

PyroMark[®] Q24 MDx Software-Handbuch

Version 1

Zum Gebrauch mit dem PyroMark Q24 MDx System.

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen



9019063



1063400DE



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

R1

MAT

1063400DE



QIAGEN® Sample and Assay Technologies

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

QIAGEN setzt Standards in:

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

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

Symbole	5
Vorgesehener Verwendungszweck	5
Anwendungseinschränkungen	5
Produktgewährleistung und Zufriedenheitsgarantie	6
Technischer Service	6
Einführung	8
Über dieses Handbuch	8
PyroMark Q24 MDx Software	9
Analysemodi	9
Verknüpfungs-Browser	10
Hauptmenü und Werkzeugleisten	12
Histogramm	16
Pyrogramm	17
Auswählen von Wells	19
Starten der Software	20
Konfigurieren eines AQ- oder CpG-Assays	20
Durchführung	20
Eingeben der zu analysierenden Sequenz	21
Dispensier-Reihenfolge generieren	24
Hinzufügen oder Entfernen von Bisulfitbehandlungs-Kontrollen (bei CpG-Assays)	26
Konfigurieren der variablen Positionen	26
Bearbeiten der Analyseparameter	28
Konfigurieren eines SQA-Assays	34
Durchführung	34
Eingeben der Dispensier-Reihenfolge	35
Bearbeiten der Analyseparameter	35
Konfigurieren eines Laufs	38
Ablauf	38
Eingeben der Laufparameter	39
Zuordnen von Assay-Dateien zu einer Platte	40

Probenkennungen und Anmerkungen eingeben	41
Kopieren oder Löschen von Zelleninhalten	41
Ausdrucken oder Exportieren der Platten-Konfiguration als Bild	43
Externes Definieren von Probenkennungs- und Anmerkungsformat	43
Überprüfen der Platten-Konfiguration	45
Durchführung eines Analyselaufs mit dem PyroMark Q24 MDx Thermocycler	46
Ablauf	46
Auswertung des Laufs	47
Ablauf	47
Analyse aller oder ausgewählter Wells	47
Anzeigen der Analyseergebnisse	48
Bearbeiten der Analyseparameter	52
Bearbeiten der Qualitätsbewertungen	54
Bearbeiten basenzugeordneter Sequenzen	55
Anzeigen, Drucken und Speichern von Analyseberichten	56
Analysestatistik-Bericht	57
Analyseergebnisse-Bericht	58
Pyrogramm-Bericht	60
Vollständiger Bericht	62
SNP-Übersichtsbericht	64
Verwalten der Gerätemethoden	65
Methoden-Parameter	66
Allgemeine Hinweise und Tipps	66
Validierung von Assays	66
Analyse-Protokoll	66
Schutz der Dateien	67
Schutz der Analyseergebnisse	67
Hilfe zur Fehlersuche	68
Anhang A: Meldungen der PyroMark Q24 MDx Software	69
Literaturhinweis	78

Symbole



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



CE-Kennzeichnung – gemäß der europäischen Richtlinie über In-vitro-Diagnostika (IVD) 98/79/EG



Katalognummer



Materialnummer



Hersteller i. S. d. Gesetzes



Lesen Sie die detaillierten Informationen im Handbuch



Wichtiger Hinweis

Vorgesehener Verwendungszweck

Die PyroMark Q24 MDx Software ist die Betriebssoftware des PyroMark Q24 MDx, der für den Nachweis von Veränderungen in bestimmten variablen Positionen eines DNA-Moleküls, die eventuell klinisch relevant sind, vorgesehen ist.

Der PyroMark Q24 MDx ist für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch in Europa vorgesehen.

Anwendungseinschränkungen

Die PyroMark Q24 MDx Software ist zum Gebrauch durch entsprechend ausgebildete Anwender bestimmt, wie beispielsweise Ärzte und medizinisch- oder biologisch-technische Assistenten, die in molekularbiologischen Methoden und der Bedienung des PyroMark Q24 MDx geschult sind.

Alle Bedienungsschritte sind gemäß den Anweisungen in diesem Handbuch und in den Dialogfenstern, die auf dem Bildschirm des PyroMark Q24 MDx erscheinen, sowie gemäß den Anweisungen im PyroMark Q24 MDx Handbuch auszuführen. Die Bedienungsschritte hängen darüber hinaus von der Anwendung laut dem jeweiligen Handbuch des QIAGEN Kits, der zur Verwendung mit dem PyroMark Q24 MDx vorgesehen ist, sowie von den Angaben des Technischen Supports von QIAGEN und den Grenzwerten, die von den technischen Spezifikationen vorgegeben sind, ab.

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

Die Software ist ausschließlich für die Verwendung mit dem PyroMark Q24 MDx vorgesehen.

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

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

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

Produktgewährleistung und Zufriedenheitsgarantie

QIAGEN garantiert die volle Funktionsfähigkeit aller ihrer Produkte für die in der Produktliteratur genannten Anwendungen bei genauer Einhaltung der beschriebenen Protokolle. Der Kunde muss die Eignung dieses Produkts für seine spezielle Anwendung selbst bestimmen. Sollte ein Produkt trotz sachgemäßer Verwendung nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen führen, wird QIAGEN es kostenlos ersetzen oder den Verkaufspreis erstatten. Wir behalten uns das Recht vor, jedes Produkt zu verändern oder zu modifizieren, um dadurch dessen Funktionalität oder Design zu verbessern. Sollte ein QIAGEN Produkt nicht Ihren Erwartungen entsprechen, rufen Sie unseren Technischen Service an. Wir werden Ihnen entweder den gezahlten Betrag erstatten oder das Produkt ersetzen – so wie Sie es wünschen. Für die wissenschaftlichen QIAGEN Geräte, Service-Dienstleistungen und Produkte, die auf Trockeneis verschickt werden, gelten separate Bedingungen. Fragen Sie bitte nach, um weitere Informationen dazu zu bekommen.

Sie können auf Wunsch ein Exemplar der Allgemeinen Verkaufsbedingungen von QIAGEN erhalten; sie sind ebenfalls auf der Rückseite unserer Rechnungen abgedruckt. Wenn Sie Fragen zu den Produktspezifikationen oder zur Leistungscharakteristik haben, wenden Sie sich bitte an unseren Technischen Service (Kontaktinformationen finden Sie auf der hinteren Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Technischer Service

Der Technische Service von QIAGEN garantiert Qualität auch in der wissenschaftlichen Beratung unserer Kunden. Hier stehen Ihnen erfahrene

Wissenschaftler für Ihre Fragen zu Probenvorbereitungs- und Testtechnologien sowie zur Anwendung der QIAGEN Produkte gerne zur Verfügung. Rufen Sie uns an, wenn Sie Fragen zum PyroMark Q24 MDx System oder zu anderen QIAGEN Produkten haben.

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

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

Einführung

Über dieses Handbuch

Dieses Handbuch enthält Informationen über die Funktionen und Merkmale der PyroMark Q24 MDx Software. Detaillierte Informationen über die ordnungsgemäße Pflege, Wartung und Bedienung des PyroMark Q24 MDx Thermocyclers und der PyroMark Q24 MDx Vakuum-Arbeitsstation finden Sie im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*.

Das vorliegende Handbuch beschreibt die Merkmale der Software und zugehöriger Tools, mit denen der Anwender Dateien und Analysen handhaben und modifizieren kann.

Dieses Handbuch zur PyroMark Q24 MDx Software ist in die folgenden Kapitel gegliedert:

- Einführung
- PyroMark Q24 MDx Software
- Starten der Software
- Konfigurieren eines AQ- oder CpG-Assays
- Konfigurieren eines SQA-Assays
- Konfigurieren eines Laufs
- Durchführung eines Analyselaufs mit dem PyroMark Q24 MDx Gerät
- Auswertung des Laufs
- Anzeigen, Drucken und Speichern von Analyseberichten
- Verwalten der Gerätemethoden
- Allgemeine Hinweise und Tipps
- Hilfe zur Fehlersuche

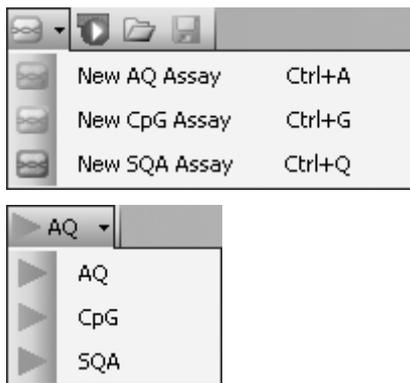
PyroMark Q24 MDx Software

Das PyroMark Q24 MDx System ist eine Komplettlösung bestehend aus dem Thermocycler, der Vakuum-Arbeitsstation, den Reagenzien und der Software.

Die wesentlichen Vorteile des Systems sind:

- Hoch aufgelöste Quantifizierung von di-, tri- oder tetraallelicen Mutationen
- Genotypisierung und Quantifizierung von Insertionen/Deletionen („InDels“)
- AQ- und CpG-Assays mit Sequenzkontext als eingebaute Qualitätskontrolle
- Methylierungsanalyse in Gegenwart von SNPs
- Eingebaute Qualitätskontrolle für Bisulfitbehandlungen bei Methylierungs-Assays
- Basenzuordnung („Base-Calling“) mit Qualitätsbewertung

Analysemodi



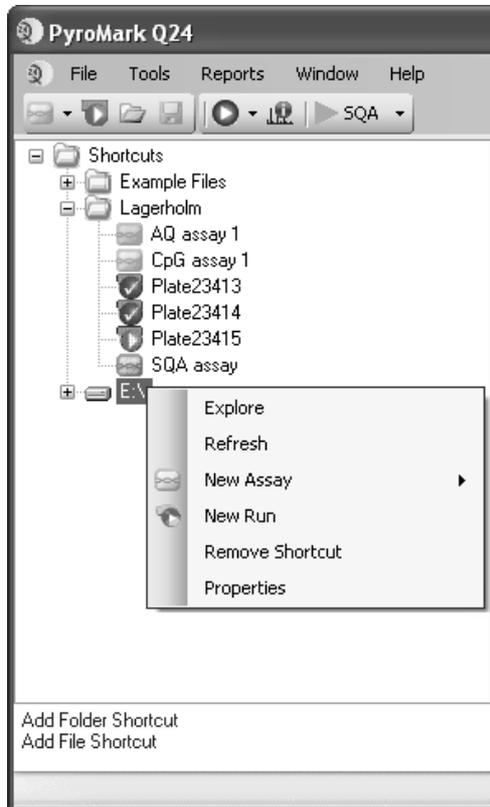
Die PyroMark Q24 MDx Software verfügt über drei Analysemodi:

- AQ: eine Auswahl an Untersuchungen zur Quantifizierung sowie Genotyp-Analysen von SNPs und „InDels“.
- CpG: Methylierungsanalyse multipler aufeinanderfolgender CpG-Stellen.
- SQA: Basenzuordnung unbekannter Sequenzen.

Bei einer PyroMark Q24 Platte können alle drei unterschiedlichen Analysemodi in einem Lauf angewandt werden. Um in der Analyse-Ansicht zwischen den Analysemodi zu wechseln, wählen Sie einfach „AQ“, „CpG“ oder „SQA“ in der Werkzeugleiste.

Verknüpfungs-Browser

Der Verknüpfungs-Browser ("Shortcut browser") bietet eine schnelle und einfache Möglichkeit, auf Ordnerinhalte und häufig benutzte Assay- und Laufdateien zuzugreifen.



Die folgenden Icons stehen zur Verfügung, um Informationen über die Dateien anzuzeigen:

-  AQ-Assay-Datei
-  CpG-Assay-Datei
-  SQA-Assay-Datei
-  Eine Laufdatei, die noch nicht abgearbeitet wurde
-  Eine Laufdatei, die bereits abgearbeitet wurde
-  Verknüpfung gelöst. Dies kann an einem Netzwerk-Server liegen, zu dem vorübergehend keine Verbindung besteht, oder daran, dass die Datei oder der Ordner außerhalb der Software verschoben, umbenannt oder gelöscht wurde.

Hinzufügen und Entfernen von Verknüpfungen, Aktualisieren von Ordnerinhalten und Anzeigen von Datei- und Ordneigenschaften:

- Eine Verknüpfung zu einem Ordner oder zu einem Laufwerk fügen Sie hinzu, indem Sie auf "Add Folder Shortcut" („Verknüpfung zu Ordner hinzufügen“) oder mit der rechten Maustaste auf den "Shortcuts"-Ordner („Verknüpfungen“) klicken und die Option "Add Folder Shortcut" aus dem Kontextmenü wählen.
- Eine Verknüpfung zu einer Datei fügen Sie hinzu, indem Sie auf "Add File Shortcut" („Verknüpfung zu Datei hinzufügen“) oder mit der rechten Maustaste auf den "Shortcuts"-Ordner („Verknüpfungen“) klicken und die Option "Add File Shortcut" aus dem Kontextmenü wählen.
- Eine Verknüpfung entfernen Sie durch rechten Mausklick auf die Verknüpfung und dann Auswählen der Option "Remove Shortcut" („Verknüpfung entfernen“) aus dem Kontextmenü. (Die Dateien und Unterordner in einem Verknüpfungs-Ordner können nicht separat entfernt werden.)

- Aktualisieren Sie die Inhalte eines Ordners, indem Sie ihn mit der rechten Maustaste anklicken und die Option "Refresh" („Aktualisieren“) aus dem Kontextmenü wählen.
- Die Datei- oder Ordneigenschaften (z. B. Laufparameter) können Sie anzeigen lassen, indem Sie die Datei oder den Ordner mit der rechten Maustaste anklicken und die Option "Properties" („Eigenschaften“) aus dem Kontextmenü wählen.

