

März 2015

# PyroMark<sup>®</sup> Q24 Control Oligo Handbuch

Version 1



Für die Installationsüberprüfung des PyroMark Q24 MDx Systems.

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen



979303



1057421DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R2

MAT

1057421DE



Sample & Assay Technologies

## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien, die die Isolierung und die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in jedem biologischen Probenmaterial ermöglichen. Unsere fortschrittlichen, qualitativ hochwertigen Produkte und Dienstleistungen stellen den Erfolg von der Probe bis zum Ergebnis sicher.

### **QIAGEN setzt Standards in:**


- der Reinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Nukleinsäure- und Protein-Assays
- microRNA-Forschung und RNAi
- der Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kit-Inhalt</b>	<b>4</b>
<b>Symbole</b>	<b>4</b>
<b>Lagerung</b>	<b>5</b>
<b>Vorgesehener Verwendungszweck</b>	<b>5</b>
<b>Anwendungseinschränkungen</b>	<b>5</b>
<b>Qualitätskontrolle</b>	<b>6</b>
<b>Technischer Service</b>	<b>6</b>
<b>Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b>	<b>6</b>
<b>Einführung</b>	<b>7</b>
Das PyroMark Prinzip und seine Anwendung	7
Kurzbeschreibung der Protokolle	7
<b>Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien</b>	<b>9</b>
<b>Protokoll: Überprüfung der Funktion des PyroMark Q24 MDx</b>	<b>10</b>
<b>Protokoll: Überprüfung der Funktion des PyroMark Q24 MDx Systems</b>	<b>15</b>
<b>Protokoll: Vorgehen bei der Fehlersuche</b>	<b>23</b>
<b>Hilfe zur Fehlersuche</b>	<b>32</b>
Qualitätsbewertung	32
Ergebnisse der Quantifizierung	36
Peakhöhe von Einzelpeaks	38
Hintergrundsignal	42
Unterschied in Peakhöhe bei Lauf mit und ohne Probenvorbereitung	42
<b>Anhang A: Vorbereitung der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation</b>	<b>44</b>
<b>Anhang B: Entleeren der Flüssigabfallbehälter und Tröge</b>	<b>46</b>
<b>Literaturhinweis</b>	<b>48</b>
<b>Bestellinformationen</b>	<b>49</b>

## Kit-Inhalt

<b>PyroMark Q24 Control Oligo</b>	
<b>Katalog-Nr.</b>	<b>979303</b>
Kontroll-Oligonukleotid, 20 $\mu$ M	50 $\mu$ l
Verdünnungspuffer (10x)	2 x 1,7 ml
Handbuch	 1

## Symbole



Zur Verwendung bis



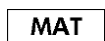
In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Katalognummer



Chargennummer



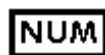
Materialnummer



Komponenten



Enthält



Anzahl



Natriumhydroxid



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller i. S. d. Gesetzes



Lesen Sie die detaillierten Informationen im Handbuch



Wichtiger Hinweis

## Lagerung

Das PyroMark Q24 Control Oligo sollte nach Wareneingang bei  $-30\text{ °C}$  bis  $-15\text{ °C}$  gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren (mehr als 5-mal pro Jahr) sollte vermieden werden. Bei Lagerung unter diesen Bedingungen ist das PyroMark Q24 Control Oligo bis zum Haltbarkeitsdatum, das auf der Kit-Verpackung angegeben ist, stabil.

## Vorgesehener Verwendungszweck

Das PyroMark Q24 Control Oligo ist als Hilfsmittel zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Installation des PyroMark Q24 MDx Systems für in-vitro-diagnostische Applikationen der Pyrosequencing<sup>®</sup> Technologie vorgesehen.

## Anwendungseinschränkungen

Für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch darf das PyroMark Q24 MDx System nur verwendet werden von:

- Personal, das entsprechend ausgebildet und in Verfahren, bei denen In-vitro-Diagnostika verwendet werden, geschult ist, und
- akkreditierten medizinischen Prüflaboratorien.

Alle Bedienungsschritte müssen gemäß den Anweisungen des PyroMark Q24 MDx Systems durchgeführt werden, so wie sie in Dialogmeldungen auf dem Bildschirm des PyroMark Q24 MDx erscheinen oder in den zugehörigen Benutzer- und anderen Handbüchern oder vom Technischen Support von QIAGEN gegeben werden. Außerdem sind dabei die in den technischen Spezifikationen vorgegebenen Grenzwerte einzuhalten.

Die erforderlichen Materialien für die Probenvorbereitung vor der Pyrosequenzierungs-Analyse sind nicht Bestandteil dieses Produkts.

Der Kit ist ausschließlich für die Verwendung mit dem PyroMark Q24 MDx System vorgesehen.

Die genaue Einhaltung der Anweisungen im Geräte-Handbuch und in diesem Handbuch ist Voraussetzung für optimale Ergebnisse. Eine andere Verdünnung der Reagenzien als die, die in diesem Handbuch beschrieben ist, wird nicht empfohlen und führt zu einer Verschlechterung der Leistungscharakteristik.

Achten Sie auf die Haltbarkeitsdaten und Lagerbedingungen, die auf der Kit-Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten des Kits aufgedruckt sind. Verwenden Sie keine Komponenten, deren Haltbarkeitsdatum abgelaufen ist oder die nicht korrekt gelagert wurden.

## Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des PyroMark Q24 Control Oligo nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Die mit dem PyroMark Q24 MDx System erhaltenen Ergebnisse müssen im Zusammenhang mit allen relevanten klinischen und Laborbefunden interpretiert werden.

## Technischer Service

Der Technische Service von QIAGEN garantiert Qualität auch in der wissenschaftlichen Beratung unserer Kunden. Hier stehen Ihnen erfahrene Wissenschaftler für Ihre Fragen zu Probenvorbereitungs- und Testtechnologien sowie zur Anwendung der QIAGEN® Produkte gerne zur Verfügung. Rufen Sie uns an, wenn Sie Fragen zum PyroMark Q24 Control Oligo oder zu anderen QIAGEN Produkten haben.

Die Erfahrungen unserer Kunden sind eine wichtige Informationsquelle bei der Entwicklung und Verbesserung unserer Produkte. Rufen Sie uns an, denn Ihre Vorschläge und Ideen zu unseren Produkten und zu neuen Techniken interessieren uns.

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support). Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (*Safety Data Sheets, SDSs*). In unserer Online-Sammlung der Materialsicherheits-Datenblätter unter [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

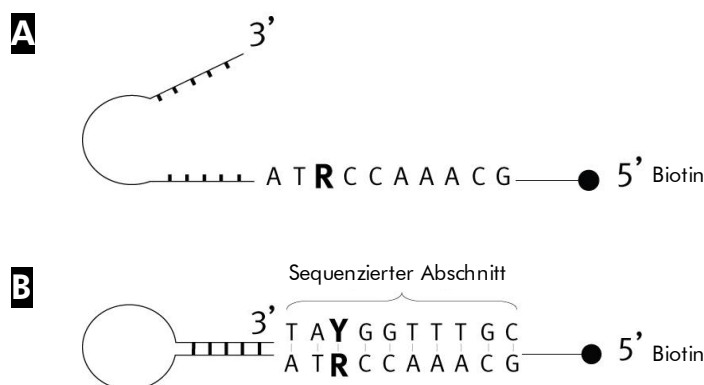
# Einführung

Mithilfe des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids kann die ordnungsgemäße Installation des PyroMark Q24 MDx Systems überprüft werden. Darüber hinaus kann das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid bei der Fehlersuche verwendet werden, um festzustellen, ob ein unerwartetes Ergebnis auf einen Fehler des Geräts, der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation oder des Assays zurückzuführen ist.

## Das PyroMark Prinzip und seine Anwendung

Beim PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid handelt es sich um ein biotinyliertes Oligonukleotid, das es dem Anwender ermöglicht zu prüfen, dass sowohl das PyroMark Q24 MDx Gerät als auch die PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation ordnungsgemäß funktionieren.

Unter definierten Bedingungen bildet das Oligonukleotid eine Haarnadel- oder Stamm-Schleifen-Struktur (*stem-loop structure*) aus. Diese Struktur ermöglicht das Selbstpriming des Oligonukleotids zur Verlängerung durch die DNA-Polymerase, sodass ein Sequenzierungs-Primer in der Pyrosequenzierungsreaktion nicht mehr benötigt wird. Der sequenzierte Bereich umfasst einzelne Basen aller Nukleotide, Homopolymere aus zwei und drei Basen sowie eine Wobble- (oder degenerierte) Base. Diese variable Position wird automatisch von der Software analysiert und die Ergebnisse werden als „% C“ und „% T“ dargestellt. In Abbildung 1 ist die Struktur des Oligonukleotids wiedergegeben.



**Abbildung 1. Struktur des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids.** **A** Die offene Struktur des Oligonukleotids. **B** Die durch Selbstpriming entstandene Struktur des Oligonukleotids; der analysierte Sequenzabschnitt ist angegeben.

## Kurzbeschreibung der Protokolle

Es wird empfohlen, zwei Läufe durchzuführen, um die ordnungsgemäße Installation des PyroMark Q24 MDx Systems zu verifizieren.

## **Funktion des PyroMark Q24 MDx**

Um die korrekte Funktion des PyroMark Q24 MDx Geräts zu überprüfen, wenden Sie das „Protokoll: Überprüfung der Funktion des PyroMark Q24 MDx“ ab Seite 10 an. Das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid wird dabei direkt in die PyroMark Q24 Platte **ohne** vorherige Probenvorbereitung mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation dispensiert.

## **Funktion des PyroMark Q24 MDx Systems**

Um die korrekte Funktion des gesamten PyroMark Q24 MDx Geräts zu überprüfen, wenden Sie das „Protokoll: Überprüfung der Funktion des PyroMark Q24 MDx Systems“ ab Seite 15 an. Das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid durchläuft dabei vor der Analyse mit dem PyroMark Q24 MDx die Probenvorbereitungsprozedur mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation.

## **Fehlersuche beim PyroMark Q24 MDx System**

Um eine Fehlersuche für das gesamte System durchzuführen, wenden Sie das „Protokoll: Vorgehen bei der Fehlersuche“ ab Seite 23 an. Dabei wird eine Pyrosequenzierungsreaktion durchgeführt, bei der das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid zum einen direkt in acht Wells und zum anderen in acht weitere Wells dispensiert wird, nachdem es die Probenvorbereitungsprozedur mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation durchlaufen hat.



## Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern (*Safety Data Sheets, SDS*) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

- Pipetten (verstellbar)\*
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Streptavidin Sepharose® High Performance (GE Healthcare, Kat.-Nr. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 MDx (Kat.-Nr. 9001513)\*†
- PyroMark Q24 MDx Software (Kat.-Nr. 9019063)†
- PyroMark Q24 Platte (Kat.-Nr. 979301)†
- PyroMark Q24 Kartusche (Kat.-Nr. 979302)†
- PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation (Kat.-Nr. 9001515 oder 9001517)\*†
- PyroMark Gold Q24 Reagenzien (Kat.-Nr. 971802)†
- PyroMark Bindungspuffer (Kat.-Nr. 979306)†
- PyroMark Denaturierungslösung (Kat.-Nr. 979307)†
- PyroMark Waschpuffer, Konzentrat (Kat.-Nr. 979308)†
- PyroMark Annealing-Puffer (Kat.-Nr. 979309)†
- Plattenschüttler\* für die DNA-Bindung an Beads (Immobilisierung)
- Heizblock\* (bis 80 °C)
- 24-Well-PCR-Platte oder -Streifen
- Deckelstreifen
- 1,5-ml- oder 2-ml-Reaktionsgefäße für die Verdünnung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids
- hochreines Wasser (Milli-Q®, 18,2 MΩ x cm oder vergleichbar)
- Ethanol (70 %)

\* Stellen Sie sicher, dass die Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerangaben überprüft und kalibriert werden.

