

Mars 2015

Manuel du kit PyroMark[®] Q24 Control Oligo

Version 1



Pour la vérification de l'installation du système PyroMark Q24 MDx

Pour utilisation en diagnostic in vitro



979303



1057421FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMAGNE

R2

MAT

1057421FR



Sample & Assay Technologies

Technologies d'échantillons et d'analyses QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillons et d'analyses, permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services ultramodernes de grande qualité garantissent un succès total, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines ;
- analyses d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche micro-ARN et interférence ARN ;
- automatisation des technologies d'échantillons et d'analyses.

Notre mission est de permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Sommaire

Contenu du kit	4
Symboles	4
Stockage	5
Utilisation prévue	5
Limitations de l'utilisation du produit	5
Contrôle qualité	6
Support technique	6
Avertissements et précautions	6
Introduction	7
Principe et procédure	7
Description des protocoles	7
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur	9
Protocole : Vérification du fonctionnement de l'appareil PyroMark Q24 MDx	10
Protocole : Vérification du fonctionnement du système PyroMark Q24 MDx	15
Protocole : Procédure de résolution des problèmes	23
Résolution des principaux problèmes rencontrés	31
Évaluation de la qualité	31
Résultats de quantification	35
Hauteur des pics mononucléotidiques	36
Bruit de fond	39
Différence de hauteur des pics avec et sans préparation des échantillons	40
Annexe A : Préparation du poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx41	
Annexe B : Vidage du flacon à déchets et des compartiments	42
Références	44
Pour commander	45

Contenu du kit

PyroMark Q24 Control Oligo		
Référence	979303	
Control Oligo 20 μM	50 μl	
Tampon de dilution 10x	2 x 1,7 ml	
Manuel		1

Symboles



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Référence



Numéro de lot



Numéro du matériel



Composants



Contient



Nombre



Hydroxyde de sodium



Code article international (GTIN)



Limitations de température



Fabricant légal



Se reporter au manuel



Remarque importante

Stockage

Il convient de stocker le kit PyroMark Q24 Control Oligo entre -30 et -15°C dès sa réception. Il convient d'éviter la répétition des cycles de décongélation congélation (5 par an max.). Stocké dans ces conditions, le kit est stable jusqu'à la date limite d'utilisation.

Utilisation prévue

Le kit PyroMark Q24 Control Oligo est destiné à la vérification de la bonne installation du système PyroMark Q24 MDx pour des applications de Pyrosequencing[®] (ou pyroséquençage) à des fins de diagnostic in vitro.

Limitations de l'utilisation du produit

Dans le cadre du diagnostic in vitro, l'utilisation du système PyroMark Q24 MDx est réservée au

- personnel spécialement formé aux procédures impliquant des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro et
- aux laboratoires d'analyse médicale agréés.

Toutes les opérations doivent être réalisées conformément aux instructions d'utilisation du PyroMark Q24 MDx telles que fournies dans les messages qui s'affichent à l'écran, aux manuels d'utilisation associés et au support technique de QIAGEN et dans les limites définies par les spécifications techniques.

Le matériel nécessaire à la préparation des échantillons pour l'analyse par pyroséquençage n'est pas inclus.

Le produit est exclusivement destiné à une utilisation sur le pyroséquenceur PyroMark Q24 MDx.

Pour des résultats optimaux, il est impératif de respecter scrupuleusement les indications du manuel d'utilisation de l'appareil et du présent manuel. La dilution des réactifs autre que celle décrite dans le présent manuel n'est pas recommandée et entraîne une perte de performances.

Prêter attention aux dates limites d'utilisation et aux conditions de stockage imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. Ne pas utiliser de composants périmés ou stockés dans de mauvaises conditions.

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de kits PyroMark Q24 Control Oligo est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Les résultats fournis par le système PyroMark Q24 MDx doivent impérativement être interprétés dans le contexte des observations cliniques et des résultats d'analyse de laboratoire pertinents.

Support technique

Chez QIAGEN, nous sommes fiers de la qualité et de la disponibilité de notre support technique. Nos services techniques sont composés de scientifiques expérimentés bénéficiant d'un vaste savoir-faire pratique et théorique en ce qui concerne les technologies d'échantillons et d'analyses et l'utilisation des produits QIAGEN®. Pour toute question ou en cas de difficultés concernant le kit PyroMark Q24 Control Oligo ou les produits QIAGEN en général, nous contacter.

Les clients de QIAGEN constituent une source d'informations majeure relative aux utilisations avancées ou spécialisées de nos produits. Ces informations sont utiles à d'autres scientifiques ainsi qu'aux chercheurs de chez QIAGEN. Par conséquent, ne pas hésiter à nous contacter pour toute suggestion concernant la performance des produits ou de nouvelles applications et techniques.

Pour le support technique et plus d'informations, consulter notre Centre de support technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des Services techniques de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Avertissements et précautions

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF (pratique et compact) à l'adresse www.qiagen.com/safety où il est possible de trouver, consulter et imprimer les FDS pour chaque kit et élément de kit QIAGEN.

Introduction

Le kit PyroMark Q24 Control Oligo offre un moyen de vérifier la bonne installation du système PyroMark Q24 MDx. De plus, le kit peut servir à la résolution des problèmes rencontrés pour déterminer si un résultat inattendu est lié à l'appareil, au poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx ou à l'analyse.

Principe et procédure

Le réactif PyroMark Q24 Control Oligo est un oligonucléotide biotinylé qui permet à l'utilisateur de vérifier le fonctionnement de l'appareil PyroMark Q24 MDx et du poste de travail sous vide du même nom.

Dans certaines conditions, l'oligonucléotide est capable de former une structure tige-boucle. Cette structure permet l'auto-amorçage de l'oligonucléotide lors de l'élongation par l'ADN polymérase. Ainsi, aucune amorce de séquençage n'est nécessaire à la réaction de pyroséquençage. La région séquencée comprend tous les nucléotides sous forme d'une seule base, des homopolymères à 2 ou 3 bases ainsi qu'une base Wobble ou dégénérée. La position variable est automatiquement analysée par le logiciel et les résultats exprimés sous forme de % de C et % de T. La structure de l'oligonucléotide est illustrée à la Figure 1.

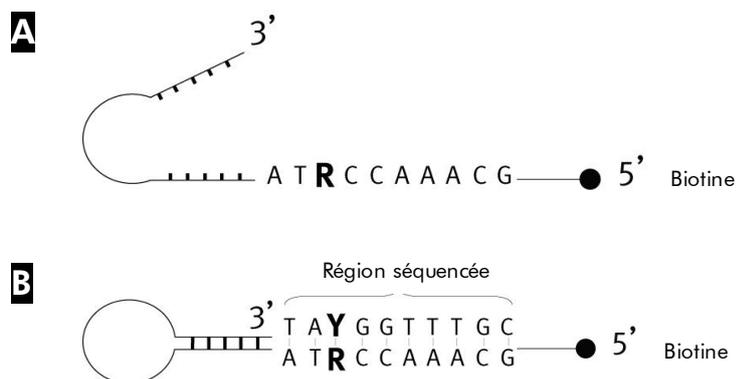


Figure 1. Structure de l'oligonucléotide du kit PyroMark Q24 Control Oligo. **A** Structure ouverte de l'oligonucléotide. **B** Structure auto-amorcée de l'oligonucléotide avec indication de la séquence analysée.

Description des protocoles

Il est recommandé de réaliser 2 runs pour vérifier la bonne installation du système PyroMark Q24 MDx.

Fonctionnement de l'appareil PyroMark Q24 MDx

Pour vérifier le bon fonctionnement de l'appareil seul, suivre « Protocole : Vérification du fonctionnement de l'appareil PyroMark Q24 MDx », page 10. Le réactif PyroMark Q24 Control Oligo est ajouté directement dans une plaque

PyroMark Q24 **sans** préparation préalable sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx.

Fonctionnement du système PyroMark Q24 MDx

Pour vérifier le bon fonctionnement de l'intégralité du système, suivre « Protocole : Vérification du fonctionnement du système PyroMark Q24 MDx », page 15. Le réactif PyroMark Q24 Control Oligo est préparé sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx avant d'être analysé sur l'appareil PyroMark Q24 MDx.

Résolution des problèmes du système PyroMark Q24 MDx

Pour résoudre un problème affectant l'ensemble du système, suivre « Protocole : Procédure de résolution des problèmes », page 23. Une réaction de pyroséquençage est réalisée dans 8 puits contenant le réactif PyroMark Q24 Control Oligo et 8 puits contenant le même réactif préparé sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx.

Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

- Pipettes (réglables) *
- Cônes de pipettes stériles munis de filtres
- Billes Streptavidin Sepharose® High Performance (GE Healthcare, réf. 17-5113-01, www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 MDx (réf. 9001513) *†
- Logiciel PyroMark Q24 MDx (réf. 9019063) †
- Plaque PyroMark Q24 (réf. 979301) †
- Cartouche PyroMark Q24 (réf. 979302) †
- Poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx (réf. 9001515 ou 9001517) *†
- Réactifs PyroMark Gold Q24 (réf. 971802) †
- Tampon de fixation PyroMark (réf. 979306) †
- Solution de dénaturation PyroMark (réf. 979307) †
- Tampon de lavage concentré PyroMark (réf. 979308) †
- Tampon d'hybridation PyroMark (réf. 979309) †
- Agitateur de plaque * pour l'immobilisation sur les billes
- Unité de chauffage * capable d'atteindre une température de 80 °C
- Plaque ou barrettes de 24 puits pour PCR
- Barrettes de bouchons
- Tubes de microcentrifugation de 1,5 ml et de 2 ml pour la dilution du réactif PyroMark Q24 Control Oligo
- Eau ultrapure (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou équivalent)
- Éthanol (70 %)

* S'assurer que tous les instruments sont vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

† Marque CE-IVD conformément à la Directive européenne 98/79/CE. Les autres produits de la liste ne portent pas la mention CE-IVD.

Protocole : Vérification du fonctionnement de l'appareil PyroMark Q24 MDx

Ce protocole décrit l'utilisation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo pour vérifier le fonctionnement de l'appareil PyroMark Q24 MDx seul. Pour vérifier le fonctionnement de l'intégralité du système, y compris celui du poste de travail sous vide, suivre « Protocole : Vérification du fonctionnement du système PyroMark Q24 MDx », page 15.

Remarque importante avant de commencer

- Pour plus d'informations sur la configuration d'une analyse et d'un run, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

Avant de commencer

- Pour installer le système, suivre les instructions du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.
- Le tampon de dilution fourni avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo doit être dilué avant usage. Préparer le tampon de dilution 1x en mélangeant 200 µl de tampon de dilution 10x et 1 800 µl d'eau ultrapure.
- Placer le porte-plaques PyroMark Q24 sur l'unité de chauffage à 80 °C en prévision de l'Étape 11.

Procédure

1. Configurer une analyse avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo à l'aide du logiciel PyroMark Q24 MDx.
2. Cliquer sur  dans la barre d'outils et sélectionner « New AQ Assay » (Nouvelle analyse AQ).
3. Saisir la séquence suivante dans le champ « Sequence to Analyze » (Séquence à analyser).
TAYGGTTGC

 Pour plus d'informations sur la création d'un fichier de configuration d'analyse, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

4. Cliquer sur l'icône « Generate Dispensation Order » (Définir l'ordre de distribution) pour obtenir l'ordre de distribution des nucléotides suivant :
CTGACTGTG

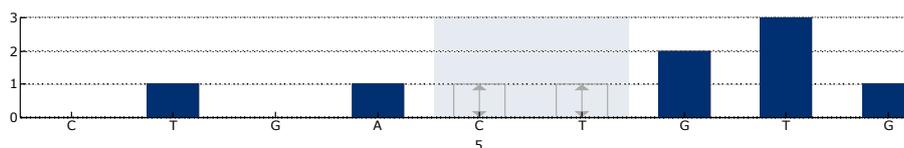


Figure 2. Histogramme en mode AQ. Les ajouts 1 et 3 sont des distributions à blanc qui servent de témoins négatifs. Les distributions 5 et 6 analysent la position variable (base Wobble ou dégénérée).

5. **Pour enregistrer l'analyse, cliquer sur  dans la barre d'outils.**
6. **Créer une configuration de run en important les paramètres d'analyse pour les 24 puits.**

Il existe deux façons d'ajouter une analyse à un puits :

- Cliquer avec le bouton droit de la souris sur le puits et sélectionner « Load Assay » (Charger l'analyse) dans le menu contextuel.
- Sélectionner l'analyse dans le navigateur des raccourcis puis cliquer et faire glisser l'analyse sur le puits.

Le puits prend la couleur de l'analyse qui lui est associée.



Pour plus d'informations sur la création d'un fichier de configuration de run, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

7. **Enregistrer la configuration de run sur une clé USB (fournie avec le système PyroMark Q24 MDx).**
8. **Imprimer la liste des volumes requis de mélange d'enzymes, de mélange de substrats et de nucléotides ainsi que la configuration de la plaque en sélectionnant « Pre Run Information » (Informations avant run) dans le menu « Tools » (Outils) puis, lorsque le rapport s'affiche, cliquer sur .**
9. **Diluer le réactif PyroMark Q24 Control Oligo à 0,04 μ M comme indiqué au Tableau 1.**

Tableau 1. Dilution du réactif PyroMark Q24 Control Oligo

Composant	Volume	Concentration
PyroMark Q24 Control Oligo	10 μ l	20 μ M
Tampon de dilution 1x *	90 μ l	–
Première dilution en série	100 μl	2 μM
Première dilution en série (ci-dessus)	30 μ l	2 μ M
Tampon de dilution 1x *	1 470 μ l	–
Dilution finale	1 500 μl	0,04 μM

* Veiller à diluer le tampon de dilution 10x fourni avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo avec de l'eau ultrapure avant usage. Voir « Avant de commencer », page 10.

- 10. Ajouter 25 μ l de réactif PyroMark Q24 Control Oligo dilué (0,04 μ M) dans chaque puits d'une plaque PyroMark Q24.**
- 11. Chauffer la plaque à 80 °C pendant 2 min à l'aide de l'unité de chauffage et du porte-plaques PyroMark Q24 préchauffé.**
- 12. Retirer la plaque du porte-plaques et laisser les échantillons revenir à température ambiante (15 à 25 °C) pendant au moins 5 min.**
- 13. Charger les volumes adaptés de réactifs PyroMark Gold Q24 sur une cartouche PyroMark Q24, tels qu'indiqués dans le rapport Pre Run Information de l'Étape 8.**

Le rapport « Pre-Run Information », accessible depuis le menu « Tools » lors de la configuration du run (voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*), indique les volumes de nucléotides, de mélange d'enzymes et de mélange de substrats nécessaires à une analyse spécifique.
- 14. Ouvrir la trappe d'accès à la cartouche et y introduire la cartouche de réactifs remplie, étiquette vers l'extérieur. Pousser la cartouche à fond puis appuyer dessus vers le bas.**
- 15. Vérifier que la ligne est visible sur le devant de la cartouche puis fermer la trappe d'accès.**
- 16. Ouvrir le châssis porte-plaques et poser la plaque sur l'unité de chauffage.**
- 17. Fermer le châssis porte-plaques et le couvercle de l'appareil.**
- 18. Introduire la clé USB contenant le fichier de run dans le port USB à l'avant de l'appareil.**



Ne pas retirer la clé USB avant la fin du run.

19. Sélectionner « Run » dans le menu principal à l'aide des touches ▲ et ▼ sous l'écran puis appuyer sur « OK ».
20. Sélectionner le fichier du run à l'aide des touches ▲ et ▼ sous l'écran.
 - ① Pour afficher le contenu d'un dossier, sélectionner ce dossier puis appuyer sur « Select » (Sélectionner). Pour revenir à l'écran précédent, appuyer sur « Back » (Précédent).
21. Une fois le fichier du run sélectionné, appuyer sur « Select » pour lancer le run.
22. À la fin du run, une fois que l'appareil a confirmé l'enregistrement du fichier de run sur la clé USB, appuyer sur « Close » (Fermer).
23. Retirer la clé USB.
24. Ouvrir le couvercle de l'appareil.
25. Ouvrir la trappe d'accès à la cartouche et retirer celle-ci en la soulevant et en la tirant vers l'extérieur.
26. Fermer la trappe.
27. Ouvrir le châssis porte-plaques et retirer la plaque PyroMark Q24 de l'unité de chauffage.
28. Fermer le châssis porte-plaques et le couvercle de l'appareil.
29. Jeter la plaque PyroMark Q24 et nettoyer la cartouche (voir le *Manuel des réactifs PyroMark Gold Q24*).
30. Dans le logiciel PyroMark Q24 MDx, ouvrir le run et analyser tous les puits. Le tracé des pics du run 1 doit être similaire à celui de la Figure 3.

① Pour obtenir la hauteur des pics, sélectionner « Export Peak Heights » (Exporter hauteur des pics) dans le menu « Tools ». Enregistrer les données dans un format adapté (*.csv ou *.tsv). Ouvrir ce fichier dans Microsoft® Excel (Delimited) et calculer la hauteur moyenne de pic mononucléotidique pour chaque puits comme décrit ci-dessous.

■ **Évaluer la qualité.**

Tous les puits doivent atteindre le critère de qualité « Passed » (Succès), indiqué par une barre bleue dans le champ inférieur du puits sur l'écran de vue d'ensemble et avec la valeur de C donnée dans un rectangle bleu sur le pyrogramme (Pyrogram®). Si le résultat de l'évaluation de la qualité est « Check » (À vérifier) ou « Failed » (Échec), consulter la partie « Well Information » (Informations sur le puits) pour obtenir des explications.

■ **Évaluer la hauteur des pics.**

Dans l'idéal, la hauteur de pic doit être de 75 ± 20 RLU.