Hinweis: Wenn der Mauszeiger im Verknüpfungs-Browser über einer Datei positioniert wird, wird in einer Quickinfo bei Assay-Dateien die Anmerkung zum Assay und bei Laufdateien die Plattenkennung ("Plate ID") angezeigt, sofern diese eingegeben wurde.

Anlegen, Öffnen und Kopieren von Dateien und Anzeigen des Lauf-Protokolls bei einem abgearbeiteten Lauf:

- Legen Sie eine neue Assay-Datei an, indem Sie mit der rechten Maustaste den gewünschten Ordner anklicken und erst "New Assay" („Neuer Assay“) und dann den gewünschten Assay-Typ aus dem Kontextmenü wählen. Geben Sie den Dateinamen ein und drücken Sie die "Enter"-Taste (Eingabe-Taste). Wie Sie den Assay konfigurieren, finden Sie auf Seite 20 (bei AQ- oder CpG-Assays) bzw. auf Seite 34 (bei SQA-Assays).
- Eine neue Laufdatei legen Sie an, indem Sie mit der rechten Maustaste auf den gewünschten Ordner klicken und dann die Option "New Run" („Neuer Lauf“) aus dem Kontextmenü wählen. Geben Sie den Dateinamen ein und drücken Sie die "Enter"-Taste (Eingabe-Taste). Wie Sie den Lauf konfigurieren, finden Sie auf Seite 38.

Sie können eine abgearbeitete Laufdatei kopieren und erneut ausführen lassen, indem Sie diese Laufdatei mit der rechten Maustaste anklicken und die Option "Copy and Rerun" („Kopieren und erneut ausführen“) aus dem Kontextmenü wählen.

Hinweis: Daraufhin wird nur die in dieser Laufdatei gespeicherte Konfiguration kopiert – nicht die Lauf- und Analysedaten.

- Kopieren Sie eine Datei, indem Sie mit der rechten Maustaste auf den Ordner klicken, der die Datei enthält, und die Option "Explore" („Durchsuchen“) aus dem Kontextmenü wählen. Der Windows® Explorer öffnet sich. Um weitere Informationen zu erhalten, drücken Sie die „F1“-Taste, um die Online-Hilfe des Windows Explorers zu öffnen.

Hinweis: Um Datenverlust zu vermeiden, kopieren Sie keine Datei, die gerade in der PyroMark Q24 MDx Software geöffnet ist.

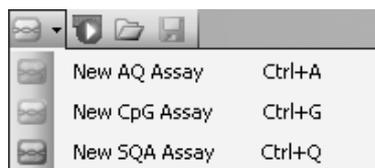
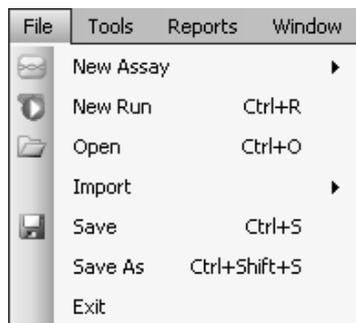
- Öffnen Sie eine Datei, indem Sie sie doppelklicken oder mit der rechten Maustaste anklicken und "Open" („Öffnen“) aus dem Kontextmenü wählen. Um eine bereits abgearbeitete Laufdatei zu öffnen, wählen Sie die

Option "Open with" („Öffnen mit“), anschließend den Analysemodus („AQ“, „CpG“ oder „SQA“).

- Zum Anzeigen der Laufparameter und eines Lauf-Protokolls einer abgearbeiteten Laufdatei klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die Datei; wählen Sie dann die Option "Run Information" („Lauf-Informationen“) aus dem Kontextmenü.

Hauptmenü und Werkzeugleisten

Datei-Menü und Werkzeugleisten



Wählen Sie die Option "New Assay" („Neuer Assay“) oder klicken Sie in der Werkzeugleiste auf das Icon  und wählen Sie den gewünschten Assay-Typ, um eine neue Assay-Datei anzulegen. Wie Sie den Assay konfigurieren, finden Sie auf Seite 20 (bei AQ- oder CpG-Assays) bzw. auf Seite 34 (bei SQA-Assays).

Wählen Sie "New Run" („Neuer Lauf“) oder klicken Sie auf das grüne Icon  in der Werkzeugleiste, um eine neue Laufdatei anzulegen. Wie Sie den Lauf konfigurieren, finden Sie auf Seite 38.

Um eine gespeicherte Assay- oder Laufdatei zu öffnen, wählen Sie die Option "Open" („Öffnen“) oder klicken Sie auf das Icon  in der Werkzeugleiste.

Wählen Sie die Option "Create New Run from Sample Layout File" („Neuen Lauf aus Probenkennungs-Layoutdatei erstellen“) aus dem „Import“-Untermenü, wenn Sie einen neuen Lauf unter Verwendung eines Platten-Layouts für Probenkennungen und Anmerkungen (optional) anlegen wollen, der als Textdatei mit Tabstopps oder Kommas als Trennzeichen gespeichert wird (*.tsv, *.txt oder *.csv); siehe Seite 43.

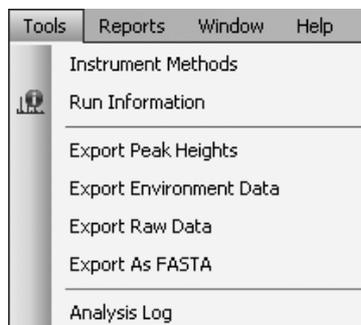
Wählen Sie die Option "Create New AQ/CpG Assay from Assay Design File" („Neuen AQ-/CpG-Assay aus Assay-Design-Datei erstellen“) aus dem „Import“-Untermenü, wenn Sie einen neuen AQ- oder CpG-Assay anlegen wollen, der auf einer Assay-Datei (*.xml) basiert, die mit der PyroMark Assay-Design-Software (ADSW) erstellt wurde. Die Software importiert die zu analysierende Sequenz und die Bezeichnungen der variablen Positionen.

Zum Abspeichern der Änderungen in der aktuellen Datei wählen Sie "Save" („Speichern“) oder klicken Sie auf das Disketten-Icon  in der Werkzeugleiste. Falls die Datei

Werkzeugmenü
("Tools") für nicht
abgearbeitete
Laufdateien



Werkzeugmenü
("Tools") für bereits
abgearbeitete
Laufdateien



bislang noch nicht gespeichert wurde, wählen Sie in dem sich öffnenden Dialogfenster den Speicherort und geben Sie den Dateinamen ein.

Wählen Sie "Save As" („Speichern unter“), um eine Kopie der aktuellen Datei zu speichern. Wählen Sie in dem sich öffnenden Dialogfenster den Speicherort und geben Sie den Dateinamen ein.

Zum Beenden der Software klicken Sie auf "Exit".

Wählen Sie "Instrument Methods" („Gerätemethoden“), um die Einstellungen für die Gerätemethode anzuzeigen und, falls erforderlich, neue Methoden zu importieren oder gemäß den von QIAGEN zur Verfügung gestellten Einstellungen zu konfigurieren (siehe Abschnitt „Verwalten der Gerätemethoden“ auf Seite 65).

Die Platten-Konfiguration und eine Liste der erforderlichen Volumina Enzymgemisch, Substratgemisch und Nukleotide für die aktuelle Laufdatei können Sie nach Wahl der Option "Pre Run Information" („Informationen vor dem Lauf“) einsehen. Zum Ausdrucken des Berichts klicken Sie auf das Drucker-Icon .

Hinweis: Wenn Sie den "Pre Run Information"-Bericht in Farbe ausdrucken möchten, aktivieren Sie die Option "Print background colors and images" („Hintergrundfarben und -bilder drucken“) im Internet Explorer (unter "Tools/Internet Options/Advanced/Printing" bzw. „Extras/Internetoptionen/Erweitert/Wird gedruckt“).

Wählen Sie "Run Information" („Laufinformationen“), um für die aktuelle Laufdatei die Laufparameter und ein Lauf-Protokoll anzuzeigen. Zum Ausdrucken des Berichts klicken Sie auf das Drucker-Icon .

Wählen Sie die Option "Export Peak Heights" („Peakhöhen exportieren“), wenn Sie die in allen Wells gemessenen Peakhöhen als Textdatei abspeichern wollen.

Wenn Sie die Drehzahl des (Platten-)Schüttlers, die Temperatur des Heizblocks und die Druckwerte in einer Textdatei speichern wollen, wählen Sie die Option "Export Environment Data" („Umgebungsdaten exportieren“). Die Temperaturen der Umgebung, des Prozesskammerdeckels und der Kühlvorrichtung werden

ebenfalls aufgelistet.

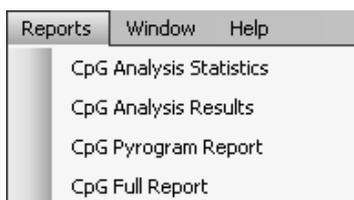
Wählen Sie "Export Raw Data" („Rohdaten exportieren“), um die (Licht-)Intensitäten und die Dispensierdaten in einer Textdatei abzuspeichern.

Zum Speichern basenzugeordneter Sequenzen im FASTA-Format wählen Sie "Export As FASTA" (steht nur bei SQA-Assays zur Verfügung). Wählen Sie dann im sich öffnenden Dialogfenster die Wells, die berücksichtigt werden sollen (alle oder nur ausgewählte), die Sortierreihenfolge der Wells (nach Reihe oder Spalte) und die Basen in den Sequenzen, die mit eingeschlossen werden sollen: entweder alle ("All") oder nur solche, die bestimmte Qualitätskriterien erfüllen ("Passed", "Passed + Check" oder "Only Quality Control Window").

Um das Protokoll mit allen im ausgewählten Well durchgeführten Analysen als HTML-Datei zu speichern, anzuzeigen oder zu speichern, wählen Sie die Option "Analysis Log" („Analyse-Protokoll“). Jede Analyse wird mit folgenden Daten protokolliert: verwendete Analyseeinstellungen, Analysemodus (AQ, CpG oder SQA), Analyse-Version, Ergebnisse (inklusive Warnmeldungen), Datum und Uhrzeit und den in Windows eingetragenen Benutzernamen, unter dem die Analyse durchgeführt wurde (siehe den Abschnitt „Allgemeine Hinweise und Tipps“ auf Seite 66).

Textdateien (*.tsv oder *.csv) können in Microsoft® Excel® importiert werden oder in andere Programme, die Daten verarbeiten können, die durch Semikolons (;) oder Tabstopps voneinander getrennt sind. Dies kann hilfreich sein, wenn die Daten für weitere Auswertungen verarbeitet werden sollen.

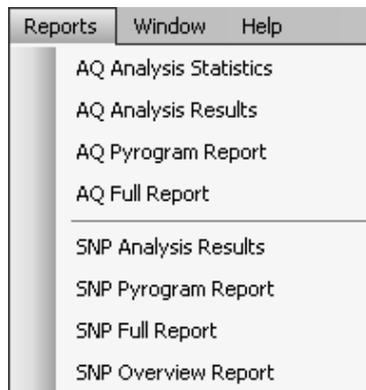
"Reports"-Menü
(„Berichte“) für CpG-
Analyseläufe



Der "Analysis Statistics"-Bericht beinhaltet eine statistische Auswertung aller oder der ausgewählten Wells.

Der Bericht "Analysis Results" enthält die Informationen und Analyseergebnisse aller oder der ausgewählten Wells.

“Reports”-Menü („Berichte“) für AQ- Analyseläufe

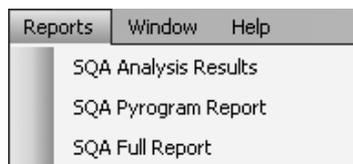


Der “Pyrogram Report” („Pyrogramm-Bericht“) beinhaltet die Informationen und das Pyrogramm® aller oder der ausgewählten Wells.

Der “Full Report” („Vollständiger Bericht“) enthält: Laufparameter, Lauf-Protokoll, Well-Informationen und Analyseergebnisse (inklusive Pyrogramm) für alle oder die ausgewählten Wells.

Im “SNP Overview Report” („SNP-Übersichtsbericht“) finden Sie die Genotypen und Qualitätsbewertungen aller SNPs und Insertionen/Deletionen („InDels“). Die Informationen werden in Form der Platten-Übersicht mit einer Platte pro Positionsnummer dargestellt.

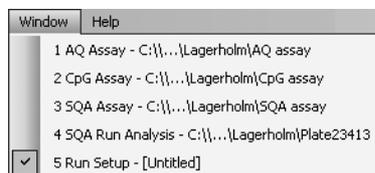
“Reports”-Menü („Berichte“) für SQA- Analyseläufe



Die Berichtsoptionen stehen nur für abgearbeitete Läufe zur Verfügung. Weitere Informationen zu den Berichten finden Sie auf Seite 56.

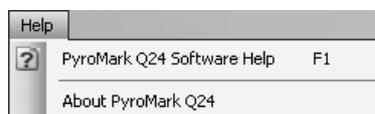
Hinweis: Um Berichte, die im PDF-Format erzeugt werden, betrachten zu können, muss ein PDF-Reader auf dem Computer installiert sein. Der Adobe® Reader® kann unter www.adobe.com heruntergeladen werden.

“Window”-Menü („Fenster“)



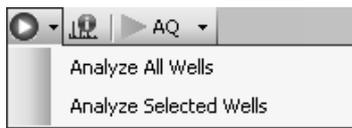
Mithilfe des “Window”-Menüs („Fenster“) können Sie zwischen verschiedenen geöffneten Dateien in der Software wechseln.

“Help”-Menü („Hilfe“)



Wählen Sie die Option “PyroMark Q24 Software Help” oder drücken Sie die „F1“-Taste, um dieses Handbuch zu öffnen.