† CE-IVD-Kennzeichnung gemäß EU-Richtlinie 98/79/EG. Alle anderen aufgeführten Produkte tragen keine CE-IVD-Kennzeichnung gemäß EU-Richtlinie 98/79/EG.

# Protokoll: Überprüfung der Funktion des PyroMark Q24 MDx

In diesem Protokoll wird die Verwendung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids beschrieben, um die Funktion des PyroMark Q24 MDx Geräts zu überprüfen. Zur Überprüfung der Funktion des gesamten PyroMark Q24 MDx Systems, inklusive der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation, siehe das „Protokoll: Überprüfung der Funktion des PyroMark Q24 MDx Systems“ auf Seite 15 ff.


## **Wichtiger Hinweis vor Beginn**

- Detaillierte Informationen, wie Sie einen Assay und einen Lauf konfigurieren, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

## **Wichtige Hinweise, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen**

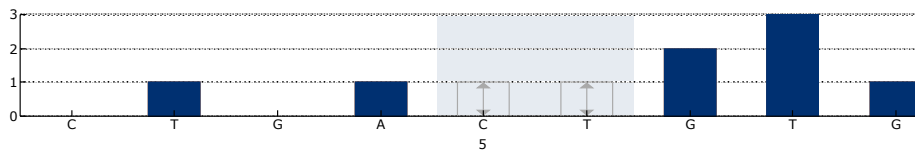
- Befolgen Sie die Anweisungen im *PyroMark Q24 MDx Handbuch* bei der Installation des PyroMark Q24 MDx Systems.
- Der Verdünnungspuffer, der mit dem PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid geliefert wird, muss vor Gebrauch verdünnt werden. Bereiten Sie den Verdünnungspuffer vor, indem Sie 200 µl des 10-fach konzentrierten Verdünnungspuffers mit 1800 µl hochreinem Wasser verdünnen.
- Temperieren Sie den PyroMark Q24 Platten-Halter auf 80 °C (wird in Schritt 11 benötigt), indem Sie ihn auf einen entsprechend eingestellten Heizblock stellen.

## **Durchführung**


- 1. Konfigurieren Sie mithilfe der PyroMark Q24 MDx Software einen Assay für das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid.**
- 2. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste und wählen Sie die Funktion „New AQ Assay“ („Neuer AQ-Assay“).**
- 3. Tippen Sie die folgende Sequenz als „zu analysierende Sequenz“ („Sequence to Analyze“) ein:  
TAYGGTTTGC**

 Weitere Informationen, wie Sie eine Assay-Datei anlegen, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

- 4. Klicken Sie auf die Schaltfläche „Generate Dispensation Order“ („Dispensier-Reihenfolge generieren“), um die folgende Dispensier-Reihenfolge der Nukleotide zu erhalten:  
CTGACTGTG.**



**Abbildung 2. Histogramm im AQ-Modus.** Bei den Nucleotid-Zugaben 1 und 3 handelt es sich jeweils um Dispensierungen von Leerproben, die als Negativkontrollen dienen. Bei der 5. und 6. Dispensierung wird die variable Position (Wobble- bzw. degenerierte Base) analysiert.

- Um die Assay-Datei zu speichern, klicken Sie auf das Disketten-Symbol  in der Werkzeugleiste.**
- Legen Sie eine Laufdatei an, indem Sie die Assay-Parameter für alle 24 Wells importieren.**


Um einem Well der Platte eine Assay-Datei zuzuordnen, können Sie entweder

- das Well mit der rechten Maustaste anklicken und die Funktion "Load Assay" („Assay laden“) aus dem Kontextmenü auswählen oder
- die Assay-Datei aus dem Shortcut-Browser auswählen und ihn per Drag-and-drop in das gewünschte Well ziehen.

Ein Well wird mit einer bestimmten Farbe dargestellt, je nachdem welcher Assay ihm zugeordnet wurde (Farbkodierung).



Weitere Informationen, wie Sie eine Laufdatei anlegen, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

- Speichern Sie die Laufdatei auf einem USB-Speicherstick (gehört zum Lieferumfang des PyroMark Q24 MDx Systems).**
- Drucken Sie eine Liste der benötigten Volumina des Enzymgemischs, des Substratgemischs und der Nucleotide sowie die Konfiguration der Platte. Wählen Sie dazu die Funktion "Pre Run Information" aus dem "Tools"-Menü und klicken Sie auf , wenn der Bericht erscheint.**
- Verdünnen Sie das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonucleotid gemäß Tabelle 1 auf 0,04  $\mu\text{M}$ .**


**Tabelle 1. Verdünnung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Konzentration</b>
PyroMark Q24 Control Oligo	10 $\mu$ l	20 $\mu$ M
Verdünnungspuffer (1x)*	90 $\mu$ l	–
<b>Verdünnung 1</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>	<b>2 <math>\mu</math>M</b>
Verdünnung 1 (aus vorigem Verdünnungsschritt)	30 $\mu$ l	2 $\mu$ M
Verdünnungspuffer (1x)*	1470 $\mu$ l	–
<b>End-Verdünnung</b>	<b>1500 <math>\mu</math>l</b>	<b>0,04 <math>\mu</math>M</b>

\* Stellen Sie sicher, dass der mit dem PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid gelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer vor Gebrauch mit hochreinem Wasser verdünnt wird (siehe den Abschnitt „Wichtige Hinweise, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen“ auf Seite 10).


- 10. Geben Sie 25  $\mu$ l des auf 0,04  $\mu$ M verdünnten PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids in jedes Well einer PyroMark Q24 Platte.**
- 11. Erhitzen Sie die PyroMark Q24 Platte mit den PyroMark Q24 Oligonukleotiden im vorgewärmten PyroMark Q24 Platten-Halter auf einem Heizblock für 2 Min. bei 80 °C.**
- 12. Entnehmen Sie die PyroMark Q24 Platte aus dem Platten-Halter und lassen Sie die Proben für mindestens 5 Min. auf Raumtemperatur (15–25 °C) abkühlen.**
- 13. Setzen Sie die PyroMark Q24 Kartusche ein, die mit den geeigneten Volumina der PyroMark Gold Q24 Reagenzien gefüllt ist, so wie sie im "Pre Run Information"-Bericht (siehe Schritt 8) angegeben sind.**  
Den "Pre Run Information"-Bericht finden Sie im "Tools"-Menü (bei der Konfiguration des Laufs; siehe im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*). Er enthält Informationen über die Volumina an Nukleotiden, Enzymgemisch und Substratgemisch, die für den Assay benötigt werden.
- 14. Öffnen Sie die Kartuschenhalterung und setzen Sie die gefüllte PyroMark Q24 Kartusche mit nach außen zeigendem Etikett ein. Drücken Sie die Kartusche ganz hinein und drücken Sie sie dann nach unten.**
- 15. Vergewissern Sie sich, dass die Linie vorne an der Kartusche sichtbar ist und schließen Sie die Halterung.**
- 16. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und setzen Sie die Platte auf den Heizblock.**
- 17. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.**

**18. Stecken Sie den USB-Speicherstick (mit der Laufdatei) in den USB-Anschluss an der Gerätefront.**

 Entfernen Sie den Stick nicht vor Ende des Laufs aus dem USB-Anschluss.

**19. Wählen Sie auf dem Bildschirm mithilfe der Pfeiltasten  $\blacktriangle$  und  $\blacktriangledown$  im Hauptmenü die Funktion "Run" („Lauf“) und drücken Sie dann "OK".**

**20. Wählen Sie die Laufdatei mithilfe der Pfeiltasten  $\blacktriangle$  und  $\blacktriangledown$ .**

 Um den Inhalt eines Ordners anzusehen, wählen Sie diesen Ordner und drücken auf "Select" („Auswählen“). Durch Drücken der Option "Back" („Zurück“) gelangen Sie zur vorherigen Ansicht.

**21. Nachdem Sie die Laufdatei ausgewählt haben, starten Sie den Lauf durch erneutes Drücken der Schaltfläche "Select" („Auswählen“).**

**22. Nach Ende des Laufs bestätigt das Gerät, dass die Laufdatei auf dem USB-Speicherstick gespeichert wurde; drücken Sie dann die Schaltfläche "Close" („Beenden“).**

**23. Entnehmen Sie den USB-Speicherstick.**

**24. Öffnen Sie den Gerätedeckel.**

**25. Öffnen Sie die Kartuschenhalterung und entnehmen Sie die PyroMark Q24 Kartusche, indem Sie sie anheben und herausziehen.**


**26. Schließen Sie die Halterung.**

**27. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und nehmen Sie die PyroMark Q24 Platte von dem Heizblock.**

**28. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.**

**29. Verwerfen Sie die PyroMark Q24 Platte und reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche (siehe das *PyroMark Gold Q24 Reagents Handbuch*).**

**30. Öffnen Sie die Laufdatei in der PyroMark Q24 MDx Software und analysieren Sie alle Wells. Das erhaltene Peakmuster für Lauf 1 sollte wie das in Abbildung 3 aussehen.**

 Um die Werte für die Peakhöhen zu erhalten, wählen Sie die Option "Export Peak Heights" („Peakhöhen exportieren“) im "Tools"-Menü. Speichern Sie dann die Daten in einem geeigneten Dateiformat (\*.csv oder \*.tsv) ab und öffnen Sie diese Datei in Microsoft® Excel (in Tab-getrenntem Format), um für jedes Well die mittlere Höhe der Einzelpeaks wie im Folgenden beschrieben zu berechnen.

■ **Führen Sie eine Qualitätsbewertung durch.**

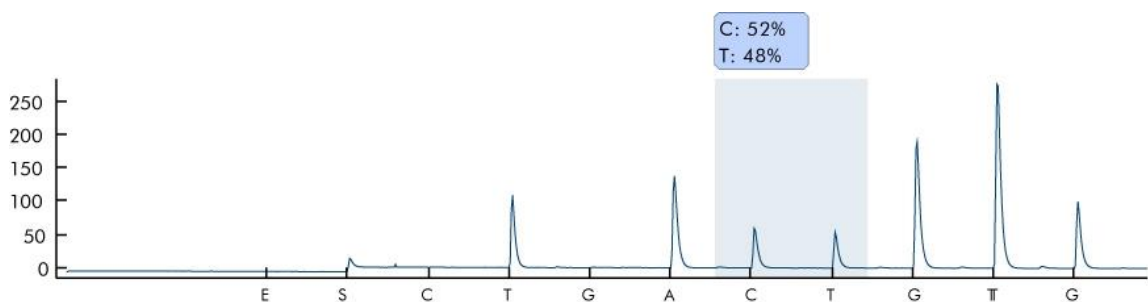
Bei allen Wells sollte die Qualitätsbewertung "Passed" („Bestanden“) erhalten werden, was als blauer Balken im unteren Feld bei

Betrachtung des Wells in der "Overview"-Registerkarte dargestellt und mit dem %-C-Wert in einem blauen Rechteck im Pyrogramm (Pyrogram®) angezeigt wird. Falls die Qualitätsbewertung "Check" („Überprüfen“) oder "Failed" („Fehlgeschlagen“) sein sollte, finden Sie im Bereich "Well Information" Erklärungen dafür.

■ **Bewertung der Peakhöhen.**

Der Wert der Peakhöhe sollte idealerweise  $75 \pm 20$  RLE betragen.