ⓘ Si les valeurs se trouvent dans les limites définies, le système est correctement installé. Si les résultats diffèrent des valeurs indiquées ci-dessus, voir « Résolution des principaux problèmes rencontrés », page 31, pour connaître les raisons possibles de l'échec puis relancer le run 1. Si la répétition du run 1 échoue, consulter notre Centre de support technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des Services techniques de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

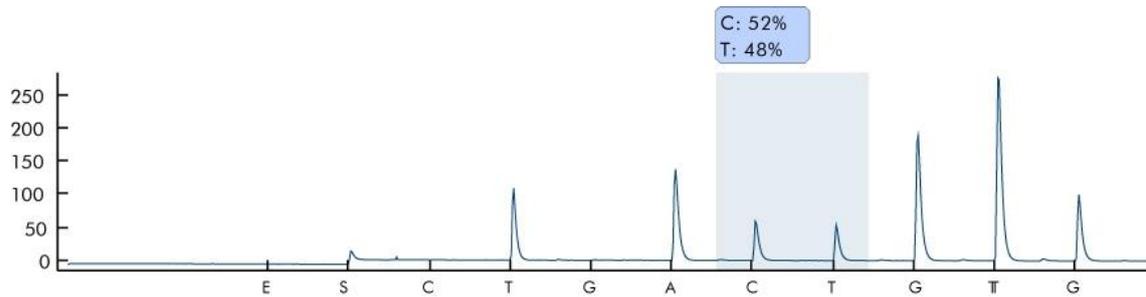


Figure 3. Pyrogramme du run 1

Protocole : Vérification du fonctionnement du système PyroMark Q24 MDx

Ce protocole décrit l'utilisation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo pour vérifier le fonctionnement du système PyroMark Q24 MDx dans son intégralité, poste de travail sous vide inclus. Pour vérifier le fonctionnement de l'appareil PyroMark Q24 MDx seul, voir « Protocole : Vérification du fonctionnement de l'appareil PyroMark Q24 MDx », page 10.

Remarque importante avant de commencer

- Pour plus d'informations sur la configuration d'une analyse et d'un run, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

Avant de commencer

- Pour installer le système, suivre les instructions du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.
- Le tampon de dilution fourni avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo doit être dilué avant usage. Préparer le tampon de dilution 1x en mélangeant 200 µl de tampon de dilution 10x et 1 800 µl d'eau ultrapure.
- Placer le porte-plaques PyroMark Q24 sur l'unité de chauffage à 80 °C en prévision de l'Étape 30.
- Amener l'ensemble des réactifs et des solutions à température ambiante (15 à 25 °C) avant de commencer.

Procédure

1. **Configurer une analyse avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo à l'aide du logiciel PyroMark Q24 MDx.**
2. **Cliquer sur  dans la barre d'outils et sélectionner « New AQ Assay ».**
3. **Saisir la séquence suivante dans le champ « Sequence to Analyze ».**
TAYGGTTTGCA

 Pour plus d'informations sur la création d'un fichier de configuration d'analyse, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

4. **Saisir la séquence suivante dans le champ « Dispensation Order » (Ordre de distribution).**
ACGTTATCGTTGC



Pour plus d'informations sur la création d'un fichier de configuration d'analyse, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

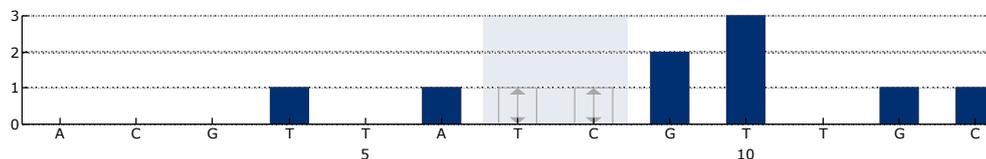


Figure 4. Histogramme en mode AQ. Les ajouts 1, 2, 3, 5 et 11 sont des distributions à blanc qui servent de témoins négatifs. Les distributions 7 et 8 analysent la position variable.

5. Pour enregistrer l'analyse, cliquer sur  dans la barre d'outils.
6. Créer une configuration de run en important les paramètres d'analyse pour les 24 puits.

Il existe deux façons d'ajouter une analyse à un puits :

- Cliquer avec le bouton droit de la souris sur le puits et sélectionner « Load Assay » dans le menu contextuel.
- Sélectionner l'analyse dans le navigateur des raccourcis puis cliquer et faire glisser l'analyse sur le puits.

Le puits prend la couleur de l'analyse qui lui est associée.



Pour plus d'informations sur la création d'un fichier de configuration de run, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

7. Enregistrer la configuration de run sur une clé USB (fournie avec le système PyroMark Q24 MDx).
8. Imprimer la liste des volumes requis de mélange d'enzymes, de mélange de substrats et de nucléotides ainsi que la configuration de la plaque en sélectionnant « Pre Run Information » dans le menu « Tools » puis, lorsque le rapport s'affiche, cliquer sur .
9. Secouer doucement le flacon de billes Streptavidin Sepharose High Performance jusqu'à obtention d'une solution homogène.
10. Préparer un Master Mix pour l'immobilisation de l'ADN comme indiqué au Tableau 2. Préparer un volume supérieur de 10 % au volume requis pour le nombre total de réactions à réaliser.

Tableau 2. Mélange réactionnel pour l'immobilisation de l'ADN

Nombre d'échantillons	1	26 *
Billes Streptavidin Sepharose High Performance	2 μ l	52 μ l
Tampon de fixation PyroMark	40 μ l	1 040 μ l
Eau ultrapure	13 μ l	338 μ l
Volume total	55 μl	1 430 μl

* Fournit une quantité suffisante pour les 24 échantillons requis.

11. Diluer le réactif PyroMark Q24 Control Oligo à 0,04 μ M comme indiqué au Tableau 3.

Tableau 3. Dilution du réactif PyroMark Q24 Control Oligo

Composant	Volume	Concentration
PyroMark Q24 Control Oligo	10 μ l	20 μ M
Tampon de dilution 1x *	90 μ l	–
Première dilution en série	100 μl	2 μM
Première dilution en série (ci-dessus)	30 μ l	2 μ M
Tampon de dilution 1x *	1470 μ l	–
Dilution finale	1500 μl	0,04 μM

* Veiller à diluer le tampon de dilution 10x fourni avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo avec de l'eau ultrapure avant usage. Voir « Avant de commencer », page 15.

12. Agiter le tube de mélange réactionnel puis ajouter 55 μ l du mélange et 25 μ l de réactif PyroMark Q24 Control Oligo dilué (0,04 μ M) dans chacun des 24 puits d'une plaque PyroMark Q24 de 24 puits ou de barrettes de tubes.

13. Boucher la plaque de PCR (ou les barrettes de tubes) à l'aide de barrettes de bouchons.

14. Agiter la plaque de PCR à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 5 à 10 min à 1 400 tr/min.



Les billes de Sepharose sédimentent rapidement. Les billes doivent être prélevées immédiatement après l'agitation.

i Au cours de cette étape, préparer le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx pour la préparation des échantillons (voir Annexe A, page 41).

15. Ajouter 25 µl de tampon d'hybridation PyroMark dans chaque puits d'une plaque PyroMark Q24.

i Garder un porte-plaques PyroMark Q24 (fourni avec le poste de travail sous vide) à température ambiante (15 à 25 °C) et l'utiliser comme support lors de la préparation et du déplacement de la plaque.

16. Placer la plaque de PCR (ou les barrettes de tubes) et la plaque PyroMark Q24 sur la table de travail du poste sous vide (voir Figure 5).

i Veiller à ce que la plaque soit orientée comme lors du chargement des échantillons.

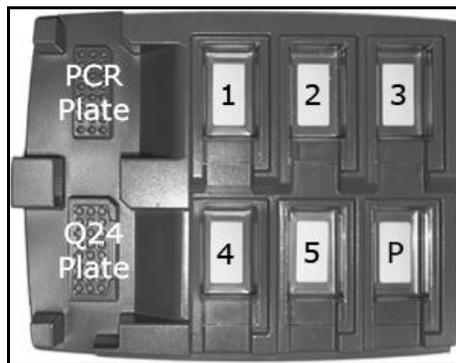


Figure 5. Emplacement d'une plaque de PCR (ou de barrettes de puits) et d'une plaque PyroMark Q24 sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx. Les positions indiquées contiennent de l'éthanol à 70 % (1), la solution de dénaturation PyroMark (2), le tampon de lavage PyroMark (3) et de l'eau ultrapure (4 et 5). P : position Parking.

17. Mettre l'outil à vide sous vide en ouvrant la commande de vide.

18. Abaisser avec précaution les sondes à filtre dans la plaque de PCR (ou les barrettes de tubes) pour capturer les billes liées à la matrice immobilisée. Maintenir les sondes en place pendant 15 s. Saisir l'outil avec précaution.

i Les billes de Sepharose sédimentent rapidement. Si plus d'1 min s'est écoulée depuis l'agitation de la plaque (ou des barrettes de tubes), répéter l'agitation pendant 1 min avant de capturer les billes.

19. Transférer l'outil dans le compartiment contenant l'éthanol à 70 % (compartiment 1). Rincer les sondes à filtre pendant 5 s.

20. Transférer l'outil dans le compartiment contenant la solution de dénaturation (compartiment 2). Rincer les sondes à filtre pendant 5 s.

21. Transférer l'outil dans le compartiment contenant le tampon de lavage (compartiment 3). Rincer les sondes à filtre pendant 10 s.
22. Lever l'outil vers l'arrière avec un angle de plus de 90° pendant 5 s afin d'évacuer le liquide des sondes à filtre (voir Figure 6).