Analyse- Werkzeugleiste

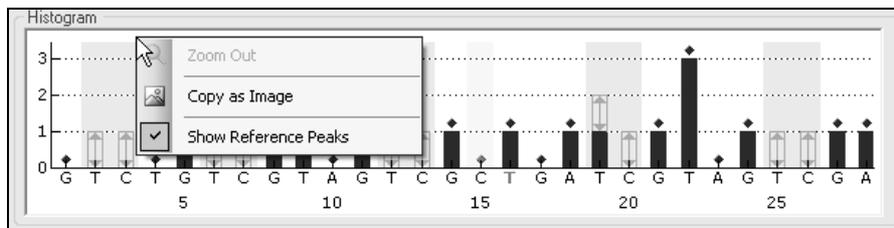


Klicken Sie auf das Icon  und wählen Sie dann entweder "Analyze All Wells" oder "Analyze Selected Wells", um für die aktuelle Laufdatei entweder alle Wells oder nur ausgewählte Wells zu analysieren (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19).

Klicken Sie auf das Icon , um für die aktuelle Laufdatei die Laufparameter und ein Lauf-Protokoll anzuzeigen. Zum Ausdrucken des Berichts klicken Sie auf das Drucker-Icon .

Um zwischen den Analysemodi hin- und herzuschalten, wählen Sie „AQ“, „CpG“ oder „SQA“ in der Werkzeugleiste.

Histogramm



Histogramm mit einem theoretischen Ergebnis eines CpG-Assays.

Beim Konfigurieren eines AQ- oder CpG-Assays wird die theoretische Darstellung des zu erwartenden Peakmusters bei der Pyrosequenzierung[®] im "Histogramm"-Bereich abgebildet. Im Histogramm werden die folgenden Icons und Farben verwendet:

- Variable Positionen werden durch eine blaugraue Hintergrundfarbe markiert.
- Referenz-Peaks werden in der Anzeige durch blaue Rauten über den Peaks gekennzeichnet.
- Kontrollen der Bisulfitbehandlung werden mit einer gelben Hintergrundfarbe hervorgehoben. Bei der Anzeige von Referenz-Peaks werden diese durch orangefarbene Rauten über den Bisulfitbehandlungs-Kontrollen markiert (nur bei CpG-Assays).

Ein-/Auszoomen im Histogramm

Im Histogramm können Sie Ausschnitte vergrößert darstellen („Zoom-in“), indem Sie mit gedrückter linker Maustaste einen Bereich auswählen.

Auszoomen können Sie entweder per rechtem Mausklick auf die Histogrammfläche und Wahl der Option "Zoom Out" aus dem Kontextmenü (der Zoom

kehrt zur vorherigen Stufe zurück) oder durch Doppelklicken auf eine Stelle in der Histogramm-Fläche (der Zoom wird auf 100 % eingestellt).

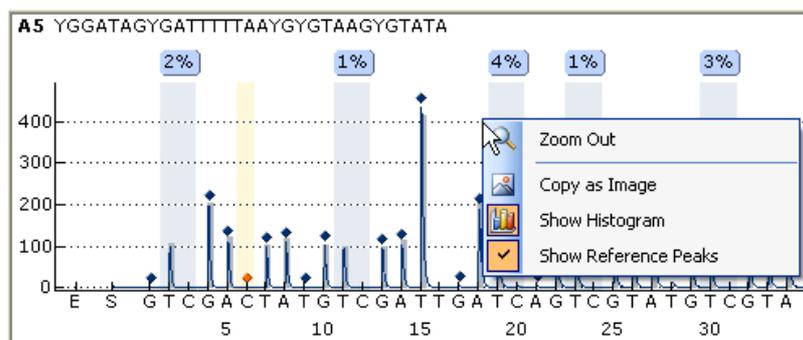
Histogramm als Bild exportieren

Das Histogramm kann als Bild in die Zwischenablage kopiert werden, indem Sie im Histogramm auf die rechte Maustaste klicken und die Option "Copy as Image" („Als Bild kopieren“) aus dem Kontextmenü wählen. Das Bild kann anschließend in Programmen eingefügt werden, die das EMF-Bildformat („Enhanced Metafile“) unterstützen.

Pyrogramm

Das Pyrogramm ist das Diagramm, das sich als Ergebnis einer Sequenzierungsreaktion, die mithilfe der Pyrosequenzierungs-Technologie durchgeführt wurde, ergibt. Eingebaute Nukleotide werden im Pyrogramm als Peaks dargestellt.

AQ- und CpG-Assays



Die folgenden Informationen, Icons und Farben werden im Pyrogramm-Bereich bei einem AQ- oder CpG-Assay angezeigt bzw. verwendet:

- Oben links werden die Bezeichnung des Wells und die zu analysierende Sequenz angezeigt.
- Das Analyseergebnis (die Allelfrequenzen oder der Methylierungs-Prozentsatz) wird über jeder variablen Position angezeigt, zum Beispiel

--:	56%
ΔT:	44%

 („InDel“) und

96%

. Die Hintergrundfarbe ist ein Indikator für die Qualitätsbewertung des Analyseergebnisses; siehe Farblegende auf Seite 50. Falls die Qualitätsbewertung vom Anwender bearbeitet wurde, wird dies durch einen Rahmen um das Analyseergebnis angezeigt, zum Beispiel

44%

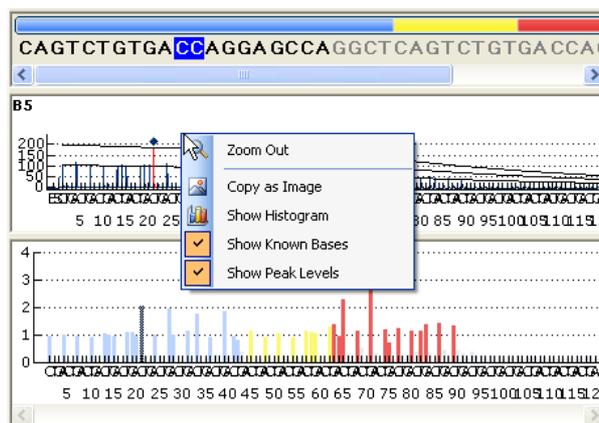
. Wenn Sie den Mauszeiger über das Analyseergebnis bewegen, werden in einem Quickinfo-Fenster die Positionsnummer und eventuell während der Analyse ausgelöste Warnmeldungen eingeblendet.

Hinweis: ☹ (in Weiß) = vom Anwender deaktiviert. N/A (in Weiß) = Die Software unterstützt die Analyse nicht, zum Beispiel SNP-Analyse im CpG-Modus. N/A (in Rot) = Analyse wegen fehlender Daten nicht möglich.

- Variable Positionen werden durch eine blaugraue Hintergrundfarbe markiert.
- Referenz-Peaks werden in der Anzeige durch blaue Rauten über den Peaks gekennzeichnet.
- Kontrollen der Bisulfitbehandlung werden mit einer hellgelben Hintergrundfarbe hervorgehoben. Bei der Anzeige von Referenz-Peaks werden diese durch orangefarbene Rauten über den Bisulfitbehandlungs-Kontrollen markiert (nur bei CpG-Assays).
- Um die Höhe eines Peaks anzuzeigen, bewegen Sie den Mauszeiger über die Spitze des Peaks. Die Höhe wird in einem Quickinfo-Fenster angezeigt.
- Bei der Anzeige des Histogramms wird dieses in grauer Farbe über den Peaks dargestellt. Es lässt sich am besten durch Einzoomen betrachten.

Hinweis: Durch rechten Mausklick in der Pyrogramm-Fläche können Sie zwischen Einblenden und Ausblenden von Histogramm und Referenz-Peaks wechseln.

SQA-Assays



Wenn eine Base in der basenzugeordneten Sequenz ausgewählt wird, wird der zugehörige Peak in beiden Bereichen des Pyrogramms markiert und umgekehrt.

Die folgenden Informationen und Farben werden im Pyrogramm-Bereich bei einem SQA-Assay angezeigt bzw. verwendet:

- Oben links wird die Bezeichnung des Wells angezeigt.
- Um die Höhe eines Peaks anzuzeigen, bewegen Sie den Mauszeiger über die Spitze des Peaks. Die Höhe wird in einem Quickinfo-Fenster angezeigt.
- Bei der Anzeige des Histogramms wird ein kompensiertes Pyrogramm in grauer Farbe über den Peaks dargestellt. Es lässt sich am besten durch Einzoomen betrachten.
- Bei der Anzeige bekannter Basen werden die Peaks dieser bekannten Basen im Pyrogramm mit blauen Rauten markiert.

- Bei der Anzeige der Peakhöhen werden im Pyrogramm die berechneten Peakhöhen wiedergegeben.
- Im kompensierten Pyrogramm in der unteren Fläche werden die Peaks entsprechend ihren Qualitätsbewertungen eingefärbt (siehe Farblegende auf Seite 50).

Hinweis: Durch rechten Mausklick in der Pyrogramm-Fläche können Sie zwischen Einblenden und Ausblenden von Histogramm, bekannten Basen und Peakhöhen wechseln.

Ein-/Auszoomen im Pyrogramm

Im Pyrogramm können Sie Ausschnitte vergrößert darstellen („Zoom-in“), indem Sie mit gedrückter linker Maustaste einen Bereich auswählen.

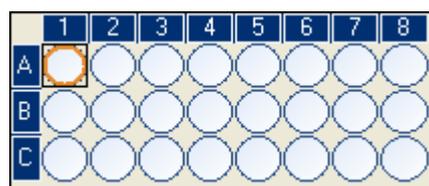
Auszoomen können Sie entweder per rechtem Mausklick auf die Pyrogramm-Fläche und Wahl der Option „Zoom Out“ aus dem Kontextmenü (der Zoom kehrt zur vorherigen Stufe zurück) oder durch Doppelklicken auf eine Stelle in der Pyrogramm-Fläche (der Zoom wird auf 100 % eingestellt).

Pyrogramm als Bild exportieren

Das Pyrogramm kann als Bild in die Zwischenablage kopiert werden, indem Sie in der Pyrogramm-Fläche auf die rechte Maustaste klicken und die Option „Copy as Image“ („Als Bild kopieren“) aus dem Kontextmenü wählen. Das Bild kann anschließend in Programmen eingefügt werden, die das EMF-Bildformat („Enhanced Metafile“) unterstützen.

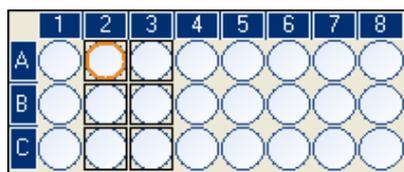
Auswählen von Wells

Ein einzelnes Well wählen Sie aus, indem Sie es einfach anklicken.



Um eine rechtwinklig angeordnete Gruppe von Wells, zum Beispiel A2-A3, B2-B3 und C2-C3, auszuwählen, gehen Sie wie folgt vor:

- Halten Sie die linke Maustaste gedrückt und bewegen Sie den Mauszeiger von Well A2 zu C3, oder
- klicken Sie Well A2 an und halten Sie die „Shift“-Taste (Hochstell-Taste) gedrückt, während Sie Well C3 anklicken, oder
- klicken Sie Well A2 an und halten Sie die „Shift“-Taste (Hochstell-Taste) gedrückt, während Sie die Pfeiltaste „Cursor nach rechts“ einmal und die Pfeiltaste „Cursor nach unten“ zweimal drücken.



Wenn Sie der bisherigen Auswahl weitere Wells hinzufügen möchten, zum Beispiel die Wells B7 und C7, halten Sie die "Ctrl"-Taste (Steuerungs- oder „Strg“-Taste) gedrückt, während Sie diese Wells anklicken.



Um ein Well wieder aus der Auswahl zu entfernen, halten Sie die "Ctrl"-Taste („Strg“-Taste) gedrückt, während Sie das Well erneut anklicken.

Hinweis: Sind mehrere Wells der Platte ausgewählt, werden die Informationen für das Well mit dem orangefarbenen Auswahlrahmen (in der Analyse-Ansicht) im Bereich "Well Information" etc. angezeigt.

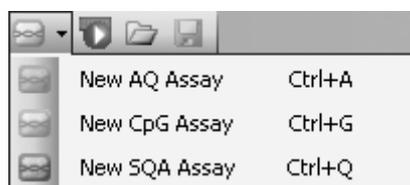
Starten der Software

Wählen Sie im Windows „Start“-Menü die Option "(All) Programs" („Alle Programme"); aus der Programmliste dann „PyroMark / PyroMark Q24“.

Nach Starten der Software können Sie durch Drücken der „F1“-Taste jederzeit das *PyroMark Q24 MDx Software-Handbuch* (dieses Dokument) einsehen.

Konfigurieren eines AQ- oder CpG-Assays

Durchführung



1. Klicken Sie in der Werkzeugleiste auf das Icon  und wählen Sie "New AQ Assay" oder "New CpG Assay". Eine neue Assay-Datei wird angelegt.
2. Geben Sie die zu analysierende Sequenz ein (siehe Seite 21).
3. Klicken Sie auf die Schaltfläche "Generate Dispensation Order" („Dispensier-Reihenfolge generieren"; siehe Seite 24).

4. **Optional:** Wenn Sie einen CpG-Assay anlegen, geben Sie die "Sequence Before Bisulfite Treatment" („Sequenz vor Bisulfitbehandlung“) ein. Diese Information ist nützlich, wenn Sie Bisulfitbehandlungs-Kontrollen mitführen.
5. **Empfehlung:** Fügen Sie die Bisulfitbehandlungs-Kontrollen beim Anlegen eines CpG-Assays bevorzugt am Anfang der Sequenz ein (siehe Seite 26).
6. **Optional:** Geben Sie Anmerkungen zum Assay in dem "Assay Note"-Textfeld ein.
7. **Optional:** Konfigurieren Sie die variablen Positionen (siehe Seite 26).
8. **Bevor Sie Ihre Proben analysieren, validieren Sie Ihren Assay unter Verwendung einer Referenz-DNA-Probe (siehe Anhang B im PyroMark Q24 MDx Handbuch).**
9. **Optional:** Falls erforderlich, ändern Sie die Analyseparameter bei der Assay-Validierung (siehe Seite 28).
10. **Optional:** Sperren Sie den Assay für weitere Bearbeitung, indem Sie auf die Schaltfläche "Lock Assay" („Assay sperren“) unten im "Assay Setup"-Fenster klicken. Ein gesperrter Assay (🔒), der auf dem PyroMark Q24 MDx Gerät ausgeführt wurde, kann nicht mehr entsperrt werden (d. h. nach Abarbeitung des Assays ist es nicht mehr möglich, die Analyseparameter oder -ergebnisse zu bearbeiten).