❗ Falls die erhaltenen Werte innerhalb der gesetzten Grenzwerte liegen, ist das System ordnungsgemäß installiert. Falls die Ergebnisse nicht wie zuvor beschrieben sind, siehe das Kapitel "Hilfe zur Fehlersuche" auf Seite 32 ff., um mögliche Ursachen für das Fehlschlagen zu finden, und wiederholen Sie anschließend den Lauf 1. Falls auch die Wiederholung von Lauf 1 zum Ergebnis "Failed" führt, lesen Sie bitte in unserem Technischen Support-Center unter [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) nach oder rufen Sie den Technischen Service von QIAGEN an (siehe Rückseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



**Abbildung 3. Pyrogramm von Lauf 1.**

# Protokoll: Überprüfung der Funktion des PyroMark Q24 MDx Systems

In diesem Protokoll wird die Verwendung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids beschrieben, um die Funktion des gesamten PyroMark Q24 MDx Systems, inklusive der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation, zu überprüfen. Wenn Sie nur die Funktion des PyroMark Q24 MDx Geräts überprüfen möchten, siehe das „Protokoll: Überprüfung der Funktion des PyroMark Q24 MDx“ auf Seite 10 ff.


## **Wichtiger Hinweis vor Beginn**

- Detaillierte Informationen, wie Sie einen Assay und einen Lauf konfigurieren, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

## **Wichtige Hinweise, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen**

- Befolgen Sie die Anweisungen im *PyroMark Q24 MDx Handbuch* bei der Installation des PyroMark Q24 MDx Systems.
- Der Verdünnungspuffer, der mit dem PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid geliefert wird, muss vor Gebrauch verdünnt werden. Bereiten Sie den Verdünnungspuffer vor, indem Sie 200 µl des 10-fach konzentrierten Verdünnungspuffers mit 1800 µl hochreinem Wasser verdünnen.
- Temperieren Sie den PyroMark Q24 Platten-Halter auf 80 °C (wird in Schritt 30 benötigt), indem Sie ihn auf einen entsprechend eingestellten Heizblock stellen.
- Lassen Sie vor Beginn alle benötigten Reagenzien und Lösungen auf Raumtemperatur (15–25 °C) äquilibrieren.

## **Durchführung**

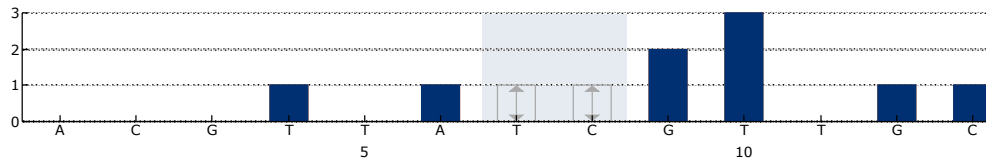
- 1. Konfigurieren Sie mithilfe der PyroMark Q24 MDx Software einen Assay für das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid.**
- 2. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste und wählen Sie die Funktion „New AQ Assay“ („Neuer AQ-Assay“).**
- 3. Tippen Sie die folgende Sequenz als „zu analysierende Sequenz“ („Sequence to Analyze“) ein:**

**TAYGGTTTGCA**


-  Weitere Informationen, wie Sie eine Assay-Datei anlegen, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

4. **Geben Sie manuell die folgende Nukleotid-„Dispensier-Reihenfolge“ („Dispensation Order“) ein:**  
**ACGTTATCGTTGC**

 Weitere Informationen, wie Sie eine Assay-Datei anlegen, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.



**Abbildung 4. Histogramm im AQ-Modus.** Bei den Nukleotid-Zugaben 1, 2, 3, 5 und 11 handelt es sich jeweils um Dispensierungen von Leerproben, die als Negativkontrollen dienen. Bei der 7. und 8. Dispensierung wird die variable Position analysiert.


5. **Um die Assay-Datei zu speichern, klicken Sie auf das Disketten-Symbol  in der Werkzeugleiste.**
6. **Legen Sie eine Laufdatei an, indem Sie die Assay-Parameter für alle 24 Wells importieren.**

Um einem Well der Platte eine Assay-Datei zuzuordnen, können Sie entweder

- das Well mit der rechten Maustaste anklicken und die Funktion „Load Assay“ („Assay laden“) aus dem Kontextmenü auswählen oder
- die Assay-Datei aus dem Shortcut-Browser auswählen und ihn per Drag-and-drop in das gewünschte Well ziehen.

Ein Well wird mit einer bestimmten Farbe dargestellt, je nachdem welcher Assay ihm zugeordnet wurde (Farbkodierung).

 Weitere Informationen, wie Sie eine Laufdatei anlegen, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

7. **Speichern Sie die Laufdatei auf einem USB-Speicherstick (gehört zum Lieferumfang des PyroMark Q24 MDx Systems).**
8. **Drucken Sie eine Liste der benötigten Volumina des Enzymgemischs, des Substratgemischs und der Nukleotide sowie die Konfiguration der Platte. Wählen Sie dazu die Funktion „Pre Run Information“ aus dem „Tools“-Menü und klicken Sie auf , wenn der Bericht erscheint.**
9. **Schütteln Sie die Flasche mit der Streptavidin Sepharose High Performance vorsichtig, bis eine homogene Lösung vorliegt.**
10. **Bereiten Sie einen Master-Mix für die DNA-Immobilisierung gemäß Tabelle 2 vor. Setzen Sie ein Volumen an, das um 10 % größer ist als das Volumen, das für die Gesamtzahl der durchzuführenden Reaktionen erforderlich ist.**



**Tabelle 2. Master-Mix für die DNA-Immobilisierung**

<b>Anzahl Proben</b>	<b>1</b>	<b>26*</b>
Streptavidin Sepharose High Performance	2 µl	52 µl
PyroMark Bindungspuffer ("Binding Buffer")	40 µl	1040 µl
hochreines Wasser	13 µl	338 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>55 µl</b>	<b>1430 µl</b>

\* Diese Zahl ergibt ein ausreichendes Volumen Master-Mix für 24 zu analysierende Proben.

**11. Verdünnen Sie das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid gemäß Tabelle 3 auf 0,04 µM.**

**Tabelle 3. Verdünnung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Konzentration</b>
PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid	10 µl	20 µM
Verdünnungspuffer (1x)*	90 µl	–
<b>Verdünnung 1</b>	<b>100 µl</b>	<b>2 µM</b>
Verdünnung 1 (aus vorigem Verdünnungsschritt)	30 µl	2 µM
Verdünnungspuffer (1x)*	1470 µl	–
<b>End-Verdünnung</b>	<b>1500 µl</b>	<b>0,04 µM</b>

\* Stellen Sie sicher, dass der mit dem PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid gelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer vor Gebrauch mit hochreinem Wasser verdünnt wird (siehe „Wichtige Hinweise, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen“ auf Seite 15).

**12. Schütteln Sie das Röhrchen mit dem Master-Mix und pipettieren Sie jeweils 55 µl Master-Mix und 25 µl des verdünnten PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids (Konzentration: 0,04 µM) in alle 24 Wells einer 24-Well-PCR-Platte oder in PCR-Streifen.**

**13. Verschließen Sie die PCR-Platte (oder -Streifen) mit PCR-Deckelstreifen.**

**14. Schütteln Sie die PCR-Platte für 5–10 Min. bei 1400 UpM und Raumtemperatur (15–25 °C).**

**i** Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Die Bindung der Oligos an die Beads (Immobilisierung) muss daher sofort nach dem Schütteln der PCR-Platte durchgeführt werden.

**i** Während dieses Arbeitsschritts können Sie die PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation für die Probenverarbeitung vorbereiten (siehe Anhang A auf Seite 44 f.).

**15. Pipettieren Sie 25 µl des PyroMark Annealing-Puffers in jedes Well einer PyroMark Q24 Platte.**

**i** Halten Sie einen der PyroMark Q24 Platten-Halter (mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation geliefert) bei Raumtemperatur (15–25 °C) bereit, und benutzen Sie ihn als Halter bei der Vorbereitung und zum Transportieren der Platte.

**16. Setzen Sie die PCR-Platte (oder -Streifen) und die PyroMark Q24 Platte auf die Arbeitsplattform der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation (siehe Abbildung 5).**

**i** Stellen Sie sicher, dass die Platte genauso ausgerichtet ist wie bei der Beschickung mit den Proben.



**Abbildung 5. Positionierung der PCR-Platte (oder -Streifen) und der PyroMark Q24 Platte in der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation.** Die gekennzeichneten Positionen enthalten: 70 % Ethanol (1), PyroMark Denaturierungslösung (2), PyroMark Waschpuffer (3) und hochreines Wasser (4, 5). P: Park-Position.

**17. Legen Sie Unterdruck an den Vakuum-Saugkopf an, indem Sie den Vakuumschalter öffnen.**

**18. Senken Sie die Filter-Hohlnadeln vorsichtig in die Wells der PCR-Platte (oder -Streifen) ab, um die Beads mit der immobilisierten Template-DNA anzusaugen. Halten Sie die Hohlnadeln für 15 s in Position. Seien Sie vorsichtig, wenn Sie den Saugkopf anheben.**


**i** Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Falls über 1 Min. seit dem Schütteln der Platte (oder Streifen) vergangen ist, schütteln Sie sie erneut für 1 Min., bevor Sie die Beads ansaugen.

- 19. Überführen Sie den Saugkopf in den Trog mit 70 % Ethanol (Trog 1). Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln für 5 s.**
- 20. Überführen Sie den Saugkopf in den Trog mit PyroMark Denaturierungslösung (Trog 2). Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln für 5 s.**
- 21. Überführen Sie den Saugkopf in den Trog mit PyroMark Waschpuffer (Trog 3). Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln für 10 s.**
- 22. Heben Sie den Saugkopf an und schwenken Sie ihn um mehr als 90° in die Senkrechte, und lassen Sie für 5 s die Flüssigkeit aus den Filter-Hohlnadeln ablaufen (siehe Abbildung 6).**




Abbildung 6. Der Saugkopf um mehr als 90° in die Senkrechte geschwenkt.

- 23. Schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf (auf „Off“), während sie ihn über der PyroMark Q24 Platte halten.**
- 24. Geben Sie die Beads in die Platte mit jeweils 25 µl PyroMark Annealing-Puffer pro Well ab, indem Sie den Saugkopf vorsichtig hin und her schütteln. Lassen Sie die Filter-Hohlnadeln auf den Boden der Wells absetzen.**
- 25. Überführen Sie den Saugkopf in den ersten Trog mit hochreinem Wasser (Trog 4) und schütteln Sie ihn für 10 s.**
- 26. Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln, indem Sie die Hohlnadeln in den zweiten Trog mit hochreinem Wasser (Trog 5) eintauchen und Unterdruck anlegen. Spülen Sie die Hohlnadeln mit 70 ml hochreinem Wasser.**
- 27. Heben Sie den Saugkopf an und schwenken Sie ihn um mehr als 90° in die Senkrechte, und lassen Sie für 5 s die Flüssigkeit aus den Filter-Hohlnadeln ablaufen (siehe Abbildung 6).**
- 28. Schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf (auf „Off“) und setzen Sie ihn in die Park-(P-)Position.**
- 29. Schalten Sie die Vakuumpumpe ab.**


 Am Ende eines Arbeitstags sollten der Flüssigabfall und Reste der Lösungen verworfen und die PyroMark Q24 MDx Vakuüm-Arbeitsstation auf Staub und verschüttete Flüssigkeit untersucht werden (siehe Anhang B auf Seite 46 f.).