Figure 6. Outil à vide levé au-delà de la verticale

23. Tout en maintenant l'outil au-dessus de la plaque PyroMark Q24, fermer la commande de vide de l'outil (position Off).
24. Libérer les billes dans la plaque contenant 25 µl de tampon d'hybridation PyroMark en agitant l'outil d'un côté à l'autre. Laisser les sondes à filtre toucher le fond des puits.
25. Transférer l'outil dans le premier compartiment contenant de l'eau ultrapure (compartiment 4) et agiter l'outil pendant 10 s.
26. Laver les sondes à filtre en les abaissant dans le second compartiment d'eau ultrapure (compartiment 5) et en appliquant le vide. Rincer les sondes avec 70 ml d'eau ultrapure.
27. Lever l'outil vers l'arrière avec un angle de plus de 90° pendant 5 s afin d'évacuer le liquide des sondes à filtre (voir Figure 6).
28. Fermer la commande de vide de l'outil (position Off) et placer l'outil en position Parking (P).
29. Arrêter la pompe à vide.

i À la fin de la journée de travail, il convient d'éliminer les déchets liquides et toute solution restante et de vérifier l'absence de poussière et de déversement sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx, voir l'Annexe B, page 42.
30. Chauffer la plaque PyroMark Q24 contenant les échantillons à 80 °C pendant 2 min à l'aide de l'unité de chauffage et du porte-plaques PyroMark Q24 préchauffé.
31. Retirer la plaque du porte-plaques et laisser les échantillons revenir à température ambiante (15 à 25 °C) pendant au moins 5 min.
32. Charger les volumes adaptés de réactifs PyroMark Gold Q24 sur une cartouche PyroMark Q24, tels qu'indiqués dans le rapport Pre Run Information de l'Étape 8.

Le rapport « Pre-Run Information », accessible depuis le menu « Tools » lors de la configuration du run (voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*), indique les volumes de nucléotides, de mélange d'enzymes et de mélange de substrats nécessaires à une analyse spécifique.

- 33. Ouvrir la trappe d'accès à la cartouche et y introduire la cartouche de réactifs remplie, étiquette vers l'extérieur. Pousser la cartouche à fond puis appuyer dessus vers le bas.**
- 34. Vérifier que la ligne est visible sur le devant de la cartouche puis fermer la trappe d'accès.**
- 35. Ouvrir le châssis porte-plaques et poser la plaque sur l'unité de chauffage.**
- 36. Fermer le châssis porte-plaques et le couvercle de l'appareil.**
- 37. Introduire la clé USB contenant le fichier de run dans le port USB à l'avant de l'appareil.**
 - (i)** Ne pas retirer la clé USB avant la fin du run.
- 38. Sélectionner « Run » dans le menu principal à l'aide des touches ▲ et ▼ sous l'écran puis appuyer sur « OK ».**
- 39. Sélectionner le fichier du run à l'aide des touches ▲ et ▼ sous l'écran.**
 - (i)** Pour afficher le contenu d'un dossier, sélectionner ce dossier puis appuyer sur « Select ». Pour revenir à l'écran précédent, appuyer sur « Back ».
- 40. Une fois le fichier du run sélectionné, appuyer sur « Select » pour lancer le run.**
- 41. À la fin du run, une fois que l'appareil a confirmé l'enregistrement du fichier de run sur la clé USB, appuyer sur « Close ».**
- 42. Retirer la clé USB.**
- 43. Ouvrir le couvercle de l'appareil.**
- 44. Ouvrir la trappe d'accès à la cartouche et retirer celle-ci en la soulevant et en la tirant vers l'extérieur.**
- 45. Fermer la trappe.**
- 46. Ouvrir le châssis porte-plaques et retirer la plaque PyroMark Q24 de l'unité de chauffage.**
- 47. Fermer le châssis porte-plaques et le couvercle de l'appareil.**
- 48. Jeter la plaque PyroMark Q24 et nettoyer la cartouche (voir le *Manuel des réactifs PyroMark Gold Q24*).**
- 49. Dans le logiciel PyroMark Q24 MDx, ouvrir le run et analyser tous les puits. Le tracé des pics du run 2 doit être similaire à celui de la Figure 7.**

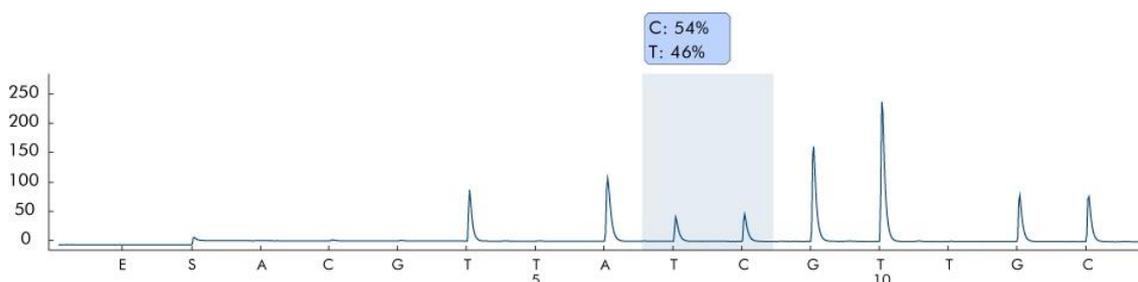


Figure 7. Pyrogramme du run 2

50. Confirmer la bonne installation du système et le bon usage des réactifs en analysant l'évaluation de la qualité, les résultats de quantification, la hauteur des pics mononucléotidiques et le bruit de fond.

i Pour obtenir la hauteur des pics, sélectionner « Export Peak Heights » dans le menu « Tools ». Enregistrer les données dans un format adapté (*.csv ou *.tsv). Ouvrir ce fichier dans Microsoft Excel (Delimited) et calculer la hauteur moyenne de pic mononucléotidique et le bruit de fond pour chaque puits comme décrit ci-dessous.

■ **Évaluer la qualité.**

Tous les puits doivent atteindre le critère de qualité « Passed », indiqué par une barre bleue dans le champ inférieur du puits sur l'écran de vue d'ensemble et avec la valeur de % de C donnée dans un rectangle bleu sur le pyrogramme. Si le résultat de l'évaluation de la qualité est « Check » ou « Failed », consulter la partie « Well Information » pour obtenir des explications.

■ **Évaluer les résultats de quantification.**

Sélectionner « AQ Analysis Statistics Report » (Rapport des statistiques d'analyse AQ) dans le menu « Reports » (Rapports). Les résultats de quantification sont fournis dans le rapport avec l'écart-type. Le % de C doit être compris entre 40 et 60 %. L'écart-type ne doit pas être supérieur à 2 unités de pourcentage.

■ **Évaluer la hauteur des pics mononucléotidiques.**

Dans l'idéal, la hauteur moyenne de pic mononucléotidique doit être de 75 ± 20 RLU.

$$\text{Hauteur moyenne de pic mononucléotidique} = \frac{\text{Somme des pics mononucléotidiques (distributions 4, 6, 12, 13)}}{4}$$

■ **Évaluer le bruit de fond.**

Le bruit de fond des distributions à blanc ne doit pas dépasser 3 %.

$$\text{Bruit de fond (\%)} = \frac{\text{Somme des distributions à blanc (1, 2, 3, 5)}}{\text{Somme des pics mononucléotidiques (distributions 4, 6, 12, 13)}} \times 100$$

ⓘ Si les valeurs se trouvent dans les limites définies, le système est correctement installé. Si les résultats diffèrent des valeurs indiquées ci-dessus, voir « Résolution des principaux problèmes rencontrés », page 31, pour connaître les raisons possibles et les mesures à prendre. Si le guide de résolution des problèmes n'apporte pas de solution, consulter notre Centre de support technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des Services techniques de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Protocole : Procédure de résolution des problèmes

En cas d'obtention d'un résultat inattendu, il est primordial de déterminer si le problème est lié à l'appareil PyroMark Q24 MDx, au poste de travail sous vide ou à l'analyse. Ce protocole décrit l'utilisation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo pour vérifier le fonctionnement du système PyroMark Q24 MDx, en comparant les résultats avec et sans le poste de travail sous vide.

Remarque importante avant de commencer

- Pour plus d'informations sur la configuration d'une analyse et d'un run, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

Avant de commencer

- Pour installer le système, suivre les instructions du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.
- Le tampon de dilution fourni avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo doit être dilué avant usage. Préparer le tampon de dilution 1x en mélangeant 200 µl de tampon de dilution 10x et 1 800 µl d'eau ultrapure.
- Placer le porte-plaques PyroMark Q24 sur l'unité de chauffage à 80 °C en prévision de l'Étape 30.
- Amener l'ensemble des réactifs et des solutions à température ambiante (15 à 25 °C) avant de commencer.

