes manuelt af brugeren efter, at dispenseringsrækkefølgen er genereret (se side 24).

Hvis det ønskes, kan dispenseringsrækkefølgen indtastes eller justeres manuelt.

Bemærk: Ved klik på "Generate Dispensation Order" vil en eventuel eksisterende dispenseringsrækkefølge blive overskrevet.

Bemærk: Når der vælges en baseposition i den sekvens, der skal analyseres, fremhæves den tilsvarende dispenserering med en grå baggrundsfarve og vice versa.



Pilen i den sekvens, der skal analyseres, dispenseringsrækkefølgen og histogrammet viser markørens position.

Bemærk: Hvis den sidste variable position i sekvensen, der skal analyseres, er en lang InDel, vil dispensering ikke ske, før der er fundet tre variabelspidser og forudsat at kravet om fem referencespidser er opfyldt. For at dispensere hele InDel tilføjes en variabel position efter InDel, eller dispenseringsrækkefølgen justéres manuelt.

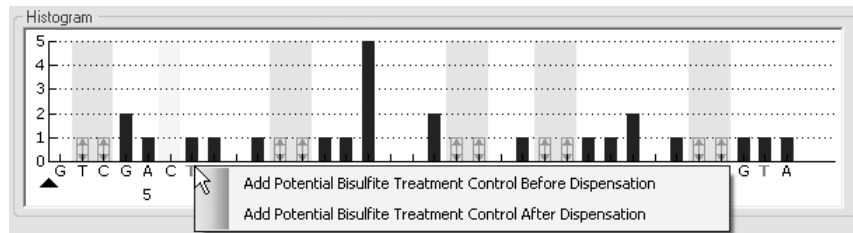
Bemærk: Hvis det ikke er muligt at få sekvensen i fase, før 32 alleler er dispenseret, vil dispenseringsrækkefølgen ikke blive gennemført. For eksempel vil sekvensen ACTCDDDDG have dispenseringsrækkefølgen ACTC, idet de fire D-polymorfismer vil generere en strækning uden for fase over for mange alleler.

Dispenseringsadvarsler

Hvis dispenseringsrækkefølgen indeholder en advarsel, vises det med et rødt udråbstegn ● i slutningen af tekstboksen "Dispensation Order". Det er muligt at køre en analyse med en dispenseringsadvarsel, men der skal tages hensyn til advarslen ved evaluering af analyseresultatet. Hvis man placerer musemarkøren over udråbstegnet, så vil et tooltip vise en forklaring af advarslen.

ADVARSEL	Foreslået handling
Sekvens usikker på grund af manglende terminalsekvensinformation.	Problemet kan løses ved enten at indlæse mere sekvensinformation eller reducere antallet af dispenseringer.
Sekvens ikke i fase i slutningen af dispenseringerne.	Problemet kan løses ved at justere dispenseringsrækkefølgen (manuelt eller ved at klikke på "Generate Dispensation Order") eller indlæse mere sekvensinformation. Bemærk: Hvis problemet ikke løses, vil den strækning, der ikke er i fase, ikke blive analyseret.
Den genererede dispenseringsrækkefølge indeholder færre referencespidser end nødvendigt.	Indlæs om muligt mere sekvensinformation og forøg antallet af dispenseringer. For den bedst mulige kvalitetsvurdering af resultaterne anbefales fem eller flere referencespidser med højden 1, 2 eller 3.

Tilføj eller fjern bisulfitbehandlingskontroller (CpG-analyse)



CpG-analyser bør indeholde mindst en intern kontrol til vurdering af gennemført bisulfitbehandling, helst i begyndelsen af sekvensen. C-baser, der ikke følges af G i sekvensen, er i reglen ikke methylerede og bør derfor konverteres fuldt ud til T efter bisulfitbehandling og PCR. Som følge af en vellykket bisulfitbehandling bør alle skabeloner kun vise T'er, ingen C'er i disse positioner. Ved omvendte analyser bør alle skabeloner kun vise A'er, ikke G'er, i disse positioner.

De potentielle positioner for bisulfitbehandlingskontroller vises med et fedt, orange bogstav i histogrammet: **T** i en fremadrettet analyse og **A** i en bagudrettet analyse.

En bisulfitbehandlingskontrol kan tilføjes ved at venstreklikke på det fede, orange **T** eller **A** og vælge den ønskede mulighed i kontekstmenuen. Den kan også tilføjes manuelt ved at tilføje et C før eller efter et T i dispenseringsrækkefølgen.

En bisulfitbehandlingskontrol kan fjernes ved at venstreklikke på kontrollen (C i en fremadrettet analyse eller G i en bagudrettet analyse) og vælge "Remove Bisulfite Control" (fjern bisulfitkontrol) i kontekstmenuen.

Bemærk: I sekvensen før bisulfi-behandlingen skal det kontrolleres, hvorvidt de foreslåede bisulfitbehandlingskontroller er C'er konverteret til T'er (læs som G'er og A'er i en bagudrettet analyse) og hvorvidt de er egnede som kontroller.

Opstil de variable positioner

De variable positioner kan opstilles under fanen "Variable Positions" (Variable positioner). De tilgængelige parametre er angivet nedenfor.

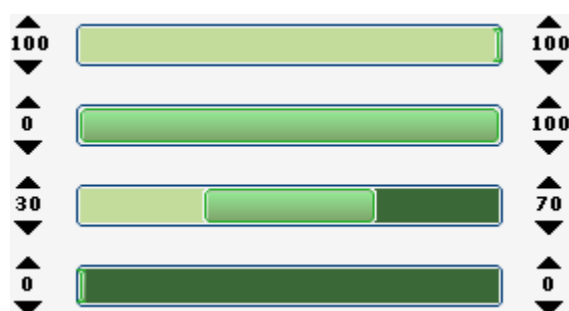
Bemærk: Hvis den sekvens, der skal analyseres, er ændret (og en ny dispenseringsrækkefølge er genereret), nulstilles de variable positionsparametre til deres standardværdier.

Position	Placeringen af den variable position i sekvensen, der skal analyseres, regnet fra venstre til højre.
----------	--

Navn	Navnet på den variable position. For at ændre navnet vælges enten tekstboksen (det aktuelle indhold vil blive valgt), eller der dobbeltklikkes på tekstboksen.
Type	Typen af variabel position; SNP, InDel eller CpG-plads.
Analysere	Hvis denne mulighed er markeret, vil den variable position blive analyseret. Bemærk: Denne mulighed er ikke tilgængelig for variable positioner, der ikke kan analyseres for den aktuelle analysetype.
Metyleringsområder (kun CpG-analyser)	<p>Den forventede CpG-metylering. Indstilling af denne parameter for alle CpG-pladser muliggør nem identifikation af pladser (i analyseresultater), der ligger uden for det forventede metyleringsområde:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Det lysegrønne område er under det forventede område. ■ Det grønne område er inden for det forventede område. ■ Det mørkegrønne område er over det forventede område. <p>Bemærk: Den forventede methylering kan ikke indstilles for CpG-pladser med muligheden "Analyze" umarkeret.</p> <p>Det forventede område kan flyttes til venstre eller højre ved at holde venstre museknap nede og flytte området med musen.</p> <p>Pilene kan bruges til at øge eller mindske det forventede område. Man kan også øge eller mindske det forventede område ved at:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Placere musemarkøren over den venstre eller højre ende af det grønne område, så markøren ændres fra en hvid pil til ⇨ 2. Holde venstre museknap nede og flytte musen til venstre eller højre. <p>Alle metyleringsområder kan redigeres samtidigt ved at holde "Shift"-knappen nede samtidigt med, at</p>

et af områderne ændres.

Eksempler på metyleringsområder



1. Forventet methylering = 100 %.
2. Forventet methylering = 0–100 %.
3. Forventet methylering = 30–70 % (standard)
4. Forventet methylering = 0 %

Klik på "Revert to Default" (sæt tilbage til standard) for at sætte parametrene i fanen "Variable Positions" og fanen "Analysis Parameters" tilbage til deres standardværdier.

Redigere analyse-parametre

Standard-analyseindstillingerne er indstillet til at give optimale analyseresultater for de fleste analyser. Hvis det er aktuelt under analysevalideringen kan resultaterne forbedres ved at redigere analyseparametrene:

- Analyseparametrene redigeres under fanen "Analysis Parameters"; se nedenfor.
- Aktivering og deaktivering af referencespids og bisulfitbehandlingskontroller (kun CpG-analyser); se side 30.
- Justering af højderne op histogram søjlerne; se side 30.
- Aktivering og deaktivering af variable positioner og/eller ændring af forventede metyleringsområder (kun CpG-analyser), se Opstilling af de variable positioner, side 24.

Kontroller, at ændringerne er validerede; se Appendiks B i *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx*.

Bemærk: Ved brug af QIAGEN-kits anvendes de indstillinger, der er angivet i kit-håndbøgerne.

Bemærk: Alle gemte ændringer logges. For at se en ændringslog for en analyse åbnes analysefilen, klik dernæst på "Show Change Log" (vis ændringslog).

Analyseparametrene redigeres under fanen "Analysis Parameters"

Følgende analyseparametre kan redigeres under fanen "Analysis Parameters".

Ikke gennemført bisulfitbehandling (kun CpG-analyser)

Disse parametre angiver de højeste accepterede procentdele af ukonverteret sekvens for at opnå kvalitetsvurderingen "Passed" (godkendt) og kvalitetsvurderingen "Check" (kontroller) for CpG-pladser. De indlæste værdier sammenlignes med den enkelte spidshøjdeværdi, som analysealgoritmen fastlægger.

Tilladt procentdel for godkendt kvalitet

De højeste accepterede procentdele af ukonverteret sekvens for at opnå kvalitetsvurderingen "Passed" for CpG-pladser.

Standardværdien er 5 %.

Bemærk: Værdien kan ikke være højere end den tilladte procentdel for kontrolkvalitetsværdi (se nedenfor).

Tilladt procentdel for kontrolkvalitet

De højeste accepterede procentdele af ukonverteret sekvens for at opnå kvalitetsvurderingen "Check" for CpG-pladser. Advarslen "Uncertain bisulfite conversion at dispensation: *number(s)*" (Usikker bisulfitkonvertering ved dispensering: nummer/re) udløses under analysen.

Bemærk: Denne regel anvendes kun, hvis reglen for "Passed" kvalitet ikke er opfyldt.

En højere procentdel af ukonverteret sekvens end den indstillede værdi vil resultere i en "Failed" (ikke-godkendt) kvalitetsvurdering for alle CpG-pladser. Advarslen "Failed bisulfite conversion at dispensation: *number(s)*" (Ikke godkendt bisulfitkonvertering ved dispensering; nummer/re) udløses under analysen.

Standardværdien er 7 %.

Bemærk: Værdien kan ikke være lavere end værdien "Allowed percentage for passed quality" (tilladt procentdel for godkendt kvalitetsværdi) (se ovenfor).

Spidshøjdetærskel

Disse parametre definerer den laveste intensitetsgrænse for det enkelte spidshøjdeniveau i begyndelsen af pyrogrammet.

Påkrævet spidshøjde for godkendt kvalitet	Minimum signalværdi for at en spids kan opnå kvalitetsbedømmelsen "Passed" for de variable positioner.
	Standardværdien er 20.
	Bemærk: Værdien kan ikke være lavere end værdien "Required peak height for check quality" (påkrævet spidshøjde for kontrolkvalitet) (se nedenfor).
Påkrævet spidshøjde for kontrolkvalitet	Minimum signalværdi for at en spids kan opnå kvalitetsbedømmelsen "Check" for de variable positioner. Advarslen "Uncertain due to low peak height" (Usikker på grund af lav spidshøjde) udløses under analysen.
	Bemærk: Denne regel anvendes kun, hvis reglen for "Passed" kvalitet ikke er opfyldt.
	Standardværdien er 10.
	En signalværdi for en spids, som er lavere end den indstillede værdi, vil medføre kvalitetsvurderingen "Failed" for de variable positioner. Advarslen "Failed due to low peak height" (Ikke-godkendt på grund af lav spidshøjde) udløses under analysen.
	Bemærk: Værdien kan ikke være højere end værdien "Required peak height for passed quality" (påkrævet spidshøjde for godkendt kvalitet) (se ovenfor).
Stringensniveauer	Stringensen i advarslerne om "Pattern deviation in variable positions" (mønsterafvigelser i variable positioner) og "Sum deviation in variable positions" (sumafvigelse i variable positioner) kan sættes til "Low" (lav), "Normal" (standard) eller "High" (høj). Et højt stringensniveau indsnævrer den tilladte afvigelse.