- 30. Erhitzen Sie die PyroMark Q24 Platte mit den Proben im vorge-wärmten PyroMark Q24 Platten-Halter auf einem Heizblock für 2 Min. bei 80 °C.**
- 31. Entnehmen Sie die PyroMark Q24 Platte aus dem Platten-Halter und lassen Sie die Proben für mindestens 5 Min. auf Raumtemperatur (15–25 °C) abkühlen.**
- 32. Setzen Sie die PyroMark Q24 Kartusche ein, die mit den geeigneten Volumina der PyroMark Gold Q24 Reagenzien gefüllt ist, so wie sie im "Pre Run Information"-Bericht (siehe Schritt 8) angegeben sind.**

Den "Pre Run Information"-Bericht finden Sie im "Tools"-Menü (bei der Konfiguration des Laufs; siehe im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*). Er enthält Informationen über die Volumina an Nukleotiden, Enzymgemisch und Substratgemisch, die für den Assay benötigt werden.
- 33. Öffnen Sie die Kartuschenhalterung und setzen Sie die gefüllte PyroMark Q24 Kartusche mit nach außen zeigendem Etikett ein. Drücken Sie die Kartusche ganz hinein und drücken Sie sie dann nach unten.**
- 34. Vergewissern Sie sich, dass die Linie vorne an der Kartusche sichtbar ist und schließen Sie die Halterung.**
- 35. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und setzen Sie die Platte auf den Heizblock.**
- 36. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.**
- 37. Stecken Sie den USB-Speicherstick (mit der Laufdatei) in den USB-Anschluss an der Gerätefront.**

 Entfernen Sie den Stick nicht vor Ende des Laufs aus dem USB-Anschluss.

- 38. Wählen Sie auf dem Bildschirm mithilfe der Pfeiltasten  $\blacktriangle$  und  $\blacktriangledown$  im Hauptmenü die Funktion "Run" („Lauf“) und drücken Sie dann "OK".**
- 39. Wählen Sie die Laufdatei mithilfe der Pfeiltasten  $\blacktriangle$  und  $\blacktriangledown$ .**

 Um den Inhalt eines Ordners anzusehen, wählen Sie diesen Ordner und drücken auf "Select" („Auswählen“). Durch Drücken der Option "Back" („Zurück“) gelangen Sie zur vorherigen Ansicht.

- 40. Nachdem Sie die Laufdatei ausgewählt haben, starten Sie den Lauf durch erneutes Drücken der Schaltfläche "Select" („Auswählen“).**

41. Nach Ende des Laufs bestätigt das Gerät, dass die Laufdatei auf dem USB-Speicherstick gespeichert wurde; drücken Sie dann die Schaltfläche "Close" („Beenden“).
42. Entnehmen Sie den USB-Speicherstick.
43. Öffnen Sie den Gerätedeckel.
44. Öffnen Sie die Kartuschenhalterung und entnehmen Sie die PyroMark Q24 Kartusche, indem Sie sie anheben und herausziehen.
45. Schließen Sie die Halterung.
46. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und nehmen Sie die PyroMark Q24 Platte von dem Heizblock.
47. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.
48. Verwerfen Sie die PyroMark Q24 Platte und reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche (siehe das *PyroMark Gold Q24 Reagents Handbuch*).
49. Öffnen Sie die Laufdatei in der PyroMark Q24 MDx Software und analysieren Sie alle Wells. Das erhaltene Peakmuster für Lauf 2 sollte wie das in Abbildung 7 aussehen.

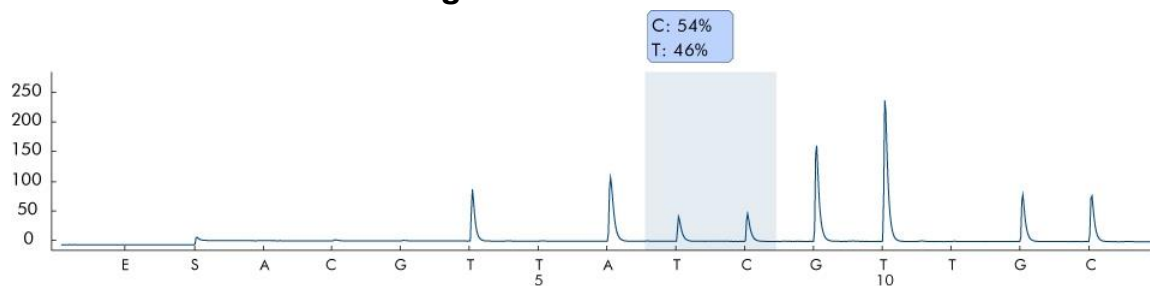


Abbildung 7. Pyrogramm von Lauf 2.

50. Bestätigen Sie die ordnungsgemäße Installation des Systems und Verwendung der Reagenzien, indem Sie die Qualitätsbewertung, die Ergebnisse der Quantifizierung, die Höhen der einzelnen Peaks und das Hintergrundsignal evaluieren.



Um die Werte für die Peakhöhen zu erhalten, wählen Sie die Option "Export Peak Heights" („Peakhöhen exportieren“) im "Tools"-Menü. Speichern Sie die dann Daten in einem geeigneten Dateiformat (\*.csv oder \*.tsv) ab und öffnen Sie diese Datei in Microsoft Excel (in Tab-getrenntem Format), um für jedes Well die mittlere Höhe der Einzelpeaks und des Hintergrundsignals wie im Folgenden beschrieben zu berechnen.

■ **Führen Sie eine Qualitätsbewertung durch.**

Bei allen Wells sollte die Qualitätsbewertung "Passed" („Bestanden“) erhalten werden, was als blauer Balken im unteren Feld bei Betrachtung des Wells in der "Overview"-Registerkarte dargestellt und mit dem %-C-Wert in einem blauen Rechteck im Pyrogramm angezeigt wird. Falls die Qualitätsbewertung "Check" („Überprüfen“) oder "Failed" („Fehlgeschlagen“) sein sollte, finden Sie im Bereich "Well Information" Erklärungen dafür.

■ **Evaluieren Sie die Ergebnisse der Quantifizierung.**

Wählen Sie die Option "AQ Analysis Statistics Report" („AQ-Analysestatistik-Bericht“) aus dem "Reports"-Menü. Die Ergebnisse der Quantifizierung werden mit Standardabweichung in dem Bericht angegeben. Der %-C-Wert sollte im Bereich von 40–60 % sein. Die Standardabweichung sollte 2 % nicht überschreiten.

■ **Bewertung der Peakhöhe von Einzelpeaks.**

Die mittlere Peakhöhe von Einzelpeaks sollte idealerweise  $75 \pm 20$  RLE betragen.

$$\text{Mittlere Peakhöhe von Einzelpeaks} = \frac{\text{Summe der einzelnen Peakhöhen (Dispensierung 4, 6, 12, 13)}}{4}$$

■ **Bewertung des Hintergrundsignals.**

Der Hintergrund bei den Dispensierungen von Leerproben sollte 3 % nicht überschreiten.

$$\text{Hintergrund (\%)} = \frac{\text{Summe der Werte bei den Leerproben (Dispensierung 1, 2, 3, 5)}}{\text{Summe der einzelnen Peakhöhen (Dispensierung 4, 6, 12, 13)}} \times 100$$

**i** Falls die erhaltenen Werte innerhalb der gesetzten Grenzwerte liegen, ist das System ordnungsgemäß installiert. Falls die Ergebnisse nicht wie zuvor beschrieben sind, siehe das Kapitel "Hilfe zur Fehlersuche" auf Seite 32 ff., um mögliche Fehlerursachen und Maßnahmen zur Abhilfe zu finden. Falls das Problem im Kapitel „Hilfe zur Fehlersuche“ nicht beschrieben ist, schauen Sie auch bitte in unserem Technischen Support-Center unter [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support) nach oder rufen Sie den Technischen Service von QIAGEN an (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Protokoll: Vorgehen bei der Fehlersuche

Falls ein unerwartetes Ergebnis erhalten wurde, ist es sehr wichtig zu bestimmen, ob dies auf einen Fehler des PyroMark Q24 MDx Geräts, der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation oder des Assays zurückzuführen ist. In diesem Protokoll wird die Verwendung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids beschrieben, um die Funktion des PyroMark Q24 MDx Systems zu überprüfen, wobei die Ergebnisse mit und ohne Verwendung der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation verglichen werden.


## **Wichtiger Hinweis vor Beginn**

- Detaillierte Informationen, wie Sie einen Assay und einen Lauf konfigurieren, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

## **Wichtige Hinweise, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen**

- Befolgen Sie die Anweisungen im *PyroMark Q24 MDx Handbuch* bei der Installation des PyroMark Q24 MDx Systems.
- Der Verdünnungspuffer, der mit dem PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid geliefert wird, muss vor Gebrauch verdünnt werden. Bereiten Sie den Verdünnungspuffer vor, indem Sie 200 µl des 10-fach konzentrierten Verdünnungspuffers mit 1800 µl hochreinem Wasser verdünnen.
- Temperieren Sie den PyroMark Q24 Platten-Halter auf 80 °C (wird in Schritt 30 benötigt), indem Sie ihn auf einen entsprechend eingestellten Heizblock stellen.
- Lassen Sie vor Beginn alle benötigten Reagenzien und Lösungen auf Raumtemperatur (15–25 °C) äquilibrieren.

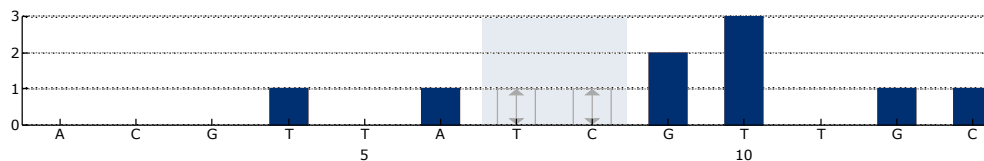
## **Durchführung**

1. **Konfigurieren Sie mithilfe der PyroMark Q24 MDx Software einen Assay für das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid.**
2. **Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste und wählen Sie die Funktion „New AQ Assay“ („Neuer AQ-Assay“).**
3. **Tippen Sie die folgende Sequenz als „zu analysierende Sequenz“ („Sequence to Analyze“) ein:  
TAYGGTTTGCA**


 Weitere Informationen, wie Sie eine Assay-Datei anlegen, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

4. **Geben Sie manuell die folgende Nukleotid-„Dispensier-Reihenfolge“ („Dispensation Order“) ein:  
ACGTTATCGTTGC**

**i** Weitere Informationen, wie Sie eine Assay-Datei anlegen, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.



**Abbildung 8. Histogramm im AQ-Modus.** Bei den Nukleotid-Zugaben 1, 2, 3, 5 und 11 handelt es sich jeweils um Dispensierungen von Leerproben, die als Negativkontrollen dienen. Bei der 7. und 8. Dispensierung wird die variable Position analysiert.

- 5. Um die Assay-Datei zu speichern, klicken Sie auf das Disketten-Symbol  in der Werkzeugleiste.**
- 6. Legen Sie eine Laufdatei an, indem Sie die Assay-Parameter zu den betreffenden Wells importieren.**


**i** Wir empfehlen, 16 Wells zu verwenden: acht Wells für Proben, die unter Verwendung der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation vorbereitet wurden und acht Wells für Proben, die direkt in die PyroMark Q24 Platte gegeben werden.