Procédure

1. **Configurer une analyse avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo à l'aide du logiciel PyroMark Q24 MDx.**
2. **Cliquer sur  dans la barre d'outils et sélectionner « New AQ Assay ».**
3. **Saisir la séquence suivante dans le champ « Sequence to Analyze ».**
TAYGGTTGCA

 Pour plus d'informations sur la création d'un fichier de configuration d'analyse, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

4. **Saisir la séquence suivante dans le champ « Dispensation Order ».**
ACGTTATCGTTGC

 Pour plus d'informations sur la création d'un fichier de configuration d'analyse, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

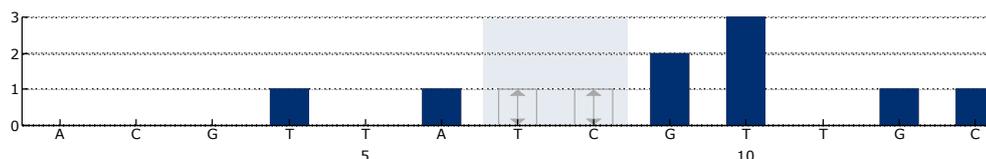


Figure 8. Histogramme en mode AQ. Les ajouts 1, 2, 3, 5 et 11 sont des distributions à blanc qui servent de témoins négatifs. Les distributions 7 et 8 analysent la position variable.

5. Pour enregistrer l'analyse, cliquer sur  dans la barre d'outils.
6. Créer une configuration de run en important les paramètres d'analyse pour les puits concernés.

 Il est recommandé d'utiliser 16 puits : 8 pour les échantillons préparés avec le poste de travail sous vide et 8 ajoutés directement dans la plaque PyroMark Q24.

Il existe deux façons d'ajouter une analyse à un puits :

- Cliquer avec le bouton droit de la souris sur le puits et sélectionner « Load Assay » dans le menu contextuel.
- Sélectionner l'analyse dans le navigateur des raccourcis puis cliquer et faire glisser l'analyse sur le puits.
- Recommandation : Renseigner les champs Sample ID (ID d'échantillon), Plate ID (ID de plaque), Barcode (Code-barres), Reagent ID (ID de réactif) et Run Note (Note sur le run).

Le puits prend la couleur de l'analyse qui lui est associée.

 Pour plus d'informations sur la création d'un fichier de configuration de run, voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*.

7. Enregistrer la configuration de run sur une clé USB (fournie avec le système PyroMark Q24 MDx).
8. Imprimer la liste des volumes requis de mélange d'enzymes, de mélange de substrats et de nucléotides ainsi que la configuration de la plaque en sélectionnant « Pre Run Information » dans le menu « Tools » puis, lorsque le rapport s'affiche, cliquer sur .
9. Secouer doucement le flacon de billes Streptavidin Sepharose High Performance jusqu'à obtention d'une solution homogène.
10. Préparer un mélange réactionnel pour l'immobilisation de l'ADN comme indiqué au Tableau 4. Préparer un volume supérieur de 10 % au volume requis pour le nombre total de réactions à réaliser.

Tableau 4. Mélange réactionnel pour l'immobilisation de l'ADN

Nombre d'échantillons	1	9 *
Billes Streptavidin Sepharose High Performance	2 μ l	18 μ l
Tampon de fixation PyroMark	40 μ l	360 μ l
Eau ultrapure	13 μ l	117 μ l
Volume total	55 μl	495 μl

* Fournit une quantité suffisante pour les 8 échantillons requis.

11. Diluer le réactif PyroMark Q24 Control Oligo à 0,04 μ M comme indiqué au Tableau 5.

Tableau 5. Dilution du réactif PyroMark Q24 Control Oligo

Composant	Volume	Concentration
PyroMark Q24 Control Oligo	10 μ l	20 μ M
Tampon de dilution 1x *	90 μ l	–
Première dilution en série	100 μl	2 μM
Première dilution en série (ci-dessus)	30 μ l	2 μ M
Tampon de dilution 1x *	1470 μ l	–
Dilution finale	1500 μl	0,04 μM

* Veiller à diluer le tampon de dilution 10x fourni avec le kit PyroMark Q24 Control Oligo avec de l'eau ultrapure avant usage. Voir « Avant de commencer », page 23.

12. Agiter le tube de mélange réactionnel puis ajouter 55 μ l du mélange et 25 μ l de réactif PyroMark Q24 Control Oligo dilué (0,04 μ M) dans 8 puits d'une plaque PyroMark Q24 de 24 puits ou de barrettes de tubes.

13. Boucher la plaque de PCR (ou les barrettes de tubes) à l'aide de barrettes de bouchons.

14. Agiter la plaque de PCR à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 5 à 10 min à 1 400 tr/min.



Les billes de Sepharose sédimentent rapidement. Les billes doivent être prélevées immédiatement après l'agitation.

i Au cours de cette étape, préparer le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx pour la préparation des échantillons (voir Annexe A, page 41).

15. Ajouter 25 µl de tampon d'hybridation PyroMark dans chaque puits de la plaque PyroMark Q24 qui recevra le réactif PyroMark Q24 Control Oligo immobilisé à traiter sur le poste de travail sous vide. Ajouter 25 µl de réactif PyroMark Q24 Control Oligo dilué (0,04 µM) dans 8 puits supplémentaires, conformément à la configuration du run.

i Garder un porte-plaques PyroMark Q24 (fourni avec le poste de travail sous vide) à température ambiante (15 à 25 °C) et l'utiliser comme support lors de la préparation et du déplacement de la plaque.

16. Placer la plaque de PCR (ou les barrettes de tubes) et la plaque PyroMark Q24 sur la table de travail du poste sous vide (voir Figure 9).

i Veiller à ce que la plaque soit orientée comme lors du chargement des échantillons.

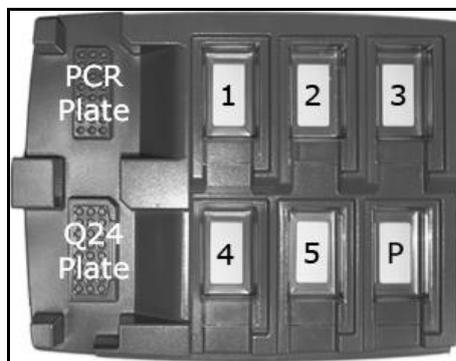


Figure 9. Emplacement d'une plaque de PCR (ou de barrettes de puits) et d'une plaque PyroMark Q24 sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx. Les positions indiquées contiennent de l'éthanol à 70 % (1), la solution de dénaturation PyroMark (2), le tampon de lavage PyroMark (3) et de l'eau ultrapure (4 et 5). P : position Parking.

17. Mettre l'outil sous vide en ouvrant la commande de vide.

18. Abaisser avec précaution les sondes à filtre dans la plaque de PCR (ou les barrettes de tubes) pour capturer les billes liées à la matrice immobilisée. Maintenir les sondes en place pendant 15 s. Saisir l'outil avec précaution.

i Les billes de Sepharose sédimentent rapidement. Si plus d'1 min s'est écoulée depuis l'agitation de la plaque (ou des barrettes de tubes), répéter l'agitation pendant 1 min avant de capturer les billes.

19. Transférer l'outil dans le compartiment contenant l'éthanol à 70 % (compartiment 1). Rincer les sondes à filtre pendant 5 s.
20. Transférer l'outil dans le compartiment contenant la solution de dénaturation (compartiment 2). Rincer les sondes à filtre pendant 5 s.
21. Transférer l'outil dans le compartiment contenant le tampon de lavage (compartiment 3). Rincer les sondes à filtre pendant 10 s.
22. Lever l'outil vers l'arrière avec un angle de plus de 90° pendant 5 s afin d'évacuer le liquide des sondes à filtre (voir Figure 10).



Figure 10. Outil à vide levé au-delà de la verticale

23. Tout en maintenant l'outil au-dessus de la plaque PyroMark Q24, fermer la commande de vide de l'outil (position Off).
24. Libérer les billes dans la plaque contenant 25 μ l de tampon d'hybridation PyroMark en agitant l'outil d'un côté à l'autre. Laisser les sondes à filtre toucher le fond des puits.
25. Transférer l'outil dans le premier compartiment contenant de l'eau ultrapure (compartiment 4) et agiter l'outil pendant 10 s.
26. Laver les sondes à filtre en les abaissant dans le second compartiment d'eau ultrapure (compartiment 5) et en appliquant le vide. Rincer les sondes avec 70 ml d'eau ultrapure.
27. Lever l'outil vers l'arrière avec un angle de plus de 90° pendant 5 s afin d'évacuer le liquide des sondes à filtre (voir Figure 10).
28. Fermer la commande de vide de l'outil (position Off) et placer l'outil en position Parking (P).
29. Arrêter la pompe à vide.

i À la fin de la journée de travail, il convient d'éliminer les déchets liquides et toute solution restante et de vérifier l'absence de poussière et de déversement sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx, voir l'Annexe B, page 42.
30. Chauffer la plaque PyroMark Q24 contenant les échantillons à 80 °C pendant 2 min à l'aide de l'unité de chauffage et du porte-plaques PyroMark Q24 préchauffé.

31. Retirer la plaque du porte-plaques et laisser les échantillons revenir à température ambiante (15 à 25 °C) pendant au moins 5 min.
32. Charger les volumes adaptés de réactifs PyroMark Gold Q24 sur une cartouche PyroMark Q24, tels qu'indiqués dans le rapport Pre Run Information de l'Étape 8.

Le rapport « Pre-Run Information », accessible depuis le menu « Tools » lors de la configuration du run (voir le *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx*), indique les volumes de nucléotides, de mélange d'enzymes et de mélange de substrats nécessaires à une analyse spécifique.