Mønsterafvigelser i variable positioner	<p>Afvigelsen mellem det målte spidsmønster i variable positioner og det teoretiske spidsmønster.</p> <p>Hvis afvigelsen er højere end det indstillede stringensniveau tillader, udløses advarslen "Uncertain/Failed due to high pattern deviation in variable position" (usikker/ikke-godkendt på grund af høj mønsterafvigelse i variable positioner) under analysen. Om advarslen vil give en "Check" eller "Failed" kvalitetsvurdering for analyseresultatet afhænger af omfanget af afvigelsen.</p>
Sumafvigelse i variable positioner	<p>Afvigelsen mellem den målte sum af alle spidserne i den variable position og den teoretiske sum (baseret på den enkelte spidshøjde).</p> <p>Hvis afvigelsen er højere end det indstillede stringensniveau tillader, udløses advarslen "Uncertain/Failed due to high sum deviation in variable position" (usikker/ikke-godkendt på grund af høj sumafvigelse i variable positioner) under analysen. Om advarslen vil give en "Check" eller "Failed" kvalitetsvurdering for analyseresultatet afhænger af omfanget af afvigelsen.</p>

Parametre

A-spidsreduktionsfaktor	<p>Den faktor, hvormed A-spidsintensiteterne multipliceres for at tage højde for, at A-spidser er højere end andre spidser.</p> <p>Standardværdien er 0,90.</p>
-------------------------	---

Klik på "Revert to Default" for at sætte parametrene i fanen "Variable Positions" og fanen "Analysis Parameters" tilbage til deres standardværdier.

Aktivering eller deaktivering af referencespidser og bisulfitbehandlingskontroller.

Ikke-variable spidser (dvs. spidser, der ikke er en del af en variabel position) (inklusive tomme dispenseringer) kaldes "reference peaks" (referencespidser). Referencespidser anvendes i analysen både som referencer ved beregning af det enkelte spidshøjdeniveau og som interne kontroller ved vurdering af kvaliteten. For den bedst mulige kvalitetsvurdering af resultaterne anbefales det, at de referencespidser, der genereres af softwaren, bevares aktiverede.

Ved at klikke på en referencespids-rude i histogrammet vil spidsen enten blive aktiveret eller deaktiveret som referencespids, afhængigt af den foregående status. Ruden viser status:

- Udfyldt blå rude: Aktiveret som referencespids.
- Tom blå rude: Deaktiveret som referencespids.

Ved at venstreklikke på en bisulfitbehandlingskontrolrude (kun CpG-analyser) vil kontrollen enten blive aktiveret eller deaktiveret som kontrol og/eller referencespids, afhængigt af den foregående status. Ruden viser status:


- Udfyldt orange rude: Aktiveret både som bisulfitbehandlingskontrol og som referencespids.
- Udfyldt blå rude: Aktiveret referencespids, men deaktiveret som bisulfitbehandlingskontrol.
- Tom orange rude: Deaktiveret både som bisulfitbehandlingskontrol og som referencespids.

Placer musemarkøren over ruden, så vil et tooltip beskrive følgerne af et klik.

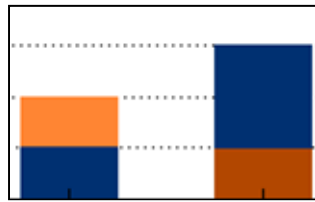
Bemærk: For at skifte mellem at vise og skjule referencespidserne i histogrammet højreklikkes på histogrammet, vælg dernæst "Show Reference Peaks" (vis referencespidser) i kontekstmenuen.

Justering af højderne på histogram søjlerne

Denne funktion kan bruges, når tidligere erfaringer har vist en reproducerbar afvigelse i det målte mønster i forhold til det teoretiske mønster. Benyt denne funktion med forsigtighed.

1. Tryk på "Ctrl"-tasten og hold den nede, mens der venstreklikkes på det øverste af histogram søjlen (venstreklik når markøren skifter fra en hvid pil til )
2. Indtast enten højden i tekstboksen, der åbnes, eller forøg eller formindsk højden ved hjælp af pilene ved siden af boksen.
3. For at anvende den nye højde, trykkes på "Enter".

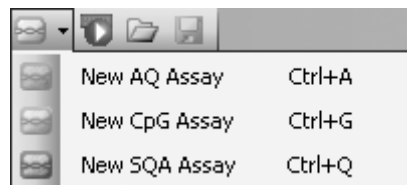
Bemærk: I stedet for at fjerne "ikke-standard" methyleringsmønstre fra sekvensen, der skal analyseres, for eksempel methyleringer af C'er, der ikke efterfølges af G'er, sættes de forventede højder af G'erne til nul (0).




Lys orange = mindsket højde
Mørk orange = øget højde

Opsætning af en SQA-analyse


Arbejdsgang



1. Klik på  i værktøjslinjen og vælg "New SQA assay" (ny SQA-analyse). Der oprettes en ny analysefil.
2. Indtast "Dispensation Order" (se side 32).
3. Valgfrit: Indlæs information om analysen i tekstboksen "Assay Note".
4. Før prøverne køres, skal analysen valideres ved hjælp af en reference DNA-prøve (se Appendiks B i Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx).
5. Valgfrit: Hvis det er aktuelt redigeres analyseparametrene under analysevalideringen, (se side 32).
6. Valgfrit: Lås analysen for redigering ved at klikke på knappen "Lock Assay" nederst i analyseopsætningsvinduet. En låst analyse (L), der er kørt på PyroMark Q24 MDx-instrumentet, kan ikke låses op (dvs. det vil ikke være muligt at redigere analyseparametre eller resultater efter, at analysen er blevet behandlet).

Bemærk: I genvejsoversigten kan man oprette en ny analysefil ved at højreklikke på den mappe, hvor man ønsker at placere den og vælge "New Assay" og den ønskede analysetype fra kontekstmenuen. Indtast filnavn og tryk på "Enter". For at tilføje en genvej til en mappe eller et drev klikkes på "Add Folder Shortcut".

Bemærk: Ved at placere musemarkøren over analysefilen kan en analysenote blive vist i et tooltip i genvejsoversigten.

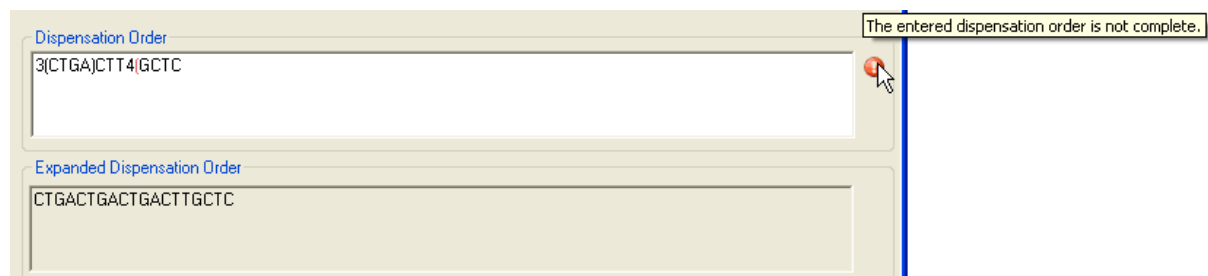
Bemærk: Klik på  i værktøjslinjen for at gemme filen. Hvis filen aldrig er blevet gemt, vælges pladsen, og filnavnet indlæses i den dialogboks, der åbnes.

Indtast dispenseringsrækkefølge

Indtast eller klistre ("Ctrl+V") dispenseringsrækkefølgen ind i tekstboksen "Dispensation Order". Følgende regler gælder ved indlæsning af dispenseringsrækkefølgen i softwaren:

- De tilladte tegn for indlæsning af sekvens er A, C, G og T.
- For at gentage en gruppe baser benyttes tal i kombination med parenteser, f.eks. svarer "3(CTGA)" til "CTGACTGACTGA".

Hvis dispenseringsrækkefølgen indeholder en fejl, vises dette med et rødt udråbstegn i slutningen af tekstboksen. Placer musemarkøren over udråbstegnet, så vil et tooltip vise en forklaring af fejlen. Det eller de tegn, der forårsagede fejlen, vil være markeret med rødt i dispenseringsrækkefølgen.



Fejlen "The entered dispensation order is not complete" (den indlæste dispenseringsrækkefølge er ikke komplet) skyldes en manglende eller forkert placeret parentes. I dette eksempel mangler der en afsluttende parentes.

Edit analysis parameters

Standard-analyseindstillingerne er indstillet til at give optimale analyseresultater for de fleste analyser. Hvis det er aktuelt under analysevalideringen kan resultaterne forbedres ved at redigere analyseparametrene:

- "Quality Control Window" (kvalitetskontrolvindue) indstillingen under fanen "Settings" er som standard sat til 20. Hvis der kræves flere eller færre baser, ændres det tilsvarende.
- Analyseparametrene redigeres under fanen "Analysis Parameters"; se nedenfor.

Kontroller, at ændringerne er validerede; se Appendiks B i *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx*.

Bemærk: Ved brug af QIAGEN-kits anvendes de indstillinger, der er angivet i kit-håndbogen.

Bemærk: Alle gemte ændringer logges. For at se en ændringslog for en analyse åbnes analysefilen, klik dernæst på "Show Change Log" nederst i analyseindstillingsvinduet.

Analyseparametrene redigeres under fanen "Analysis Parameters"

Følgende analyseparametre kan redigeres under fanen "Analysis Parameters".

Spidshøjdetærskel

Disse parametre definerer den laveste intensitetsgrænse for det enkelte spidshøjdeniveau i begyndelsen af pyrogrammet.

Påkrævet spidshøjde for godkendt kvalitet

Minimum signalværdi for at en spids kan opnå kvalitetsbedømmelsen "Passed" i den base-kaldte sekvens.

Standardværdien er 10.

Bemærk: Værdien kan ikke være lavere end værdien "Required peak height for check quality" (påkrævet spidshøjde for kontrolkvalitet) (se nedenfor).

Påkrævet spidshøjde for kontrolkvalitet

Minimum signalværdi for at en spids kan opnå kvalitetsbedømmelsen "Check" i den base-kaldte sekvens. Advarslen "Uncertain due to low peak height" (Usikker på grund af lav spidshøjde) udløses under analysen.

Bemærk: Denne regel anvendes kun, hvis reglen for "Passed" kvalitet ikke er opfyldt.

Standardværdien er 5.

En signalværdi for en spids, som er lavere end den indstillede værdi, vil medføre kvalitetsvurderingen "Failed". Advarslen "Failed due to low peak height" udløses under analysen.

Bemærk: Værdien kan ikke være højere end værdien "Required peak height for passed quality" (se ovenfor).

Parametre

A-spidsreduktionsfaktor

Den faktor, hvormed A-spidsintensiteterne multipliceres for at tage højde for, at A-spidser er højere end andre spidser.

Standardværdien er 0.90.

Plus skift compensation	Hvis der er markeret for denne mulighed, kompenseres spidserne for plus-skift.
Minus skift compensation	Hvis der er markeret for denne mulighed, kompenseres spidserne for minus-skift.
Stringent homopolymer-scoring	Hvis der er markeret for denne mulighed, benyttes der strengere regler for kvalitetsvurderingen af homopolymerer. Advarslen "Peak height deviates from the expected peak level at dispensation: <i>number(s)</i> " (spidshøjde afviger fra det forventede spidshøjdeniveau ved dispensering: nummer) under analysen.

Kendte baser


Hvis der er nogen kendte baser i dispenseringsrækkefølgen, anbefales det, at disse indlæses, da dette kan forbedre analysen:


1. Venstre klik i dispenseringsrækkefølgen og indtast enten højden i tekstboksen, der åbnes, eller forøg eller formindsk højden ved hjælp af pilene ved siden af tekstboksen.
2. For at anvende den nye højde, trykkes på "Enter".

Klik på "Revert to Default" for at sætte parametrene i fanen "Settings" og fanen "Analysis Parameters" tilbage til deres standardværdier.

