

Manuale di PyroMark[®] Q24 Validation Oligo



Versione 1

IVD

Per il controllo delle prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx.

Per uso diagnostico in vitro



REF

979304



1057426IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R3

MAT

1057426IT



Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'estrazione e alla purificazione di acidi nucleici a partire da qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN pone nuovi standard:

- nella purificazione del DNA, RNA e delle proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca sul microRNA e sull'RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per maggiori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Sommario

Contenuto del kit	4
Simboli	4
Conservazione	5
Uso previsto	5
Limitazioni all'uso del prodotto	5
Controllo di qualità	6
Assistenza tecnica	6
Avvertenze e precauzioni	6
Introduzione	7
Principio e procedura	7
Descrizione dei protocolli	9
Apparecchiatura e reagenti in dotazione all'utente	10
Protocollo 1: Configurazione di un dosaggio PyroMark Q24 Validation Oligo	11
Protocollo 2: Configurazione del processo per il test di prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx	12
Protocollo 3: Preparazione della serie di diluizioni PyroMark Q24 Validation Oligo	14
Protocollo 4: Determinazione di linearità, deviazione e ripetibilità	17
Protocollo 5: Analisi della linearità	25
Guida alla risoluzione dei problemi	31
Appendice A: Preparazione della stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx	35
Appendice B: Svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti	37
Riferimenti bibliografici	39
Informazioni per gli ordini	40

Contenuto del kit

PyroMark Q24 Validation Oligo	
Catalogo n°	979304
Numero di dosaggi	3
PyroMark Q24 Validation Oligo 5% (20 µM)	70 µl
PyroMark Q24 Validation Oligo 95% (20 µM)	70 µl
Tampone di diluizione	2 x 1,7 ml
Manuale	 1

Simboli

 <N>	Contenuto sufficiente per <N> test
	Data di scadenza
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Numero di catalogo
	Codice del lotto
	Numero di materiale
	Componenti
	Contiene
	Numero
	Idrossido di sodio
	Global Trade Item Number



Limiti di temperatura



Produttore legale



Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale



Nota importante

Conservazione

PyroMark Q24 Validation Oligo deve essere conservato tra -30 e -15°C all'arrivo. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti (>4 x). PyroMark Q24 Validation Oligo è stabile fino alla data di scadenza se conservato nel rispetto delle presenti condizioni.

Uso previsto

PyroMark Q24 Validation Oligo consente di verificare le prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx in applicazioni Pyrosequencing[®] di diagnostica in vitro.

Limitazioni all'uso del prodotto

Destinato all'uso in applicazioni di diagnostica in vitro, il sistema PyroMark Q24 MDx deve essere azionato unicamente da

- personale in possesso delle specifiche competenze e della formazione adeguata sulle procedure per utilizzare i dispositivi medici di diagnostica in vitro e
- laboratori di analisi mediche accreditati.

Tutte le operazioni devono essere effettuate in conformità alle istruzioni del sistema PyroMark Q24 MDx, come indicato nelle finestre di dialogo visualizzate sullo schermo di PyroMark Q24 MDx, nel rispetto dei manuali utente collegati e dell'assistenza tecnica di QIAGEN, nonché entro i limiti imposti dalle specifiche tecniche.

I materiali per la preparazione dei campioni prima delle analisi condotte con la tecnologia Pyrosequencing non sono inclusi nel prodotto.

Il prodotto è destinato ad essere usato unicamente sul sistema PyroMark Q24 MDx.

Al fine di ottenere risultati ottimali, occorre attenersi strettamente al manuale utente dello strumento e alla presente guida. La diluizione dei reagenti in

maniera diversa da quanto descritto nel presente manuale è sconsigliata e determinerà un calo di prestazioni.

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non usare componenti scaduti o conservati in modo errato.

I risultati ricavati dal sistema PyroMark Q24 MDx devono essere interpretati nel contesto di tutti gli esiti clinici e di laboratorio pertinenti.

Controllo di qualità

In conformità al sistema di gestione della qualità con certificazione ISO della QIAGEN, ciascun lotto di Pyromark Q24 Validation Oligo viene testato con le specifiche predefinite per garantire una qualità del prodotto costante.

Assistenza tecnica

QIAGEN è orgogliosa della qualità e della disponibilità della propria assistenza tecnica. Il nostro reparto di assistenza tecnica è composto da personale qualificato che ha alle spalle una lunga esperienza maturata a livello pratico e teorico nelle tecnologie per campioni e analisi e nell'impiego dei prodotti QIAGEN®. In caso volette porgere delle domande o incontriate delle difficoltà con PyroMark Q24 Validation Oligo o con i prodotti QIAGEN in generale, vi preghiamo di non esitare a contattarci.

I clienti QIAGEN sono la fonte principale d'informazione relativa all'uso avanzato o specializzato dei nostri prodotti. Tali informazioni sono utili sia agli altri ricercatori che a quelli della QIAGEN. Pertanto vi esortiamo a contattarci, in caso di suggerimenti da darci sulle prestazioni dei prodotti o su nuove applicazioni e tecniche.

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, visitate il sito del nostro servizio di assistenza tecnica www.qiagen.com/Support o chiamate uno dei reparti del servizio tecnico di QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Avvertenze e precauzioni

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Introduzione

PyroMark Q24 Validation Oligo consente di verificare le prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx.

Principio e procedura

Il prodotto è costituito da 2 oligonucleotidi biotinilati che differiscono nella sequenza in una posizione, sintetizzati come A o G. Una posizione variabile viene generata miscelando i 2 oligonucleotidi in proporzioni diverse. C o T vengono incorporati al momento del sequenziamento e la posizione variabile viene analizzata come %C.

I replicati delle miscele consentono di determinare linearità, deviazioni e ripetibilità. Queste determinazioni costituiscono il test delle prestazioni del sistema.*

I limiti delle proporzioni delle 2 miscele, 5% e 95%, sono stati accuratamente selezionati per coincidere con i limiti generalmente accettati per una quantificazione affidabile, come stabilito dalla valutazione interna e dai dati pubblicati (2–8).

Il test delle prestazioni è valido per l'intero sistema PyroMark Q24 MDx, poiché le miscele sono preparate con la PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx) prima dell'analisi nello strumento PyroMark Q24 MDx.

Entrambi gli oligonucleotidi possono formare una struttura stem-loop interna. Questa struttura consente l'innescio automatico degli oligonucleotidi per l'estensione mediante DNA polimerasi ed elimina la necessità di un primer di sequenziamento nella reazione di Pyrosequencing. La Figura 1 mostra la struttura degli oligonucleotidi.

* La terminologia per i parametri di prestazione è costituita da definizioni adattate dal riferimento 1 (vedere "Riferimenti bibliografici", a pagina 39).

Linearità: Capacità, all'interno di un dato intervallo di misurazione, di fornire risultati di misurazione direttamente proporzionali al valore di %C nel campione.

Deviazione: Differenza tra i risultati di misurazione e un valore effettivo di %C.

Ripetibilità: Precisione di risultati di misurazione consecutivi per %C eseguiti in condizioni di misurazione sostanzialmente invariate (per esempio, replicati).