33. Ouvrir la trappe d'accès à la cartouche et y introduire la cartouche de réactifs remplie, étiquette vers l'extérieur. Pousser la cartouche à fond puis appuyer dessus vers le bas.
34. Vérifier que la ligne est visible sur le devant de la cartouche puis fermer la trappe d'accès.
35. Ouvrir le châssis porte-plaques et poser la plaque sur l'unité de chauffage.
36. Fermer le châssis porte-plaques et le couvercle de l'appareil.
37. Introduire la clé USB contenant le fichier de run dans le port USB à l'avant de l'appareil.

 Ne pas retirer la clé USB avant la fin du run.

38. Sélectionner « Run » dans le menu principal à l'aide des touches ▲ et ▼ sous l'écran puis appuyer sur « OK ».
39. Sélectionner le fichier du run à l'aide des touches ▲ et ▼ sous l'écran.

 Pour afficher le contenu d'un dossier, sélectionner ce dossier puis appuyer sur « Select ». Pour revenir à l'écran précédent, appuyer sur « Back ».

40. Une fois le fichier du run sélectionné, appuyer sur « Select » pour lancer le run.
41. À la fin du run, une fois que l'appareil a confirmé l'enregistrement du fichier de run sur la clé USB, appuyer sur « Close ».
42. Retirer la clé USB.
43. Ouvrir le couvercle de l'appareil.
44. Ouvrir la trappe d'accès à la cartouche et retirer celle-ci en la soulevant et en la tirant vers l'extérieur.
45. Fermer la trappe.
46. Ouvrir le châssis porte-plaques et retirer la plaque PyroMark Q24 de l'unité de chauffage.
47. Fermer le châssis porte-plaques et le couvercle de l'appareil.

48. Jeter la plaque PyroMark Q24 et nettoyer la cartouche (voir le Manuel des réactifs PyroMark Gold Q24).
49. Dans le logiciel PyroMark Q24 MDx, ouvrir le run et analyser tous les puits. Le tracé des pics doit être similaire à celui de la Figure 11.

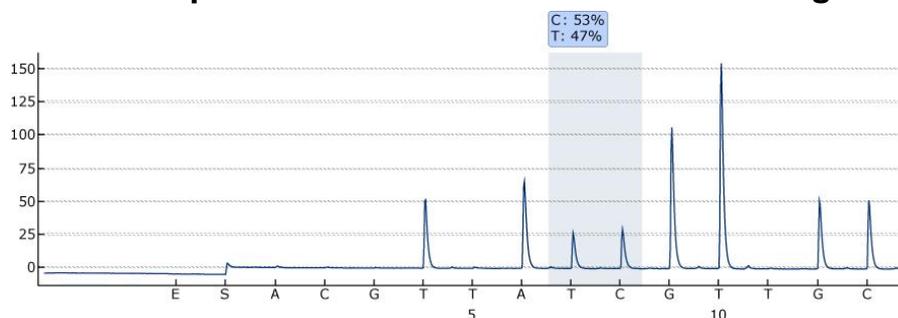


Figure 11. Pyrogramme du run 3

50. Confirmer la bonne installation du système et le bon usage des réactifs en analysant l'évaluation de la qualité, les résultats de quantification, la hauteur des pics mononucléotidiques et le bruit de fond.



Pour obtenir la hauteur des pics, sélectionner « Export Peak Heights » dans le menu « Tools ». Enregistrer les données dans un format adapté (*.csv ou *.tsv). Ouvrir ce fichier dans Microsoft Excel (Delimited) et calculer la hauteur moyenne de pic mononucléotidique et le bruit de fond pour chaque puits comme décrit ci-dessous.

■ **Évaluer la qualité.**

Tous les puits doivent atteindre le critère de qualité « Passed », indiqué par une barre bleue dans le champ inférieur du puits sur l'écran de vue d'ensemble et avec la valeur de % C donnée dans un rectangle bleu sur le pyrogramme. Si le résultat de l'évaluation de la qualité est « Check » ou « Failed », consulter la partie « Well Information » pour obtenir des explications.

■ **Évaluer les résultats de quantification.**

Sélectionner « AQ Analysis Statistics Report » dans le menu « Reports ». Les résultats de quantification sont fournis dans le rapport avec l'écart-type. Le % C doit être compris entre 40 et 60 %. L'écart-type ne doit pas être supérieur à 2 unités de pourcentage.

■ **Évaluer la hauteur des pics mononucléotidiques.**

Dans l'idéal, la hauteur moyenne de pic mononucléotidique doit être de 75 ± 20 RLU.

$$\text{Hauteur moyenne de pic mononucléotidique} = \frac{\text{Somme des pics mononucléotidiques (distributions 4, 6, 12, 13)}}{4}$$

■ **Évaluer le bruit de fond.**

Le bruit de fond des distributions à blanc ne doit pas dépasser 3 %.

$$\text{Bruit de fond (\%)} = \frac{\text{Somme des distributions à blanc (1, 2, 3, 5)}}{\text{Somme des pics mononucléotidiques (distributions 4, 6, 12, 13)}} \times 100$$

51. Évaluer la différence de hauteur des pics avec et sans préparation des échantillons. La variation à la baisse de la hauteur des pics entre les échantillons préparés sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx et le réactif PyroMark Q24 Control Oligo ajouté directement dans la plaque PyroMark Q24 ne doit pas dépasser 20 %.



Si les valeurs se trouvent dans les limites définies, le système est correctement installé. Si les résultats diffèrent des valeurs indiquées ci-dessus, voir « Résolution des principaux problèmes rencontrés », page 31, pour connaître les raisons possibles et les mesures à prendre. Si le guide de résolution des problèmes n'apporte pas de solution, consulter notre Centre de support technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des Services techniques de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Résolution des principaux problèmes rencontrés

Ce guide de résolution des principaux problèmes rencontrés peut aider à répondre à certaines questions qui peuvent se poser. Pour plus d'informations, voir aussi la page Foire aux Questions de notre Centre de support technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des Services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Chaque évaluation à réaliser fait l'objet d'une section distincte :

- Évaluation de la qualité, ci-dessous
- Résultats de quantification, page 35
- Hauteur des pics mononucléotidiques, page 36
- Bruit de fond, page 39
- Différence de hauteur des pics avec et sans préparation des échantillons, page 40

 Pour la résolution des problèmes généraux relatifs à l'appareil, consulter le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.

Évaluation de la qualité

Commentaires et suggestions

Avertissement du logiciel à propos des pics larges

Concentration du réactif
PyroMark Q24 Control
Oligo trop élevée

 Suivre le protocole concerné. Veiller à diluer l'oligonucléotide dans le tampon de dilution, comme indiqué dans les protocoles.

Pic de substrat haut

Consommation de mélange
de substrats anormalement
élevée en raison de la
contamination des
échantillons (signal de
préséquençage fort).

 Remplacer les tampons. Utiliser uniquement des tampons fournis par QIAGEN ou ses distributeurs agréés.

 Vérifier si des pics ont été générés avec la fonction de zoom (sélectionner une section du pyrogramme avec le bouton gauche de la souris).

Commentaires et suggestions

Mauvaise détermination de la séquence

- a) Mauvaise préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo
- ① Suivre les instructions des protocoles de préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo. Veiller à diluer l'oligonucléotide dans le tampon de dilution, comme indiqué dans les protocoles. Avant usage, veiller à diluer le tampon de dilution 10x avec de l'eau ultrapure.
- b) Ordre de distribution incorrect
- ① Vérifier qu'une séquence correcte a été saisie lors de la configuration de l'analyse.
- c) Tampons ou réactifs mal dilués ou mal stockés
- ① Suivre les instructions fournies avec les réactifs. Prévoir un puits vide (contenant uniquement le tampon d'hybridation PyroMark) dans le run pour savoir si les pics de bruit de fond proviennent des nucléotides.
- d) Erreur de distribution (se manifestant, par exemple, par le dédoublement des pics)
- ① Nettoyer ou remplacer la cartouche PyroMark Q24. Si le problème persiste, contacter les Services techniques de QIAGEN (pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).
- e) Cartouche PyroMark Q24 bouchée
- ① Les nucléotides sont mal distribués en raison de l'obstruction d'une aiguille de la cartouche PyroMark Q24. Nettoyer la cartouche et vérifier qu'elle fonctionne correctement.
- f) Cartouche PyroMark Q24 endommagée
- ① Jeter la cartouche PyroMark Q24 conformément aux réglementations nationales, régionales et locales relatives à l'élimination des déchets de laboratoire en vigueur.
- g) Durée d'hybridation trop longue
- ① Respecter la durée et les températures d'hybridation indiquées dans les protocoles.