Opsæt en kørsel

Arbejdsgang

1. Klik på  i værktøjslinjen. Der oprettes en ny kørsel.
2. Indlæs kørselsparametrene (se side 35).
3. Indstil pladen (dvs. tilføj en analyse og, hvis det ønskes, indlæs et prøve-ID og note for hver brønd, der anvendes); se side 36.
4. Når kørslen er indstillet og klar til at køre på PyroMark Q24 MDx-instrumentet:

Vælg "Pre Run Information" i menuen "Tools" (Værktøjer) for at udskrive pladeopsætningen og en liste over de påkrævede voluminer af enzymblanding, substratblanding og nukleotider, og når rapporten åbnes, klik da på .

Luk kørselsfilen og kopier den til en af USB-nøgler, der følger med systemet, ved hjælp af Windows Explorer. For at åbne Windows Explorer højreklikkes på den mappe, der indeholder kørselsfilen, i genvejsoversigten,


og vælg så "Explore" i kontekstmenuen. For yderligere oplysninger trykkes på "F1" tasten for at åbne Windows online hjælp.

Se side 41 for at køre pladen på PyroMark Q24 MDx-instrumentet.

Bemærk: For at udskrive "Pre Run Information" rapporten i farver, tilvælges muligheden "Print background colors and images" (udskriv baggrundsfarver og billeder) i Internet Explorer ("Funktioner/Internetindstillinger/Avanceret/Udskrivning").

Bemærk: I genvejsoversigten kan man oprette en ny kørselsfil ved at højreklikke på den ønskede mappe og vælge "New Run" fra kontekstmenuen. Indtast filnavn og tryk på "Enter". For at tilføje en genvej til en mappe eller et drev klikkes på "Add Folder Shortcut".

Bemærk: For at basere kørslen på en tidligere kørsel højreklikkes på den behandlede kørselsfil i genvejsoversigten, vælg dernæst "Copy and Rerun" (kopier og kør igen) i kontekst-menuen. Det er kun kørselens opsætning, ikke kørslen og analysen, der kopieres.

Bemærk: Klik på  i værktøjslinjen for at gemme filen. Hvis filen aldrig er blevet gemt, vælges pladsen, og filnavnet indlæses i den dialogboks, der åbnes.

Indlæs kørselsparametrene

Følgende kørselsparametre er tilgængelige.

Kørselens navn	Navnet på kørslen gives, når filen gemmes. Ved omdøbning af filen ændres også navnet på kørslen.
Instrumentmetode	Vælg instrumentmetode efter reagenserne og den reagensbeholder, der skal bruges til kørslen (se Manage Instrument Methods (administrere instrumentmetoder), side 58). Bemærk: Det anbefales at kun benytte metoder, der leveres af QIAGEN.
Plade-ID	Valgfrit: Indlæs ID på PyroMark Q24-pladen. Bemærk: Hvis man placerer musemarkøren over en fil i genvejs-browseren, viser et tooltip det indlæste plade-ID.
Barcode	Valgfrit: Indtast et stregkodennummer for pladen eller, hvis du har en stregkodelæser tilsluttet computeren, placer musemarkøren i tekstboksen "Barcode" og scan stregkoden ind.

Reagens-ID	Valgfrit: Indlæs lot-nummeret for de PyroMark Q24-reagenser, der skal bruges. Lot-nummeret kan ses på produktetiketten. Bemærk: Det anbefales at indlæse reagensets ID, så eventuelle uventede problemer med reagenserne kan spores.
Skønnet kørselstid	Den skønnede kørselstid
Kørsels-note	Valgfrit: Indtast en note om indholdet af eller formålet med kørslen.

Tilføj analysefiler til pladen

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

- Vælg analysen i genvejsoversigten og trykke på venstre musetast og holde den nede, mens man trækker analysen til brønden
- Højreklikke på brønden og vælge "Load Assay" (hent analyse) i kontekstmenuen.

Bemærk: For at tilføje en analyse til flere brønde vælges brøndene (se Valg af brønde, side 18) og analysen trækkes til det valgte.

Bemærk: Det er ikke muligt at tilføje en analyse uden dispenseringsrækkefølge eller at tilføje to eller flere analyser, som har samme analysenavn, men forskellige dispenseringsrækkefølger.

Plate Setup						
	1	2	3	4	5	6
A	AQ assay 1	AQ assay 2	CpG assay 1	CpG assay 2	SQA assay 1	SQA assay 2

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

Indlæsning af prøve-ID'er og noter

- En prøve-ID eller note aktiveres ved at vælge cellen (se billede nedenfor) og indsætte teksten.
- For at redigere et prøve-ID eller en note kan man enten vælge cellen (det aktuelle indhold vil blive valgt) eller dobbeltklikke på cellen.
- For at importere et prøve- og note-layout, der er defineret i en tekstfil (*.tsv eller *.csv) højreklikkes på en brønd, og man vælger "Insert Sample Layout File" (indsæt prøvelayoutfil) fra kontekstmenuen. For yderligere information, se Definere prøve-ID og note eksternt, side 38.

- For at indklipstyre et prøve-layout fra udklipsholderen, højreklikkes på en brønd, og man vælger "Paste Sample Layout" (indsæt prøvelayout) fra kontekstmenuen. For yderligere information, se Definere prøve-ID og note eksternt, side 38.

Bemærk: Komma og semikolon understøttes ikke.

Assay Name	Assay Name
Sample ID	Sample ID
Note	Note

En valgt celle fremhæves med en blå baggrundsfarve.

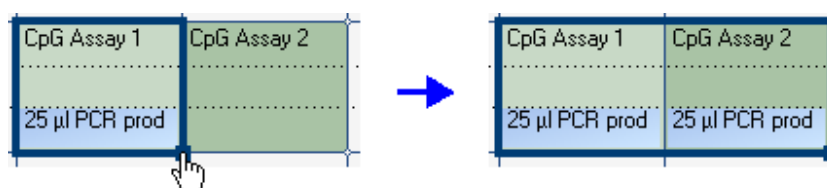
Kopiere eller slette indhold fra celler

- For at klippe indholdet af en celle ud og sætte det ind i udklipsholderen, højreklikkes på brønden, og man vælger "Cut" (klip) fra kontekstmenuen.
- For at kopiere indholdet af en celle ud og sætte det ind i udklipsholderen kan man enten højreklikke på cellen og vælge "Copy Cell" (kopier celle) fra kontekstmenuen eller vælge cellen og trykke på "Ctrl.+C".
- For at klistre indholdet af udklipsholderen til en celle eller et udvalg af celler (se Vælg celler, side 18) kan man enten højreklikke på cellen eller det udvalgte og vælge "Paste" (klistre) i kontekstmenuen eller vælge cellen/erne og trykke på "Ctrl.+V".
- For at slette en eller flere analyser, prøve-ID'er eller noter kan man enten klikke på cellen eller det udvalgte og vælge "Delete" (slet) i kontekstmenuen eller vælge cellen/erne og trykke på "Delete".

Trække og kopiere indholdet af en celle til andre brønde

For at trække og kopiere indholdet af en celle til andre brønde:

1. Vælg den celle, der skal kopieres.
2. Anbring musemarkøren over den nederste højre firkant af det udvalgte og tryk på venstre musetast og hold den nede, mens musen flyttes for at ændre det udvalgte.
3. Når venstre musetast slippes, klistres indholdet af den først valgte celle ind i de valgte celler.



Træk og kopier noten "25 µl PCR prod".

Træk og kopier og forøg prøve-ID

Hvis den sidste del af et indlæst prøve-ID er et tal, kan tallet forhøjes, når prøve-ID'et trækkes og kopieres:

1. **Vælg prøve-ID celle.**
2. **For at forøge efter række:**

Anbring musemarkøren over den nederste højre firkant af det udvalgte.

Tryk på "Ctrl."-tasten + venstre musetast og holde dem nede, mens musen flyttes for at ændre det udvalgte.

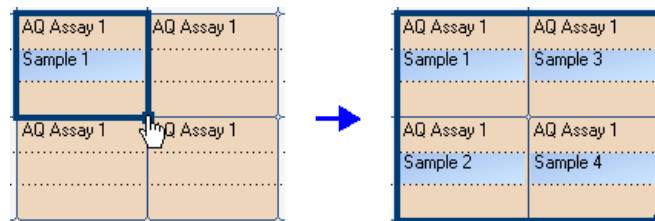
Slip først venstre musetast og dernæst "Ctrl."-tasten. Når venstre musetast slippes, forhøjes prøve-ID for den først valgte celle og klistres ind i den valgte celle.

3. **For at forøge efter kolonne:**

Anbring musemarkøren over den nederste højre firkant af det udvalgte.

Tryk på Shift"- og "Ctrl." -tasten + venstre musetast og holde dem nede, mens musen flyttes for at ændre det udvalgte.

Slip først venstre musetast og dernæst "Shift" og "Ctrl."-tasten. Når venstre musetast slippes, forøges prøve-ID for den først valgte celle og klistres ind i de valgte celler.



Prøve-ID "Sample 1" (prøve 1) kopieres og forhøjes efter kolonne.

Udskriv eller eksporter pladeindstilling som billede

"Pladeopsætningen" kan udskrives eller kopieres som billede (til udklipsholderen) ved at højreklikke på pladen og vælge "Print" eller "Copy as image" i kontekstmenuen. Billedet kan klistres ind i applikationer, der understøtter Enhanced Metafile (EMF)-billeder.

Definere prøve-ID og note eksternt

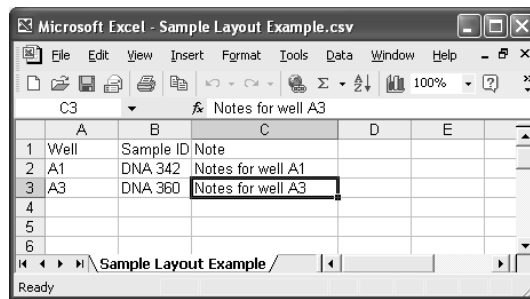
Ved hjælp af funktionen "Import/Insert Sample Layout File" (importer/indsæt prøvelayoutfil) eller "Paste Sample Layout" kan man nemt bruge samme layout i flere kørsler og genbruge information, der er tilgængelig i eksisterende dokumentation.

Brug af funktionen import/indsæt prøvelayoutfil.

Man kan for eksempel generere layoutfiler ud fra Laboratory Information Management Systems (LIMS). Prøve- og notelayoutfiler kan også oprettes i Microsoft Excel, Notepad og tilsvarende applikationer. Layoutfilen skal have to eller tre kolonner: "Well" (brønd), "Sample ID" (prøve-ID), og "Note" (valgfrit). Hver kolonne skal være separeret med tabulator, komma eller semikolon, og hver linje skal være afgrænset med et linjeskift. Gem filen som en tab- eller komma-separeret tekstfil (*.tsv, *.txt eller *.csv).

Prøve- og notelayoutfilen kan importeres til:

- En eksisterende kørselsfil ved at højreklikke i "Plate Setup" (pladeindstilling) og vælge "Insert Sample Layout File" fra kontekstmenuen
- En ny kørselsfil ved at vælge "Import" efterfulgt af "Create New Run from Sample Layout File" fra menuen "File".



Et eksempel på en prøve- og notelayoutfil skabt i Microsoft Excel.

Plate Setup			
	1	2	3
A	DNA 342		DNA 360
	Notes for well A1		Notes for well A3

Resultatet ved import af prøve- og notelayoutfilen ovenfor.

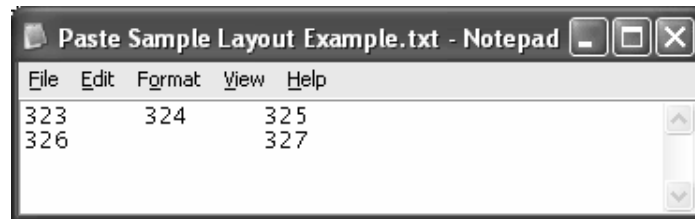
Brug af funktionen indsæt prøvelayout

Man kan for eksempel generere og kopiere layouts fra LIMS. prøvelayouts kan kopieres ud fra Microsoft Excel, Word, Notepad og lignende applikationer. I kildefilen skal hver kolonne med prøve-ID'er være separeret med en tab, og hver linje med prøve-ID'er skal være afgrænset med et linjeskift.