Um einem Well der Platte eine Assay-Datei zuzuordnen, können Sie entweder

- das Well mit der rechten Maustaste anklicken und die Funktion "Load Assay" („Assay laden“) aus dem Kontextmenü auswählen oder
- die Assay-Datei aus dem Shortcut-Browser auswählen und ihn per Drag-and-drop in das gewünschte Well ziehen.
- Empfehlung: Tragen Sie Probenkennung ("Sample ID"), Plattenkennung ("Plate ID"), Barcode, Reagenzienkennung ("Reagent ID") und eine Anmerkung zum Lauf ("Run Note") ein.

Ein Well wird mit einer bestimmten Farbe dargestellt, je nachdem welcher Assay ihm zugeordnet wurde (Farbkodierung).

**i** Weitere Informationen, wie Sie eine Laufdatei anlegen, finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*.

- 7. Speichern Sie die Laufdatei auf einem USB-Speicherstick (gehört zum Lieferumfang des PyroMark Q24 MDx Systems).**
- 8. Drucken Sie eine Liste der benötigten Volumina des Enzymgemischs, des Substratgemischs und der Nukleotide sowie die Konfiguration der Platte. Wählen Sie dazu die Funktion "Pre Run Information" aus dem "Tools"-Menü und klicken Sie auf , wenn der Bericht erscheint.**
- 9. Schütteln Sie die Flasche mit der Streptavidin Sepharose High Performance vorsichtig, bis eine homogene Lösung vorliegt.**



**10. Bereiten Sie einen Master-Mix für die DNA-Immobilisierung gemäß Tabelle 4 vor. Setzen Sie ein Volumen an, das um 10 % größer ist als das Volumen, das für die Gesamtzahl der durchzuführenden Reaktionen erforderlich ist.**

**Tabelle 4. Master-Mix für die DNA-Immobilisierung**

<b>Anzahl Proben</b>	<b>1</b>	<b>9*</b>
Streptavidin Sepharose High Performance	2 µl	18 µl
PyroMark Bindungspuffer	40 µl	360 µl
hochreines Wasser	13 µl	117 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>55 µl</b>	<b>495 µl</b>

\* Diese Zahl ergibt ein ausreichendes Volumen Master-Mix für acht zu analysierende Proben.

**11. Verdünnen Sie das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid gemäß Tabelle 5 auf 0,04 µM.**

**Tabelle 5. Verdünnung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Konzentration</b>
PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid	10 µl	20 µM
Verdünnungspuffer (1x)*	90 µl	–
<b>Verdünnung 1</b>	<b>100 µl</b>	<b>2 µM</b>
Verdünnung 1 (aus vorigem Verdünnungsschritt)	30 µl	2 µM
Verdünnungspuffer (1x)*	1470 µl	–
<b>End-Verdünnung</b>	<b>1500 µl</b>	<b>0,04 µM</b>

\* Stellen Sie sicher, dass der mit dem PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid gelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer vor Gebrauch mit hochreinem Wasser verdünnt wird (siehe „Wichtige Hinweise, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen“ auf Seite 23).

**12. Schütteln Sie das Röhrchen mit dem Master-Mix und pipettieren Sie jeweils 55 µl Master-Mix und 25 µl des verdünnten PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids (Konzentration: 0,04 µM) in acht Wells einer 24-Well-PCR-Platte oder eines PCR-Streifens.**

**13. Verschließen Sie die PCR-Platte (oder -Streifen) mit PCR-Deckelstreifen.**

**14. Schütteln Sie die PCR-Platte für 5–10 Min. bei 1400 UpM und Raumtemperatur (15–25 °C).**

**i** Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Die Bindung der Oligos an die Beads (Immobilisierung) muss daher sofort nach dem Schütteln der PCR-Platte durchgeführt werden.

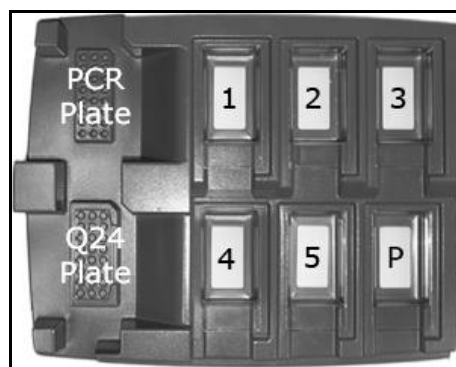
**i** Während dieses Arbeitsschritts können Sie die PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation für die Probenverarbeitung vorbereiten (siehe Anhang A auf Seite 44 f.).

**15. Geben Sie 25 µl PyroMark Annealing-Puffer in jedes Well der PyroMark Q24 Platte, das für die Probenvorbereitung des immobilisierten PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation verwendet wird. Geben Sie gemäß der Laufkonfiguration 25 µl des verdünnten PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids (Konzentration: 0,04 µM) in acht zusätzliche Wells.**

**i** Halten Sie einen der PyroMark Q24 Platten-Halter (mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation geliefert) bei Raumtemperatur (15–25 °C) bereit, und benutzen Sie ihn als Halter bei der Vorbereitung und zum Transportieren der Platte.

**16. Setzen Sie die PCR-Platte (oder -Streifen) und die PyroMark Q24 Platte auf die Arbeitsplattform der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation (siehe Abbildung 9).**

**i** Stellen Sie sicher, dass die Platte genauso ausgerichtet ist wie bei der Beschickung mit den Proben.



**Abbildung 9. Positionierung der PCR-Platte (oder -Streifen) und der PyroMark Q24 Platte in der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation.** Die gekennzeichneten Positionen enthalten: 70 % Ethanol (1), PyroMark Denaturierungslösung (2), PyroMark Waschpuffer (3) und hochreines Wasser (4, 5). P: Park-Position.

**17. Legen Sie Unterdruck an den Saugkopf an, indem Sie den Vakuumschalter öffnen.**

- 18. Senken Sie die Filter-Hohlnadeln vorsichtig in die Wells der PCR-Platte (oder -Streifen), um die Beads mit der immobilisierten Template-DNA anzusaugen. Halten Sie die Hohlnadeln für 15 s in Position. Seien Sie vorsichtig, wenn Sie den Saugkopf anheben.**



Sepharose-Beads sedimentieren relativ schnell. Falls über 1 Min. seit dem Schütteln der Platte (oder Streifen) vergangen ist, schütteln Sie sie erneut für 1 Min., bevor Sie die Beads ansaugen.

- 19. Überführen Sie den Saugkopf in den Trog mit 70 % Ethanol (Trog 1). Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln für 5 s.**
- 20. Überführen Sie den Saugkopf in den Trog mit PyroMark Denaturierungslösung (Trog 2). Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln für 5 s.**
- 21. Überführen Sie den Saugkopf in den Trog mit PyroMark Waschpuffer (Trog 3). Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln für 10 s.**
- 22. Heben Sie den Saugkopf an und schwenken Sie ihn um mehr als 90° in die Senkrechte, und lassen Sie für 5 s die Flüssigkeit aus den Filter-Hohlnadeln ablaufen (siehe Abbildung 10).**



Abbildung 10. Der Saugkopf um mehr als 90° in die Senkrechte geschwenkt.

- 23. Schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf (auf „Off“), während sie ihn über der PyroMark Q24 Platte halten.**
- 24. Geben Sie die Beads in die Platte mit jeweils 25 µl PyroMark Annealing-Puffer pro Well ab, indem Sie den Saugkopf vorsichtig hin und her schütteln. Lassen Sie die Filter-Hohlnadeln auf den Boden der Wells absetzen.**
- 25. Überführen Sie den Saugkopf in den ersten Trog mit hochreinem Wasser (Trog 4) und schütteln Sie ihn für 10 s.**
- 26. Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln, indem Sie die Hohlnadeln in den zweiten Trog mit hochreinem Wasser (Trog 5) eintauchen und Unterdruck anlegen. Spülen Sie die Hohlnadeln mit 70 ml hochreinem Wasser.**
- 27. Heben Sie den Saugkopf an und schwenken Sie ihn um mehr als 90° in die Senkrechte, und lassen Sie für 5 s die Flüssigkeit aus den Filter-Hohlnadeln ablaufen (siehe Abbildung 10).**

**28. Schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf (auf „Off“) und setzen Sie ihn in die Park-(P-)Position.**

**29. Schalten Sie die Vakuumpumpe ab.**



Am Ende eines Arbeitstags sollten der Flüssigabfall und Reste der Lösungen verworfen und die PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation auf Staub und verschüttete Flüssigkeit untersucht werden (siehe Anhang B auf Seite 46).

**30. Erhitzen Sie die PyroMark Q24 Platte mit den Proben im vorgewärmten PyroMark Q24 Platten-Halter auf einem Heizblock für 2 Min. bei 80 °C.**

**31. Entnehmen Sie die PyroMark Q24 Platte aus dem Platten-Halter und lassen Sie die Proben für mindestens 5 Min. auf Raumtemperatur (15–25 °C) abkühlen.**

**32. Setzen Sie die PyroMark Q24 Kartusche ein, die mit den geeigneten Volumina der PyroMark Gold Q24 Reagenzien gefüllt ist, so wie sie im „Pre Run Information“-Bericht (siehe Schritt 8) angegeben sind.**

Den „Pre Run Information“-Bericht finden Sie im „Tools“-Menü (bei der Konfiguration des Laufs; siehe im *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch*). Er enthält Informationen über die Volumina an Nukleotiden, Enzymgemisch und Substratgemisch, die für den Assay benötigt werden.

**33. Öffnen Sie die Kartuschenhalterung und setzen Sie die gefüllte PyroMark Q24 Kartusche mit nach außen zeigendem Etikett ein. Drücken Sie die Kartusche ganz hinein und drücken Sie sie dann nach unten.**

**34. Vergewissern Sie sich, dass die Linie vorne an der Kartusche sichtbar ist und schließen Sie die Halterung.**

**35. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und setzen Sie die Platte auf den Heizblock.**

**36. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.**

**37. Stecken Sie den USB-Speicherstick (mit der Laufdatei) in den USB-Anschluss an der Gerätefront.**



Entfernen Sie den Stick nicht vor Ende des Laufs aus dem USB-Anschluss.

**38. Wählen Sie auf dem Bildschirm mithilfe der Pfeiltasten ▲ und ▼ im Hauptmenü die Funktion „Run“ („Lauf“) und drücken Sie dann „OK“.**

**39. Wählen Sie die Laufdatei mithilfe der Pfeiltasten ▲ und ▼.**

**i** Um den Inhalt eines Ordners anzusehen, wählen Sie diesen Ordner und drücken auf "Select" („Auswählen"). Durch Drücken der Option "Back" („Zurück") gelangen Sie zur vorherigen Ansicht.