Commentaires et suggestions

Pics petits ou manquants

- a) Quantité de matrice insuffisante à l'immobilisation
- ⓘ Veiller à correctement diluer le réactif PyroMark Q24 Control Oligo et de respecter les quantités indiquées dans les protocoles.
- b) Quantité d'enzymes ou de substrats insuffisante par rapport au nombre de puits
- ⓘ Remplir la cartouche PyroMark Q24 conformément aux instructions du rapport Pre Run Information.
- c) Puits indiqués dans la configuration du run différents de la disposition des échantillons sur la plaque
- ⓘ Vérifier que la plaque a été chargée correctement, conformément à la configuration du run.
- d) Mauvais remplissage d'un ou plusieurs compartiments de nucléotides ou de réactifs de la cartouche PyroMark Q24
- ⓘ Veiller à ce que les réactifs soient ajoutés en quantité suffisante dans la cartouche PyroMark Q24. Suivre le mode d'emploi fourni avec les réactifs.
- e) Erreur de distribution (se manifestant, par exemple, par le dédoublement des pics)
- ⓘ Nettoyer ou remplacer la cartouche PyroMark Q24. Si le problème persiste, contacter les Services techniques de QIAGEN (pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).
- f) Cartouche PyroMark Q24 bouchée
- ⓘ Les nucléotides sont mal distribués en raison de l'obstruction d'une aiguille de la cartouche PyroMark Q24. Nettoyer la cartouche et vérifier qu'elle fonctionne correctement.
- ⓘ Les enzymes ou les substrats sont mal distribués en raison de l'obstruction de la cartouche PyroMark Q24 (comme indiqué par l'absence de signal de préséquençage et de pics sur le pyrogramme). Nettoyer la cartouche et vérifier qu'elle fonctionne correctement.

Commentaires et suggestions

- g) Cartouche PyroMark Q24 endommagée
- ⓘ Jeter la cartouche PyroMark Q24 conformément aux réglementations nationales, régionales et locales relatives à l'élimination des déchets de laboratoire en vigueur.
- h) Tampons ou réactifs mal dilués ou mal stockés
- ⓘ Suivre les instructions fournies avec les réactifs.
- i) Démarrage du PyroMark Q24 MDx avant introduction d'une plaque
- ⓘ Nettoyer l'unité de chauffage et les guides de lumière ou les optiques conformément aux instructions du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.
- j) Mauvaise préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo
- ⓘ Suivre les instructions des protocoles de préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo. Veiller à diluer l'oligonucléotide dans le tampon de dilution, comme indiqué. Avant usage, veiller à diluer le tampon de dilution 10x avec de l'eau ultrapure.
- k) Consommation de mélange de substrats anormalement élevée en raison de la contamination des échantillons (signal de préséquençage fort).
- ⓘ Remplacer les tampons. Utiliser uniquement des tampons fournis par QIAGEN ou ses distributeurs agréés.
- ⓘ Vérifier si des pics ont été générés avec la fonction de zoom (sélectionner une section du pyrogramme avec le bouton gauche de la souris).

Avertissement concernant le rapport signal/bruit

Divers

- ⓘ Voir les points a) à k) de « Pics petits ou manquants », ci-dessus.

Résultats de quantification

Commentaires et suggestions

Mauvaise détermination de la séquence

- a) Mauvaise préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo  Suivre les instructions des protocoles de préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo. Veiller à diluer l'oligonucléotide dans le tampon de dilution, comme indiqué dans les protocoles. Avant usage, veiller à diluer le tampon de dilution 10x en tampon 1x avec de l'eau ultrapure.
- b) Séquence à analyser ou ordre de distribution incorrects  Vérifier qu'une séquence correcte a été saisie lors de la configuration de l'analyse.
- c) Tampons ou réactifs mal dilués ou mal stockés  Suivre les instructions fournies avec les réactifs. Prévoir un puits vide (contenant uniquement le tampon d'hybridation PyroMark) dans le run pour savoir si les pics de bruit de fond proviennent des nucléotides.
- d) Erreur de distribution (se manifestant, par exemple, par le dédoublement des pics)  Nettoyer ou remplacer la cartouche PyroMark Q24. Si le problème persiste, contacter les Services techniques de QIAGEN (pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).
- e) Cartouche PyroMark Q24 bouchée  Les nucléotides sont mal distribués en raison de l'obstruction d'une aiguille de la cartouche PyroMark Q24. Nettoyer la cartouche et vérifier qu'elle fonctionne correctement.
- f) Cartouche PyroMark Q24 endommagée  Jeter la cartouche PyroMark Q24 conformément aux réglementations nationales, régionales et locales relatives à l'élimination des déchets de laboratoire en vigueur.
- g) Durée d'hybridation trop longue  Respecter la durée et les températures d'hybridation indiquées dans les protocoles.

Commentaires et suggestions

Bruit de fond élevé

- a) Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été stockés conformément aux instructions de la Section « Stockage », page 5.
- ⓘ Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation des réactifs. Si nécessaire, utiliser des réactifs neufs.
- ⓘ Les nucléotides ne doivent jamais être congelés !
- b) Réactifs périmés
- ⓘ Vérifier les conditions de stockage et la date d'expiration des réactifs. Si nécessaire, utiliser des réactifs neufs.

Hauteur des pics mononucléotidiques

Commentaires et suggestions

Mauvaise détermination de la séquence

- a) Mauvaise préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo
- ⓘ Suivre les instructions des protocoles de préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo. Veiller à diluer l'oligonucléotide dans le tampon de dilution, comme indiqué dans les protocoles. Avant usage, veiller à diluer le tampon de dilution 10x avec de l'eau ultrapure 1x.
- b) Séquence à analyser ou ordre de distribution incorrects
- ⓘ Vérifier qu'une séquence correcte a été saisie lors de la configuration de l'analyse.
- c) Tampons ou réactifs mal dilués ou mal stockés
- ⓘ Suivre les instructions fournies avec les réactifs. Prévoir un puits vide (contenant uniquement le tampon d'hybridation PyroMark) dans le run pour savoir si les pics de bruit de fond proviennent des nucléotides.
- d) Erreur de distribution (se manifestant, par exemple, par le dédoublement des pics)
- ⓘ Nettoyer ou remplacer la cartouche PyroMark Q24. Si le problème persiste, contacter les Services techniques de QIAGEN (pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

- e) Cartouche PyroMark Q24 bouchée (i) Les nucléotides sont mal distribués en raison de l'obstruction d'une aiguille de la cartouche PyroMark Q24. Nettoyer la cartouche et vérifier qu'elle fonctionne correctement.
- f) Cartouche PyroMark Q24 endommagée (i) Jeter la cartouche PyroMark Q24 conformément aux réglementations nationales, régionales et locales relatives à l'élimination des déchets de laboratoire en vigueur.
- g) Durée d'hybridation trop longue (i) Respecter la durée et les températures d'hybridation indiquées dans les protocoles.

Pics petits ou manquants

- a) Quantité de matrice insuffisante à l'immobilisation (i) Veiller à correctement diluer le réactif PyroMark Q24 Control Oligo et de respecter les quantités indiquées dans les protocoles.
- b) Quantité d'enzymes ou de substrats insuffisante par rapport au nombre de puits (i) Remplir la cartouche PyroMark Q24 conformément aux instructions du rapport Pre Run Information.
- c) Puits indiqués dans la configuration du run différents de la disposition des échantillons sur la plaque (i) Vérifier que la cartouche a été chargée correctement, conformément à la configuration du run.
- d) Mauvais remplissage d'un ou plusieurs compartiments de nucléotides ou de réactifs de la cartouche PyroMark Q24 (i) Veiller à ce que les réactifs soient ajoutés en quantité suffisante dans la cartouche PyroMark Q24. Suivre le mode d'emploi fourni avec les réactifs.
- e) Erreur de distribution (se manifestant, par exemple, par le dédoublement des pics) (i) Nettoyer ou remplacer la cartouche PyroMark Q24. Si le problème persiste, contacter les Services techniques de QIAGEN (pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

- f) Cartouche PyroMark Q24 bouchée
- ① Les nucléotides sont mal distribués en raison de l'obstruction d'une aiguille de la cartouche PyroMark Q24. Nettoyer la cartouche et vérifier qu'elle fonctionne correctement.
- ① Les enzymes ou les substrats sont mal distribués en raison de l'obstruction de la cartouche PyroMark Q24 (comme indiqué par l'absence de signal de préséquençage et de pics sur le pyrogramme). Nettoyer la cartouche et vérifier qu'elle fonctionne correctement.
- g) Cartouche PyroMark Q24 endommagée
- ① Jeter la cartouche PyroMark Q24 conformément aux réglementations nationales, régionales et locales relatives à l'élimination des déchets de laboratoire en vigueur.
- h) Tampons ou réactifs mal dilués ou mal stockés
- ① Suivre les instructions fournies avec les réactifs.
- i) Mauvaise préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo
- ① Suivre les instructions des protocoles de préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo. Veiller à diluer l'oligonucléotide dans le tampon de dilution, comme indiqué. Avant usage, veiller à diluer le tampon de dilution 10x avec de l'eau ultrapure 1x.
- j) Consommation de mélange de substrats anormalement élevée en raison de la contamination des échantillons (signal de préséquençage fort).
- ① Remplacer les tampons. Utiliser uniquement des tampons fournis par QIAGEN ou ses distributeurs agréés.
- ① Vérifier avec la fonction de zoom si des pics ont été générés (sélectionner une section du pyrogramme avec le bouton gauche de la souris).

Commentaires et suggestions

Pics très hauts

Mauvaise préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo

i Suivre les instructions des protocoles de préparation du réactif PyroMark Q24 Control Oligo. Veiller à diluer l'oligonucléotide dans le tampon de dilution, comme indiqué dans les protocoles. Avant usage, veiller à diluer le tampon de dilution 10x avec de l'eau ultrapure 1x.