Hinweis: Im Verknüpfungs-Browser können Sie eine neue Assay-Datei anlegen, indem Sie auf den Ordner, in dem die Datei gespeichert werden soll, doppelklicken und dann aus dem Kontextmenü erst die Option "New Assay" („Neuer Assay“) und dann "AQ Assay" oder "CpG Assay" wählen. Geben Sie den Dateinamen ein und drücken Sie die "Enter"-Taste (Eingabe-Taste). Um eine Verknüpfung zu einem Ordner oder Laufwerk hinzuzufügen, klicken Sie auf "Add Folder Shortcut" („Verknüpfung zu Ordner hinzufügen“).

Hinweis: Eine Anmerkung zum Assay kann im Verknüpfungs-Browser als Quickinfo angezeigt werden. Bewegen Sie dazu den Mauszeiger über die Assay-Datei.

Hinweis: Um die Datei zu speichern, klicken Sie auf das Disketten-Symbol  in der Werkzeugleiste. Falls die Datei bislang noch nicht gespeichert wurde, wählen Sie in dem sich öffnenden Dialogfenster den Speicherort und geben Sie den Dateinamen ein.

Eingeben der zu analysierenden Sequenz

Tippen Sie die zu analysierende Sequenz in das "Sequence to Analyze"-Textfeld ein oder fügen Sie sie über die Tastenkombination "Ctrl+V" („Strg" + „V“) ein.

Wenn Sie einen CpG-Assay anlegen, geben Sie die Sequenz nach der Bisulfitbehandlung ein.

Halten Sie bei der Eingabe der DNA-Sequenz in die Software die folgenden Regeln ein:

- Die erlaubten Buchstaben für die Sequenzeingabe sind: A, C, G und T sowie die IUPAC-Codes.
- Variable Positionen können entweder durch Verwendung des IUPAC-Codes oder eines Schrägstrichs („/“) als Separator zwischen zwei möglichen Basen (z. B. „C/T“) eingegeben werden.
- Bei der Eingabe von Insertionen/Deletionen („InDels“) sollten Sie eckige Klammern („[]“) verwenden, z. B. „[AT]“.
- Die Sequenz sollte aus nicht mehr als 400 Buchstaben bestehen bzw. nicht mehr als 100 variable Position enthalten.
- Variable Positionen mit einer Kombination aus SNPs und „InDels“ sollten als Kombination bestehend aus „/“ oder IUPAC-Codes und „[]“ eingegeben werden. Zum Beispiel repräsentieren „[T/A]“ und „[W]“ einen triallelischen Polymorphismus, bei dem die möglichen Allele von einem T, einem A oder keinem von beiden (Deletion) repräsentiert werden.
- Eine Kombination aus einem SNP und konstanten Basen innerhalb eines „InDel“ (z. B. „[A/TC]“) ist nicht möglich.
- Verschachtelte „InDels“ (z. B. „[ATT[C]G]“) werden nicht unterstützt.

Falls die zu analysierende Sequenz einen Fehler enthält, wird dies durch ein rotes Ausrufezeichen am Ende des Textfelds angezeigt. Wenn Sie den Mauszeiger über das Ausrufezeichen bewegen, wird eine Quickinfo mit Erklärung des Fehlers eingeblendet. Das oder die Zeichen, die den Fehler verursachen, werden in der zu analysierenden Sequenz rot markiert.



Da die Zeichenfolge „T/T“ keine zulässige variable Position ist, verursacht sie einen „Invalid sequence“-Fehler („Nicht zulässige Sequenz“).

Hinweis: Bei der Analyse von „Nichtstandard“-Methylierungsmustern – zum Beispiel Methylierungen von Cs, auf die keine Gs folgen – können diese Muster im AQ-Modus analysiert werden. Für die Analyse im CpG-Modus geben Sie zusätzliche Gs in das „Sequence to Analyze“-Textfeld („Zu analysierende Sequenz“) ein und stellen die erwartete Höhe der zusätzlichen Gs auf Null („0“) ein (siehe den Abschnitt „Einstellen der Höhe der Histogrammsäulen“ auf Seite 33).

IUPAC-Codes

Code	Beschreibung	Code	Beschreibung
A	Adenin	W	T oder A
C	Cytosin	S	C oder G
G	Guanin	B	C, T oder G (nicht A)
T	Thymin	D	A, T oder G (nicht C)
R	Purin (A oder G)	H	A, T oder C (nicht G)
Y	Pyrimidin (C oder T)	V	A, C oder G (nicht T)
M	C oder A	N	beliebige Base (A, C, G oder T)
K	T oder G		

Hinweis: Nach Bisulfitbehandlung sind S, B, V und N nicht zulässig.

Zulässige Basenabfolgen in einem CpG-Assay

Abfolgen, die nach Bisulfitbehandlung nicht vorkommen können, sind in einem CpG-Assay nicht zulässig. Zum Beispiel ist die Folge „GC/TGAC/G“ nicht zulässig, weil „C/TG“ eine CpG-Stelle in Vorwärtsrichtung ist und „C/G“ nach Bisulfitbehandlung nicht vorkommen kann.

Folgende CpG-Stelle und SNPs können in einen Assays in Vorwärtsrichtung aufgenommen werden:

- CpG-Stelle: C/TG
- SNPs: A/T, A/G, G/T und A/T/G (d. h. C kann nicht eingegeben werden).

Folgende CpG-Stelle und SNPs können in einen Assays in Rückwärtsrichtung aufgenommen werden:

- CpG-Stelle: CG/A
- SNPs: A/T, A/C, C/T und A/T/G (d. h. G kann nicht eingegeben werden).

Hinweis: Die Software unterstützt die Analyse von CpG-Stellen, die eine zusätzliche variable Position enthalten (z. B. „A/C/TG“) nicht. Diese Arten von SNPs können analysiert werden, indem Sie „C/TG“ in das „Sequence to Analyze“-Textfeld und „ATCG“ in das „Dispensation Order“-Textfeld eintippen. Führen Sie dann den Lauf wie gewohnt durch. Wechseln Sie nach Analyse der CpG-Stellen in den AQ-Modus und ändern Sie „C/TG“ zu „A/C/TG“ (im „Sequence to Analyze“-Textfeld) und analysieren Sie die variable Position. Auf gleiche Weise können Sie „C/TG/A“ analysieren, indem Sie „C/TG“ in das „Sequence to Analyze“-Textfeld und „TCGA“ in das „Dispensation Order“-

Textfeld eintippen. Wechseln Sie nach Analyse der CpG-Stellen in den AQ-Modus und ändern Sie „C/TG“ zu „C/TG/A“ (im “Sequence to Analyze“-Textfeld) und analysieren Sie die variable Position.

Dispensier-Reihenfolge generieren

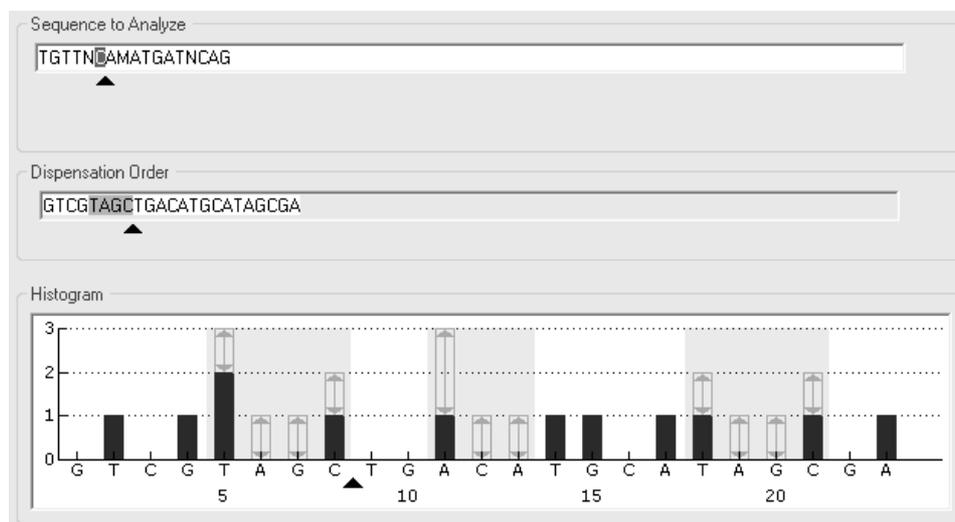
Die Software generiert eine Dispensier-Reihenfolge für die eingegebene zu analysierende Sequenz, wenn Sie auf die Schaltfläche “Generate Dispensation Order” klicken. Dabei werden Dispensierungen von Leerproben in die erzeugte Dispensier-Reihenfolge eingefügt, um sicherzustellen, dass die korrekte Sequenz erhalten wurde.

Beim Anlegen eines CpG-Assays sollten Sie Bisulfitbehandlungs-Kontrollen in die Dispensier-Reihenfolge mit aufnehmen. Diese Kontrollen müssen von Hand eingegeben werden, nachdem die Dispensier-Reihenfolge generiert wurde (siehe Seite 26).

Auf Wunsch kann die Dispensier-Reihenfolge von Hand eingegeben oder geändert werden.

Hinweis: Wenn Sie auf die Schaltfläche “Generate Dispensation Order” („Dispensier-Reihenfolge generieren“) klicken, wird eine eventuell noch vorhandene Dispensier-Reihenfolge überschrieben.

Hinweis: Wenn Sie in der zu analysierenden Sequenz eine Basen-Position auswählen, wird die zugehörige Dispensierung durch eine graue Hintergrundfarbe gekennzeichnet und umgekehrt.



Die Pfeilspitzen in der zu analysierenden Sequenz, in der Dispensier-Reihenfolge und im Histogramm zeigen die Position des Cursors an.

Hinweis: Ist die letzte variable Position in der zu analysierenden Sequenz eine lange „InDel“, wird die Dispensierung nur solange durchgeführt, bis drei variable Peaks gefunden wurden, sofern die Anforderung, dass fünf Referenz-Peaks vorhanden sein müssen, erfüllt ist. Um die Dispensierung für die gesamte

„InDel“ zu erreichen, fügen Sie manuell eine variable Position nach der „InDel“ ein oder passen Sie die Dispensier-Reihenfolge an.

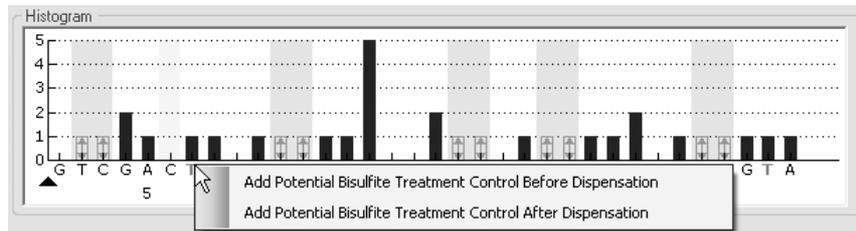
Hinweis: Falls die Sequenz nicht innerhalb der Dispensierung von 32 Allelen in Phase ist, wird die Dispensier-Reihenfolge nicht zu Ende ausgeführt. Zum Beispiel wird für die Sequenz „ACTCDDDDG“ die Dispensier-Reihenfolge „ACTC“ ausgeführt, weil die vier D-Polymorphismen eine Basen-Abfolge erzeugt, die über zu viele Allele phasenverschoben ist.

Warnmeldungen bei der Dispensierung

Falls die Dispensier-Reihenfolge eine Warnung enthält, wird dies durch ein rotes Ausrufezeichen am Ende des „Dispensation Order“-Textfelds angezeigt (⚠). Es ist zwar möglich, einen Assay trotz einer Dispensier-Warnung durchzuführen, die Warnmeldung muss aber bei der Evaluierung des Analyseergebnisses berücksichtigt werden. Wenn Sie den Mauszeiger über das Ausrufezeichen bewegen, wird eine Quickinfo mit der Warnmeldung eingeblendet.

Warnmeldung	Vorgeschlagene Maßnahme
<p>“Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information.” („Sequenz aufgrund fehlender terminaler Sequenzdaten unsicher.“)</p>	<p>Das Problem lässt sich eventuell lösen, indem Sie entweder mehr Sequenzdaten eingeben oder die Anzahl der Dispensierungen reduzieren.</p>
<p>“Sequence not in phase at the end of the dispensations.” („Sequenz am Ende der Dispensierungen nicht in Phase.“)</p>	<p>Das Problem kann eventuell durch Änderung der Dispensier-Reihenfolge (von Hand oder durch Klicken auf „Generate Dispensation Order“) oder Eingabe von mehr Sequenzdaten behoben werden. Hinweis: Wird das Problem nicht gelöst, wird der phasenverschobene Sequenzabschnitt nicht analysiert.</p>
<p>“The generated dispensation order contains less reference peaks than required.” („Die generierte Dispensier-Reihenfolge enthält weniger Referenz-Peaks als erforderlich.“)</p>	<p>Geben Sie, falls möglich, mehr Sequenzdaten ein und erhöhen Sie die Anzahl der Dispensierungen. Um bestmögliche Qualitätsbewertungen der Ergebnisse zu erhalten, werden fünf oder mehr Referenz-Peaks der Höhe 1, 2 oder 3 empfohlen.</p>

Hinzufügen oder Entfernen von Bisulfitbehandlungs-Kontrollen (bei CpG-Assays)



Bei CpG-Assays sollte mindestens eine interne Kontrolle – vorzugsweise zu Beginn der Sequenz – mitgeführt werden, um eine erfolgreiche Bisulfitbehandlung nachzuweisen. C-Basen, auf die in der Sequenz kein G folgt, werden normalerweise nicht methyliert und sollten daher nach Bisulfitbehandlung und PCR vollständig in Ts umgewandelt werden. Als Ergebnis einer erfolgreichen Bisulfitbehandlung sollten alle Templates nur Ts und keine Cs in diesen Position aufweisen. Bei reversen Assays sollten alle Templates ausschließlich As und keine Gs in diesen Positionen aufweisen.