**40. Nachdem Sie die Laufdatei ausgewählt haben, starten Sie den Lauf durch erneutes Drücken der Schaltfläche "Select" („Auswählen").**

**41. Nach Ende des Laufs bestätigt das Gerät, dass die Laufdatei auf dem USB-Speicherstick gespeichert wurde; drücken Sie dann die Schaltfläche "Close" („Beenden").**

**42. Entnehmen Sie den USB-Speicherstick.**

**43. Öffnen Sie den Gerätedeckel.**

**44. Öffnen Sie die Kartuschenhalterung und entnehmen Sie die PyroMark Q24 Kartusche, indem Sie sie anheben und herausziehen.**

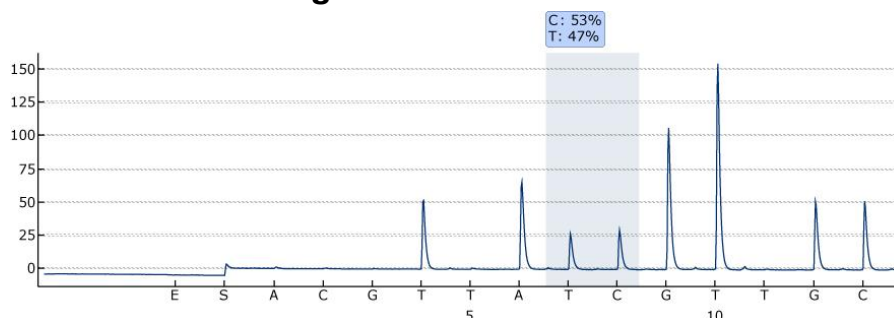
**45. Schließen Sie die Halterung.**

**46. Öffnen Sie den Plattenhalter-Rahmen und nehmen Sie die PyroMark Q24 Platte von dem Heizblock.**

**47. Schließen Sie den Plattenhalter-Rahmen und den Gerätedeckel.**

**48. Verwerfen Sie die PyroMark Q24 Platte und reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche (siehe das *PyroMark Gold Q24 Reagents Handbuch*).**

**49. Öffnen Sie die Laufdatei in der PyroMark Q24 MDx Software und analysieren Sie alle Wells. Das erhaltene Peakmuster von Lauf 3 sollte wie das in Abbildung 11 aussehen.**



**Abbildung 11. Pyrogramm von Lauf 3.**

**50. Bestätigen Sie die ordnungsgemäße Installation des Systems und Verwendung der Reagenzien, indem Sie die Qualitätsbewertung, die Ergebnisse der Quantifizierung, die Höhen der einzelnen Peaks und das Hintergrundsignal evaluieren.**

**i** Um die Werte für die Peakhöhen zu erhalten, wählen Sie die Option "Export Peak Heights" („Peakhöhen exportieren") im "Tools"-Menü. Speichern Sie die dann Daten in einem geeigneten Dateiformat (\*.csv oder \*.tsv) ab und öffnen Sie diese Datei in Microsoft Excel (in Tab-getrenntem

Format), um für jedes Well die mittlere Höhe der Einzelpeaks und des Hintergrundsignals wie im Folgenden beschrieben zu berechnen.

■ **Führen Sie eine Qualitätsbewertung durch.**

Bei allen Wells sollte die Qualitätsbewertung "Passed" („Bestanden“) erhalten werden, was als blauer Balken im unteren Feld bei Betrachtung des Wells in der "Overview"-Registerkarte dargestellt und mit dem %-C-Wert in einem blauen Rechteck im Pyrogramm angezeigt wird. Falls die Qualitätsbewertung "Check" („Überprüfen“) oder "Failed" („Fehlgeschlagen“) sein sollte, finden Sie im Bereich "Well Information" Erklärungen dafür.

■ **Evaluieren Sie die Ergebnisse der Quantifizierung.**

Wählen Sie die Option "AQ Analysis Statistics Report" („AQ-Analysestatistik-Bericht“) aus dem "Reports"-Menü. Die Ergebnisse der Quantifizierung werden mit Standardabweichung in dem Bericht angegeben. Der %-C-Wert sollte im Bereich von 40–60 % sein. Die Standardabweichung sollte 2 % nicht überschreiten.

■ **Bewertung der Peakhöhe von Einzelpeaks.**

Die mittlere Peakhöhe von Einzelpeaks sollte idealerweise  $75 \pm 20$  RLE betragen.

$$\text{Mittlere Peakhöhe von Einzelpeaks} = \frac{\text{Summe der einzelnen Peakhöhen (Dispensierung 4, 6, 12, 13)}}{4}$$

■ **Bewertung des Hintergrundsignals.**

Der Hintergrund bei den Dispensierungen von Leerproben sollte 3 % nicht überschreiten.

$$\text{Hintergrund (\%)} = \frac{\text{Summe der Werte bei den Leerproben (Dispensierung 1, 2, 3, 5)}}{\text{Summe der einzelnen Peakhöhen (Dispensierung 4, 6, 12, 13)}} \times 100$$

**51. Bestimmen Sie den Unterschied in den Peakhöhen bei Verarbeitung mit und ohne Probenvorbereitung mit der Vakuum-Arbeitsstation. Die Peaks, die bei Probenvorbereitung mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation erhalten wurden, sollten im Vergleich zu den Peaks des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids, das direkt in die PyroMark Q24 Platte gegeben wurde, nicht um mehr 20 % kleiner sein.**



Falls die erhaltenen Werte innerhalb der gesetzten Grenzwerte liegen, ist das System ordnungsgemäß installiert. Falls die Ergebnisse nicht wie zuvor beschrieben sind, siehe das Kapitel "Hilfe zur Fehlersuche" auf

Seite 32 ff., um mögliche Fehlerursachen und Maßnahmen zur Abhilfe zu finden. Falls das Problem im Kapitel „Hilfe zur Fehlersuche“ nicht beschrieben ist, schauen Sie auch bitte in unserem Technischen Support-Center unter [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support) nach oder rufen Sie den Technischen Service von QIAGEN an (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Hilfe zur Fehlersuche

Diese Anleitung zur Fehlersuche soll Ihnen eine Hilfe geben, falls einmal Probleme auftreten sollten. Weitere Informationen finden Sie auch auf der „Frequently Asked Questions“-Seite unseres Support-Centers unter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Darüber hinaus steht Ihnen unser Technischer Service (Tel.-Nr. siehe hintere Umschlagseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch haben sollten. Das Team besteht aus erfahrenen Wissenschaftlern, die Ihnen in allen molekularbiologischen Fragen gerne weiterhelfen.

Diese Hilfe zur Fehlersuche ist in folgende Abschnitte für die verschiedenen Bewertungen, die durchgeführt werden, gegliedert:

- Qualitätsbewertung (siehe unten)
- Ergebnisse der Quantifizierung (Seite 36 f.)
- Peakhöhe von Einzelpeaks (Seite 38 ff.)
- Hintergrundsignal (Seite 42)
- Unterschied in Peakhöhe bei Lauf mit und ohne Probenvorbereitung (Seite 42 f.)

 Generelle Hilfe zur Fehlerbeseitigung bei Problemen mit dem Gerät finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*.


## Qualitätsbewertung

### Kommentare und Vorschläge

---

#### Warnmeldung der Software über zu breite Peaks

Konzentration des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids zu hoch

 Befolgen Sie das zutreffende Protokoll. Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid in Verdünnungspuffer verdünnt wird, wie dies in den Protokollen beschrieben ist.



### Hoher Substrat-Peak

Verunreinigte Probe führt zu ungewöhnlich hohem Verbrauch an Substratgemisch (wird als hohes Vor-Sequenzsignal registriert)

**i** Wechseln Sie die Puffer. Verwenden Sie nur Puffer von QIAGEN oder von QIAGEN-autorisierten Händlern.

**i** Prüfen Sie mithilfe der Zoom-in-Funktion, ob überhaupt Peaks generiert wurden (markieren Sie mit der linken Maustaste einen Abschnitt des Pyrogramms).

### Qualitativ schlechte oder fehlerhafte Sequenz

a) PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid nicht korrekt vorbereitet

**i** Befolgen Sie die Anweisung zur Vorbereitung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids in den Protokollen. Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid in Verdünnungspuffer verdünnt wird, wie dies in den Protokollen beschrieben ist. Stellen Sie außerdem sicher, dass der mitgelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer zuerst 1:10 mit hochreinem Wasser verdünnt wird.

b) Fehlerhafte Dispensier-Reihenfolge

**i** Überprüfen Sie, dass die korrekte Sequenz beim Konfigurieren des Assays eingegeben wurde.

c) Puffer oder Reagenzien falsch verdünnt oder gelagert




**i** Befolgen Sie die Anweisungen, die im Reagenzien-Handbuch gegeben werden. Nehmen Sie ein leeres Well (nur mit PyroMark Annealing-Puffer gefüllt) in die Konfiguration Ihres Laufs mit auf, um zu überprüfen, ob Hintergrund-Peaks von den Nukleotiden verursacht werden.

d) Fehler bei der Dispensierung (zeigt sich zum Beispiel in Form von gesplitteten Peaks)





**i** Reinigen oder ersetzen Sie die PyroMark Q24 Kartusche. Falls das Problem danach weiterhin besteht, kontaktieren Sie den Technischen Service von QIAGEN (Kontaktinformationen siehe Rückseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kommentare und Vorschläge

---

- e) Verstopfte PyroMark Q24 Kartusche  Nukleotide werden aufgrund einer verstopften Nadel in der PyroMark Q24 Kartusche nicht korrekt dispensiert. Reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche und überprüfen Sie ihre ordnungsgemäße Funktion.
- f) Beschädigte PyroMark Q24 Kartusche  Verwerfen Sie die PyroMark Q24 Kartusche unter Beachtung der Bundes-, Landes- und kommunalen Umweltauflagen für die Entsorgung von Laborabfällen.
- g) Annealing-Zeit zu lang  Halten Sie beim Annealing die korrekte Zeit und die Temperaturen ein, wie sie in den Protokollen angegeben sind.

### Kleine oder fehlende Peaks

- a) Unzureichende Menge an Template bei der Immobilisierung  Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid korrekt verdünnt wird und verwenden Sie die in den Protokollen angegebenen Mengen.
- b) Nicht genügend Enzym- oder Substratgemisch für alle Wells  Befüllen Sie die PyroMark Q24 Kartusche gemäß den Angaben im "Pre Run Information"-Bericht.
- c) Die bei der Konfiguration des Laufs markierten Wells stimmen nicht mit der Positionierung der Proben in der Platte überein  Vergewissern Sie sich, dass Sie die Proben in die korrekten Positionen der PyroMark Q24 Platte – gemäß der Laufkonfiguration – pipettiert haben.
- d) Eine oder mehrere der Nukleotid-Kammern in der PyroMark Q24 Kartusche ist/sind nicht korrekt mit Reagenz(ien) oder Nukleotid(en) befüllt  Stellen Sie sicher, dass ausreichende Mengen an Reagenzien in die PyroMark Q24 Kartusche gefüllt werden. Befolgen Sie die zu den Produkten gehörenden Gebrauchsanweisungen.

## Kommentare und Vorschläge

---

- e) Fehler bei der Dispensierung (zeigt sich zum Beispiel in Form von gesplitteten Peaks)
- ⓘ Reinigen oder ersetzen Sie die PyroMark Q24 Kartusche. Falls das Problem danach weiterhin besteht, kontaktieren Sie den Technischen Service von QIAGEN (Kontaktinformationen siehe Rückseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).
- f) Verstopfte PyroMark Q24 Kartusche
- ⓘ Nukleotide werden aufgrund einer verstopften Nadel in der PyroMark Q24 Kartusche nicht korrekt dispensiert. Reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche und überprüfen Sie ihre ordnungsgemäße Funktion.
- ⓘ Enzyme oder Substrate werden aufgrund einer verstopften PyroMark Q24 Kartusche nicht korrekt dispensiert (zeigt sich darin, dass ein Vor-Sequenzsignal fehlt und im Pyrogramm keine Peaks zu sehen sind). Reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche und überprüfen Sie ihre ordnungsgemäße Funktion.
- g) Beschädigte PyroMark Q24 Kartusche
- ⓘ Verwerfen Sie die PyroMark Q24 Kartusche unter Beachtung der Bundes-, Landes- und kommunalen Umweltauflagen für die Entsorgung von Laborabfällen.
- h) Puffer oder Reagenzien falsch verdünnt oder gelagert
- ⓘ Befolgen Sie die Anweisungen, die im Reagenzien-Handbuch gegeben werden.
- i) PyroMark Q24 MDx gestartet, ohne dass eine Platte eingesetzt wurde
- ⓘ Reinigen Sie den Heizblock sowie Lichtleiter und Linsen-Array gemäß den Anweisungen im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*.