For at indsætte et prøvelayout i en eksisterende kørselsfil:

- 1. Kopier alle informationer i kildefilen.**
- 2. Højreklik på en brønd i "Plate Setup" og vælg "Paste Sample Layout" fra kontekstmenuen.**

Softwaren vil indsætte prøve-ID'erne på pladen startende med brønd A1. (Hvis der er indsat brøndnoter for brøndene, bevares disse).



Et eksempel på en prøve- og notelayoutfil skabt i Microsoft Notepad.

Plate Setup			
	1	2	3
A	323	324	325
B	326		327

Resultatet ved kopiering og klistring af prøvelayout skabt i Microsoft Notepad.

Kontrol af pladeindstilling

Området "Well Information" (brøndinformation) viser følgende information om en brønd, der er valgt i "Plate Setup":

- Brøndnavn
- Analysetype (AQ, CpG eller SQA)
- Analysenavn
- Prøve-ID (hvis indlæst)
- Sekvens der skal analyseres (AQ- og CpG-analyser)
- Dispenseringsrækkefølge
- Brønd-note (hvis indlæst)

Hvis der vælges flere brønde i "Plate Setup", vises informationen for den først valgte brønd.

Behandl kørslen på PyroMark Q24 MDx-instrumentet

Arbejdsgang

Når en kørsel er indstillet og klar til at køre på PyroMark Q24 MDx-instrumentet, gennemføres følgende trin:

- 1. Klargør prøverne.**
- 2. Fyld PyroMark Q24-beholderen med de påkrævede mængder reagenser.**
- 3. Isæt reagensbeholderen og PyroMark Q24-pladen i instrumentet.**
- 4. Indsæt USB-nøgle indeholdende kørselsfilen i USB-porten på instrumentets front.**
- 5. Vælg kørselsfil og start kørslen.**
- 6. Når kørslen er afsluttet, og data er blevet overført til USB-nøglen, tages denne ud.**
- 7. Tag pladen og reagensbeholderen ud.**

Se afsnitt 5.5 i *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx* for mere information.

Analyser kørslen

Workflow

1. Flyt den behandlede kørselsfil fra USB-nøglen til en computer, der kører PyroMark Q24 MDx-software; indsæt USB-nøglen i computerens USB-port og flyt kørselsfilen til den ønskede plads ved hjælp af Windows Explorer.
2. Åbn kørselsfilen i PyroMark Q24 MDx-softwaren, enten ved at vælge "Open" i menuen "File" eller ved at dobbeltklikke på filen (📁) i genvejsoversigten. Hvis der er flere analysetyper med, vælges analyseform i den dialogboks, der åbnes.

Bemærk: For at opdatere indholdet af en mappe i genvejsoversigten højreklikkes på den, vælg dernæst "Refresh" (opdater) i kontekstmenuen.

Bemærk: Det er også muligt at åbne kørselsfilen ved at dobbeltklikke på den i Windows Explorer.

3. **Analysering af kørslen (se nedenfor).**
4. **Vis analyseresultater (se side 43).**
5. **Valgfrit: Hvis det er aktuelt ændrer man, hvordan analysen gennemføres (se side 47).**
6. **Valgfrit: Indlæs en analysenote i tekstboksen "Note" under fanen "Overview" (oversigt).**

Bemærk: Klik på "+" eller "-" for at udvide eller formindske "Note"-feltet.

7. **Klik på  i værktøjslinjen for at gemme analyseresultaterne.**

Bemærk: Det er ikke muligt at redigere analyseparametrene eller indlæse en analysenote for en låst analyse (🔒).

Analysering af alle eller udvalgte brønde

Under fanen "Overview" er der to måder at foretage analysen på:



Enten analysere alle brønde med en gyldig analyseopsætning for den aktuelle analyseform.



Eller analysere de udvalgte brønde (Valf og brønde, side 18).

Bemærk: Det er også muligt at højreklikke på det valgte og vælge "Analyze Selected" (analyser udvalgte) fra kontekstmenuen.

Under analysen vises en forløbs-dialogboks. Denne dialogboks indeholder en forløbsbjælke, en stopknap og navnet på den brønd, der analyseres. Analysen kan stoppes ved at klikke på "Stop".

Bemærk: Når en brønd er blevet analyseret, ændres brøndens farve til lyseblå.

Analyseformer

PyroMark Q24 MDx-software har tre analyseformer: AQ, CpG og SQA. For at skifte mellem formerne vælges "AQ", "CpG" eller "SQA" i værktøjslinjen.

Gentypebestemmelse af SNP'er og InDel'er kan vurderes fra menuen "Reports" i AQ-funktion.



Bemærk: Da CpG-funktionen ikke understøtter automatisk analyse af SNP'er, bestemmes methyleringsprocenter og kvalitetsvurderinger kun for CpG-pladser. SNP'er i en CpG-analyse kan analyseres i AQ-funktion ved hjælp af den sekvens, der skal analyseres i CpG-opstillingen. For at udelukke CpG-pladser i SNP-rapporter vælges fanen "Analysis Setup" (analyseopstilling), og muligheden "Analyze" fravælges for disse positioner under fanen "Variable Positions".

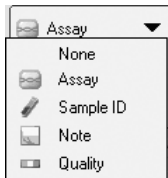
Vis analyseresultaterne

Ved valg af en analyseret brønd (lyseblå) i fanen "Overview" (oversigt) vises det tilhørende Pyrogram i Pyrogram-området, og brøndens information (inklusive analyseadvarsler) angives i "Well Information"-området (brøndinformation). Hvis der vælges flere brønde i plade-oversigten, vises informationen for brønden med den orange valgramme.

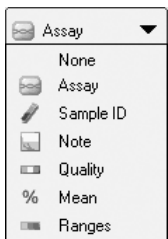
Få en oversigt over resultaterne

Følgende brøndinformationer kan vises i pladeoversigten under fanen "Overview":

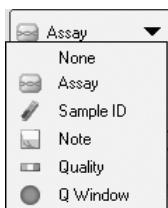
AQ-analyser



CpG-analyser



SQA-analyser



Vælg for at vise analysenavn.



Vælg for at vise prøve-ID.



Vælg for at vise brøndnote.



Vælg for at vise kvalitetssøjlen. Kvalitetssøjlen viser kvalitetsvurderingen for alle variable positioner i brønden eller for alle baserne i den base-kaldte sekvens. Se farve-forklaringen på side 45.



Vælg for at vise den gennemsnitlige metyleringsprocent for alle CpG-pladser i brønden.



Vælg for at vise metyleringsbjælken.

Metyleringsbjælken viser metyleringsniveauet for hvert CpG-område i brønden. Se farveforklaring på side 46.



Vælg for at vise kvalitetsvurderingen i slutningen af kvalitetskontrolvinduet. Standardantallet af inkluderede baser er 20.

Bemærk: Brønde med en høj substratpids vil være mærket med et informationsikon (i) i pladeoversigten. Dette vil ikke påvirke kvalitetsvurderingerne.

Bemærk: Hvis analyseparametre, kvalitetsvurderinger eller analyseresultater (kun SQA.-analyser) er blevet redigeret af brugeren, er brønden mærket med et advarselsikon (⚠).

Bemærk: Hvis en analyse er låst, er brønden mærket med ikonet 🔒.

Udskriv eller eksporter pladeoversigten som billede

Pladeoversigten kan udskrives eller kopieres som billede (til udklipsholderen) ved at højreklikke på pladeoversigten og vælge "Print" eller "Copy as image" i kontekstmenuen. Billedet kan klistres ind i applikationer, der understøtter Enhanced Metafile (EMF)-billeder.

Analyseadvarsler

Ved valg af en analyseret brønd (lyseblå) vises analyseadvarslerne i "Well Information"-området (brøndinformation). En analyseadvarsel påvirker kvalitetsvurderingen på følgende måde:

- AQ- og CpG-analyser: Påvirker kvalitetsvurderingen for enten alle variable positioner eller en enkelt position. Hvis der er udløst flere advarsler af samme art, vises kun de mest alvorlige i "Well Information"-området
- SQA-analyse: Påvirker kvalitetsvurderingen for enten hele sekvensen eller fra en specifik dispensering og fremefter. Alle udløste advarsler inden for kvalitetsvinduet vises i "Well Information"-området.

For visse af advarslerne kan kriterierne for forekomst og virkningen på kvalitetsvurderingen ændres af brugeren under fanen "Analysis Parameters"; se Redigering af analyseparametre, side 47.

Bemærk: Hvis der forekommer en dispenseringsfejl, anbefales det at udskifte reagensbeholderen.

Kvalitetsvurderinger

Kvalitetsvurderingerne af analyseresultaterne vises ved:

- Kvalitetssøjler (🇩🇪) i pladeoversigten, se side 44.
- Baggrundsfarven for analyseresultaterne (alleldefrekvenser eller metyleringsprocenrer i pyrogrammet, for eksempel) 96%, eller base-kaldte sekvenser); se side 44.
- Kvalitetskontrolvinduer (●) i pladeoversigten; se side 44 (kun SQA-analyser).
- Spidserne i det kompenserede pyrogram er farvet efter deres kvalitetsvurderinger (kun SQA-analyser).

Kvalitetsfarver

- Blå: Godkendt
- Gul: Kontroller
- Rød: Ikke-godkendt
- Hvid: Ikke analyseret. Enten understøttes analyse ikke af softwaren (f.eks. SNP i CpG-funktion) eller også er den variable position blevet fravalgt af brugeren (kun AQ- og CpG-analyser).

Metyleringsniveauer

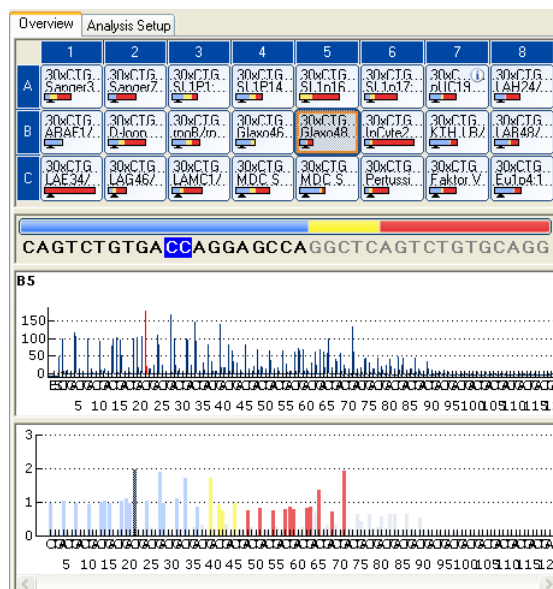
I CpG-funktion viser en metyleringssøjle under fanen "Overview" metyleringsniveaulet for hver enkelt CpG-plads i brønden (se side 44).

Metyleringsfarver

- Lys grøn: Under det forventede område
- Grøn: Inden for det forventede område
- Mørk grøn: Over det forventede område

Vise og sammenligne Pyrogram

Ved valg af en analyseret brønd under fanen "Overview" får man vist det tilsvarende pyrogram og teoretiske histogram (hvis det er en AQ- eller CpG-analyse) eller kompenseret pyrogram (hvis det er en SQA-analyse).

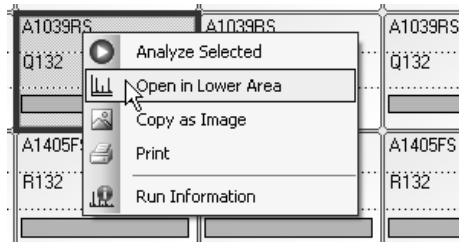


Når der vises en base i den base-kaldte sekvens, fremhæves den tilsvarende spids i begge pyrogramområder og vice versa.


Sammenligne pyrogram for forskellige brønde


For at sammenligne et pyrogram for en specifik brønd (vist i det øverste område) med et pyrogram for en eller flere brønde (vist i det nederste område):

1. Vælg den eller de brønd(e) (se Valg af brønde, side 18), der skal åbnes i det nederste område, under fanen "Overview".
2. Højreklik på valget og vælg "Open in Lower Area" (åbn i nederste område) i kontekstmenuen.
3. Vælg den brønd, der skal åbnes i det øverste område.



Hvis pyrogrammerne for flere brønde vises i det nederste område, bruges scroll-bjælken til at ændre pyrogram inden for udvalget.