Die möglichen Positionen für Bisulfitbehandlungs-Kontrollen werden im Histogramm durch einen fett gesetzten, orangefarbenen Buchstaben markiert: **T** bei einem Assay in Vorwärtsrichtung und **A** bei einem Assay in Rückwärtsrichtung (reverser Assay).

Eine Bisulfitbehandlungs-Kontrolle können Sie durch Anklicken des fetten, orangefarbenen **T** oder **A** mit der linken Maustaste und Auswahl der gewünschten Option aus dem Kontextmenü hinzufügen. Sie können Sie auch von Hand hinzufügen, indem Sie ein C vor bzw. nach einem T in der Dispensier-Reihenfolge eingeben.

Eine Bisulfitbehandlungs-Kontrolle entfernen Sie, indem Sie sie mit der linken Maustaste anklicken (C bei einem Assay in Vorwärtsrichtung oder G bei reversem Assay) und die Option "Remove Bisulfite Control" („Bisulfitkontrolle entfernen“) aus dem Kontextmenü wählen.

Hinweis: Überprüfen Sie vor der Bisulfitbehandlung in der Sequenz, ob bei den vorgeschlagenen Bisulfitbehandlungs-Kontrollen eine Konversion von Cs zu Ts (zu lesen als Gs und As bei reversen Assays) vorliegt und als Kontrollen geeignet sind oder nicht.

Konfigurieren der variablen Positionen

Die variablen Positionen können auf der Registerkarte "Variable Positions" konfiguriert werden. Die verfügbaren Parameter sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Hinweis: Wenn Sie die zu analysierende Sequenz ändern (und eine neue Dispensier-Reihenfolge generiert haben), werden die Parameter der variablen Positionen wieder auf ihre voreingestellten Werte zurückgesetzt.

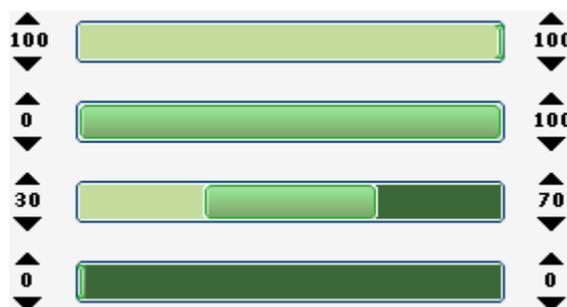
“Position”	Die Stelle der variablen Position in der zu analysierenden Sequenz (von links nach rechts gezählt).
“Name”	Die Bezeichnung der variablen Position. Um die Bezeichnung zu ändern, wählen Sie entweder das betreffende Textfeld aus (der aktuelle Inhalt wird angezeigt) oder doppelklicken Sie auf das Textfeld.
“Type”	Legt den Typ der variablen Position fest: SNP, „InDel“ (Insertion/Deletion) oder CpG-Stelle.
“Analyze”	Wenn Sie diese Option aktivieren, wird die variable Position analysiert. Hinweis: Diese Option steht für variable Positionen, die mit dem aktuell eingestellten Assay-Typ nicht analysiert werden können, nicht zur Verfügung.
“Methylation ranges” (nur bei CpG-Assays)	<p>Bereiche des erwarteten CpG-Methylierungs-Prozentsatzes. Die Einstellung dieses Parameters bei allen CpG-Stellen ermöglicht in den Analyseergebnissen das schnelle Auffinden von Stellen, deren Methylierungs-Prozentsatz außerhalb des erwarteten Bereichs liegt:</p> <ul style="list-style-type: none">■ Die hellgrüne Fläche ist unterhalb des erwarteten Bereichs.■ Die grüne Fläche ist innerhalb des erwarteten Bereichs.■ Die dunkelgrüne Fläche ist oberhalb des erwarteten Bereichs. <p>Hinweis: Der erwartete Methylierungs-Prozentsatz für CpG-Stellen kann nicht eingestellt werden, wenn die “Analyze”-Option deaktiviert ist.</p> <p>Die Fläche des erwarteten Bereichs kann nach links oder rechts verschoben werden. Halten Sie dazu die linke Maustaste gedrückt und bewegen Sie die Fläche mit der Maus.</p> <p>Durch Klicken auf die Pfeile können Sie den erwarteten Bereich vergrößern oder verkleinern. Sie können</p>

den erwarteten Bereich auch wie folgt vergrößern oder verkleinern:

1. Bewegen Sie den Mauszeiger über das linke oder rechte Ende der grünen Fläche, sodass die Form des Zeigers von einem weißen Pfeil zu einem senkrechten Strich (+) wechselt.
2. Bewegen Sie die Maus bei gedrückt gehaltener linker Maustaste nach links oder rechts.

Um alle Methylierungsbereiche gleichzeitig zu ändern, halten Sie die "Shift"-Taste (Hochstell-Taste) gedrückt, während Sie einen der Bereiche ändern.

Beispiele für Bereiche des Methylierungs-Prozentsatzes:



1. Erwartete Methylierung = 100 %.
2. Erwartete Methylierung = 0–100 %.
3. Erwartete Methylierung = 30–70 % (voreingestellt)
4. Erwartete Methylierung = 0 %.

Um die Parameter der Registerkarten "Variable Positions" und "Analysis Parameters" auf ihre voreingestellten Werte zurückzusetzen, klicken Sie auf die Schaltfläche "Revert to Default" („Auf Voreinstellung zurücksetzen“).

Bearbeiten der Analyseparameter

Die voreingestellten Analyseparameter wurden so gewählt, dass sie bei den meisten Assays zu optimalen Analyseergebnissen führen. Falls erforderlich, können Sie die Ergebnisse während der Assay-Validierung eventuell verbessern, indem Sie die Analyseparameter bearbeiten:

- Bearbeiten der Analyseparameter in der "Analysis Parameters"-Registerkarte; siehe unten.
- Aktivieren oder Deaktivieren von Referenz-Peaks und Bisulfitbehandlungs-Kontrollen (nur bei CpG-Assays); siehe Seite 32.
- Einstellen der Höhe der Histogrammsäulen; siehe Seite 33.

- Aktivieren oder Deaktivieren variabler Positionen und/oder Ändern der erwarteten Methylierungsbereiche (nur bei CpG-Assays), siehe Abschnitt „Konfigurieren der variablen Positionen“ auf Seite 26.

Stellen Sie sicher, dass die Änderungen validiert sind; siehe Anhang B im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*.

Hinweis: Wenn Sie QIAGEN Kits verwenden, verwenden Sie die im jeweiligen Kit-Handbuch angegebenen Einstellungen.

Hinweis: Alle gespeicherten Änderungen werden protokolliert. Um das Änderungs-Protokoll für einen Assay anzuzeigen, öffnen Sie die Assay-Datei und klicken Sie auf „Show Change Log“ („Änderungs-Protokoll anzeigen“).

Bearbeiten der Analyseparameter in der „Analysis Parameters“-Registerkarte

In der „Analysis Parameters“-Registerkarte können Sie die folgenden Analyseparameter bearbeiten.

„Unsuccessful bisulfite treatment“ (nur bei CpG-Assays)

Diese Parameter geben den höchsten zulässigen Prozentsatz für nicht konvertierte Sequenzabschnitte an, um bei CpG-Stellen die Qualitätsbewertung „Passed“ („Bestanden“) bzw. „Check“ („Überprüfen“) zu erreichen. Die eingegebenen Werte werden mit dem Wert der Höhe von Einzelpeaks verglichen, die mit dem Auswertungsalgorithmus bestimmt werden.

„Allowed percentage for passed quality“

Der höchste zulässige Prozentsatz für nicht konvertierte Sequenzabschnitte, um bei CpG-Stellen die Qualitätsbewertung „Passed“ („Bestanden“) zu erreichen.

Der voreingestellte Wert ist 5 %.

Hinweis: Der Wert darf nicht höher sein als der Wert für „Allowed percentage for check quality“ („Zulässiger Prozentsatz für Qualitätsbewertung „Überprüfen““; siehe unten).

“Allowed percentage for check quality”

Der höchste zulässige Prozentsatz für nicht konvertierte Sequenzabschnitte, um bei CpG-Stellen die Qualitätsbewertung “Check” („Überprüfen“) zu erreichen. Die Warnung “Uncertain bisulfite conversion at dispensation: *number(s)*” („Unsichere Bisulfitkonversion bei Dispensierung: *Nummer(n)*“) wird während der Analyse ausgelöst.

Hinweis: Diese Regel wird nur angewandt, wenn die Qualitätsregel für “Passed” („Bestanden“) nicht erfüllt wird.

Ein höherer Prozentsatz für nicht konvertierte Sequenzabschnitte als der eingestellte Wert führt bei allen CpG-Stellen zur Qualitätsbewertung “Failed” („Fehlgeschlagen“). Die Warnung “Failed bisulfite conversion at dispensation: *number(s)*” („Unsichere Bisulfitkonversion bei Dispensierung: *Nummer(n)*“) wird während der Analyse ausgelöst.

Der voreingestellte Wert ist 7 %.

Hinweis: Der Wert darf nicht niedriger sein als der Wert für “Allowed percentage for passed quality” („Zulässiger Prozentsatz für Qualitätsbewertung ‚Bestanden‘“; siehe oben).

“Peak height threshold”

Mit diesen Parametern wird der untere Grenzwert der (Licht-)Intensität für eine einzelne Peakhöhe zu Beginn des Pyrogramms festgelegt.

“Required peak height for passed quality”

Die minimale Signalstärke für einen Peak, um bei variablen Positionen die Qualitätsbewertung “Passed” („Bestanden“) zu erreichen.

Der voreingestellte Wert ist 20.

Hinweis: Der Wert darf nicht niedriger sein als der Wert für “Required peak height for check quality” („Erforderliche Peakhöhe für Qualitätsbewertung ‚Überprüfen‘“; siehe unten).

“Required peak height for check quality”

Die minimale Signalstärke für einen Peak, um bei variablen Positionen die Qualitätsbewertung “Check” („Überprüfen“) zu erreichen. Die Warnung “Uncertain due to low peak height” („Aufgrund zu niedriger Peakhöhe unsicher“) wird während der Analyse ausgelöst.

Hinweis: Diese Regel wird nur angewandt, wenn die Qualitätsregel für “Passed” („Bestanden“) nicht erfüllt wird.

Der voreingestellte Wert ist 10.

Ist die Signalstärke bei einem Peak kleiner als der eingestellte Wert, führt dies bei den variablen Positionen zur Qualitätsbewertung “Failed” („Fehlgeschlagen“). Die Warnung “Failed due to low peak height” („Aufgrund zu niedriger Peakhöhe fehlgeschlagen“) wird während der Analyse ausgelöst.

Hinweis: Der Wert darf nicht höher sein als der Wert für “Required peak height for passed quality” („Erforderliche Peakhöhe für Qualitätsbewertung ‚Bestanden‘“; siehe oben).

“Stringency levels”

Die Stringenz für die Warnungen “Pattern deviation in variable positions” („Abweichung der Abfolge an variablen Positionen“) und “Sum deviation in variable positions” („Summenabweichung an variablen Positionen“) kann auf die Stufe “Low” („Niedrig“), “Normal” (voreingestellt) oder “High” („Hoch“) eingestellt werden. Ein hohes Stringenzniveau engt die zulässige Abweichung ein.

“Pattern deviation in variable positions”

Dieser Parameter beschreibt die Abweichung zwischen dem gemessenen Peakmuster an der variablen Position und dem theoretisch zu erwartenden Peakmuster.

Ist die Abweichung größer, als es das eingestellte Stringenzlevel erlaubt, wird die Warnung “Uncertain/Failed due to high pattern deviation in variable position” („Aufgrund zu großer Abweichung des Peakmusters an variabler Position unsicher/fehlgeschlagen“) während der Analyse ausgelöst. Ob in der Warnmeldung die Qualitätsbewertung “Check” („Überprüfen“) oder “Failed” („Fehlgeschlagen“) für das Analyseergebnis erscheint, hängt von der Größe der Abweichung ab.

“Sum deviation in variable positions”

Dieser Parameter entspricht der Abweichung zwischen der gemessenen Summe aller Peakhöhen an der variablen Position und der theoretisch zu erwartenden Summe (auf Basis der einzelnen Peakhöhen).

Ist die Abweichung größer, als es das eingestellte Stringenzlevel erlaubt, wird die Warnung “Uncertain/Failed due to high sum deviation in variable position” („Aufgrund zu großer Summen-Abweichung an variabler Position unsicher/fehlgeschlagen“) während der Analyse ausgelöst. Ob in der Warnmeldung die Qualitätsbewertung “Check” („Überprüfen“) oder “Failed” („Fehlgeschlagen“) für das Analyseergebnis erscheint, hängt von der Größe der Abweichung ab.

“Parameters”

“A-peak reduction factor”

Entspricht dem Faktor, um den die Intensitäten der A-Peaks multipliziert werden, um zu berücksichtigen, dass A-Peaks höher sind als die Peaks anderer Nukleotide.

Der voreingestellte Wert ist 0,90.