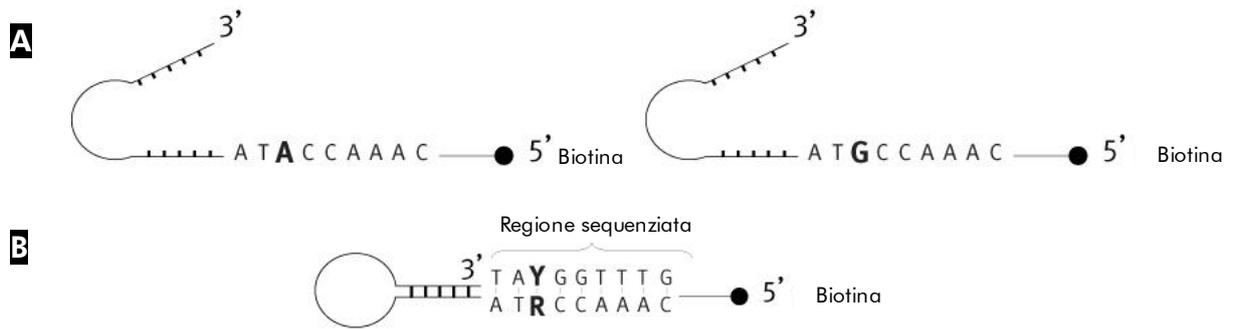
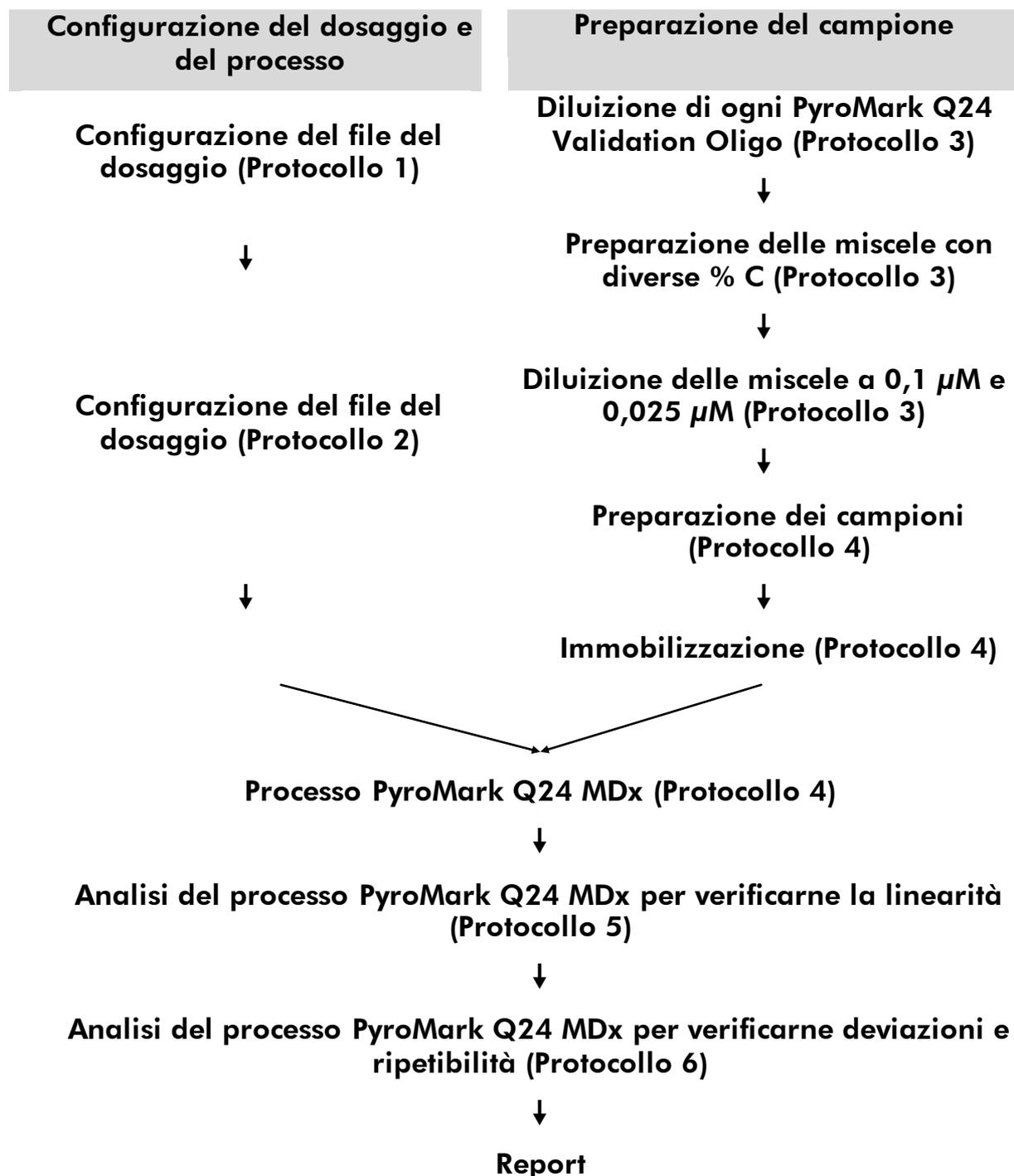


Figura 1. Struttura di PyroMark Q24 Validation Oligo. **A** La struttura aperta degli oligonucleotidi. **B** La struttura a innesco automatico degli oligonucleotidi, con indicazione della sequenza analizzata.

Descrizione dei protocolli

Il flusso di lavoro riportato di seguito illustra la procedura del dosaggio.

Flusso di lavoro della procedura con PyroMark Q24 Validation Oligo



Apparecchiatura e reagenti in dotazione all'utente

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Da utilizzare su PyroMark Q24 MDx

- PyroMark Q24 MDx (cat. n° 9001513)*†
- Software PyroMark Q24 MDx (cat. n° 9019063)†
- Piastra PyroMark Q24 (cat. n° 979301)†
- Cartuccia PyroMark Q24 (cat. n° 979302)†
- Stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx (cat. n° 9001515 o 9001517)*†
- Reagenti PyroMark Gold (cat. n° 971802)†
- Pipette (regolabili)*
- Puntali per pipette sterili con filtri
- Tampone di legame PyroMark (cat. n° 979306)†
- Soluzione di denaturazione PyroMark (cat. n° 979307)†
- Tampone di lavaggio PyroMark, concentrato (cat. n° 979308)†
- Tampone di annealing PyroMark (cat. n° 979309)†
- Streptavidin Sepharose® High Performance (GE Healthcare, cat. n° 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Mixer piastra* per immobilizzazione su grani
- Blocco riscaldante* che possa raggiungere la temperatura di 80°C
- Piastra o strisce PCR a 24 pozzetti
- Tappi per strisce
- Provette da 1,5 ml o 2 ml idonee per microcentrifuga per la diluizione di PyroMark Q24 Validation Oligo
- Penna indelebile per l'etichettatura delle provette
- Acqua altamente depurata (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm o equivalente)
- Etanolo (70%)

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati controllati e calibrati periodicamente secondo le disposizioni del produttore.

† Marchio CE-IVD conformemente alla Direttiva UE 98/79/CE. Tutti gli altri prodotti elencati non sono contrassegnati dal marchio CE-IVD, sulla base della Direttiva UE 98/79/CE.

Protocollo 1: Configurazione di un dosaggio PyroMark Q24 Validation Oligo

Punto importante prima di iniziare

- Per ulteriori informazioni sulla configurazione di un dosaggio e di un processo, consultare la *Guida al software per l'utente PyroMark Q24 MDx*.

Procedura

1. Configurare un dosaggio per PyroMark Q24 Validation Oligo utilizzando il software PyroMark Q24 MDx.
2. Fare clic su  nella barra strumenti e selezionare "New AQ Assay" (Nuovo dosaggio AQ)
3. Digitare questa sequenza nel campo "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare).

TAYGGTTGA

 Per ulteriori informazioni sulla creazione di un file di configurazione dosaggio, consultare la *Guida al software per l'utente PyroMark Q24 MDx*.

4. Fare clic sull'icona "Generate Dispensation Order" (Genera ordine di dispensazione) per ottenere il seguente ordine di dispensazione dei nucleotidi:

AQ: CTGACTGTG

CpG: ATGATCGTG

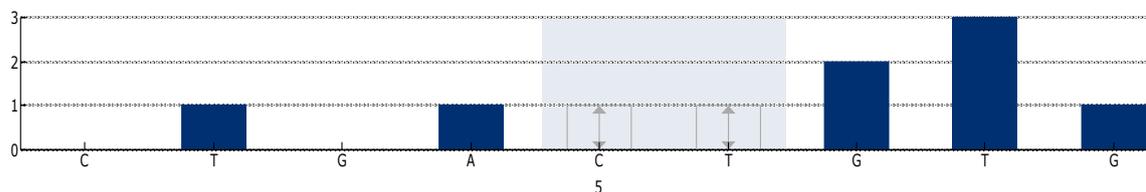


Figura 2. Istogramma per modalità AQ. La prima e la terza aggiunta di nucleotidi sono dispensazioni in bianco e servono da controlli negativi. La quinta e la sesta dispensazione costituiscono la posizione variabile creata dalla miscelazione dei 2 oligonucleotidi.

5. Fare clic su  nella barra strumenti per salvare il dosaggio.

Protocollo 2: Configurazione del processo per il test di prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx

Punti importanti prima di iniziare

- Per ulteriori informazioni sulla creazione di una nuova configurazione di processo, consultare la *Guida al software per l'utente PyroMark Q24 MDx*.
- Si raccomanda di configurare i campioni in un pattern casuale nella PyroMark Q24 Plate (piastra PyroMark Q24). Un esempio di pattern casuale è fornito nella Tabella 1 e nella Tabella 2, le cui lettere si riferiscono alle miscele della Tabella 3 (vedere "Protocollo 3: Preparazione della serie di diluizioni PyroMark Q24 Validation Oligo"). Immettere % C come Sample ID (ID campione).
- Per ogni test occorre preparare due file di processo: uno per 0,5 picomoli e uno per 2 picomoli.