Et pyrogram med samme sekvens at analysere kan zoomes ind samtidig (dvs. linket zoomning) ved at klikke på  i det øverste højre hjørne af det øverste område.

For at lukke pyrogramlisten i det nederste område klikkes på  i det øverste højre hjørne af det nederste område.


Zoom pyrogrammet og få vist beskrivelsen af ikoner og farver

For informationer om ikoner og farver anvendt i pyrogramområdet og hvordan man zoomer, se Pyrogram, side 16.

Redigere analyse-parametre

Standard-analyseindstillingerne er indstillet til at give optimale analyseresultater for de fleste analyser. Kontroller, at ændringerne er validerede; se Appendiks B i *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx*.

Bemærk: Ved brug af QIAGEN-kits anvendes de indstillinger, der er angivet i kit-håndbøgerne.

Bemærk: Det er ikke muligt at redigere analyseparametrene for en låst analyse (.

1. Vælg den eller de brønd(e) (se Valg af brønde, side 18), der skal redigeres analyseparametre for.

Bemærk: Ændringerne vil kun blive anvendt på brønde, der har samme analyse og dispenseringsrækkefølge som den viste brønd. For at redigere analyseparametrene for alle brønde med samme analyse og dispenseringsrækkefølge skal man blot vælge en af brøndene.


2. Redigere analyseparametre under fanen "Analysis Setup":

Aktivering og deaktivering af variable positioner og/eller ændring af forventede metyleringsområder (kun CpG-analyser), se Opstilling af de variable positioner, side 24. For at redigere andre analyseparametre for en AQ- eller CpG-analyse, se side 26.

For at redigere analyseparametre for en SQA-analyse, se side 32.

Bemærk: Det er ikke muligt at ændre analysenavn, dispenseringsrækkefølge eller analysenote.

3. Klik på "Apply" (anvend), når du er klar.

Bemærk: Det er også muligt at aktivere eller deaktivere referencespidser og/eller bisulfitbehandlingskontroller (kun CpG-analyser) i Pyrogram under fanen "Overview" (se instruktion på side 30). Klik på den grønne  knap for at anvende de ændringer, der er foretaget i Pyrogram. Denne knap aktiveres, når der er foretaget en ændring.


4. Anvend ændringerne på alle eller de udvalgte brønde: i dialogboksen "Apply Analysis Setup" (anvend analyseindstilling).

For at anvende ændringerne på alle brønde, der har samme analyse og dispenseringsrækkefølge som den viste brønd (dvs. alle de hvide brønde i dialogboksen "Apply Analysis Setup") klikkes på "To All" (til alle).

For at anvende ændringerne til alle de valgte brønde (dvs. de hvide brønde, der er valgt i dialogboksen "Apply Analysis Setup") klikkes på "To Selected" (til valgte).

Under analysen vises en forløbs-dialogboks. Dialogboksen indeholder en forløbsbjælke, en stopknap og navnet på den brønd, der analyseres. Analysen kan stoppes ved at klikke på "Stop".

5. Klik på for at gemme ændringerne.

Bemærk: Hvis analyseparametre, kvalitetsvurderinger eller analyseresultater (kun SQA.-analyser) er blevet redigeret af brugeren, er brønden mærket med et advarselsikon () under fanen "Overview".

Bemærk: Alle ændringer logges. For at se analyseloggen for en udvalgt brønd vælges "Analysis Log" i menuen "Tools".

Benytte modificeret analyse i andre kørsler

Ændringer foretaget under fanen "Analysis Setup" vil ikke blive gemt i den oprindelige analysefil. For at benytte den modificerede analyse i andre kørsler:

1. Vælg en brønd, der benytter en modificeret analyse, og klik på "Save Assay". Dialogboksen "Save Assay As" (gem analyse som) åbnes.
2. Gem ændringerne i den originale fil eller gem den modificerede analyse som en ny fil:

Vælg destination (mappe) i rullelisten "Save in".

Indtast filnavnet i tekstboksen "File name" (filnavn) og klik på "Save"

Redigere kvalitetsvurderinger

For at redigere kvalitetsvurderingen for en allelefrekvens eller en methyleringsprocentdel, venstreklikkes på analyseresultatet i Pyrogram, vælg dernæst "Passed", "Check", eller "Failed" i kontekstmenuen.

For at redigere kvalitetsvurderingen for en base-kaldt sekvens anbringes musemarkøren over venstre eller højre ende af området "Passed", "Check" eller "Failed", så markøren ændres fra en hvid pil til +, flyt dernæst musen til venstre eller højre, mens venstre musetast holdes nede.



Hvis en kvalitetsvurdering er blevet redigeret af brugeren, vises dette med et advarselsikon (⚠) i pladeoversigten under fanen "Overview", en advarsel i "Well Information"-området, og hvis det er en AQ- eller CpG-analyse, en kant omkring analyseresultatet i Pyrogram (f.eks. 44%).

Bemærk: Alle ændringer logges. For at se analyseloggen for en udvalgt brønd vælges "Analysis Log" i menuen "Tools".

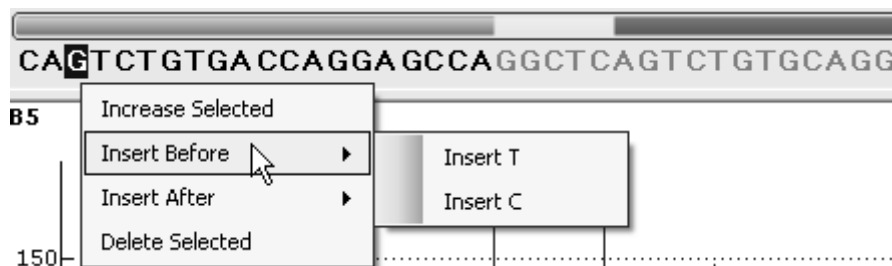
Bemærk: Kvalitetsvurderinger, der er genereret af softwaren, er baseret op avancerede analysealgoritmer. Det anbefales ikke at redigere kvalitetsvurderingerne.

Bemærk: Det er ikke muligt at redigere kvalitetsvurderingerne for en låst analyse (🔒).

Bemærk: Ændringer i AQ-funktion vil ikke påvirke kvalitetsvurderingerne i SNP-rapporter.

Redigere base-kaldte sekvenser

For at redigere en base-kaldt sekvens højreklikker man på den og vælger den ønskede muloighed.



Bemærk: Alle ændringer logges. For at se analyseloggen for en udvalgt brønd vælges "Analysis Log" i menuen "Tools".

Bemærk: Ved redigering af en base-kaldt sekvens skal det bemærkes, at kvalitetsvurderingerne stadig er baseret på den oprindelige sekvens (den

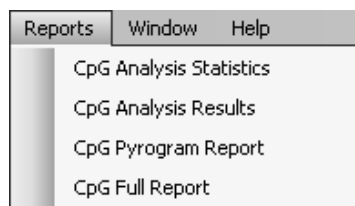
sekvens, der er kaldt af softwaren). For at redigere kvalitetsvurderinger, se side 49.

Bemærk: Det er ikke muligt at redigere base-kaldte sekvenser for en låst analyse (🔒).

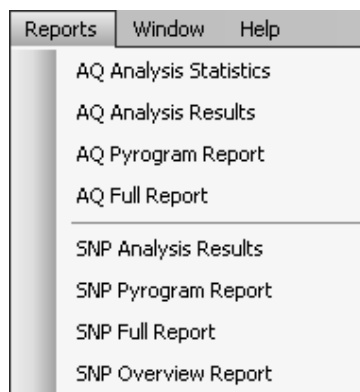
Vise, udskrive og gemme analyserapporter

PyroMark Q24 MDx-software tilbyder følgende analyserapporter for behandlede kørsler.

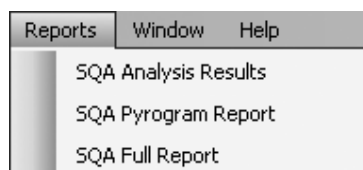
Rapporter for CpG-kørsler



Rapporter for AQ-kørsler



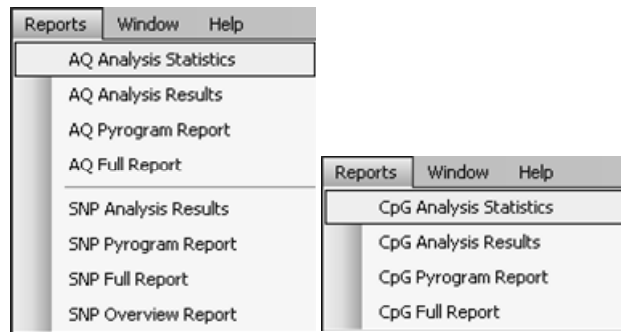
Rapporter for SQA-kørsler



- Analysestatistikrapport. Denne indeholder analysestatistikker for alle eller udvalgte brønde.
- Analyseresultatrapport. Denne indeholder brøndinformation og analyseresultater for alle eller udvalgte brønde.
- Pyrogramrapport. Denne indeholder brøndinformation og pyrogram for alle eller udvalgte brønde.
- Fuld rapport. Denne indeholder parametre, kørselslog, brøndinformation og analyseresultater (inklusive pyrogram) for alle eller udvalgte brønde.
- SNP Overview Report (oversigtsrapport). Denne indeholder genotyper og kvalitetsvurderinger for alle SNP'er og InDels. Informationen vises som pladeoversigter med en plade per positionsnummer.

Bemærk: For at kunne se de rapporter, der genereres, i PDF-format skal der være installeret en PDF-læser på computeren. Adobe Reader kan downloades fra www.adobe.com.

Analysestatistikrapport



Rapporten "Analysis Statistics" indeholder følgende information for variable positioner i alle eller udvalgte brønde (se Udvalgte brønde, side 18):

- De gennemsnitlige allelefrekvenser (AQ-rapport) eller gennemsnitlige metyleringsprocenter (CpG-rapport)
- De højeste og de laveste allelefrekvenser (AQ-rapport) eller metyleringsprocenter (CpG-rapport)
- Standardafvigelsen
- Antallet af værdier og brønde anvendt i hver enkelt beregning
- Hvis analyseparametre eller kvalitetsvurderinger er blevet redigeret af brugeren, er de berørte brønde angivet øverst i rapporten.

Rapporten kan gemmes som en tekstfil (*.tsv eller *.csv) eller en HTML-fil (.html). Rapporten kan importeres til Microsoft Excel eller andre applikationer, der kan håndtere tekstfiler (*.tsv eller *.csv) med data, der separeret af semikolon (;) eller tabs. Dette er praktisk, hvis der skal foretages yderligere beregninger på dataene.

Rapporteringsmuligheder

I dialogboksen "Analysis Statistics Report" (analysestatistikrapport) er der følgende muligheder:

Alle brønde/udvalgte brønde

De brønde, der skal inkluderes i rapporten.

Analyse/Analyse og prøve-ID

Analyseresultatstatistikker kan grupperes efter:

- Analyse
Brønde med samme analyse vil blive grupperet.
- Analyse og prøve-ID
Brønde med samme analyse og prøve-ID vil blive grupperet. Kan være praktisk, hvis der udføres eksperimenter med kopier.

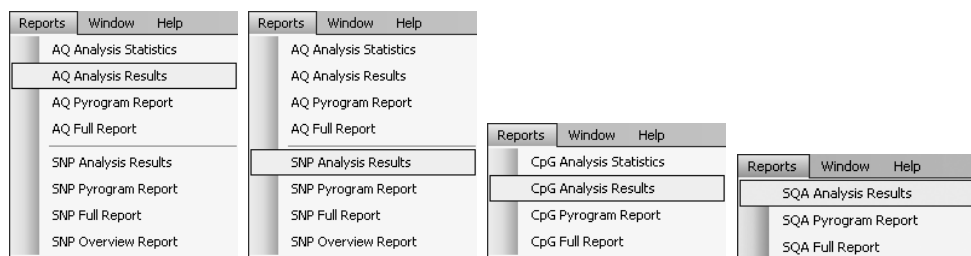
“Passed/Check”
(godkendt/kontroller)

De analyseresultater, der skal inkluderes.
Beregningerne kan foretages på resultater med godkendte og/eller kontrol-kvalitetsvurdering.