Bruit de fond

Commentaires et suggestions

Bruit de fond élevé

a) Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été stockés conformément aux instructions de la Section « Stockage », page 5.

i Vérifier les conditions de stockage et la date d'expiration des réactifs. Si nécessaire, utiliser des réactifs neufs.

i Les nucléotides ne doivent jamais être congelés !

b) Réactifs périmés

i Vérifier les conditions de stockage et la date d'expiration des réactifs. Si nécessaire, utiliser des réactifs neufs.

Différence de hauteur des pics avec et sans préparation des échantillons

Commentaires et suggestions

Mauvaise préparation des échantillons

- a) Du liquide est resté dans certains puits ou tubes lors de la capture des billes liées à la matrice immobilisée à l'aide des sondes à filtre.
- ⓘ Remplacer la sonde concernée de l'outil à vide du poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx. Pour les recommandations de préparation des échantillons, consulter notre Centre de support technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des Services techniques de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).
- b) Sondes à filtre défectueuses
- ⓘ Vérifier les sondes à filtre. Ajouter 80 µl d'eau ultrapure dans chaque puits d'une plaque de PCR. Démarrer la pompe à vide et appliquer le vide en ouvrant la commande de vide (position On). Abaisser l'outil à vide dans la plaque de PCR et attendre 10 s. Vérifier que tous les puits de la plaque de PCR sont vides. Si ce n'est pas le cas, remplacer les sondes à filtre défectueuses et répéter le test.
- c) Des résidus blancs (billes Streptavidin Sepharose High Performance) sont restés dans certains puits ou tubes lors de la capture des billes liées à la matrice immobilisée à l'aide des sondes à filtre.
- ⓘ Ne pas laisser la plaque de PCR ayant servi à l'immobilisation reposer plus d'1 min après la fin de l'agitation. Si nécessaire, prolonger l'agitation d'une minute avant de capturer les billes.
- d) Fuite du poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx
- ⓘ Vérifier le bon raccordement du tube et l'absence de fuite. Il se peut que le filtre à déchets soit humide et doive être remplacé.

Annexe A : Préparation du poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx

Ce protocole décrit la préparation du poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx avant son utilisation pour préparer l'ADN monobrin.

Procédure

1. Remplir 5 compartiments fournis avec le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx comme suit.

- Environ 50 ml d'éthanol (70 %) (1)
- Environ 40 ml de solution de dénaturation PyroMark (2)
- Environ 50 ml de tampon de lavage PyroMark (3)
- Environ 50 ml d'eau ultrapure (4)
- Environ 70 ml d'eau ultrapure (5)

Une configuration est suggérée à la Figure 12. Compléter les compartiments à ces niveaux aussi souvent que nécessaire.

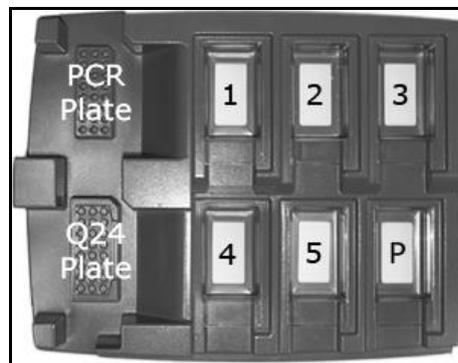


Figure 12. Positions sur le poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx

2. Mettre en marche la pompe à vide.
3. Mettre l'outil sous vide en ouvrant la commande de vide.
4. Laver les sondes à filtre en les abaissant dans l'eau ultrapure (compartiment 5). Rincer les sondes avec 70 ml d'eau ultrapure. Vérifier que l'eau est bien transférée dans le flacon à déchets. Si ce n'est pas le cas, vérifier la bonne connexion et l'intégrité du tube. Il convient de remplacer tout tube cassé (voir « Remplacement du tube » dans le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*).
5. Veiller à ce que le filtre à déchets soit sec. Il convient de remplacer tout filtre humide (voir « Remplacement du filtre à déchets » dans le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*).
6. Ajouter 70 ml d'eau ultrapure dans le compartiment 5.
7. Fermer la commande de vide de l'outil (position Off) et placer l'outil en position Parking (P).

Annexe B : Vidage du flacon à déchets et des compartiments

AVERTISSEMENT 	Produits chimiques dangereux <p>La solution de dénaturation PyroMark utilisée avec le poste de travail sous vide contient de l'hydroxyde de sodium qui est irritant pour les yeux et la peau. Toujours porter des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire. La personne responsable (par exemple, le directeur du laboratoire) doit prendre les précautions nécessaires afin de garantir que le lieu de travail environnant est sûr et que les opérateurs de l'appareil ne sont pas exposés à des niveaux dangereux de substances (chimiques ou biologiques) toxiques comme cela est défini dans les fiches de données de sécurité (FDS) ou dans les documents de l'OSHA *, de l'ACGIH † ou du COSHH ‡ applicables. L'évacuation des vapeurs et la mise au rebut des déchets doivent s'effectuer conformément à toutes les réglementations et lois nationales, régionales et locales relatives à la santé et à la sécurité.</p>
---	---

* OSHA : Occupational Safety and Health Administration (États-Unis d'Amérique) (Administration pour la santé et la sécurité du travail).

† ACGIH : American Conference of Government Industrial Hygienists (États-Unis d'Amérique) (Conférence américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux).

‡ COSHH : Control of Substances Hazardous to Health (Royaume-Uni) (Contrôle des substances dangereuses pour la santé).

Veiller à respecter les réglementations nationales, régionales et locales relatives à l'élimination des déchets de laboratoire en vigueur.

L'élément suivant est nécessaire :

- Eau ultrapure (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, ou équivalent).

Procédure

- 1. Veiller à ce que l'outil à vide ne soit pas sous vide, c'est-à-dire que la commande de vide soit fermée (position « Off ») et que la pompe à vide soit arrêtée.**
- 2. Éliminer toute solution restante dans les compartiments.**
- 3. Rincer les compartiments à l'eau ultrapure ou les remplacer si nécessaire.**
- 4. Vider le flacon à déchets.**



Il est possible d'enlever le bouchon sans débrancher le tube.

- 5. S'il est impératif de nettoyer le poste de travail sous vide (par exemple en cas de présence de poussière ou d'un déversement), suivre les instructions de la Section « Nettoyage du poste de travail sous vide PyroMark Q24 MDx » dans le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.**

Références

QIAGEN tient à jour une grande banque de données en ligne de publications scientifiques utilisant les produits QIAGEN. Des critères de sélection de recherche aident à trouver les articles à l'aide d'un mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

Pour une liste complète des références, visiter notre banque de données en ligne « QIAGEN Reference Database » à l'adresse www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou bien contacter les Services techniques de QIAGEN ou le distributeur local.

Pour commander

Produit	Contenu	Référence
PyroMark Q24 Control Oligo	Pour la vérification de l'installation du système	979303
Accessoires		
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Pour analyser 5 x 24 échantillons sur le PyroMark Q24 MDx : mélange d'enzymes, mélange de substrats et nucléotides	971802
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Pour l'hybridation de l'amorce de séquençage sur le produit de PCR monobrin et la réaction de pyroséquençage	979309
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Pour la fixation du produit de PCR biotinylé aux billes de Sepharose	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Pour la dénaturation du produit de PCR double brin en matrice d'ADN monobrin	979307
PyroMark Wash Buffer, concentrate (200 ml)	Pour le rinçage de l'ADN monobrin	979308
PyroMark Q24 Plate (100)	Plaque de réaction de séquençage à 24 puits	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartouches pour la distribution des nucléotides et des réactifs	979302
Produits assimilés		
PyroMark Q24 MDx	Plateforme de détection de séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001513
PyroMark Q24 MDx Software	Application logicielle	9019063

Produit	Contenu	Référence
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Poste de travail sous vide (220 V) pour la préparation de 24 échantillons en parallèle, du produit de PCR à la matrice monobrin	9001515 * 9001517 †
PyroMark Q24 Validation Oligo	Pour la vérification des performances du système	979304

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN respectifs. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

* Reste du monde (sauf R.U).

† Pour le R.U.

Page laissée volontairement vierge

Page laissée volontairement vierge

Page laissée volontairement vierge

Marques de commerce : QIAGEN®, Pyrosequencing®, Pyrogram®, PyroMark® (Groupe QIAGEN), Microsoft® (Microsoft Corporation), Milli-Q® (Millipore Corporation), Sepharose® (GE Healthcare).

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit PyroMark Q24 Control Oligo accepte les conditions suivantes :

1. Le kit PyroMark Q24 Control Oligo ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du kit PyroMark Q24 Control Oligo* et uniquement avec les composants du produit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce produit avec tout autre composant non fourni dans ce produit, à l'exception de ce qui est stipulé dans le *Manuel du kit PyroMark Q24 Control Oligo* et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce produit et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce produit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du produit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN peut faire appliquer des interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au produit et/ou à ses composants.

Pour les termes de licence mis à jour, voir www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, tous droits réservés.

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 021-3865-3865 ■ Fax 021-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

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

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

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

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

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

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

Italy ■ Orders 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)