Procedura

- 1. Creare 2 configurazioni di processo per la determinazione della linearità importando i parametri del dosaggio nel numero appropriato di piastre e di pozzetti, come illustrato nella Tabella 1. Salvare i dosaggi come "Linearity_0.5picomol" e "Linearity_2picomol".**

Per aggiungere un dosaggio a un pozzetto, è possibile procedere in uno dei seguenti modi:

- Fare clic con il pulsante destro del mouse sul pozzetto e selezionare "Load Assay" (Carica dosaggio) dal menu contestuale.
- Selezionare il dosaggio nel browser dei collegamenti e fare clic e trascinare il dosaggio nel pozzetto.

Un pozzetto presenta la codifica colori corrispondente al dosaggio che vi è stato caricato.

 Per ulteriori informazioni sulla creazione di un file di configurazione dosaggio, consultare la *Guida al software per l'utente PyroMark Q24 MDx*.

Tabella 1. Configurazione della piastra per la determinazione della linearità

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A	C	–	F	B	E	–	G
B	D	G	C	D	F	B	C	D
C	A	F	E	A	B	E	–	G

2. Creare 2 configurazioni di processo per la determinazione di deviazione e ripetibilità importando i parametri del dosaggio nel numero appropriato di piastre e di pozzetti, come illustrato nella Tabella 1. Salvare i dosaggi come "BiasRepeatability_0.5picomol" e "BiasRepeatability_2picomol".

Tabella 2. Configurazione della piastra per la determinazione di deviazione e ripetibilità

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	C	A	B	B	C	C	A	B
B	A	C	A	B	B	C	A	B
C	C	A	B	A	C	B	C	A

3. Salvare le configurazioni di processo su una penna USB (fornita in dotazione con il sistema PyroMark Q24 MDx).
4. Stampare un elenco dei volumi richiesti di miscela enzimatica, miscela di substrato e nucleotidi e la configurazione della piastra per ogni configurazione di processo. Selezionare "Pre Run Information" (Informazioni pre-elaborazione) dal menu "Tools" (Strumenti) e, quando viene visualizzato il report, fare clic su .

Protocollo 3: Preparazione della serie di diluizioni PyroMark Q24 Validation Oligo

Punti importanti prima di iniziare

- Il pipettaggio accurato è fondamentale per ottenere miscele corrette. Il metodo descritto di seguito comporta la miscelazione consecutiva di uguali volumi di soluzione. In tal modo vengono ridotti gli errori di pipettaggio. È tuttavia importante utilizzare la stessa tecnica di pipettaggio per tutte le miscele, per garantire la dispensazione di volumi identici.
- Il tampone fornito con PyroMark Q24 Validation Oligo contiene un agente che elimina efficacemente l'assorbimento dei nucleotidi su superfici di plastica che potrebbero comprometterne le prestazioni. È importante che questo tampone sia utilizzato laddove specificato. Lo stesso PyroMark Q24 Validation Oligo viene conservato in questo tampone.

Procedura

- 1. Il tampone di diluizione fornito con PyroMark Q24 Validation Oligo deve essere diluito prima dell'uso. Preparare 1x di tampone di diluizione miscelando 600 μ l di 10x di tampone di diluizione con 5400 μ l di acqua altamente depurata.**

 Durante il pipettaggio, l'agente può causare la formazione di bolle.

- 2. Preparare 1,5 ml o 2 ml di provette idonee per microcentrifuga per la serie di diluizione. Etichettare le provette come segue:
A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1
A0.1, B0.1, C0.1, D0.1, E0.1, F0.1, G0.1
A0.025, B0.025, C0.025, D0.025, E0.025, F0.025, G0.025**
- 3. Pipettare 30 μ l di PyroMark Q24 Validation Oligo 5% (20 μ M) nella provetta contrassegnata "A1".**
- 4. Pipettare 30 μ l di PyroMark Q24 Validation Oligo 95% (20 μ M) nella provetta contrassegnata "B1".**
- 5. Aggiungere 570 μ l ciascuna di tampone di diluizione 1x (dal punto 1) alle provette "A1" e "B1" per generare soluzioni 1 μ M di ogni PyroMark Q24 Validation Oligo. Miscelare agitando in verticale.**

 Per garantire diluizioni analoghe, si raccomanda fortemente di pipettare le aliquote di 30 μ l e 570 μ l senza modificare le impostazioni sulla pipetta tra le miscele.

6. Preparare le soluzioni per le provette da "C1" a "G1" come illustrato nella Tabella 3.

Tabella 3. Preparazione delle miscele PyroMark Q24 Validation Oligo con diversi tenori di % C

Etichetta provetta	Miscelare insieme		Volume finale	%C
A1	–	–	600 µl	5%
B1	–	–	600 µl	95%
C1	200 µl A1	200 µl B1	400 µl	50%
D1	100 µl A1	100 µl C1	200 µl	27,5%
E1	100 µl A1	100 µl D1	200 µl	16,3%
F1	100 µl B1	100 µl C1	200 µl	72,5%
G1	100 µl B1	100 µl F1	200 µl	83,8%

7. Preparare le soluzioni per le provette da "A0.1" a "G0.1" diluendo ogni soluzione da "A1" a "G1" a 0,1 µM come illustrato nella Tabella 4.

Tabella 4. Diluizione delle miscele di PyroMark Q24 Validation Oligo per provette da "A0.1" a "G0.1"

Componente	Volume	Concentrazione
Soluzioni da "A1" a "G1" (dal punto 6)	30 µl	1 µM
Tampone di diluizione 1x*	270 µl	–
Soluzioni da "A0.1" a "G0.1"	300 µl	0,1 µM

* Verificare che il tampone di diluizione 10x fornito con PyroMark Q24 Validation Oligo venga diluito con acqua altamente depurata prima dell'uso. Vedere punto 1.

8. Preparare le soluzioni per le provette da "A0.025" a "G0.025" eseguendo una seconda diluizione di ogni soluzione da "A0.1" a "G0.1" a 0,025 μM come illustrato nella Tabella 5.

Tabella 5. Diluizione delle miscele di PyroMark Q24 Validation Oligo per provette da "A0.025" a "G0.025"

Componente	Volume	Concentrazione
Soluzioni da "A0.1" a "G0.1" (dal punto 7)	60 μl	0,1 μM
Tampone di diluizione 1x*	180 μl	–
Soluzioni da "A0.025" a "G0.025"	240 μl	0,025 μM

* Verificare che il tampone di diluizione 10x fornito con PyroMark Q24 Validation Oligo venga diluito con acqua altamente depurata prima dell'uso. Vedere punto 1.

 I volumi residui di PyroMark Q24 Validation Oligo nelle provette da "A1" a "G1" possono essere conservati a -20°C per 1 mese al massimo. Evitare scongelamenti e congelamenti ripetuti (>4 x).

Protocollo 4: Determinazione di linearità, deviazione e ripetibilità

Prima di iniziare

- Seguire le istruzioni riportate nel *Manuale utente PyroMark Q24* per installare il sistema PyroMark Q24 MDx,
- Collocare 4 PyroMark Q24 Plate Holder (portapiastre PyroMark Q24) su un blocco riscaldante a 80°C per utilizzarli al punto 26.
- Tutti i reagenti e le soluzioni richiesti devono raggiungere la temperatura ambiente (15–25°C) prima di iniziare.
- Etichettare le 4 piastre PyroMark Q24 come segue:
Piastra 1, Piastra 2, Piastra 3, Piastra 4

Procedura

1. **Agitare delicatamente il flacone contenente Streptavidin Sepharose High Performance fino ad ottenere una soluzione omogenea.**
2. **Preparare una miscela master per l'immobilizzazione del DNA conformemente alla Tabella 6. Preparare un volume di almeno il 10% superiore al valore richiesto per il numero totale di reazioni da eseguire.**

Questo protocollo richiede $4 \times 24 = 96$ reazioni.

Tabella 6. Miscela master per immobilizzazione del DNA

Numero di campioni	1	110*
Streptavidin Sepharose High Performance	12 μ l	220 μ l
Tampone di legame PyroMark	40 μ l	4,4 ml
Acqua altamente depurata.	18 μ l	1,98 ml
Volume totale	60 μl	6,60 ml

* Fornisce una quantità sufficiente per $4 \times 24 = 96$ campioni richiesti.