Bemærk: Hvis alle godkendte og kontrol-resultater skal inkluderes i rapporten, kan man ekskludere resultater i denne gruppe ved at fravælge muligheden “Analyze” for disse positioner under fanen “Analysis Setup” (se Indstilling af variable positioner, side 24).

For at få vist rapporten, før den gemmes eller udskrives, klikkes på “Preview”.

Analyseresultatrapport



Rapporten “Analysis Results” (analyseresultater) indeholder følgende information for variable positioner i alle eller udvalgte brønde (se Udvalgte brønde, side 18):

- Brøndinformation (brøndnavn, analysenavn og prøve-ID)
- Allelefrekvenser (AQ-rapport), genotyper (SNP-rapport), methyleringsprocenter (CpG-rapport) eller base-kaldte sekvenser (SQA-rapport) samt kvalitetsvurderinger
- Den gennemsnitlige methyleringsprocent og standardafvigelsen for alle godkendte CpG-pladser i en brønd (kun CpG-rapport)
- De højeste og laveste methyleringsprocenter i en brønd (kun CpG-rapport)
- Information om, hvorvidt analyseparametre, kvalitetsvurderinger og analyseresultater (kun SQA-rapport) er blevet redigeret af brugeren.

Valgfrit: Analyseversion, brøndnoter og analyseadvarsler. I AQ- og CpG-rapporter er det også muligt at inkludere navnene og de originale og/eller aktuelle kvalitetsvurderinger for de variable positioner.

Rapporten kan gemmes som tekstfil (*.tsv eller *.csv) eller HTML-fil (.html). Rapporten kan importeres til Microsoft Excel eller andre applikationer, der kan håndtere tekstfiler (*.tsv eller *.csv) med data, der er separeret med semikoloner (;) eller tabs. Dette er nyttigt, hvis der skal foretages yderligere beregninger på dataene. Den første linje i rapporten angiver navnet på kørslen. De

efterfølgende to eller tre linjer indeholder kolonneoverskrifterne. Hver af linjerne efter kolonneoverskrifterne indeholder detaljeret brøndinformation og statistik for en specificeret brønd.

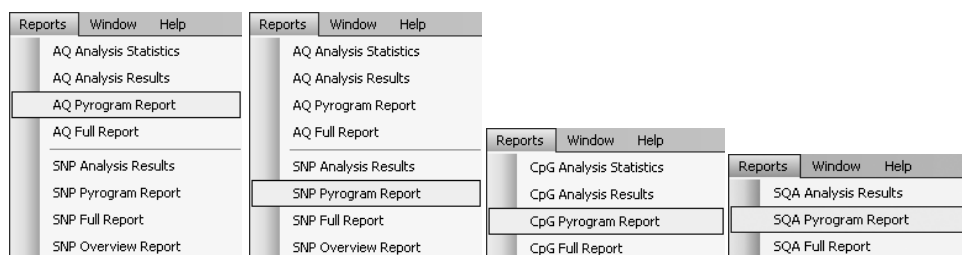
Rapporteringsmuligheder

I dialogboksen "Analysis Results Report" (analyseresultatrapport) er der følgende muligheder:

Alle brønde/udvalgte brønde	De brønde, der skal inkluderes i rapporten.
Sorter efter række/kolonne	Sorteringsrækkefølge for brøndene.
All/Passed/Passed + Check/Only Quality Window (alle/godkendte/godkendte + kontrol/kun kvalitetsvindue)	Baserne i de base-kaldte sekvenser, der skal inkluderes i rapporten. Denne mulighed er kun tilgængelig for SQA-rapporten.
Note-kolonne	Hvis der er markeret for denne mulighed, er der inkluderet en kolonne med brønd-noter.
Advarselskolonne	Hvis der er markeret for denne mulighed, er der inkluderet en kolonne med analyseadvarsler.
Analyseversion-kolonne	Hvis der er markeret for denne mulighed, er der inkluderet en kolonne med analyseversionen.
Positionnavn-kolonne	Hvis der er markeret for denne mulighed, er der inkluderet en kolonne med navnene på de variable positioner. Denne mulighed er ikke tilgængelig for SQA-rapporten.
Kvalitetskolonne	Hvis der er markeret for denne mulighed, er der inkluderet en kolonne med aktuelle kvalitetsvurderinger.
Original kvalitet-kolonner	Hvis der er markeret for denne mulighed, er der inkluderet en kolonne med de originale kvalitetsvurderinger. Denne mulighed er ikke tilgængelig for SQA-rapporten.

For at få vist rapporten, før den gemmes eller udskrives, klikkes på "Preview".

Pyrogramrapport



“Pyrogram Report” indeholder brøndinformation (brøndnavn, analysenavn, prøve-ID og brønd-note) og Pyrogram for alle eller udvalgte brønde (se Valg af brønde, side 18). Hvis analyseparametre, kvalitetsvurderinger eller analyseresultater (kun SQA-rapport) er blevet redigeret af brugeren, er dette angivet i rapporten.

Følgende informationer, ikoner og farver vises og anvendes i AQ-, SNP- og CpG-rapporter:

- Brøndnavn og sekvens, der skal analyseres
 - Analyseresultatet - allelefrekvenser (AQ-rapport), genotyper (SNP-rapport) eller metyleringsprocenter (CpG-rapport) - vises over den enkelte variabelposition, for eksempel

---	56%
ΔT:	44%

 (InDel) og

96%

. Kvalitetsvurderingen vises af resultatets baggrundsfarve; se farveoversigten på side 45.
- Bemærk:**

-

 (i hvidt) = Fravalgt af brugeren.

N/A

 (i hvidt) = Softwaren understøtter ikke analyse, for eksempel analyse af SNP i CpG-funktion.

N/A

 (i rødt) = Ikke muligt at analysere på grund af manglende data.
- Hvis det ønskes, fremhæves variable positioner med en blågrå baggrundsfarve.
 - Bisulfitbehandlingskontroller fremhæves med en lysgul baggrundsfarve (kun CpG-rapport).

Følgende informationer og farver vises og anvendes i SQA-rapporten:

- Brøndnavnet.
- Den base-kaldte sekvens. Baggrundsfarven for en base i sekvensen er i overensstemmelse med dens kvalitetsvurdering; se farveoversigten på side 45.
- Hvis et kompenseret pyrogram er inkluderet, er spidserne farvet efter deres kvalitetsvurderinger.

Rapporteringsmuligheder

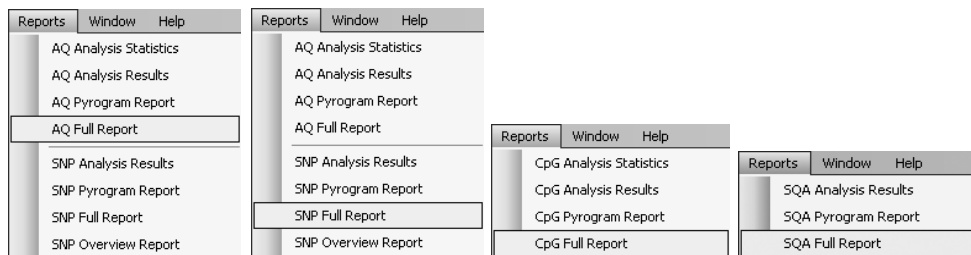
I dialogboksen "Pyrogram Report" er der følgende muligheder:

Alle brønde/udvalgte brønde	De brønde, der skal inkluderes i rapporten.
Antal rækker/kolonner	Antallet af kolonner og rækker i et pyrogram på hvert enkelt ark.
Sorter efter række/kolonne	Sorteringsrækkefølge for brøndene
Stående/Liggende	Papirretning.
Fremhæv variable regioner	Hvis der er markeret for denne mulighed, fremhæves variable regioner med en blågrå baggrundsfarve. Denne mulighed er ikke tilgængelig for SQA-rapporten.
Vis spidsniveauer	Hvis der er markeret for denne mulighed, er beregnede spidsniveauer vist i pyrogrammet. Denne mulighed er kun tilgængelig for SQA-rapporten.
Råt pyrogram/ Kompenseret pyrogram	Typen af pyrogram, der skal inkluderes i rapporten. Denne mulighed er kun tilgængelig for SQA-rapporten.
Papirstørrelse	Papirets størrelse (A4, A3, folio eller tabloid).

For at få vist rapporten, før den gemmes eller udskrives, klikkes på "Preview".

Bemærk: For at kunne se rapporten, skal der være installeret en PDF-læser på computeren. Adobe Reader kan downloades fra www.adobe.com.

Fuld rapport



Den fulde rapport indeholder følgende information for alle eller udvalgte brønde (se Udvalgte brønde, side 18):

- Kørselsparametre (kørselsnavn, kørselsdato og klokkeslæt, instrumentmetode, instrumentnavn, serienummer, operatør, plade-ID, strekcode, reagens-ID og kørselsnote) og en kørsels-log.
- Brønd-information (brøndsnavn, analysenavn, prøve-ID og brøndnote), analyseversion, AQ- eller CpG-analyse, sekvens der skal analyseres
- Pyrogram. For informationer om ikoner og farver anvendt i pyrogramområdet og hvordan man zoomer, se Pyrogram, side 54.
- Allelefrekvenser (AQ-rapport), genotyper (SNP-rapport), metyleringsprocenter (CpG-rapport) eller base-kaldte sekvenser (SQA-rapport) samt kvalitetsvurderinger
- Analyseadvarsler
- Hvis analyseparametre eller kvalitetsvurderinger er blevet redigeret af brugeren, er de berørte brønde angivet.

Rapporteringsmuligheder

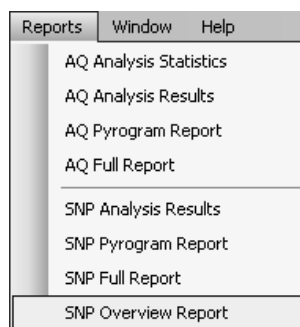
I dialogboksen "Full Report" (fuld rapport) er der følgende muligheder:

Alle brønde/udvalgte brønde	De brønde, der skal inkluderes i rapporten.
Råt pyrogram/ Kompenseret pyrogram	Typen af pyrogram, der skal inkluderes i rapporten. Denne mulighed er kun tilgængelig for SQA-rapporten.

For at få vist rapporten, før den gemmes eller udskrives, klikkes på "Preview".

Bemærk: For at kunne se rapporten, skal der være installeret en PDF-læser på computeren. Adobe Reader kan downloades fra www.adobe.com.

SNP Overview Report (oversigtsrapport).



“SNP Overview Report” indeholder genotyper og kvalitetsvurderinger for alle SNP'er og InDels. Informationen vises som pladeoversigter med en plade per positionsnummer. Kvalitetsvurderingen for SNP vises af brøndenes baggrundsfarve; se farveoversigten på side 45.

Hvis analyseparametre er blevet redigeret af brugeren, er de berørte brønde angivet øverst i rapporten.

For at få vist rapporten, før den gemmes eller udskrives, klikkes på “Preview” i dialogboksen “SNP Overview Report”.

Position 1

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	T/T	T/T	C/G	C/G	--	C/C	A/G	A/G
B	-T	-T	C/T	C/T	G/G	G/G	G/G	G/G
C	-T	-T	G/T	G/T	C/G	C/G	G/G	G/G

Position 2

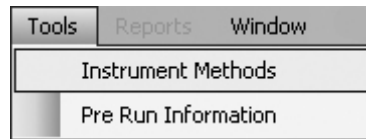
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	-/-	-/-			--	A/A	G/G	G/G
B	-C	-C			A/A	A/A	G/G	G/G
C	-C	-C			A/A	A/A	G/G	G/G

Uddrag fra en report. “Analyze”-mulighed er blevet afbrudt for position 1 og 2 i brønd A5. Brønd A3-A4, B3-B4 og C3-C4 har ingen SNP'er eller InDels i position 2.

Bemærk: Variable positioner kan udelukkes fra rapporten ved at afbryde muligheden “Analyze” under fanen “Analysis Setup” (se Indstilling af variable positioner, side 24).

Bemærk: Rapporten SNP Overview er kun tilgængelige i AQ-funktion. For at kunne se rapporten, skal der være installeret en PDF-læser på computeren. Adobe Reader kan downloades fra www.adobe.com.