Um die Parameter der Registerkarten “Variable Positions” und “Analysis Parameters” auf ihre voreingestellten Werte zurückzusetzen, klicken Sie auf die Schaltfläche “Revert to Default” („Auf Voreinstellung zurücksetzen“).

Aktivieren oder Deaktivieren von Referenz-Peaks und Bisulfitbehandlungs-Kontrollen

Nicht variable Peaks, d. h. Peaks, die nicht zu einer variablen Position gehören (inklusive Dispensierungen von Leerproben), werden als „Referenz-Peaks“ bezeichnet. Diese Referenz-Peaks werden bei der Analyse zum einen als Referenz bei der Berechnung der Höhe der einzelnen Peaks und zum anderen als interne Kontrolle bei der Qualitätsbewertung verwendet. Für die bestmögliche Qualitätsbewertung der Analyseergebnisse empfiehlt es sich, die Referenz-Peaks, die von der Software generiert werden, aktiviert zu lassen.

Durch Anklicken der Raute über einem Referenz-Peak im Histogramm mit der linken Maustaste können Sie den Peak als Referenz-Peak aktivieren oder deaktivieren, je nachdem, welcher Zustand aktuell vorliegt. Die Raute zeigt den Status an:

- gefüllte blaue Raute: als Referenz-Peak aktiviert.
- leere blaue Raute: als Referenz-Peak deaktiviert.

Durch Anklicken der Raute über einer Bisulfitbehandlungs-Kontrolle mit der linken Maustaste (nur bei CpG-Assays), können Sie die Kontrolle als Kontroll- und/oder Referenz-Peak aktivieren oder deaktivieren, je nachdem, welcher Zustand aktuell vorliegt. Die Raute zeigt den Status an:

- gefüllte orangefarbene Raute: als Bisulfitbehandlungs-Kontrolle und als Referenz-Peak aktiviert.
- gefüllte blaue Raute: als Referenz-Peak aktiviert, aber als Bisulfitbehandlungs-Kontrolle deaktiviert.
- leere orangefarbene Raute: als Bisulfitbehandlungs-Kontrolle und als Referenz-Peak deaktiviert.

Wenn Sie den Mauszeiger über eine Raute bewegen, wird Ihnen in einer Quickinfo angezeigt, welchen Status Sie mit einem Mausklick einstellen können.

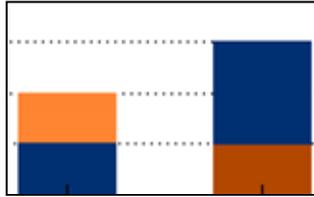
Hinweis: Um zwischen dem Einblenden und Ausblenden der Referenz-Peaks im Histogramm zu wechseln, klicken Sie mit der rechten Maustaste ins Histogramm und wählen Sie die Option "Show Reference Peaks" („Referenz-Peak anzeigen“) aus dem Kontextmenü.

Einstellen der Höhe der Histogrammsäulen

Diese Funktion kann verwendet werden, wenn sich bei früheren Analysen wiederholt eine Abweichung des gemessenen Peakmusters von dem theoretischen Muster gezeigt hat. Diese Funktion sollten Sie mit Bedacht einsetzen.

1. **Klicken Sie – bei gedrückt gehaltener "Ctrl"-Taste („Strg“-Taste) – mit der linken Maustaste auf die Spitze der Histogrammsäule (klicken Sie, wenn die Form des Mauszeigers vom weißen Pfeil zum Hand-Symbol  wechselt).**
2. **Geben Sie die Höhe entweder in dem sich öffnenden Textfeld ein, oder erhöhen oder reduzieren Sie die Höhe durch Anklicken der Pfeile neben dem Textfeld.**
3. **Um die neu eingestellte Höhe zu übernehmen, drücken Sie die "Enter"-Taste (Eingabe-Taste).**

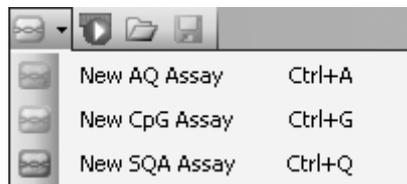
Hinweis: Anstatt „Nichtstandard“-Methylierungsmuster aus der zu analysierenden Sequenz zu entfernen, zum Beispiel Methylierungen von Cs, auf die keine Gs folgen, stellen Sie die erwartete Höhe der Gs auf Null („0“) ein.



Hellorange = Höhe herabgesetzt
 Dunkelorange = Höhe heraufgesetzt

Konfigurieren eines SQA-Assays

Durchführung



1. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste und wählen Sie die Funktion "New AQ Assay" („Neuer SQA-Assay“). Eine neue Assay-Datei wird angelegt.
2. Geben Sie die Dispensier-Reihenfolge ein (siehe Seite 35).
3. Optional: Geben Sie Anmerkungen zum Assay in dem "Assay Note"-Textfeld ein.
4. Bevor Sie Ihre Proben analysieren, validieren Sie Ihren Assay unter Verwendung einer Referenz-DNA-Probe (siehe Anhang B im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*).
5. Optional: Falls erforderlich, ändern Sie die Analyseparameter bei der Assay-Validierung (siehe Seite 35).
6. Optional: Sperren Sie den Assay für weitere Bearbeitung, indem Sie auf die Schaltfläche "Lock Assay" („Assay sperren“) unten im "Assay Setup"-Fenster klicken. Ein gesperrter Assay () , der auf dem PyroMark Q24 MDx Gerät ausgeführt wurde, kann nicht mehr entsperrt werden (d. h. nach Abarbeitung des Assays ist es nicht mehr möglich, die Analyseparameter oder -ergebnisse zu bearbeiten).

Hinweis: Im Verknüpfungs-Browser können Sie eine neue Assay-Datei anlegen, indem Sie auf den Ordner, in dem die Datei gespeichert werden soll, doppelklicken und dann aus dem Kontextmenü erst die Option "New Assay" („Neuer Assay“) und dann den gewünschten Assay-Typ wählen. Geben Sie den Dateinamen ein und drücken Sie die "Enter"-Taste (Eingabe-Taste). Um eine

Verknüpfung zu einem Ordner oder Laufwerk hinzuzufügen, klicken Sie auf "Add Folder Shortcut" („Verknüpfung zu Ordner hinzufügen“).

Hinweis: Eine Anmerkung zum Assay kann im Verknüpfungs-Browser als Quickinfo angezeigt werden. Bewegen Sie dazu den Mauszeiger über die Assay-Datei.

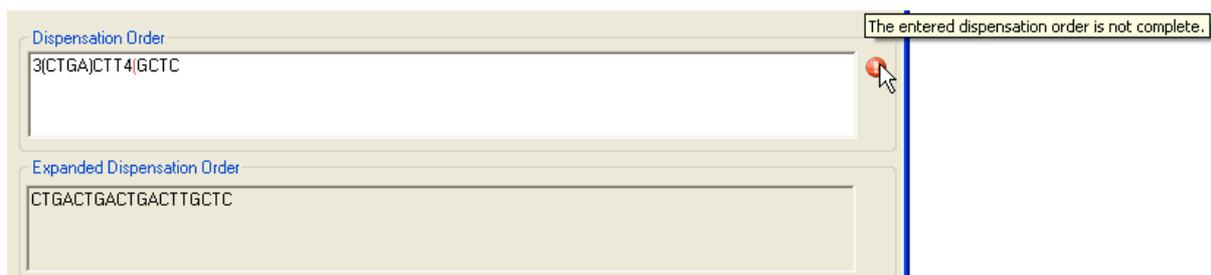
Hinweis: Um die Datei zu speichern, klicken Sie auf das Disketten-Symbol  in der Werkzeugleiste. Falls die Datei bislang noch nicht gespeichert wurde, wählen Sie in dem sich öffnenden Dialogfenster den Speicherort und geben Sie den Dateinamen ein.

Eingeben der Dispensier-Reihenfolge

Tippen Sie die Dispensier-Reihenfolge in das "Dispensation Order"-Textfeld ein oder fügen Sie sie über die Tastenkombination "Ctrl+V" („Strg" + „V“) ein. Halten Sie bei der Eingabe der Dispensier-Reihenfolge in die Software die folgenden Regeln ein:

- Die zulässigen Buchstaben bei der Eingabe sind: A, C, G und T.
- Für die wiederholte Eingabe einer Basenabfolge verwenden Sie Zahlen in Kombination mit runden Klammern, z. B. „3(CTGA)“ entspricht der Reihenfolge „CTGACTGACTGA“.

Falls die Dispensier-Reihenfolge einen Fehler enthält, wird dies durch ein rotes Ausrufezeichen am Ende des Textfelds angezeigt. Wenn Sie den Mauszeiger über das Ausrufezeichen bewegen, wird eine Quickinfo mit Erklärung des Fehlers eingeblendet. Das oder die Zeichen, die den Fehler verursachen, werden in der Dispensier-Reihenfolge rot markiert.



Der Fehler "The entered dispensation order is not complete" („Die eingegebene Dispensier-Reihenfolge ist unvollständig“) wird durch eine fehlende oder falsch positionierte Klammer verursacht. In diesem Beispiel fehlt die schließende runde Klammer.

Bearbeiten der Analyseparameter

Die voreingestellten Analyseparameter wurden so gewählt, dass sie bei den meisten Assays zu optimalen Analyseergebnissen führen. Falls erforderlich, können Sie die Ergebnisse während der Assay-Validierung eventuell verbessern, indem Sie die Analyseparameter bearbeiten:

- Der Wert für das "Quality Control Window" („Qualitätskontroll-Fenster“) in der "Settings"-Registerkarte („Einstellungen“) ist standardmäßig auf 20 eingestellt. Falls mehr oder weniger Basen erforderlich sind, ändern Sie den Wert entsprechend.
- Bearbeiten der Analyseparameter in der "Analysis Parameters"-Registerkarte; siehe unten.

Stellen Sie sicher, dass die Änderungen validiert sind; siehe Anhang B im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*.

Hinweis: Wenn Sie QIAGEN Kits verwenden, verwenden Sie die im jeweiligen Kit-Handbuch angegebenen Einstellungen.

Hinweis: Alle gespeicherten Änderungen werden protokolliert. Um das Änderungs-Protokoll für einen Assay anzuzeigen, öffnen Sie die Assay-Datei und klicken Sie auf "Show Change Log" („Änderungs-Protokoll anzeigen“) am unteren Ende des "Assay Setup"-Fensters.

Bearbeiten der Analyseparameter in der "Analysis Parameters"-Registerkarte

In der "Analysis Parameters"-Registerkarte können Sie die folgenden Analyseparameter bearbeiten.

"Peak height threshold"	Diese Parameter legen den unteren Grenzwert der (Licht-)Intensität für eine einzelne Peakhöhe zu Beginn des Pyrogramms fest.
"Required peak height for passed quality"	Die minimale Signalstärke für einen Peak, um in der basenzugeordneten Sequenz die Qualitätsbewertung "Passed" („Bestanden“) zu erreichen. Der voreingestellte Wert ist 10. Hinweis: Der Wert darf nicht niedriger sein als der Wert für "Required peak height for check quality" („Erforderliche Peakhöhe für Qualitätsbewertung „Überprüfen““; siehe unten).

“Required peak height for check quality”

Die minimale Signalstärke für einen Peak, um in der basenzugeordneten Sequenz die Qualitätsbewertung “Check” („Überprüfen“) zu erreichen. Die Warnmeldung “Uncertain due to low peak height” („Aufgrund zu niedriger Peakhöhe unsicher“) wird während der Analyse ausgelöst.

Hinweis: Diese Regel wird nur angewandt, wenn die Qualitätsregel für “Passed” („Bestanden“) nicht erfüllt wird.

Der voreingestellte Wert ist 5.

Ist die Signalstärke bei einem Peak kleiner als der eingestellte Wert, führt dies zur Qualitätsbewertung “Failed” („Fehlgeschlagen“). Die Warnmeldung “Failed due to low peak height” („Aufgrund zu niedriger Peakhöhe fehlgeschlagen“) wird während der Analyse ausgelöst.

Hinweis: Der Wert darf nicht höher sein als der Wert für “Required peak height for passed quality” („Erforderliche Peakhöhe für Qualitätsbewertung ‚Bestanden‘“; siehe oben).

“Parameters”

“A-peak reduction factor”

Entspricht dem Faktor, um den die Intensitäten der A-Peaks multipliziert werden, um zu berücksichtigen, dass A-Peaks höher sind als die Peaks anderer Nukleotide.

Der voreingestellte Wert ist 0,90.

“Plus shift compensation”

Wenn diese Option aktiviert ist, werden die Peaks bei einer Positiv-Verschiebung kompensiert.

“Minus shift compensation”

Wenn diese Option aktiviert ist, werden die Peaks bei einer Negativ-Verschiebung kompensiert.

“Stringent homopolymer scoring”

Wenn diese Option aktiviert ist, werden strengere Regeln für die Qualitätsbewertung von Homopolymeren angewandt. Die Warnung “Peak height deviates from the expected peak level at dispensation: *number(s)*” („Abweichung der Peakhöhe von der erwarteten Peakhöhe bei Dispensierung: *Nummer(n)*“) wird während der Analyse ausgelöst.

“Known bases”

Falls Basen in der Dispensier-Reihenfolge bekannt sind, empfiehlt es sich, diese einzugeben, da dies die Analyse verbessern könnte:

1. Klicken Sie die Base mit der linken Maustaste in der Dispensier-Reihenfolge an und geben Sie in dem sich öffnenden Textfeld die Höhe entweder von Hand ein oder erhöhen oder reduzieren Sie die Höhe, indem Sie auf die Pfeile neben dem Textfeld klicken.
2. Um die neu eingestellte Höhe zu übernehmen, drücken Sie die “Enter”-Taste (Eingabe-Taste).

Um die Parameter der Registerkarten “Settings” und “Analysis Parameters” auf ihre voreingestellten Werte zurückzusetzen, klicken Sie auf die Schaltfläche “Revert to Default” („Auf Voreinstellung zurücksetzen“).