3. **Aggiungere 60 μ l di miscela master a tutti i 24 pozzetti delle quattro piastre per PCR. Etichettare le piastre come segue.**
Piastra 1, Piastra 2, Piastra 3, Piastra 4
4. **Piastra 1: Pipettare 20 μ l di ogni miscela PyroMark Q24 Validation Oligo 0,025 μ M (provette da "A0.025" a "G0.025" da "Protocollo 3:**

Preparazione della serie di diluizioni PyroMark Q24 Validation Oligo") in triplicati sulla "Piastra 1" rispettando lo stesso pattern della configurazione del processo per "Linearity_0.5picomol" (vedere il report delle informazioni pre-elaborazione da "Protocollo 2: Configurazione del processo per il test di prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx").

i I 3 pozzetti residui possono essere usati come controlli negativi. Aggiungere 20 μ l di tampone di diluizione 1x anziché oligonucleotidi.

i Il volume totale per pozzetto dovrebbe essere 80 μ l dopo l'aggiunta delle miscele PyroMark Q24 Validation Oligo.

- 5. Piastra 2: Pipettare 20 μ l di ogni miscela PyroMark Q24 Validation Oligo 0,1 μ M (provette da "A0.01" a "G0.1" da "Protocollo 3: Preparazione della serie di diluizioni PyroMark Q24 Validation Oligo") in triplicati sulla "Piastra 2" rispettando lo stesso pattern della configurazione del processo per "Linearity_2picomol" (vedere il report di informazioni pre-elaborazione da "Protocollo 2: Configurazione del processo per il test di prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx").**

i I 3 pozzetti residui possono essere utilizzati come controlli negativi. Aggiungere 20 μ l di tampone di diluizione 1x anziché oligonucleotidi.

i Il volume totale per pozzetto dovrebbe essere 80 μ l dopo l'aggiunta delle miscele PyroMark Q24 Validation Oligo.

- 6. Piastra 3: Pipettare 20 μ l delle prime 3 miscele PyroMark Q24 Validation Oligo 0,025 μ M (provette da "A0.025" a "C0.025" da "Protocollo 3: Preparazione della serie di diluizioni PyroMark Q24 Validation Oligo") in replicati di otto sulla "Piastra 3" rispettando lo stesso pattern della configurazione del processo per "BiasRepeatability_0.5picomol" (vedere il report di informazioni pre-elaborazione da "Protocollo 2: Configurazione del processo per il test di prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx").**

i Il volume totale per pozzetto dovrebbe essere 80 μ l dopo l'aggiunta delle miscele PyroMark Q24 Validation Oligo.

- 7. Piastra 4: Pipettare 20 μ l delle prime 3 miscele PyroMark Q24 Validation Oligo 0,1 μ M (provette da "A0.1" a "C0.1" da "Protocollo 3: Preparazione della serie di diluizioni PyroMark Q24 Validation Oligo") in replicati di otto sulla "Piastra 4" rispettando lo stesso pattern della configurazione del processo per "BiasRepeatability_2picomol" (vedere il report di informazioni pre-**

elaborazione da “Protocollo 2: Configurazione del processo per il test di prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx”).

i Il volume totale per pozzetto dovrebbe essere 80 μ l dopo l’aggiunta delle miscele PyroMark Q24 Validation Oligo.

- 8. Sigillare le piastre PCR (dalla “Piastra 1” alla “Piastra 4”) usando i tappi delle strisce.**
- 9. Agitare la “Piastra 1” a temperatura ambiente (15–25°C) per 5 min a 1400 giri/min.**

I grani Sepharose sedimentano rapidamente. Se dall’agitazione della piastra è trascorso oltre 1 minuto, agitare nuovamente per 1 minuto prima di catturare i grani.

i Durante questa fase, preparare la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx per la preparazione dei campioni (vedere Appendice A, pagina 35).

- 10. Aggiungere 25 μ l di tampone di annealing PyroMark ad ogni pozzetto della Piastra 1 PyroMark Q24.**

i Tenere uno dei portapiastre PyroMark Q24 (forniti in dotazione con la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx) a temperatura ambiente (15–25°C), e usarla come supporto durante la preparazione e lo spostamento della piastra.

i Poiché gli oligonucleotidi sono a innesco automatico, non è richiesto alcun primer di sequenziamento. I grani sono rilasciati nel tampone di annealing PyroMark.

- 11. Collocare la “Piastra 1” PCR e una piastra PyroMark Q24 sul piano di lavoro della stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx (vedere Figura 3).**

i Verificare che la piastra abbia lo stesso orientamento adottato durante il caricamento dei campioni.

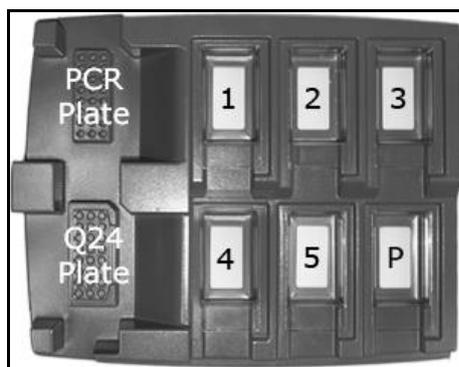


Figura 3. Posizionamento della piastra PCR e della piastra PyroMark Q24 sulla stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx. Le posizioni marcate contengono etanolo al 70% (1), soluzione di denaturazione PyroMark (2), tampone di lavaggio PyroMark (3), e acqua altamente depurata (4, 5). P: Posizione di sosta.

- 12. Applicare il vuoto al Vacuum prep tool (strumento preparazione vuoto) aprendo l'interruttore di vuoto.**
- 13. Abbassare attentamente le sonde del filtro nella piastra per PCR per catturare i grani contenenti lo stampo immobilizzato. Tenere le sonde del filtro in posizione per 15 s. Restare attenzione durante il prelievo dello strumento.**
 Nota: i grani Sepharose sedimentano rapidamente. Se dall'agitazione della piastra è trascorso oltre 1 minuto, agitare nuovamente per 1 minuto prima di catturare i grani.
- 14. Trasferire lo strumento nel recipiente contenente etanolo 70% (recipiente 1). Sciacquare le sonde del filtro per 5 s.**
- 15. Trasferire lo strumento nel recipiente contenente la Soluzione di Denaturazione PyroMark (Recipiente 2). Sciacquare le sonde del filtro per 2 s.**
- 16. Trasferire lo strumento nel recipiente contenente Tampone di Lavaggio PyroMark (recipiente 3). Sciacquare le sonde del filtro per 10 s.**
- 17. Sollevare lo strumento verso l'alto e all'indietro oltre 90° in verticale per 5 s, per drenare il liquido dalle sonde del filtro (vedere Figura 4).**



Figura 4. Illustrazione dello strumento di vuoto sollevato oltre i 90° in verticale.

18. Tenendo al contempo lo strumento sopra la piastra PyroMark Q24, chiudere l'interruttore di vuoto sullo strumento (Off).
19. Rilasciare i grani nella piastra contenente 25 μ l di tampone di annealing PyroMark agitando lo strumento da un lato all'altro. Lasciare riposare le sonde del filtro sul fondo dei pozzetti.
20. Trasferire lo strumento nel primo recipiente contenente acqua altamente depurata (recipiente 4) e agitare lo strumento per 10 s.
21. Lavare le sonde del filtro abbassandole nel secondo recipiente di acqua altamente depurata (recipiente 5) e applicando il vuoto. Sciacquare le sonde con 70 ml di acqua altamente depurata.
22. Sollevare lo strumento verso l'alto e all'indietro oltre 90° in verticale per 5 s, per drenare il liquido dalle sonde del filtro (vedere Figura 4).
23. Chiudere l'interruttore di vuoto sullo strumento (Off) e impostarlo in posizione di sosta (P).
24. Ripetere i punti 9–23 per le restanti piastre PCR ("Piastra 2", "Piastra 3", "Piastra 4").
25. Spegnerne la pompa del vuoto.

i Al termine di una giornata di lavoro, smaltire il materiale di scarto liquido e il residuo di soluzioni, e verificare che la PyroMark Vacuum Workstation Q24 MDx (stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx) sia priva di polvere e non presenti perdite, vedere Appendice B, pagina 37.
26. Riscaldare la piastra PyroMark Q24 contenente i campioni a 80°C per 2 min usando un blocco riscaldante e i portapiastre PyroMark Q24 preriscaldati.
27. Rimuovere le piastre PyroMark Q24 dai portapiastre e lasciare raffreddare i campioni a temperatura ambiente (15-25°C) per almeno 5 min.
28. Caricare una cartuccia PyroMark Q24 con i volumi appropriati di Reagenti PyroMark Gold Q24, come indicato nel Pre Run Information report (Report informazioni pre-elaborazione) per

“Linearity_0.5picomol” da “Protocollo 2: Configurazione del processo per il test di prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx”.