Administrer instrumentmetoder



Instrumentets metode skal vælges efter reagenserne og den reagensbeholder, der skal bruges til kørslen. Det metodenummer, der er trykt på PyroMark Q24-beholderen, svarer til specifikke metodeindstillinger, der kan fås på www.qiagen.com/Products/PyroMarkQ24MDx.aspx.

Bemærk: Det anbefales at kun benytte metoder, der leveres af QIAGEN.

Import af en ny metode:

1. **Download fra ovennævnte webside den metodefil, der svarer til det metodenummer, der er trykt på beholderetiketten. Gem den på den computer, der kører PyroMark Q24 MDx-softwaren.**
2. **I dialogboksen "Instrument Methods" klikkes på "Import". Dialogboksen "Find Instrument Method" åbnes.**
3. **Find og vælg den metode, der ønskes importeret, og klok på "Open".**

Oprettelse af en ny metode:

1. **I dialogboksen "Instrument Method" vælges en eksisterende metode, klik dernæst på "Save As" (Gem som).**
2. **Indtast et navn på den nye metode og tryk på "Enter".**
3. **Metodeindstillingerne ændres i dialogboksen, så de svarer til dem, der er angivet på www.qiagen.com/Products/PyroMarkQ24MDx.aspx.**
4. **Klik på "Save".**

Metodeparametre

I dialogboksen "Instrument Methods" er følgende parametre tilgængelige.

Ragenstryk	Tryk (i millibar) til dispensering af enzymblanding og substratblanding.
Enzym-pulstid	Dispenseringstid (i millisekunder) for enzymblandingen.
Substratets pulstid	Dispenseringstid (i millisekunder) for substratblandingen.
Nukleotidtryk	Tryk (i millibar) fra dispensering af nukleotiderne.
Nukleotidpulstid	Dispenseringstid (i millisekunder) for nukleotider.
Bemærk	Bemærkning om instrumentmetode (valgfrit).

Almene råd og tips

Validering af analyser

Analyserne valideres ved hjælp af reference DNA-prøver; (se Appendiks B i *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx*).

Ánalyse-log

Alle udførte analyser logges med de anvendte analyseindstillinger, analyseform (AQ, CpG eller SQA), analyseversion, resultater (inklusive analyseadvarsler), dato og klokkeslæt for analysen samt hvem der udførte analysen. For at information om, hvem der har udført en analyse, og hvem der har oprettet en analyse eller kørselsfil, skal være korrekt, skal alle brugere logge på Windows med deres egen brugerkonto. For yderligere information om brugerkonti og på- og aflogning, se Windows online hjælp eller kontakt din systemadministrator.

To view the analysis log for a selected well, select "Analysis Log" from the "Tools" menu.

Beskyttelse af filer

For at beskytte en fil mod at blive redigeret af en anden bruger gemmes filen i en mappe, som man kun selv har adgang til. For yderligere oplysninger, kontakt din system-administrator.

For at beskytte en fil mod utilsigtet overskrivning foretaget af en selv eller en anden bruger gives den attributtet "Read Only" (låst mod bearbejdning) ved hjælp af Windows Explorer:

- 1. Luk filen i PyroMark Q24 MDx-softwaren.**
- 2. Åbn Windows Explorer og find filen.**

Dette kan gøres ved at højreklikke på den mappe, der indeholder filen i genvejsoversigten og vælge "Explore" (undersøge) i kontekstmenuen.
- 3. I Windows Explorer højreklikkes på filen, vælg så "Properties" (egenskaber) i kontekstmenuen.**
- 4. Når dialogboksen "Properties" åbnes, aktiveres "Read only"-attributten, og man klikker på "OK".**

Der bør tages hyppige backups.

Beskyttelse af analyseresultater

Bemærk: Det er ikke muligt at redigere analyseparametre eller resultater for en låst analyse (🔒). For at låse en analyse åbnes analysefilen, klik dernæst på

“Lock Assay” nederst i analyseindstillingsvinduet. Lås analysen, før den føjes til pladen.

Fejlsøgning

Fejl	Kommentarer og forslag
a) Rødt kryds over brønde i fanen “Overview” under analyse	Kontakt QIAGENs tekniske service.
b) dialogboksen “Exception” (undtagelse) vises	Gem fejlrapporten og send den til QIAGENs tekniske service som information. Klik på “Continue” (fortsæt) for at fortsætte med analysen. Hvis dialogboksen bliver stående, klikkes på “Quit” (forlad); genstart derefter softwaren.
c) Kunne ikke oprette analyse ud fra den specificerede PyroMark Assay Design Software-fil	Sørg for at importere en gyldig analysefiltype (AQ, CpG eller SNP).

For analyse-relateret problem, se Fejlfindings-delen af *Brugervejledningen til PyroMark Q24 MDx-software*.

For yderligere information henvises også til siden “Frequently Asked Questions” (Hyppigt stillede spørgsmål) hos vort Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen i denne brugervejledning eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Appendiks A: Meddelelser i PyroMark Q24 MDx-software

Følgende er en liste over anvendelses-, advarsels- og fejlmeddelelser, der kan forekomme i PyroMark Q24 MDx-softwaren under analyseopsætning, analysekørsel og dataanalyse.

Meddelelsetekst	Forklaring
Almene opsætningsmeddelelser	
"The dispensation order is very long" (Dispenseringsrækkefølgen er meget lang)	Dispenseringsrækkefølgen er længere end 200 baser
Almene analysemeddelelser	
"Not analyzable due to lack of data (overall)" (Kan ikke analyseres på grund af manglende data (samlet))	Utilstrækkelige spidser i pyrogrammet til at analysere data. Denne advarsel tilsidesætter alle andre advarsler.
"High pre-sequencing signal" (Højt forsekvenserings-signal)	Substratspidsen er høj sammenlignet med lyden og enkeltspids-niveauet.
"Uncertain due to baseline drift" (usikkert på grund af baseline-forskydning).	Der er en abnorm baseline-forskydning, som kan have en negativ indflydelse på resultatet
"Failed due to possible dispensation error at dispensation" (Ikke-godkendt på grund af mulig dispenseringsfejl ved dispensering)	Der er en mulig fejl ved de(n) angivn(e) dispensering(er). Påvirker kvaliteten af alle pladser efter fejlen.
"No peaks detected between dispensations" (ingen spidser detekteret mellem dispenseringerne)	Der er ikke detekteret nogen spidser, selv om alle nukleotider er dispenseret, hvilket kan angive problemer med dispenseringsenheden. Påvirker kvalitetsfarven for alle pladser efter fejlen.
"Uncertain due to wide peaks" (usikker på grund af brede spidser)	Den gennemsnitlige spidsbredde overskrider kontrolgrænsen. Påvirker kvaliteten af alle pladser i sekvensen.

Meddelelsetekst

Forklaring

Analyseopsætningsmeddelelser i AQ-funktion

"Invalid sequence" (ugyldig sekvens)	Der er en fejl i den indlæste sekvens, der skal analyseres.
"Variable positions with common dispensations cannot be analyzed" (variable positioner med fælles dispenseringer kan ikke analyseres)	Nukleotiddispenseringer for flere polymorfismer er ude af fase.
"The generated dispensation order contains less reference peaks than required" (Den genererede dispenseringsrækkefølge indeholder færre referencespidses end nødvendigt)	Analysen indeholder mindre end fem konstante spidses med en forventet værdi på over 1.
"Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information" (Sekvens usikker på grund af manglende terminalsekvensinformation)	Det sidste nukleotid i sekvensen, der skal analyseres, er blevet dispenseret, hvilket betyder, at den forventede spidshøjde for den sidste dispensering er ukendt. Bemærk: Den sekvens, der skal analyseres, skal være et nukleotid længere end dispenseringsrækkefølgen.
"Last variable position not analyzable due to lack of terminal sequence information" (den sidste variabelposition kan ikke analyseres på grund af manglende terminalsekvensinformation)	Der er ikke indlæst nogen sekvensinformation efter den sidste variabelregion, hvilket betyder, at den forventede spidshøjde for den variable position er ukendt. Bemærk: Den sekvens, der skal analyseres, skal være et nukleotid længere end dispenseringsrækkefølgen.
"Sequence not in phase at the end of dispensations" (sekvens ikke i fase i slutningen af dispenseringerne).	Sekvensen er ikke i fase efter, at alle nukleotider er dispenseret, hvilket betyder, at den forventede spidshøjde for den variable position er ukendt.

Meddelelsetekst

Forklaring

"Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations" (Kvantificeringen kan være usikker: Den variable position består af mere end 5 dispenseringer)

Nukleotiddispenseringer forekommer ude af fase ved en polymorfisme for mere end 5 dispenseringer, hvilket kan have en negativ indvirkning på resultatet.

"Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 variable dispensations" (Kvantificeringen kan være usikker: Den variable position kræver mere end 5 variabeldispenseringer).

En InDel-position kræver mere end 5 dispenseringer for at kunne analyseres, hvilket kan have en negativ indvirkning på resultatet.

"Quantification may be uncertain: the variable position contains a homopolymer" (Kvantificeringen kan være usikker: Den variable position indeholder et homopolymer).

Et homopolymer med en højde på ≥ 3 kommer før eller efter en enkelt-base InDel. Advarslen angiver, at pladsen er meget vanskelig at analysere.

Analysemeddelelser i AQ-funktion

"Analysis not supported" (Analysen understøttes ikke)

Variabelpladsen understøttes ikke i AQ-format.

"Deselected by user" (fravalgt af bruger)

Variabelpladsen er fravalgt ved analysen af brugeren.

"The sequence contains less reference peaks than required" (Sekvensen indeholder færre referencespidser end nødvendigt)

Pyrogrammet indeholder mindre end 5 konstante spidser med en forventet værdi på over 1.

"Not analyzable due to lack of data" (Kan ikke analyseres på grund af manglende data)

Utilstrækkelige spidser på en plads til at analysere data.

"The variable position contains a homopolymer" (Den variable position indeholder et homopolymer).

Et homopolymer med en højde på ≥ 3 kommer før eller efter en enkelt-base InDel. Advarslen angiver, at pladsen er meget vanskelig at analysere.

Meddelelsetekst

Forklaring

"Uncertain due to low signal-to-noise ratio" (Usikker på grund af lavt forhold mellem signal og lyd)

Summen af spidser i den variable region adskiller sig ikke signifikant fra lyden, hvilken kan have en negativ indvirkning på resultatet.

"Failed due to low signal-to-noise ratio" (Ikke-godkendt på grund af lavt forhold mellem signal og lyd)

Summen af spidser i den variable region adskiller sig ikke signifikant fra lyden, hvilken kan have en negativ indvirkning på resultatet

"Uncertain due to low peak height" (usikker på grund af lav spidshøjde)

Det enkelte spidsniveau i begyndelsen af pyrogrammet er lavere end den spidshøjde, der kræves for "passed"-kvalitet (defineret i analyseopsætningen).

"Failed due to low peak height" (Ikke-godkendt på grund af lav spidshøjde)

RLU-værdien for spidsen i den angivne position er under den forud definerede "failed"-kvalitetsværdi.

"Uncertain due to high sum deviation in variable position" (Usikker på grund af høj sumafvigelse i variabelpositionen)

Summen af spidserne i en variabelregion adskiller sig fra det forventede enkeltspidsniveau i den polymorfe position og overskrider kontrolgrænsen.

"Failed due to high sum deviation in variable position" (Ikke-godkendt på grund af høj sumafvigelse i variabelpositionen)

Summen af spidserne i en variabelregion adskiller sig fra det forventede enkeltspidsniveau i den polymorfe position og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

"Uncertain due to high pattern deviation in variable position" (Usikker på grund af høj mønsterafvigelse i variabelpositionen)

Den bedste match fra mulige frekvensmønstre afviger fra det faktiske mønster og overskrider kontrolgrænsen.

"Failed due to high pattern deviation in variable position" (Ikke-godkendt på grund af høj mønsterafvigelse i variabelpositionen)

Den bedste match fra mulige frekvensmønstre afviger fra det faktiske mønster og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

Meddelelsetekst

Forklaring

"Uncertain surrounding reference sequence pattern" (Usikkert omgivende referencesekvensmønster)

De målte spidshøjder i kvalitetsvinduet afviger fra de forventede værdier og overskrider kontrolgrænsen.