Konfigurieren eines Laufs

Ablauf

1. **Klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste. Eine neue Laufdatei wird angelegt.**
2. **Geben Sie die Laufparameter ein (siehe Seite 39).**
3. **Konfigurieren Sie die Platte (d. h. ordnen Sie einen Assay zu und geben Sie, falls gewünscht, eine Probenkennung und eine Anmerkung für jedes benutzte Well ein); siehe Seite 40.**
4. **Wenn die Datei für den Lauf erstellt und für den Lauf auf dem PyroMark Q24 MDX Gerät bereit ist:**

Um die Platten-Konfiguration und eine Auflistung der erforderlichen Volumina Enzymgemisch, Substratgemisch und Nukleotiden auszudrucken, wählen Sie die Option “Pre Run Information” aus dem “Tools”-Menü und klicken Sie auf das Drucker-Icon , sobald sich der Bericht öffnet.

Schließen Sie anschließend die Laufdatei und kopieren Sie sie mithilfe des Windows® Explorers auf einen der zum System gehörenden USB-Sticks. Um den Windows Explorer zu öffnen, klicken Sie im Verknüpfungs-Browser mit der rechten Maustaste auf den Ordner, in dem die Laufdatei enthalten ist, und wählen Sie die Option “Explore” („Durchsuchen“) aus dem Kontextmenü. Um weitere Informationen zu erhalten, drücken Sie die „F1“-Taste, um die Windows Online-Hilfe zu öffnen.

Die Verarbeitung der fertigen Platte mit dem PyroMark Q24 MDx Gerät wird gemäß den Schritten auf Seite 46 durchgeführt.

Hinweis: Wenn Sie den “Pre Run Information”-Bericht in Farbe ausdrucken möchten, aktivieren Sie die Option “Print background colors and images”

(„Hintergrundfarben und -bilder drucken“) im Internet Explorer (unter „Tools/Internet Options/Advanced/Printing“ bzw. „Extras/Internetoptionen/Erweitert/Wird gedruckt“).

Hinweis: Im Verknüpfungs-Browser können Sie eine neue Laufdatei anlegen, indem Sie mit der rechten Maustaste den gewünschten Ordner anklicken und „New Assay“ („Neuer Assay“) aus dem Kontextmenü wählen. Geben Sie den Dateinamen ein und drücken Sie die „Enter“-Taste (Eingabe-Taste). Um eine Verknüpfung zu einem Ordner oder Laufwerk hinzuzufügen, klicken Sie auf „Add Folder Shortcut“ („Verknüpfung zu Ordner hinzufügen“).

Hinweis: Wenn Sie als Ausgangsdatei für Ihren Lauf eine frühere Laufdatei verwenden möchten, klicken Sie im Verknüpfungs-Browser mit der rechten Maustaste auf die bereits abgearbeitete Laufdatei und wählen Sie die Funktion „Copy and Rerun“ („Kopieren und erneut ausführen“) aus dem Kontextmenü. Daraufhin wird nur die in dieser Laufdatei gespeicherte Konfiguration kopiert – nicht die Lauf- und Analysedaten.

Hinweis: Um die Datei zu speichern, klicken Sie auf das Disketten-Symbol  in der Werkzeugleiste. Falls die Datei bislang noch nicht gespeichert wurde, wählen Sie in dem sich öffnenden Dialogfenster den Speicherort und geben Sie den Dateinamen ein.

Eingeben der Laufparameter

Die folgenden Laufparameter sind verfügbar.

“Run name” („Laufname“)	Der Name des Laufs wird beim Speichern der Datei vergeben. Ein Umbenennen der Datei ändert auch den Namen des Laufs.
“Instrument method” („Gerätemethode“)	Wählen Sie die Gerätemethode entsprechend den Reagenzien und der Kartusche, die beim Lauf verwendet werden (siehe den Abschnitt „Verwalten der Gerätemethoden“ auf Seite 65). Hinweis: Es wird empfohlen, nur die von QIAGEN bereitgestellten Methoden zu verwenden.
“Plate ID” („Plattenkennung“)	Optional: Geben Sie die Kennung der PyroMark Q24 Platte ein. Hinweis: Wenn Sie den Mauszeiger im Verknüpfungs-Browser über eine Laufdatei bewegen, wird die eingegebene Plattenkennung in einer Quickinfo eingeblendet.

- “Barcode” **Optional:** Geben Sie die Barcode-Nummer der Platte ein oder, falls Sie einen Barcode-Scanner an Ihrem Computer angeschlossen haben, gehen Sie mit dem Maus-Cursor auf das “Barcode”-Textfeld und scannen Sie den Barcode ein.
- “Reagent ID” („Reagenzienkennung“) **Optional:** Geben Sie die Chargennummer (“lot number“) der verwendeten PyroMark Gold Q24 Reagenzien ein. Die Chargennummer finden Sie auf dem Etikett auf der Kit-Verpackung.
Hinweis: Wir empfehlen, die Reagenzienkennung einzugeben, sodass bei unerwarteten Problemen die Reagenzien rückverfolgt werden können.
- “Estimated run time” Gibt die geschätzte Dauer des Laufs an.
- “Run note” **Optional:** Geben Sie eine Anmerkung zum Inhalt oder Zweck des Laufs ein.

Zuordnen von Assay-Dateien zu einer Platte

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

- die Assay-Datei im Verknüpfungs-Browser auswählen und ihn mit gedrückt gehaltener linker Maustaste zu dem gewünschten Well ziehen („Drag-and-drop“) oder
- das Well mit der rechten Maustaste anklicken und die Funktion “Load Assay” („Assay laden“) aus dem Kontextmenü auswählen.

Hinweis: Um einen Assay mehreren Wells zuzuordnen, wählen Sie die Wells aus (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19) und ziehen Sie mit gedrückter Maustaste den Assay auf diese Auswahl.

Hinweis: Es ist nicht möglich, einen Assay ohne eine Dispensier-Reihenfolge oder zwei (oder mehr) Assays mit demselben Namen – aber unterschiedlicher Dispensier-Reihenfolge – zuzuordnen.

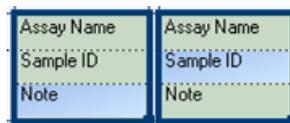
Plate Setup						
	1	2	3	4	5	6
A	AQ assay 1	AQ assay 2	CpG assay 1	CpG assay 2	SQA assay 1	SQA assay 2

Ein Well wird gemäß dem zugeordneten Assay farblich markiert.

Probenkennungen und Anmerkungen eingeben

- Um eine Probenkennung oder eine Anmerkung einzugeben, wählen Sie die betreffende Tabellenzelle (siehe Abbildung unten) und geben den Text ein.
- Um eine Probenkennung oder einen Hinweis zu ändern, wählen Sie entweder die betreffende Zelle aus (der aktuelle Inhalt der jeweiligen Zelle wird angezeigt) oder doppelklicken Sie auf die Zelle.
- Zum Importieren eines Probenkennungs- und Anmerkungs-Textlayouts, das zuvor in einer separaten Textdatei (Format: *.tsv oder *.csv) definiert wurde, klicken Sie mit der rechten Maustaste ein Well an und wählen die Option "Insert Sample Layout File" („Einfügen einer Probenkennungs-Layoutdatei“) aus dem Kontextmenü. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Externes Definieren von Probenkennungs- und Anmerkungsformat“ auf Seite 43.
- Um ein Probenkennungs-Layout aus der Zwischenablage einzufügen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf ein Well und wählen Sie die Option "Paste Sample Layout" („Probenkennungs-Layout einfügen“) aus dem Kontextmenü. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Externes Definieren von Probenkennungs- und Anmerkungsformat“ auf Seite 43.

Hinweis: Die Zeichen Komma (,) und Semikolon (;) werden nicht unterstützt.



Assay Name	Assay Name
Sample ID	Sample ID
Note	Note

Eine ausgewählte Zelle wird mit einer blauen Hintergrundfarbe hervorgehoben.

Kopieren oder Löschen von Zelleninhalten

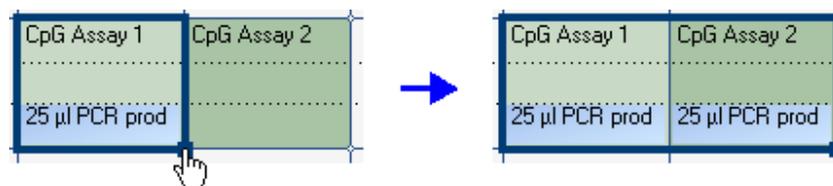
- Um den Inhalt aus einer Tabellenzelle auszuschneiden und in die Zwischenablage zu speichern, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die Zelle und wählen die Option "Cut" („Ausschneiden“) aus dem Kontextmenü.
- Um den Inhalt einer Zelle in die Zwischenablage zu kopieren, klicken Sie die Zelle entweder mit der rechten Maustaste an und wählen "Copy Cell" („Zelle kopieren“) aus dem Kontextmenü oder wählen die Zelle aus und drücken die Tastenkombination "Ctrl" + "C" („Strg" + „C“).
- Zum Einfügen des Inhalts der Zwischenablage in eine Zelle oder eine Auswahl von Zellen (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19) klicken Sie die Zelle oder Auswahl von Zellen entweder mit der rechten Maustaste an und wählen "Paste" („Einfügen“) aus dem Kontextmenü oder wählen die Zelle(n) aus und drücken die Tastenkombination "Ctrl" + "V" („Strg" + „V“).

- Zum Löschen eines oder mehrerer Assays, der Probenkennungen oder Anmerkungen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die betreffende Zelle oder Auswahl an Zellen und wählen "Delete" („Löschen“) aus dem Kontextmenü oder wählen die Zelle(n) aus und drücken die "Delete"-Taste („Entf“-Taste).

Kopieren von Zelleninhalten per Drag-and-drop zu anderen Wells

Um den Inhalt einer Zelle per Drag-and-drop zu anderen Wells zu kopieren, gehen Sie wie folgt vor:

1. Wählen Sie die Zelle aus, die Sie kopieren möchten.
2. Bewegen Sie den Mauszeiger über das untere rechte Quadrat des Auswahlrahmens und halten Sie die linke Maustaste gedrückt, während Sie die Maus bewegen, um die Auswahl zu erweitern.
3. Sobald Sie die linke Maustaste loslassen, werden die Inhalte der zuerst markierten Zelle in die ausgewählten Zellen eingefügt.



Die Anmerkung "25 µl PCR prod" wird per Drag-and-drop kopiert.

Kopieren per Drag-and-drop und Erhöhen der Probenkennung

Falls der letzte Teil einer eingegebenen Probenkennung eine Zahl ist, kann diese Zahl erhöht werden, wenn die Probenkennung per Drag-and-drop kopiert wird:

1. Wählen Sie die Zelle mit der Probenkennung aus.

2. Inkrementelle Erhöhung nach Zeilen:

Bewegen Sie den Mauszeiger über das untere rechte Quadrat des Auswahlrahmens.

Halten Sie die "Ctrl"-Taste („Strg“-Taste) und linke Maustaste gleichzeitig gedrückt, während Sie die Maus bewegen, um die Auswahl zu erweitern.

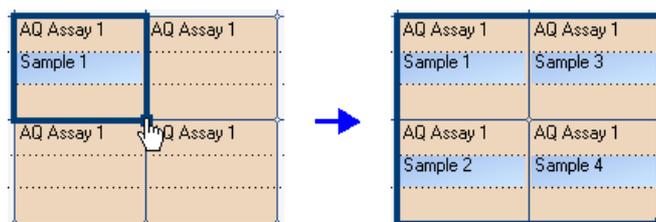
Lassen Sie zuerst die linke Maustaste und dann die "Ctrl"-Taste („Strg“-Taste) los. Sobald Sie die linke Maustaste loslassen, wird die Probenkennung der zuerst markierten Zelle inkrementell erhöht und in die ausgewählten Zellen eingefügt.

3. Inkrementelle Erhöhung nach Spalten:

Bewegen Sie den Mauszeiger über das untere rechte Quadrat des Auswahlrahmens.

Halten Sie die "Shift"- (Hochstell-) und "Ctrl"-Taste („Strg“-Taste) sowie die linke Maustaste gleichzeitig gedrückt, während Sie die Maus bewegen, um die Auswahl zu erweitern.

Lassen Sie zuerst die linke Maustaste und dann die Hochstell- und "Ctrl"-Taste („Strg“-Taste) los. Sobald Sie die linke Maustaste loslassen, wird die Probenkennung der zuerst markierten Zelle inkrementell erhöht und in die ausgewählten Zellen eingefügt.



Die Probenkennung "Sample 1" wird kopiert und nach Spalten inkrementell erhöht.

Ausdrucken oder Exportieren der Platten-Konfiguration als Bild

Die Platten-Konfiguration kann ausgedruckt werden oder als Bild in die Zwischenablage kopiert werden, indem Sie die Platte mit der rechten Maustaste anklicken und die Option "Print" („Drucken“) oder "Copy as Image" („Als Bild kopieren“) aus dem Kontextmenü wählen. Das Bild kann anschließend in Programmen eingefügt werden, die das EMF-Bildformat („Enhanced Metafile“) unterstützen.

Externes Definieren von Probenkennungs- und Anmerkungsformat

Mithilfe der Funktion "Import/Insert Sample Layout File" („Probenkennungs-Layoutdatei importieren/einfügen“) oder "Paste Sample Layout" („Probenkennungs-Layout einfügen“) können Sie auf einfache Weise dasselbe Layout auf verschiedene Läufe anwenden und die in vorhandenen Dokumenten verfügbaren Informationen wiederverwenden.