Il report “Pre Run information” (reperibile nel menu “Tools” al momento della configurazione del processo (vedere *Guida al software per l’utente PyroMark Q24 MDx*, fornisce informazioni sul volume di nucleotidi, miscela enzimatica e miscela di substrato necessari per il dosaggio.

- 29. Aprire lo sportellino della cartuccia e inserire la cartuccia PyroMark Q 24 caricata con l’etichetta rivolta verso l’esterno. Spingere la cartuccia completamente verso l’interno e poi verso il basso.**
- 30. Verificare che la linea sia visibile sul lato anteriore della cartuccia e chiudere lo sportellino.**
- 31. Aprire il telaio portapietra e posizionare la piastra PyroMark Q24 (“Piastra 1”) sul blocco riscaldante.**
- 32. Chiudere il telaio portapietra e il coperchio dello strumento.**
- 33. Inserire la penna USB (contenente il file di processo) nella porta USB sul lato anteriore dello strumento.**
 -  Non rimuovere la penna USB prima della fine del processo.
- 34. Selezionare “Run” (Esegui) nel menu principale (utilizzando i pulsanti ▲ e ▼) e premere “OK”.**
- 35. Selezionare il file di processo “Linearity_0.5picomol” utilizzando i pulsanti dello schermo ▲ e ▼.**
 -  Per visualizzare il contenuto di una cartella, selezionare la cartella e premere “Select” (Seleziona). Per tornare alla vista precedente, premere “Back” (Indietro).
- 36. Una volta selezionato il file da elaborare, premere “Select” (Seleziona) per avviare il processo.**
- 37. Al termine del processo e quando lo strumento conferma che il file è stato salvato sulla penna USB, premere “Close” (Chiudi).**
- 38. Aprire il coperchio dello strumento.**
- 39. Aprire lo sportellino della cartuccia e rimuovere la cartuccia PyroMark Q24 sollevandola e contemporaneamente tirando verso l’esterno.**
- 40. Chiudere lo sportellino.**
- 41. Aprire il telaio portapietra e rimuovere la piastra PyroMark Q24 dal blocco riscaldante.**
- 42. Chiudere il telaio portapietra e il coperchio dello strumento.**
- 43. Pulire la cartuccia PyroMark Q24 (vedere il *Manuale Reagenti PyroMark Gold Q24*).**

- 44. Caricare la cartuccia PyroMark Q24 con i volumi appropriati di Reagenti PyroMark Gold Q24, come indicato nel Pre Run Information report (report Informazioni pre-elaborazione) per “Linearity_2picomol” da “Protocollo 2: Configurazione del processo per il test di prestazioni del sistema PyroMark Q24 MDx”.**

Il report “Pre Run information” (reperibile nel menu “Tools”) al momento della configurazione del processo (vedere *Guida al software per l’utente PyroMark Q24 MDx*), fornisce informazioni sul volume di nucleotidi, miscela enzimatica e miscela di substrato necessari per il dosaggio.

- 45. Aprire lo sportellino della cartuccia e inserire la cartuccia PyroMark Q 24 caricata con l’etichetta rivolta verso l’esterno. Spingere la cartuccia completamente verso l’interno e poi verso il basso.**
- 46. Verificare che la linea sia visibile sul lato anteriore della cartuccia e chiudere lo sportellino.**
- 47. Aprire il telaio portapietra e posizionare la piastra PyroMark Q24 (“Piastra 2”) sul blocco riscaldante.**
- 48. Chiudere il telaio portapietra e il coperchio dello strumento.**
- 49. Inserire la penna USB (contenente il file di processo) nella porta USB sul lato anteriore dello strumento.**



Non rimuovere la penna USB prima della fine del processo.

- 50. Selezionare “Run” nel menu principale (utilizzando i pulsanti ▲ e ▼) e premere “OK”.**
- 51. Selezionare il file di processo “Linearity_2picomol” utilizzando i pulsanti dello schermo ▲ e ▼.**



Per visualizzare il contenuto di una cartella, selezionare una cartella e premere “Select” (Seleziona). Per tornare alla vista precedente, premere “Back” (Indietro).

- 52. Una volta selezionato il file di processo, premere “Select” (Seleziona) per avviare il processo.**
- 53. Al termine del processo e quando lo strumento conferma che il file è stato salvato sulla penna USB, premere “Close” (Chiudi).**
- 54. Ripetere i punti 38–53 per le restanti Piastre PyroMark Q24 (“Piastra 3”, “Piastra 4”).**



Per la “Piastra 3”, usare il file di processo salvato con nome “BiasRepeatability_0.5picomol”.



Per la “Piastra 4”, usare il file di processo salvato con nome “BiasRepeatability_2picomol”.

- 55. Rimuovere la penna USB.**

56. Eliminare le Piastre PyroMark Q24 e pulire la cartuccia PyroMark Q24 (vedere il *Manuale Reagenti PyroMark Gold Q24*).

Protocollo 5: Analisi della linearità



La linearità del dosaggio può essere testata a 2 livelli:

- in conformità alle linee guida dell'istituto delle norme di laboratorio clinico EP6-A⁹, come raccomandato dalla norma EN-13612¹⁰, e utilizzando il software convalidato, oppure
- mediante semplice analisi della regressione lineare.

Prestazioni conclamate per entrambe le modalità CpG e AQ conformemente a EP6-A

Per 0,5–2 picomoli di PyroMark Q24 Validation Oligo utilizzando il metodo descritto nel presente, è stato dimostrato che il metodo è lineare dal 5% al 95% C entro una non linearità ammessa del 3 % di unità in questo intervallo.

Linearità conformemente a CLSI EP6-A (secondo IVD)

Questo metodo implica equazioni lineari e polinomiali dei dati. Il metodo quindi determina se il fit dell'equazione polinomiale è significativamente migliore rispetto a quello dell'equazione lineare, nel qual caso i dati sono non lineari. Tuttavia, possono essere impostati limiti di accettazione tali da soddisfare i requisiti pratici del dosaggio. Questi sono inclusi nell'analisi dei dati al fine di determinare se l'eventuale non linearità rilevata sia accettabile.

Sul mercato sono disponibili numerosi prodotti software in grado di analizzare i dati conformemente a EP6-A¹⁰. Il software di analisi può essere convalidato utilizzando, per esempio, set di dati del National Institute of Standards and Technology, USA (www.nist.gov).

Procedura

- 1. Aprire i file di processo di "Linearity_0.5picomol" e "Linearity_2picomol" nel software PyroMark Q24 MDx e analizzare tutti i pozzetti.**



Tutti i pozzetti tranne i controlli negativi devono ottenere una valutazione di qualità "Passed" (Superata), indicata da una barra blu nel campo inferiore del pozzetto e da una %C riportata all'interno di un rettangolo blu nella stampa di Pyrogram[®].

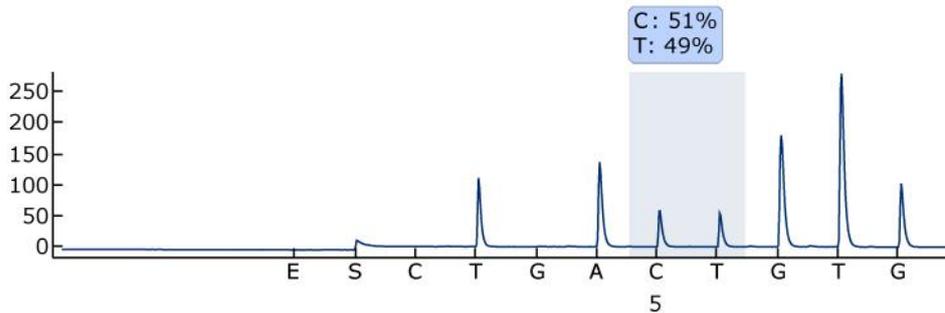


Figura 5. Esempio del risultato di un dosaggio AQ ricavato da una miscela al 50% (provetta "C0.1").