## Kommentare und Vorschläge

---

- j) PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid nicht korrekt vorbereitet
- ⓘ Befolgen Sie die Anweisung zur Vorbereitung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids in den Protokollen. Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid in Verdünnungspuffer verdünnt wird, wie dies in den Protokollen beschrieben ist. Stellen Sie außerdem sicher, dass der mitgelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer zuerst 1:10 mit hochreinem Wasser verdünnt wird.
- k) Verunreinigte Probe führt zu ungewöhnlich hohem Verbrauch an Substratgemisch (wird als hohes Vor-Sequenzsignal registriert)
- ⓘ Wechseln Sie die Puffer. Verwenden Sie nur Puffer von QIAGEN oder von QIAGEN-autorisierten Händlern.
- ⓘ Prüfen Sie mithilfe der Zoom-in-Funktion, ob überhaupt Peaks generiert wurden (markieren Sie mit der linken Maustaste einen Abschnitt des Pyrogramms).

## Warnmeldung zu Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Verschiedene

- ⓘ Siehe die Punkte a) bis k) im Abschnitt „Kleine oder fehlende Peaks“ (siehe oben).

## Ergebnisse der Quantifizierung

### Kommentare und Vorschläge







---

#### Qualitativ schlechte oder fehlerhafte Sequenz

- a) PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid nicht korrekt vorbereitet
- ⓘ Befolgen Sie die Anweisung zur Vorbereitung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids in den Protokollen. Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid in Verdünnungspuffer verdünnt wird, wie dies in den Protokollen beschrieben ist. Stellen Sie außerdem sicher, dass der mitgelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer zuerst 1:10 mit hochreinem Wasser verdünnt wird.

## Kommentare und Vorschläge

---

- b) Fehlerhafte zu analysierende Sequenz oder Dispensier-Reihenfolge  Überprüfen Sie, dass die korrekte Sequenz beim Konfigurieren des Assays eingegeben wurde.
- c) Puffer oder Reagenzien falsch verdünnt oder gelagert  Befolgen Sie die Anweisungen, die im Reagenzien-Handbuch gegeben werden. Nehmen Sie ein leeres Well (nur mit PyroMark Annealing-Puffer gefüllt) in die Konfiguration Ihres Laufs mit auf, um zu überprüfen, ob Hintergrund-Peaks von den Nukleotiden verursacht werden.
- d) Fehler bei der Dispensierung (zeigt sich zum Beispiel in Form von gesplitteten Peaks)  Reinigen oder ersetzen Sie die PyroMark Q24 Kartusche. Falls das Problem danach weiterhin besteht, kontaktieren Sie den Technischen Service von QIAGEN (Kontaktinformationen siehe Rückseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).
- e) Verstopfte PyroMark Q24 Kartusche  Nukleotide werden aufgrund einer verstopften Nadel in der PyroMark Q24 Kartusche nicht korrekt dispensiert. Reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche und überprüfen Sie ihre ordnungsgemäße Funktion.
- f) Beschädigte PyroMark Q24 Kartusche  Verwerfen Sie die PyroMark Q24 Kartusche unter Beachtung der Bundes-, Landes- und kommunalen Umweltauflagen für die Entsorgung von Laborabfällen.
- g) Annealing-Zeit zu lang  Halten Sie beim Annealing die korrekte Zeit und die Temperaturen ein, wie sie in den Protokollen angegeben sind.

## Kommentare und Vorschläge

---

### Hoher Lumineszenz-Hintergrund

- a) Die Lagerungsbedingungen für ein oder mehrere Reagenz(ien) entsprechen nicht den Angaben im Abschnitt „Lagerung“ auf Seite 5
- ⓘ Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und die Haltbarkeitsdaten der Reagenzien und verwenden Sie neue Reagenzien, falls erforderlich.
- ⓘ Die Nukleotide dürfen nicht eingefroren werden!
- b) Haltbarkeitsdaten der Reagenzien abgelaufen
- ⓘ Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und die Haltbarkeitsdaten der Reagenzien und verwenden Sie neue Reagenzien, falls erforderlich.

### Peakhöhe von Einzelpeaks

#### Kommentare und Vorschläge

---

#### Qualitativ schlechte oder fehlerhafte Sequenz

- a) PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid nicht korrekt vorbereitet
- ⓘ Befolgen Sie die Anweisung zur Vorbereitung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids in den Protokollen. Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid in Verdünnungspuffer verdünnt wird, wie dies in den Protokollen beschrieben ist. Stellen Sie außerdem sicher, dass der mitgelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer zuerst 1:10 mit hochreinem Wasser verdünnt wird.
- b) Fehlerhafte zu analysierende Sequenz oder Dispensier-Reihenfolge
- ⓘ Überprüfen Sie, dass die korrekte Sequenz beim Konfigurieren des Assays eingegeben wurde.

## Kommentare und Vorschläge

---

- c) Puffer oder Reagenzien falsch verdünnt oder gelagert
- i) Befolgen Sie die Anweisungen, die im Reagenzien-Handbuch gegeben werden. Nehmen Sie ein leeres Well (nur mit PyroMark Annealing-Puffer gefüllt) in die Konfiguration Ihres Laufs mit auf, um zu überprüfen, ob Hintergrund-Peaks von den Nukleotiden verursacht werden.
- d) Fehler bei der Dispensierung (zeigt sich zum Beispiel in Form von gesplitteten Peaks)
- i) Reinigen oder ersetzen Sie die PyroMark Q24 Kartusche. Falls das Problem danach weiterhin besteht, kontaktieren Sie den Technischen Service von QIAGEN (Kontaktinformationen siehe Rückseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).
- e) Verstopfte PyroMark Q24 Kartusche
- i) Nukleotide werden aufgrund einer verstopften Nadel in der PyroMark Q24 Kartusche nicht korrekt dispensiert. Reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche und überprüfen Sie ihre ordnungsgemäße Funktion.
- f) Beschädigte PyroMark Q24 Kartusche
- i) Verwerfen Sie die PyroMark Q24 Kartusche unter Beachtung der Bundes-, Landes- und kommunalen Umweltauflagen für die Entsorgung von Laborabfällen.
- g) Annealing-Zeit zu lang
- i) Halten Sie beim Annealing die korrekte Zeit und die Temperaturen ein, wie sie in den Protokollen angegeben sind.

### Kleine oder fehlende Peaks

- a) Unzureichende Menge an Template bei der Immobilisierung
- i) Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid korrekt verdünnt wird und verwenden Sie die in den Protokollen angegebenen Mengen.
- b) Nicht genügend Enzym- oder Substratgemisch für alle Wells
- i) Befüllen Sie die PyroMark Q24 Kartusche gemäß den Angaben im "Pre Run Information"-Bericht.

## Kommentare und Vorschläge

---

- c) Die bei der Konfiguration des Laufs markierten Wells stimmen nicht mit der Positionierung der Proben in der Platte überein
- ⓘ Vergewissern Sie sich, dass Sie die Proben in die korrekten Positionen der PyroMark Q24 Platte – gemäß der Laufkonfiguration – pipettiert haben.
- d) Eine oder mehrere der Nukleotid-Kammern in der PyroMark Q24 Kartusche ist/sind nicht korrekt mit Reagenz(ien) oder Nukleotid(en) befüllt
- ⓘ Stellen Sie sicher, dass ausreichende Mengen an Reagenzien in die PyroMark Q24 Kartusche gefüllt werden. Befolgen Sie die zu den Produkten gehörenden Gebrauchsanweisungen.
- e) Fehler bei der Dispensierung (zeigt sich zum Beispiel in Form von gesplitteten Peaks)
- ⓘ Reinigen oder ersetzen Sie die PyroMark Q24 Kartusche. Falls das Problem danach weiterhin besteht, kontaktieren Sie den Technischen Service von QIAGEN (Kontaktinformationen siehe Rückseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).
- f) Verstopfte PyroMark Q24 Kartusche
- ⓘ Nukleotide werden aufgrund einer verstopften Nadel in der PyroMark Q24 Kartusche nicht korrekt dispensiert. Reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche und überprüfen Sie ihre ordnungsgemäße Funktion.
- ⓘ Enzyme oder Substrate werden aufgrund einer verstopften PyroMark Q24 Kartusche nicht korrekt dispensiert (zeigt sich darin, dass ein Vor-Sequenzsignal fehlt und im Pyrogramm keine Peaks zu sehen sind). Reinigen Sie die PyroMark Q24 Kartusche und überprüfen Sie ihre ordnungsgemäße Funktion.
- g) Beschädigte PyroMark Q24 Kartusche
- ⓘ Verwerfen Sie die PyroMark Q24 Kartusche unter Beachtung der Bundes-, Landes- und kommunalen Umweltauflagen für die Entsorgung von Laborabfällen.



## Kommentare und Vorschläge

---

- h) Puffer oder Reagenzien falsch verdünnt oder gelagert
- i) PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid nicht korrekt vorbereitet
- j) Verunreinigte Probe führt zu ungewöhnlich hohem Verbrauch an Substratgemisch (wird als hohes Vor-Sequenzsignal registriert)
- i** Befolgen Sie die Anweisungen, die im Reagenzien-Handbuch gegeben werden.
- i** Befolgen Sie die Anweisung zur Vorbereitung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids in den Protokollen. Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid in Verdünnungspuffer verdünnt wird, wie dies in den Protokollen beschrieben ist. Stellen Sie außerdem sicher, dass der mitgelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer zuerst 1:10 mit hochreinem Wasser verdünnt wird.
- i** Wechseln Sie die Puffer. Verwenden Sie nur Puffer von QIAGEN oder von QIAGEN- autorisierten Händlern.
- i** Prüfen Sie mithilfe der Zoom-in-Funktion, ob überhaupt Peaks generiert wurden (markieren Sie mit der linken Maustaste einen Abschnitt des Pyrogramms).

### Sehr hohe Peaks

PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid nicht korrekt vorbereitet

**i** Befolgen Sie die Anweisung zur Vorbereitung des PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotids in den Protokollen. Stellen Sie sicher, dass das PyroMark Q24 Kontroll-Oligonukleotid in Verdünnungspuffer verdünnt wird, wie dies in den Protokollen beschrieben ist. Stellen Sie außerdem sicher, dass der mitgelieferte 10-fach konzentrierte Verdünnungspuffer zuerst 1:10 mit hochreinem Wasser verdünnt wird.

## Hintergrundsignal

### Kommentare und Vorschläge

---

#### Hoher Lumineszenz-Hintergrund

- a) Die Lagerungsbedingungen für ein oder mehrere Reagenz(ien) entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Lagerung“ auf Seite 5
- ⓘ Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und die Haltbarkeitsdaten der Reagenzien und verwenden Sie neue Reagenzien, falls erforderlich.
- ⓘ Die Nukleotide dürfen nicht eingefroren werden!
- b) Haltbarkeitsdaten der Reagenzien abgelaufen
- ⓘ Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und die Haltbarkeitsdaten der Reagenzien und verwenden Sie neue Reagenzien, falls erforderlich.