"Failed surrounding reference sequence pattern" (Ikke-godkendt omgivende referencesekvensmønster)

De målte spidshøjder i kvalitetsvinduet afviger fra de forventede værdier og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

"Uncertain due to high peak height deviation at dispensation" (Usikker på grund af høj spidshøjdeafvigelse ved dispensering)

Den målte spidshøjde ved den angivne dispensering afviger fra den forventede værdi og overskrider kontrolgrænsen.

"Failed due to high peak height deviation at dispensation" (Ikke-godkendt på grund af høj spidshøjdeafvigelse ved dispensering)

Den målte spidshøjde ved den angivne dispensering afviger fra den forventede værdi og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

"Uncertain reference sequence pattern at more than 5 dispensations" (Usikkert referencesekvensmønster ved mere end 5 dispenseringer)

De målte spidshøjder afviger fra de forventede værdier ved mere end 5 dispenseringer og overskrider kontrolgrænsen.

"Failed reference sequence pattern at more than 5 dispensations" (Ikke-godkendt referencesekvensmønster ved mere end 5 dispenseringer)

De målte spidshøjder afviger fra de forventede værdier ved mere end 5 dispenseringer og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

Analysemeddelelser i SNP-funktion

"Failed genotype determination" (Ikke-godkendt genotype-bestemmelse)

Differencen mellem det bedste og det næstbedste genotype-match er mindre end grænsen for ikke-godkendt.

"Uncertain genotype determination" (Usikker genotype-bestemmelse)

Differencen mellem det bedste og det næstbedste genotype-match er mindre end kontrolgrænsen.

Analyseopsætningsmeddelelser i CpG-funktion

"Invalid sequence" (ugyldig sekvens)

Der er en fejl i den indlæste sekvens, der skal analyseres.

Meddelelsetekst

Forklaring

"Cannot resolve sequence direction"
(Kan ikke løse sekvensretning)

Den indlæste sekvens, der skal analyseres, indeholder nukleotider, der er specifikke for enten fremadgående eller bagudgående bisulfitbehandlede sekvenser.

"A CpG site has to be biallelic" (En CpG-plads skal være biallel)

Forekommer, hvis den angivne CpG-plads indeholder en ekstra polymorfisme, f.eks. C/T/AG.

"Variable positions with common dispensations cannot be analyzed"
(variable positioner med fælles dispenseringer kan ikke analyseres)

Nukleotiddispenseringer for flere polymorfismer er ude af fase.
En variabel region evalueret med nukleotid-dispenseringer, som gælder for mere end en polymorfisme (fælles dispensering) kan ikke analyseres. For eksempel vil sekvensen til analysering af A/GC/TCAC med dispenseringsrækkefølgen CATCGTCA ikke blive analyseret, da dispenseringerne vil være ude af fase.

"The generated dispensation order contains less reference peaks than required"

Analysen indeholder mindre end 5 konstante spidser med en forventet værdi på over 1.

"Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information" (Sekvens usikker på grund af manglende terminalsekvensinformation)

Det sidste nukleotid i sekvensen, der skal analyseres, er blevet dispenseret, hvilket betyder, at den forventede spidshøjde for den sidste dispensering er ukendt.

"Last variable position not analyzable due to lack of terminal sequence information" (den sidste variabelposition kan ikke analyseres på grund af manglende terminalsekvensinformation)

Der er ikke indlæst nogen sekvensinformation efter den sidste variabelregion, hvilket betyder, at den forventede spidshøjde for den variable position er ukendt.

"Sequence not in phase at the end of dispensations" (sekvens ikke i fase i slutningen af dispenseringerne).

Sekvensen er ikke i fase efter, at alle nukleotider er dispenseret, hvilket betyder, at den forventede spidshøjde for den variable position er ukendt.

Meddelelsetekst

Forklaring

"Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations" (Kvantificeringen kan være usikker: Den variable position består af mere end 5 dispenseringer)

Nukleotiddispenseringer forekommer ude af fase ved en polymorfisme for mere end 5 dispenseringer, hvilket kan have en negativ indvirkning på resultatet.

Analysemeddelelser i CpG-funktion

"Analysis not supported" (Analysen understøttes ikke)

Variabelpladsen understøttes ikke i CpG-format.

"Deselected by user" (fravalgt af bruger)

Variabelpladsen er fravalgt ved analysen af brugeren.

"Uncertain bisulfite conversion at dispensation" (Usikker bisulfitkonvertering ved dispensering)

Spidsen for bisulfitkontrol ved de(n) angivne dispensering(er) er højere end kontrolgrænsen. Påvirker kvaliteten af alle pladser i sekvensen.

"Failed bisulfite conversion at dispensation" (Ikke-tilladt bisulfitkonvertering ved dispensering)

Spidsen for bisulfitkontrol ved de(n) angivne dispensering(er) er højere end grænsen for ikke-godkendt. Påvirker kvaliteten af alle pladser i sekvensen.

"The sequence contains less reference peaks than required" (Sekvensen indeholder færre referencespidser end nødvendigt)

Pyrogrammet indeholder mindre end 5 konstante spidser med en forventet værdi på over 1.

"Not analyzable due to lack of data" (Kan ikke analyseres på grund af manglende data)

Utilstrækkelige spidser på en plads til at analysere data.

"Uncertain due to low signal-to-noise ratio" (Usikker på grund af lavt forhold mellem signal og lyd)

Summen af spidser i den variable region adskiller sig ikke signifikant fra lyden (under kontrolgrænsen), hvilken kan have en negativ indvirkning på resultatet.

Meddelelsetekst

Forklaring

"Failed due to low signal-to-noise ratio"
(Ikke-godkendt på grund af lavt forhold mellem signal og lyd)

Summen af spidser i den variable region adskiller sig ikke signifikant fra lyden (under grænsen for ikke-godkendt), hvilken kan have en negativ indvirkning på resultatet.

"Uncertain due to low peak height"
(usikker på grund af lav spidshøjde)

Det enkelte spidsniveau i begyndelsen af pyrogrammet er lavere end den spidshøjde, der kræves for "passed"-kvalitet (defineret i analyseopsætningen).

"Failed due to low peak height" (Ikke-godkendt på grund af lav spidshøjde)

RLU-værdien for spidsen i den angivne position er under den forud definerede "failed"-kvalitetsværdi.

"Uncertain due to high sum deviation in variable position" (Usikker på grund af høj sumafvigelse i variabelpositionen)

Summen af spidserne i en variabelregion adskiller sig fra det forventede enkeltspidsniveau i den polymorfe position, og differencen overskrider kontrolgrænsen.

"Failed due to high sum deviation in variable position" (Ikke-godkendt på grund af høj sumafvigelse i variabelpositionen)

Summen af spidserne i en variabelregion adskiller sig fra det forventede enkeltspidsniveau i den polymorfe position, og differencen overskrider grænsen for ikke-godkendt.

"Uncertain due to high pattern deviation in variable position" (Usikker på grund af høj mønsterafvigelse i variabelpositionen)

Den bedste match fra mulige frekvensmønstre afviger fra det faktiske mønster og overskrider kontrolgrænsen.

"Failed due to high pattern deviation in variable position" (Ikke-godkendt på grund af høj mønsterafvigelse i variabelpositionen)

Den bedste match fra mulige frekvensmønstre afviger fra det faktiske mønster og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

"Uncertain surrounding reference sequence pattern" (Usikkert omgivende referencesequensmønster)

De målte spidshøjder i kvalitetsvinduet afviger fra de forventede værdier og overskrider kontrolgrænsen.

Meddelelsetekst

Forklaring

"Failed surrounding reference sequence pattern" (Ikke-godkendt omgivende referencesekvensmønster)

De målte spidshøjder i kvalitetsvinduet afviger fra de forventede værdier og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

"Uncertain due to high peak height deviation at dispensation" (Usikker på grund af høj spidshøjdeafvigelse ved dispensering)

Den målte spidshøjde ved den angivne dispensering afviger fra den forventede værdi og overskrider kontrolgrænsen.

"Failed due to high peak height deviation at dispensation" (Ikke-godkendt på grund af høj spidshøjdeafvigelse ved dispensering)

Den målte spidshøjde ved den angivne dispensering afviger fra den forventede værdi og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

"Uncertain reference sequence pattern at more than 5 dispensations" (Usikkert referencesekvensmønster ved mere end 5 dispenseringer)

De målte spidshøjder afviger fra de forventede værdier ved mere end 5 dispenseringer og overskrider kontrolgrænsen.

"Failed reference sequence pattern at more than 5 dispensations" (Ikke-godkendt referencesekvensmønster ved mere end 5 dispenseringer)

De målte spidshøjder afviger fra de forventede værdier ved mere end 5 dispenseringer og overskrider grænsen for ikke-godkendt.

Analysemeddelelser i SQA-funktion

"Base-calling not consistent with entered known bases" (Base-kald ikke i overensstemmelse med indlæste kendte baser)

Der er indlæst bruger-definerede normaliseringsspidser, og det resulterende base.kald er uoverensstemmende med de indlæste informationer.

"Low peak height" (Lav spidshøjde)

Det enkelte spidsniveau i begyndelsen af pyrogrammet er lavere end den spidshøjde, der kræves for "passed"-kvalitet (defineret i analyseopsætningen).

"High homopolymer at dispensation" (Høj homopolymer ved dispensering)

Et homopolymer bestående af mere end 5 nukleotider ved de(n) angivne dispensering(er).

Meddelelsetekst

Forklaring

"Large peak height variation" (Stor spidshøjde-variation)

Stor samlet spidshøjde-variation. Giver usikker/ikke-godkendt startkvalitet, hvis det detekteres inden for de første 5 dispenseringer.

"Large peak height variation around dispensation" (Stor spidshøjdevariation omkring dispensering)

Stor spidshøjdevariation inden for enkelt- eller dobbeltspidsniveauer. Specificerer dispensationerne, som denne advarsel gælder for, og giver usikker/ikke-godkendt kvalitet til sekvensering fra den dispensering.

"Low signal-to-noise ratio (overall)" (Lavt Signal-til-støj-ratio (samlet))

Lavt signal-til-støj-ratio. Giver usikker/ikke-godkendt startkvalitet, hvis det detekteres inden for de første 5 dispenseringer.

"Low signal-to-noise ratio from dispensation" (Lavt signal-til-støj-ratio fra dispensering)

Lavt signal-til-støj-ratio. Giver usikker/ikke-godkendt kvalitet til sekvensering fra den dispensering.

"Missing peaks in cycle starting at dispensation" (Manglende spidser i cyklus startende ved dispensering)

Der mangler spidser i en cyklus (alle 4 nukleotider er blevet dispenseret, men der er ikke detekteret nogen spids i sekvensen). Giver usikker kvalitet startende ved den sidst detekterede spids.

"Peak height deviates from the expected peak level at dispensation" (Spidshøjde afviger fra det forventede spidshøjdeniveau ved dispensering)

Den målte spidshøjde ved den angivne dispensering afviger stærkt fra den forventede værdi. Påvirker kvalitetsfarven for den angivne dispensering.

"Risk for overlaid sequence from dispensation" (Risiko for overlejret sekvens fra dispensering)

Der er detekteret en mulig baggrundssekvens i et bestemt område. Påvirker kvalitetsfarven fra begyndelsen af det pågældende område.

Meddelelsetekst**Forklaring**

"Spurious peak(s) at dispensation"
(Falsk(e) spids(er) ved dispensering)

Der er detekteret uklassificerede spidser over en vis værdi. Påvirker kvalitetsfarven startende fra den angivne dispensering.

"Wide peaks from dispensation" (Brede spidser fra dispensering)

Brede spidser detekteret. Giver usikker kvalitet startende ved den dispensering, hvor det blev detekteret. Hvis de findes inden for de første 5 dispenseringer, medfører det en usikker startkvalitet.

Referencer

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

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

Varemærker: QIAGEN®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); Adobe®, Reader® (Adobe Systems Incorporated); Excel®, Microsoft®, Windows® (Microsoft Corporation).

Aftale om begrænset licens

Brug af dette product betyder, at enhver køber eller bruger af PyroMark Q24 MDx-systemet accepterer følgende vilkår:

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

For opdaterede licensbetingelser henvises til www.qiagen.com.

© 2010 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ 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 0086-21-3865-3865 (Fax 0086-21-3865-3965 (Technical 800-988-0325, 800-988-0327

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Singapore (Orders 65-67775366 (Fax 65-67785177 (Technical 65-67775366

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

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

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

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

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