2. Determinare le altezze dei singoli picchi.

i Teoricamente, i picchi devono essere compresi tra 30 ± 10 RLU per campioni con 0,5 picomoli di stampo e superiori a 120 ± 40 RLU per campioni con 2 picomoli di stampo.

i Per ottenere i valori dell'altezza dei picchi, selezionare "Export Peak Heights" (Esporta altezze picchi) dal menu "Tools". Salvare i dati in un formato appropriato (*.csv o *.tsv). Aprire questo file in Microsoft® Excel (Delimitato), e calcolare il valore medio dell'altezza di un singolo picco e del fondo per ogni pozzetto, come descritto di seguito.

3. Selezionare "AQ/CpG Analysis Results" (Risultati analisi AQ/CpG) dal menu "Report" per aprire il report del risultato di analisi.

4. Salvare i dati in un formato appropriato (*.csv o *.tsv).

5. Aprire il file di dati nel software di analisi.

6. Preparare una tabella con i valori attesi ed effettivi.

Un esempio è riportato nella Tabella 7 a pagina 27.

7. Analizzare la linearità secondo le istruzioni del software.

Un esempio dell'analisi della linearità è riportato nella Figura 6 a pagina 28.

Tabella 7. Valori % C attesi ed effettivi

Etichetta provetta	Campione	% C attesa	% C effettiva*
A	1	5	6,22
	2	5	6,17
	3	5	5,06
E	1	16,3	18,20
	2	16,3	17,90
	3	16,3	18,12
D	1	27,5	31,2
	2	27,5	29,89
	3	27,5	29,89
C	1	50	51,88
	2	50	52,62
	3	50	52,27
F	1	72,5	74,76
	2	72,5	74,66
	3	72,5	75,31
G	1	83,8	85,28
	2	83,8	85,53
	3	83,8	85,68
B	1	95	95,30
	2	95	95,40
	3	95	95,73

* Questi valori sono forniti unicamente a titolo esemplificativo. I valori effettivi devono essere determinati.

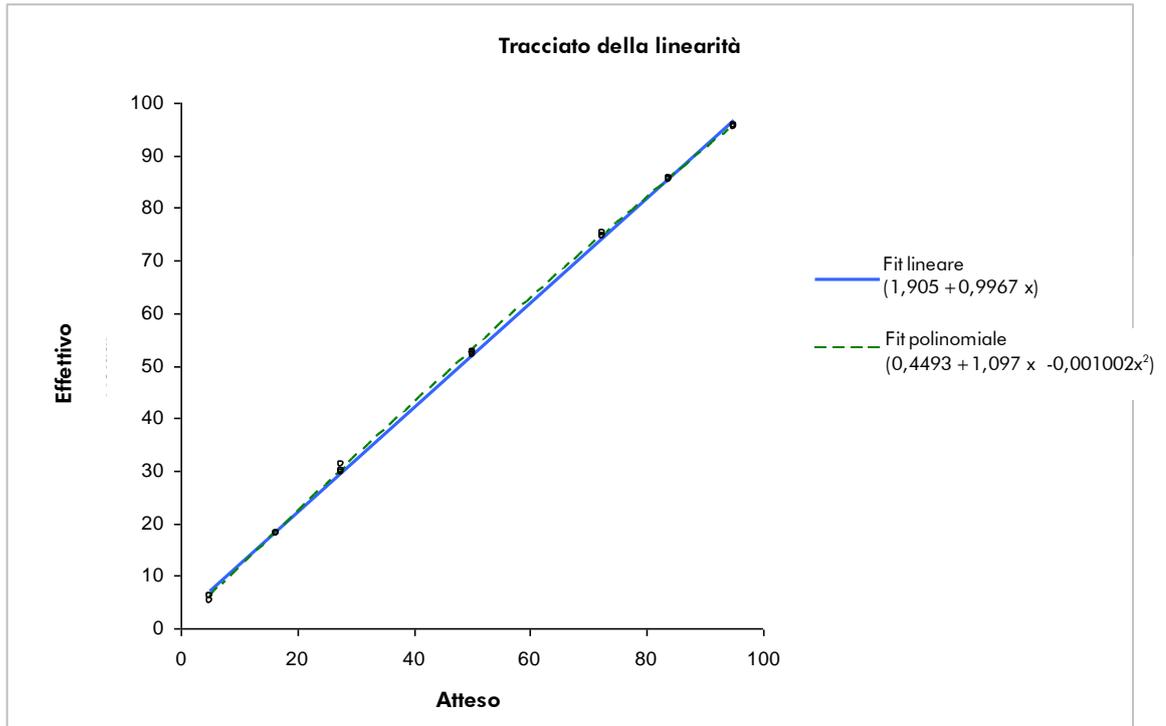
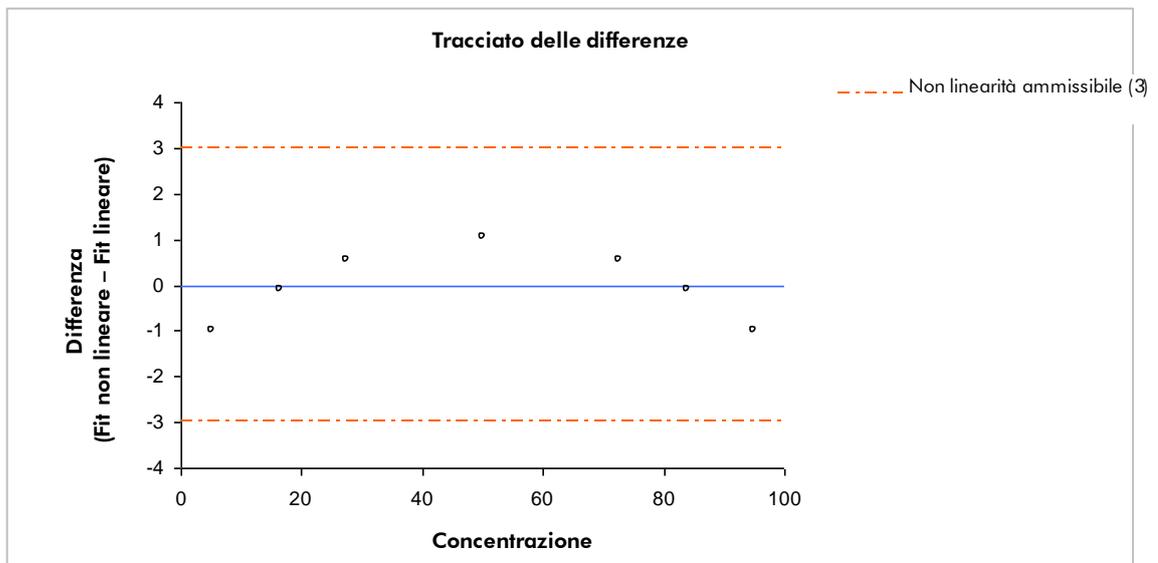
A**B**

Figura 6. Esempio di analisi della linearità. **A.** Rappresentazione grafica del fit lineare e del fit polinomiale. Il fit polinomiale è statisticamente significativo. **B.** Il tracciato della differenza illustra che i dati rientrano ampiamente nel limite di 3 unità percentuali di non linearità ammesso

Protocollo 6: Analisi di deviazione e ripetibilità

Prestazioni conclamate per entrambe le modalità CpG e AQ

Per 0,5–2 picomoli di PyroMark Q24 Validation Oligo utilizzando il metodo descritto nel presente, il metodo ha dimostrato di fornire le seguenti prestazioni.

- Ripetibilità, misurata come deviazione standard per 8 replicati, superiore a 3 unità percentuali nell'intervallo da 5 % C a 95 % C
- Deviazione inferiore a 5 unità percentuali per una media di 8 replicati in un intervallo da 5 % C a 95 % C.

Le miscele "A", "B" e "C" con 5 % C, 95 % C e 50 % C rispettivamente, sono usate per determinare ripetibilità, deviazione, e precisione intermedia.

Procedura

1. Aprire i file di processo di "BiasRepeatability_0.5picomol" e "BiasRepeatability_2picomol" nel software PyroMark Q24 MDx e analizzare tutti i pozzetti.

i Tutti i pozzetti tranne i controlli negativi devono ottenere una valutazione di qualità "Passed" (Superata), indicata da una barra blu nel campo inferiore del pozzetto e da una %C riportata all'interno di un rettangolo blu nella stampa di Pyrogram.