## Unterschied in Peakhöhe bei Lauf mit und ohne Probenvorbereitung

### Kommentare und Vorschläge

---

#### Fehler bei Probenvorbereitung

- a) In Wells oder Röhrchen verbleiben Flüssigkeitsreste beim Ansaugen der Beads (mit immobilisierter Template) in die Filter-Hohnadeln
- ⓘ Tauschen Sie die betreffende Filter-Hohnadel im Saugkopf der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation aus. Lesen Sie die Richtlinien zur Probenvorbereitung, die in unserem Technischen Support-Center unter [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) verfügbar sind, oder rufen Sie den Technischen Service von QIAGEN an (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kommentare und Vorschläge

---

b) Filter-Hohlnadeln funktionieren nicht ordnungsgemäß

ⓘ Überprüfen Sie die Filter-Hohlnadeln. Geben Sie 80 µl hochreines Wasser in jedes Well einer PCR-Platte. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein und legen Sie Unterdruck an, indem Sie den Vakuumschalter öffnen (auf "On"). Senken Sie den Saugkopf in die PCR-Platte ab und warten Sie 10 s. Vergewissern Sie sich, dass alle Wells der PCR-Platte leer sind. Ist dies nicht der Fall, tauschen Sie die betreffenden Filter-Hohlnadeln aus und wiederholen Sie diesen Funktionstest.

c) In einigen Welles oder Röhrchen bleibt beim Ansaugen der Beads (mit immobilisierter Template) in die Filter-Hohlnadeln eine weiße Ablagerung (der Streptavidin Sepharose High Performance Beads)

ⓘ Lassen Sie die PCR-Platte, die beim Immobilisierungs-Schritt verwendet wurde, für länger als 1 Min. nach dem Mischen stehen. Falls erforderlich, mischen Sie erneut für 1 Min., bevor Sie die Beads ansaugen.

d) Undichtigkeit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation

ⓘ Vergewissern Sie sich, dass der Schlauch ordnungsgemäß angeschlossen ist und dass kein Leck vorhanden ist. Der Abfallfilter könnte nass sein und muss ersetzt werden.

# Anhang A: Vorbereitung der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation

Dieses Protokoll beschreibt, wie Sie die PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation vorbereiten, bevor Sie sie für die Präparation einzelsträngiger DNA verwenden können.

## Durchführung

### 1. Befüllen Sie fünf der mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation gelieferten Tröge wie folgt:

- ca. 50 ml Ethanol (70 %) (1)
- ca. 40 ml PyroMark Denaturierungslösung (2)
- ca. 50 ml PyroMark Waschpuffer (3)
- ca. 50 ml hochreines Wasser (4)
- ca. 70 ml hochreines Wasser (5)

Die empfohlene Konfiguration ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Füllen Sie die Tröge, falls erforderlich, immer bis zu diesen Volumina auf.

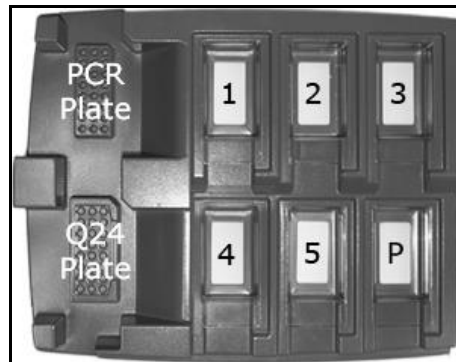



Abbildung 12. Positionen in der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation.

2. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein.
3. Legen Sie Unterdruck an den Saugkopf an, indem Sie den Vakuumschalter öffnen.
4. Spülen Sie die Filter-Hohlnadeln, indem Sie sie in hochreines Wasser eintauchen (Trog 5). Spülen Sie die Hohlnadeln mit 70 ml hochreinem Wasser. Vergewissern Sie sich, dass das Wasser in den Flüssigabfallbehälter abgesaugt wird. Falls dies nicht der Fall sein sollte: Prüfen Sie, ob die Schläuche korrekt angeschlossen und nicht beschädigt sind. Beschädigte Schläuche sollten umgehend ersetzt werden (siehe den Abschnitt „Austauschen des Schlauchs“ im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*).

- 5. Stellen Sie sicher, dass der Flüssigabfallfilter trocken ist. Falls der Abfallfilter nass ist, sollte er ersetzt werden (siehe den Abschnitt „Austauschen des Abfallfilters“ im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*).**
- 6. Füllen Sie Trog 5 wieder mit 70 ml hochreinem Wasser auf.**
- 7. Schließen Sie den Vakuumschalter am Saugkopf (auf „Off“) und setzen Sie ihn in die Park-(P-)Position.**

## Anhang B: Entleeren der Flüssigabfallbehälter und Tröge

<b>WARNUNG</b> 	<b>Gefährliche Chemikalien</b> <p>Die PyroMark Denaturierungslösung, die zusammen mit der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation verwendet wird, enthält Natriumhydroxid, das auf Augen und Haut reizend wirkt. Tragen Sie immer eine Schutzbrille, Laborhandschuhe und einen Laborkittel. Die verantwortliche Person (z. B. der Laborleiter) muss alle erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen treffen, um sicherzustellen, dass die unmittelbare Umgebung des Arbeitsplatzes sicher ist. Auch dürfen die Grenzwerte in Bezug auf infektiöse Erreger, die in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDS) oder den Vorschriften der OSHA*, ACGIH<sup>†</sup> oder COSHH<sup>‡</sup> festgelegt sind, nicht überschritten werden. Beim Betrieb eines Abzugs und bei der Entsorgung von Abfallstoffen müssen alle Bestimmungen und Gesetze zu Gesundheitsschutz und Sicherheit am Arbeitsplatz auf Bundes-, Landes- und kommunaler Ebene eingehalten werden.</p>
---	---

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Vereinigte Staaten von Amerika)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Vereinigte Staaten von Amerika)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Vereinigtes Königreich)

Stellen Sie sicher, dass die geltenden Bundes-, Landes- und kommunalen Umweltauflagen bei der Entsorgung der Laborabfälle eingehalten werden.

Das folgende Material wird benötigt:

- hochreines Wasser (Milli-Q, 18,2 MΩ x cm, oder vergleichbar; [www.millipore.com](http://www.millipore.com)).

### Durchführung

- 1. Vergewissern Sie sich, dass kein Unterdruck am Vakuum-Saugkopf anliegt, d. h. der Vakuumschalter geschlossen (auf „Off“) ist, und die Vakuumpumpe ausgeschaltet ist.**
- 2. Verwerfen Sie in den Trögen verbliebene Reste der Lösungen.**
- 3. Spülen Sie die Tröge mit hochreinem Wasser oder ersetzen Sie sie, falls erforderlich.**
- 4. Entleeren Sie den Flüssigabfallbehälter.**



Der Deckel kann abgenommen werden, ohne die Schlauchverbindungen zu trennen.

5. Falls die PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation gereinigt werden muss (z. B. wegen Staub oder verschütteter Flüssigkeit), befolgen Sie dazu bitte die Anweisungen im Abschnitt „Reinigen der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation“ im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*.

## Literaturhinweis

QIAGEN unterhält eine umfangreiche, regelmäßig aktualisierte Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, in denen QIAGEN Produkte verwendet werden. Mehrere Suchoptionen ermöglichen es Ihnen, die Artikel zu finden, die Sie brauchen – entweder mit der einfachen Suche nach Stichwörtern oder durch Eingabe der Applikation, des Forschungsgebiets, des Titels etc.

Eine vollständige Liste der Referenzen finden Sie online in der QIAGEN Referenz-Datenbank unter [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp). Sie können sich auch an den Technischen Service von QIAGEN wenden, um sie anzufordern.



## Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
PyroMark Q24 Control Oligo	Kontroll-Oligonukleotid; für die Installationsüberprüfung des Systems	979303
<b>Zubehör</b>		
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Für die Analyse von 5 x 24 Proben mit dem PyroMark Q24 MDx: Enzymgemisch, Substratgemisch und Nukleotide	971802
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Für das Annealing der Sequenzierungs-Primer an einzelsträngige PCR-Produkte und für die Pyrosequenzierungsreaktion	979309
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Bindungspuffer; für die Bindung der biotinylierten PCR-Produkte an Sepharose-Beads	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Denaturierungslösung; für die Denaturierung doppelsträngiger PCR-Produkte in einzelsträngige Template-DNA	979307
PyroMark Wash Buffer, concentrate (200 ml)	Waschpuffer-Konzentrat; zum Waschen der einzelsträngigen DNA	979308
PyroMark Q24 Plate (100)	24-Well-Platten für Sequenzierungsreaktionen	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Kartuschen für das Dispensieren von Nukleotiden und Reagenzien	979302
<b>Verwandte Produkte</b>		
PyroMark Q24 MDx	Sequenzbasierte Detektionsplattform für die Pyrosequenzierungsanalyse von 24 Proben gleichzeitig	9001513
PyroMark Q24 MDx Software	Applikations-Software	9019063

<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Kat.-Nr.</b>
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Vakuum-Arbeitsstation (220 V) für die Vorbereitung von 24 Proben gleichzeitig, vom PCR-Produkt bis zur einzelsträngigen Template-DNA	9001515* 9001517†
PyroMark Q24 Validation Oligo	Validierungs-Oligonukleotid; für die Leistungsüberprüfung des Systems	979304

\* Für Rest der Welt (nicht UK).

† Für UK.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) zur Verfügung oder können Sie vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor anfordern.

Frei bleibende Seite

Frei bleibende Seite

Frei bleibende Seite



Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, Pyrosequencing®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN-Gruppe); Microsoft® (Microsoft Corporation); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare).

### **Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung**

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des PyroMark Q24 Control Oligo die folgenden Bedingungen an:

1. Das PyroMark Q24 Control Oligo darf nur gemäß den Angaben im *PyroMark Q24 Control Oligo Handbuch* und mit den Komponenten, die Bestandteil des Produkts sind, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Produkt gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu diesem Produkt gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *PyroMark Q24 Control Oligo Handbuch* und in zusätzlichen, unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Produkt und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieses Produkt und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Produkts stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit diesem Produkt und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nachgelesen werden.

© 2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

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

**Australien** ■ Bestellungen 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technischer Service 1-800-243-066

**Belgien** ■ Bestellungen 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technischer Service 0800-79556

**Brasilien** ■ Bestellungen 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technischer Service 0800-557779

**China** ■ Bestellungen 021-3865-3865 ■ Fax 021-3865-3965 ■ Technischer Service 800-988-0325

**Dänemark** ■ Bestellungen 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technischer Service 80-885942

**Deutschland** ■ Bestellungen 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technischer Service 02103-29-12400

**Finnland** ■ Bestellungen 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technischer Service 0800-914413

**Frankreich** ■ Bestellungen 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technischer Service 01-60-920-930 ■ Angebote 01-60-920-928

**Hongkong** ■ Bestellungen 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technischer Service 800 930 425

**Irland** ■ Bestellungen 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technischer Service 1800 555 061

**Italien** ■ Bestellungen 02-33430 -420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technischer Service 800-787980

**Japan** ■ Telefon 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technischer Service 03-6890-7300

**Kanada** ■ Bestellungen 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technischer Service 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**Luxemburg** ■ Bestellungen 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technischer Service 8002-2067

**Mexiko** ■ Bestellungen 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technischer Service 01-800-7742-639

**Niederlande** ■ Bestellungen 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technischer Service 0800-0229602

**Norwegen** ■ Bestellungen 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technischer Service 800-18712

**Österreich** ■ Bestellungen 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technischer Service 0800/28-10-11

**Schweden** ■ Bestellungen 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technischer Service 020-798328

**Schweiz** ■ Bestellungen 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technischer Service 055-254-22-12

**Singapur** ■ Bestellungen 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technischer Service 65-67775366

**Spanien** ■ Bestellungen 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technischer Service 91-630-7050

**Südkorea** ■ Bestellungen 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technischer Service 1544 7145

**UK** ■ Bestellungen 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technischer Service 01293-422-999

**USA** ■ Bestellungen 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technischer Service 800-DNA-PREP (800-362-7737)