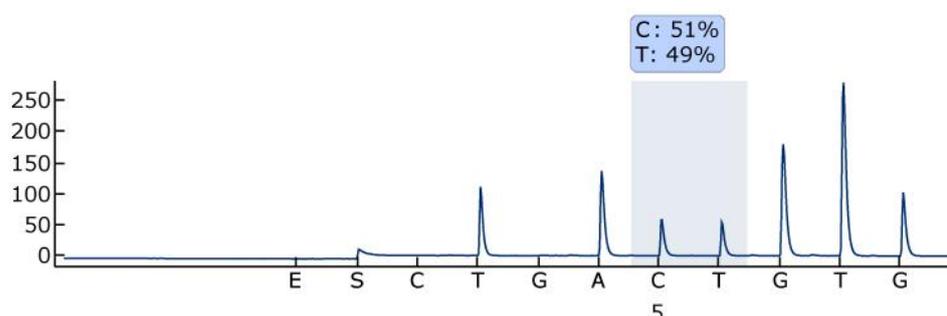


Figura 7. Esempio del risultato di un dosaggio AQ ricavato da una miscela al 50% (provetta "C0.1").

2. Determinare le altezze dei singoli picchi.

i Teoricamente, i picchi devono essere compresi tra 30 ± 10 RLU per campioni con 0,5 picomoli di stampo e superiori a 120 ± 40 RLU per campioni con 2 picomoli di stampo.

i Per ottenere i valori di altezza dei picchi, selezionare "Export Peak Heights" dal menu "Tools" menu. Salvare i dati in un formato appropriato (*.csv o *.tsv). Aprire questo file in Microsoft Excel (Delimitato), e calcolare il

valore medio dell'altezza di un singolo picco e del fondo per ogni pozzetto, come descritto di seguito.

3. Selezionare "AQ/CpG Analysis Results" dal menu "Report" per aprire il report del risultato di analisi.

4. Salvare i dati in un formato appropriato (*.csv o *.tsv).

5. Aprire il file di dati nel software di analisi.

6. Preparare una tabella con i valori attesi ed effettivi.

Un esempio è riportato nella Tabella 8 a pagina 27.

7. I dati ottenuti dall'analisi devono essere analizzati dal software statistico convalidato. Viene calcolata la deviazione media e standard per ogni miscela, sulla base degli 8 replicati.

Un esempio dei dati è riportato nella Tabella 8.

Tabella 8. Risultati della determinazione di deviazione e ripetibilità

% C attesa	% C effettiva*	Prestazioni	
		Deviazione standard*	Deviazione*
5	5,2	0,2	0,2
50	52,7	0,7	2,7
95	95,2	0,5	0,2

* Questi valori sono forniti unicamente a titolo esemplificativo. I valori effettivi devono essere determinati.

8. Test per la precisione intermedia.

La precisione intermedia può essere testata usando le stesse miscele in combinazione con il livello di variazione desiderato in funzione di operatore, strumento e altri reagenti.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre lieti di rispondere a qualsiasi domanda possiate avere, per quanto riguarda le informazioni ed i protocolli presenti in questo manuale, oppure le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti, vedere sul retro oppure visitare il sito www.qiagen.com).

 Per la risoluzione di problemi generici con lo strumento, consultare il *Manuale utente PyroMark Q24 MDx*.

Commenti e suggerimenti

Sequenza scarsa o difettosa

- | | |
|---|--|
| a) PyroMark Q24 Validation Oligo non è stato preparato correttamente |  Seguire le istruzioni nei protocolli per la preparazione di PyroMark Q24 Validation Oligo. Assicurarsi di diluire PyroMark Q24 Validation Oligo nel tampone di diluizione come descritto nei protocolli. Verificare che il buffer di diluizione 10x fornito sia prima diluito a 1x utilizzando acqua altamente depurata. |
| b) Sequenza da analizzare o ordine di dispensazione errati |  Verificare che nella configurazione del dosaggio sia stata immessa la sequenza corretta. |
| c) Tamponi o reagenti diluiti o conservati in modo errato |  Seguire le istruzioni fornite con i reagenti. Includere nel processo un pozzetto vuoto (contenente solo tampone di Annealing PyroMark) per verificare se i picchi di fondo provengono dai nucleotidi. |
| d) Errore di dispensazione (rappresentato, per esempio, da picchi divisi) |  Pulire o sostituire la cartuccia PyroMark Q24. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica QIAGEN (per informazioni sui contatti, vedere il retro della copertina o visitare il sito www.qiagen.com). |

Commenti e suggerimenti

- e) Cartuccia PyroMark Q24 ostruita
- f) Cartuccia PyroMark Q24 danneggiata
- g) Tempo di annealing eccessivo
- i** I nucleotidi non vengono dispensati correttamente a causa di un ago otturato nella cartuccia PyroMark Q24. Pulire la cartuccia PyroMark Q24 e verificare che funzioni debitamente.
- i** Smaltire la cartuccia PyroMark Q24 nel rispetto delle leggi federali, statali e locali che disciplinano lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.
- i** Eseguire l'annealing per l'intervallo di tempo corretto e alle temperature descritte nei protocolli.

Picchi piccoli o assenti

- a) Quantità di stampo insufficiente per l'immobilizzazione
- b) Miscela enzimatica o di substrato insufficiente per tutti i pozzetti
- c) I pozzetti riportati nella configurazione del processo non corrispondono al posizionamento del campione nella piastra
- d) Uno o più vani dei nucleotidi della cartuccia PyroMark Q24 non erano stati caricati correttamente con reagenti o nucleotidi.
- e) Errore di dispensazione (rappresentato, per esempio, da picchi divisi)
- i** Assicurarsi di diluire PyroMark Q24 Validation Oligo correttamente e usare le quantità specificate nei protocolli.
- i** Caricare la cartuccia PyroMark Q24 in base alle istruzioni del report Pre Run Information.
- i** Assicurarsi di aver caricato la piastra PyroMark Q24 correttamente, secondo quanto indicato nella configurazione di processo.
- i** Verificare che alla cartuccia PyroMark Q24 siano aggiunti reagenti sufficienti. Seguire le istruzioni per l'uso fornite con i prodotti.
- i** Pulire o sostituire la cartuccia PyroMark Q24. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica QIAGEN (per informazioni sui contatti, vedere il retro della copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

- f) Cartuccia PyroMark Q24 ostruita
- ① Nucleotidi non dispensati correttamente a causa di un ago otturato nella cartuccia PyroMark Q24. Pulire la cartuccia PyroMark Q24 e verificare che funzioni debitamente.
 - ① Gli enzimi o i substrati non sono dispensati correttamente a causa di una cartuccia PyroMark Q24 ostruita (come indicato da un segnale di presequenziamento mancante e dall'assenza di picchi in Pyrogram). Pulire la cartuccia PyroMark Q24 e verificare che funzioni correttamente.
- g) Cartuccia PyroMark Q24 danneggiata
- ① Smaltire la cartuccia PyroMark Q24 nel rispetto delle leggi federali, statali e locali che disciplinano lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.
- h) Tamponi o reagenti diluiti o conservati in modo errato
- ① Seguire le istruzioni fornite con i reagenti.
- i) PyroMark Q24 Validation Oligo non è stato preparato correttamente
- ① Seguire le istruzioni nei protocolli per la preparazione di PyroMark Q24 Validation Oligo. Assicurarsi di diluire PyroMark Q24 Validation Oligo nel buffer di diluizione come descritto nei protocolli. Verificare che il buffer di diluizione 10x fornito sia prima diluito a 1x utilizzando acqua altamente depurata.
- j) Un campione contaminato determina un consumo di miscela di substrato insolitamente alto (indicato da un segnale di presequenziamento alto)
- ① Cambiare tamponi. Usare unicamente tamponi forniti da QIAGEN o da distributori autorizzati QIAGEN.
 - ① Usare la funzione di ingrandimento per verificare la generazione di eventuali picchi (selezionare un tratto di Pirogramma con il pulsante sinistro del mouse).

Commenti e suggerimenti

Picchi molto alti

PyroMark Q24 Validation Oligo non è stato preparato correttamente

 Seguire le istruzioni nei protocolli per la preparazione di PyroMark Q24 Validation Oligo. Assicurarsi di diluire PyroMark Q24 Validation Oligo nel buffer di diluizione come descritto nei protocolli. Verificare che il buffer di diluizione 10x fornito sia prima diluito a 1x utilizzando acqua altamente depurata.

Linearità scarsa

Errori di pipettaggio

 Assicurarsi di seguire attentamente le istruzioni per diluire PyroMark Q24 Validation Oligo in "Protocollo 3: Preparazione della serie di diluizioni PyroMark Q24 Validation Oligo". Per garantire diluizioni paragonabili, si raccomanda fortemente di pipettare aliquote dello stesso volume senza modificare le impostazioni sulla pipetta tra le miscele.

Pendenza invertita nel test della linearità

Miscele 5% e 95% C invertite

 Assicurarsi di etichettare le provette chiaramente e di non confonderle durante la diluizione di PyroMark Q24 Validation Oligo.

Appendice A: Preparazione della stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx

Questo protocollo descrive come preparare la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx prima di utilizzarla per la preparazione di DNA a filamento singolo.

Procedura

1. **Caricare 5 recipienti separati (forniti con la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx) nel seguente modo:**
 - Circa 50 ml di etanolo (70%) (1)
 - Circa 40 ml di soluzione di Denaturazione PyroMark (2)
 - Circa 50 ml di tampone di Lavaggio PyroMark (3)
 - Circa 50 ml di acqua altamente depurata (4)
 - Circa 70 ml di acqua altamente depurata (5)

Una configurazione consigliata è riportata nella Figura 8. Ricaricare i recipienti a questi livelli ogni qualvolta sia necessario.

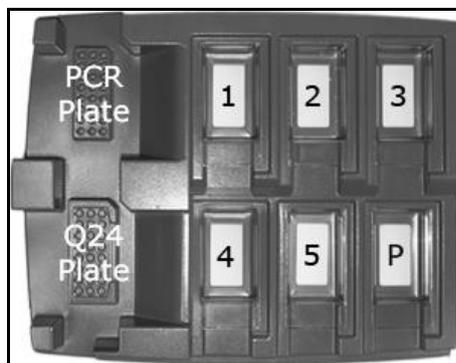


Figura 8. Posizioni sulla stazione di Lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx

2. **Accendere la pompa per il vuoto.**
3. **Applicare il vuoto allo strumento aprendo l'interruttore di vuoto.**
4. **Lavare le sonde del filtro abbassandole nell'acqua altamente depurata (recipiente 5). Sciacquare le sonde con 70 ml di acqua altamente depurata. Verificare che l'acqua sia trasferita nel contenitore del materiale di scarto. In caso contrario, verificare che la tubazione sia collegata correttamente e non sia rotta. Vedere "Sostituzione della tubazione" nel *Manuale utente PyroMark Q24*.**
5. **Verificare che il filtro del materiale di scarto sia asciutto. Se il filtro è bagnato, deve essere sostituito, vedere "Sostituzione del filtro del materiale di scarto" nel *Manuale utente PyroMark Q24*.**
6. **Ricaricare il recipiente 5 con 70 ml di acqua altamente depurata.**

7. **Chiudere l'interruttore di vuoto sullo strumento (Off) e impostarlo in posizione di sosta (P).**

Appendice B: Svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti

AVVERTENZA 	Agenti chimici pericolosi <p>La soluzione di Denaturazione PyroMark utilizzata con la stazione di Lavoro per il Vuoto PyroMark Q24 MDx contiene idrossido di sodio, che è irritante per occhi e cute. Indossare sempre occhiali protettivi, guanti e un camice da laboratorio. L'ente responsabile (per esempio il responsabile di laboratorio) deve prendere tutte le precauzioni necessarie per garantire che l'area circostante il luogo di lavoro sia sicura e che gli operatori non siano esposti a livelli pericolosi di sostanze tossiche (chimiche o biologiche), come definito nelle schede tecniche sulla sicurezza dei materiali (MSDs) o nei documenti OSHA,* ACGIH,[†] o COSHH[‡] applicabili. Lo sfiato dei fumi e lo smaltimento dei rifiuti devono avvenire nel rispetto di tutti i regolamenti e le leggi su salute e sicurezza vigenti a livello nazionale, statale e locale.</p>
--	---

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

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

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

Verificare di osservare tutte le norme ambientali in vigore a livello federale, statale e locale per lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

È richiesto il seguente articolo:

- Acqua altamente depurata (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, o equivalente).

Procedura

- 1. Verificare che non venga applicato il vuoto al Vacuum prep tool (strumento di preparazione vuoto), vale a dire controllare che l'interruttore di vuoto sia chiuso (Off), e che la pompa per il vuoto sia spenta.**
- 2. Smaltire eventuali residui di soluzione nei recipienti.**
- 3. Risciacquare i recipienti con acqua altamente depurata o, se necessario, sostituirli.**
- 4. Svotare il contenitore del materiale di scarto.**



Nota: il tappo può essere rimosso senza scollegare la tubazione.

5. **Se occorre pulire la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx (per esempio da polvere o fuoriuscita di liquidi), seguire le istruzioni riportate al paragrafo "Pulizia della stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx" nel *Manuale utente PyroMark Q24*.**

Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia per parole chiave sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo, ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitate il QIAGEN Reference Database online all'indirizzo www.qiagen.com/RefDB/search.asp o contattate il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Riferimenti citati

1. UNI-ISO 5725-1 Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione - Parte 1: Principi generali e definizioni.
2. White, H.E., Durston, V.J., Harvey, J.F., and Cross, N.C. (2006) Clin. Chem. **52**, 1005.
3. Tost, J., Dunker, J., and Gut, I.G. (2003) Biotechniques **35**, 152.
4. Colella, S., Shen, L., Baggerly, K.A., Issa, J.P., and Krahe, R. (2003) Biotechniques **35**, 146.
5. Uhlmann, K., Brinckmann, A., Toliat, M.R., Ritter, H., and Nürnberg, P. (2002) Electrophoresis **23**, 4072.
6. Neve, B., Frougel, P., Corset, L., Vaillant, E., Vatin, V., and Boutin, P. (2002) Biotechniques **32**, 1138.
7. Wasson, J., Skolnick, G., Iove-Gregory, L., and Permutt, M.A. (2002) Biotechniques **32**, 1144.
8. Gruber, J.D., Colligan, P.B., and Wolford, J.K. (2002) Hum. Genet. **110**, 395.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute document EP6-A: Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline.
10. EN 13612: Valutazione delle prestazioni dei dispositivi medico-diagnostici in vitro, Comitato Europeo di Normazione

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
PyroMark Q24 Validation Oligo	Per il controllo delle prestazioni del sistema	979304
Accessori		
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Per 5 x 24 campioni da utilizzare su PyroMark Q24 MDx: miscela enzimatica, miscela di substrato e nucleotidi	971802
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Per l'annealing del primer di sequenziamento in prodotto PCR a filamento singolo e per la reazione di pirosequenziamento	979309
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Per legare il prodotto PCR biotinilato su grani Sepharose	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Per la denaturazione del prodotto PCR a filamento doppio in un DNA stampo a filamento singolo	979307
PyroMark Wash Buffer, concentrate (200 ml)	Per il lavaggio di DNA a filamento singolo	979308
PyroMark Q24 Plate (100)	Piastra per reazione di sequenziamento a 24 pozzetti	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartucce per la dispensazione di nucleotidi e reagenti	979302
Prodotti correlati		
PyroMark Q24 MDx	Piattaforma di rilevamento basata su sequenze per il pirosequenziamento di 24 campioni in parallelo	9001513
PyroMark Q24 MDx Software	Software dell'applicazione	9019063
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Stazione di lavoro per il vuoto (220 V) per la preparazione di 24 campioni in parallelo, dal prodotto PCR allo stampo a filamento singolo	9001515* 9001517†

* Per il resto del mondo (non UK).

† Per UK.

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sonde per filtro riutilizzabili per PyroMark Vacuum Workstation Q96 e Q24	979010
PyroMark Q24 Control Oligo	Per il controllo dell'installazione del sistema	979303

Per le informazioni di licenza aggiornate e i disclaimer specifici dei prodotti consultare il manuale specifico del kit QIAGEN. I manuali dei kit QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Marchi commerciali: QIAGEN®, Pyrosequencing®, Pyrogram®, PyroMark® (Gruppo QIAGEN); Microsoft® (Microsoft Corporation); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare).

Contratto di Licenza Limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente di PyroMark Q24 Validation Oligo dei seguenti termini:

1. PyroMark Q24 Validation Oligo può essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale PyroMark Q24 Validation Oligo* e unicamente per gli usi con i componenti contenuti nel Prodotto. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale PyroMark Q24 Validation Oligo* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questo Prodotto e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente Prodotto ed i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del Prodotto concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di licenza limitato, e recupererà tutte le spese di investigazione e legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di licenza limitato o qualunque diritto di proprietà intellettuale correlato al Prodotto e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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)