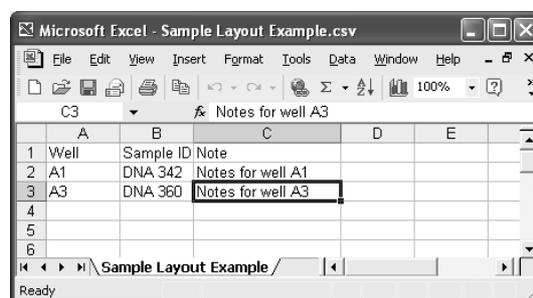
Verwendung der Funktion "Import/insert sample layout file"

Beispielsweise können Sie Layoutdateien in Ihrem Laborinformations-Managementssystem (LIMS) erstellen. Probenkennungs- und Anmerkungs-Layoutdateien können auch in Microsoft Excel, Notepad und ähnlichen Programmen erzeugt werden. Die Layoutdatei muss folgende zwei oder drei Spalten aufweisen: "Well", "Sample ID" („Probenkennung“) und "Note" („Anmerkung“; optional). Als Trennzeichen zwischen Spalten muss ein Tabstopp, Komma oder Semikolon verwendet werden, und jede Reihe muss

durch einem Zeilenumbruch begrenzt werden. Speichern Sie die Datei als Tabstopp- oder Komma-getrennte Textdatei (Format: *.tsv, *.txt oder *.csv).

Die Probenkennungs- und Anmerkungs-Layoutdatei kann importiert werden in:

- eine vorhandene Laufdatei: durch Klicken mit der rechten Maustaste auf ein Well in der "Plate Setup"-Registerkarte und Wählen der Option "Insert Sample Layout File" („Probenkennungs-Layoutdatei einfügen“) aus dem Kontextmenü; oder
- eine neue Laufdatei: durch Wählen der "Import"-Funktion, gefolgt von der Option "Create New Run from Sample Layout File" („Neuen Lauf aus Probenkennungs-Layoutdatei erstellen“) aus dem "File"-Menü („Datei“-Menü).



Beispiel für eine in Microsoft Excel erstellte Probenkennungs- und Anmerkungs-Layoutdatei.

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

Das Ergebnis nach Import der zuvor abgebildeten Probenkennungs- und Anmerkungs-Layoutdatei.

Verwendung der Funktion "Paste sample layout"

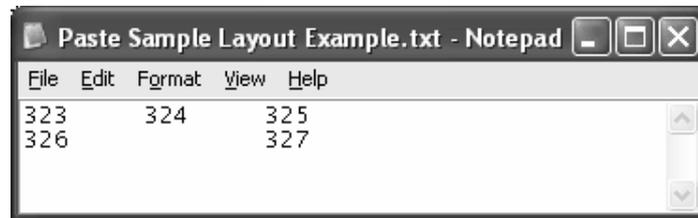
Sie können Layouts zum Beispiel in Ihrem LIMS erstellen und daraus kopieren. Probenkennungs-Layouts können aus Microsoft Excel, Word, Notepad und ähnlichen Programmen kopiert werden. In der Quelldatei muss jede Spalte mit Probenkennungen durch einen Tabstopp und jede Reihe durch einen Zeilenumbruch begrenzt werden.

Gehen Sie zum Einfügen eines Probenkennungs-Layouts in eine bestehende Laufdatei wie folgt vor:

1. Kopieren Sie sämtliche Informationen in der Quelldatei.

2. Klicken Sie in der "Plate Setup"-Registerkarte auf ein Well und wählen Sie die Option "Paste Sample Layout" („Probenkennungs-Layout einfügen“) aus dem Kontextmenü.

Die Software fügt daraufhin die Probenkennungen beginnend mit dem Well A1 in die Platte ein. (Falls Anmerkungen zu den Wells eingegeben wurden, bleiben diese erhalten.)



Beispiel für ein in Microsoft Notepad erstelltes Probenkennungs-Layout.

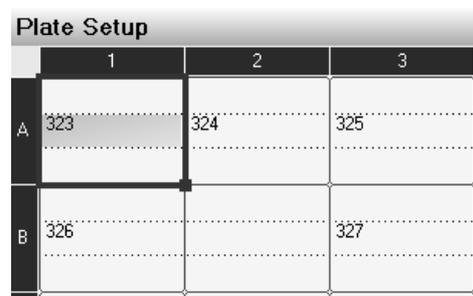


Plate Setup			
	1	2	3
A	323	324	325
B	326		327

Das Ergebnis nach Kopieren und Einfügen des in Microsoft Notepad erstellten Probenkennungs-Layout.

Überprüfen der Platten-Konfiguration

Der Bereich "Well Information" zeigt die folgenden Informationen zu einem Well an, das in der "Plate Setup"-Registerkarte ausgewählt wird:

- Well-Bezeichnung
- Assay-Typ (AQ, CpG oder SQA)
- Assay-Bezeichnung
- Probenkennung (falls eingegeben)
- zu analysierende Sequenz (bei AQ- und CpG-Assays)
- Dispensier-Reihenfolge
- Anmerkung zum Well (falls eingegeben)

Werden mehrere Wells in der "Plate Setup"-Registerkarte ausgewählt, dann werden die Informationen für das erste der ausgewählten Wells angezeigt.

Durchführung eines Analyselaufs mit dem PyroMark Q24 MDx Thermocycler

Ablauf

Die Durchführung eines Laufs mit einer konfigurierten, gebrauchsfertigen Laufdatei mit dem PyroMark Q24 MDx Thermocycler erfolgt in den folgenden Schritten:

- 1. Bereiten Sie Ihre Proben vor.**
- 2. Befüllen Sie die PyroMark Q24 Kartusche mit den erforderlichen Volumina an Reagenzien.**
- 3. Setzen Sie die Reagenzienkartusche und die PyroMark Q24 Platte in das Gerät ein.**
- 4. Stecken Sie den USB-Stick mit der Laufdatei in den USB-Anschluss auf der Vorderseite des Geräts.**
- 5. Wählen Sie die Laufdatei aus und starten Sie den Analyselauf.**
- 6. Entnehmen Sie den USB-Stick, nachdem der Lauf beendet ist und die Daten auf den USB-Stick übertragen worden sind.**
- 7. Entnehmen Sie die Platte und die Reagenzienkartusche.**

Weitere Informationen zum Vorgehen nach Laufende finden Sie in Abschnitt 5.5 im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*.

Auswertung des Laufs

Ablauf

1. Kopieren Sie die abgearbeitete Laufdatei von dem USB-Stick auf einen Computer, auf dem die PyroMark Q24 MDx Software installiert ist; stecken Sie dazu den USB-Stick in den USB-Anschluss des Computers und kopieren Sie die Laufdatei mithilfe des Windows Explorers an den gewünschten Speicherort.
2. Öffnen Sie die Laufdatei in der PyroMark Q24 MDx Software: Wählen Sie dazu entweder die Funktion "Open" („Öffnen“) im Menü "File" („Datei“) oder doppelklicken Sie auf die Datei (🗑️) im Verknüpfungs-Browser. Falls verschiedene Assay-Typen zugeordnet sind, wählen Sie den Analysemodus im sich öffnenden Dialogfenster.
Hinweis: Zum Aktualisieren des Inhalts in einem Ordner klicken Sie ihn im Verknüpfungs-Browser mit der rechten Maustaste an und wählen die Option "Refresh" („Aktualisieren“) aus dem Kontextmenü.
Hinweis: Sie können die Laufdatei auch durch Doppelklicken im Windows Explorer öffnen.
3. Werten Sie den Lauf aus (siehe unten).
4. Zeigen Sie die Analyseergebnisse an (siehe Seite 48).
5. Optional: Ändern Sie gegebenenfalls den Analysemodus (siehe Seite 52).
6. Optional: Geben Sie auf der "Overview"-Registerkarte in dem Textfeld "Note" eine Anmerkung zu der Analyse ein.
Hinweis: Um das "Note"-Textfeld zu erweitern oder zu reduzieren, klicken Sie auf „+“ oder „-“.
7. Um die Analyseergebnisse zu speichern, klicken Sie auf das Disketten-Symbol  in der Werkzeugleiste.

Hinweis: Bei einem gesperrten Assay (🔒) ist es nicht möglich, die Analyseparameter zu bearbeiten oder eine Anmerkung zur Analyse einzugeben.

Analyse aller oder ausgewählter Wells

Auf der "Overview"-Registerkarte stehen zwei Möglichkeiten der Analyse zur Verfügung:



Analyse aller Wells mit einer gültigen Analyse-Konfiguration für den aktuellen Analysemodus.



Analyse der ausgewählten Wells (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19).

Hinweis: Sie können auch die markierten Wells mit der rechten Maustaste anklicken und die Option „Analyze Selected“ („Auswahl analysieren“) aus dem Kontextmenü wählen.

Während der Analyse wird ein Fortschritts-Dialogfenster angezeigt. Dieses Dialogfenster enthält einen Fortschrittsbalken und eine „Stop“-Schaltfläche, außerdem wird die Bezeichnung des gerade analysierten Wells angezeigt. Die Analyse kann durch Klicken auf „Stop“ abgebrochen werden.

Hinweis: Nach Abschluss der Analyse eines Wells ändert sich dessen Farbe zu Hellblau.

Analysemodi

Die PyroMark Q24 MDx Software verfügt über drei Analysemodi: AQ, CpG und SQA. Um zwischen den Modi hin- und herzuschalten, wählen Sie „AQ“, „CpG“ oder „SQA“ in der Werkzeugleiste. Auf Genotypisierungen von SNPs und Insertionen/Deletionen („InDels“) kann aus dem „Reports“-Menü im AQ-Modus zugegriffen werden.



Hinweis: Da die automatische Analyse von SNPs im CpG-Modus nicht unterstützt wird, werden der Prozentsatz der Methylierung und die Qualitätsbewertungen nur für die CpG-Stellen bestimmt. SNPs können in einem CpG-Assay im AQ-Modus unter Verwendung der zu analysierenden Sequenz, die in der CpG-Assay-Konfiguration eingegeben wurde, analysiert werden. Um die CpG-Stellen von den SNP-Berichten auszuschließen, wählen Sie die „Analysis Setup“-Registerkarte und deaktivieren Sie die Option „Analyse“ für diese Positionen in der „Variable Positions“-Registerkarte.

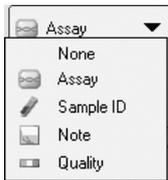
Anzeigen der Analyseergebnisse

Durch Auswahl eines analysierten Wells (hellblau) in der „Overview“-Registerkarte werden das zugehörige Pyrogramm (im Pyrogramm-Bereich des Bildschirms) und die Informationen zu dem Well (inklusive Warnmeldungen während der Analyse; im Bereich „Well Information“) angezeigt. Werden mehrere Wells in der Platten-Übersichtsdarstellung ausgewählt, dann werden die Informationen für die Wells mit dem orangefarbenen Auswahl-Rahmen angezeigt.

Überblick über die Ergebnisse

Die folgenden Well-Informationen können in der Platten-Übersicht auf der "Overview"-Registerkarte eingesehen werden:

AQ-Assays



Zeigt den Namen des Assays an.



Zeigt die Probenkennung an.

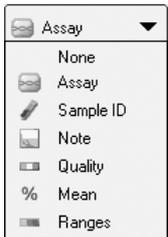


Zeigt die Anmerkung zu dem Well an.



Zeigt die Qualität in der Balkendarstellung an. Der Qualitätsbalken zeigt die Qualitätsbewertung aller variablen Positionen in dem Well oder die aller Basen in der basenzugeordneten Sequenz an. Siehe die Farblegende auf Seite 50.

CpG-Assays



Zeigt den mittleren Methylierungs-Prozentsatz aller CpG-Stellen in dem Well an.



Zeigt den Methylierungsbalken an. Der Methylierungsbalken zeigt den Methylierungs-Prozentsatz für jede CpG-Stelle in dem Well an. Siehe die Farblegende auf Seite 51.

SQA-Assays



Zeigt die Qualitätsbewertung am Ende des Qualitätskontroll-Fensters an. Die voreingestellte Anzahl der berücksichtigten Basen beträgt 20.

Hinweis: Wells mit einem hohen Substrat-Peak werden in der Platten-Übersicht mit einem Info-Icon (i) markiert. Die Qualitätsbewertungen werden dadurch nicht beeinträchtigt.

Hinweis: Falls Analyseparameter, Qualitätsbewertungen oder Analyseergebnisse (nur bei SQA-Assays) vom Anwender bearbeitet wurden, wird das betreffende Well mit einem Warnungs-Icon (⚠) gekennzeichnet.

Hinweis: Falls ein Assay gesperrt ist, wird das Well mit dem Schloss-Icon (🔒) markiert.

Ausdrucken oder Exportieren der Platten-Übersicht als Bild

Die Platten-Übersicht kann ausgedruckt werden oder als Bild in die Zwischenablage kopiert werden, indem Sie die Platten-Übersicht mit der rechten Maustaste anklicken und die Option "Print" („Drucken“) oder "Copy as Image" („Als Bild kopieren“) aus dem Kontextmenü wählen. Das Bild kann anschließend in Programmen eingefügt werden, die das EMF-Bildformat („Enhanced Metafile“) unterstützen.

Warnmeldungen während der Analyse

Durch Auswahl eines analysierten (hellblauen) Wells werden die Analyse-Warnmeldungen (sofern welche auftraten) im Bereich "Well Information" angezeigt. Eine Analyse-Warnmeldung hat folgende Auswirkungen auf die Qualitätsbewertung:

- AQ- und CpG-Assays: Die Qualitätsbewertung für alle variablen Positionen oder eine einzelne Position ist betroffen. Falls mehrere Warnmeldungen derselben Art ausgelöst wurden, werden nur die gravierendsten im "Well Information"-Bereich angezeigt.
- SQA-Assays: Die Qualitätsbewertung für die gesamte Sequenz oder ab einer bestimmten Dispensierung (in Vorwärtsrichtung) ist betroffen. Alle innerhalb des Qualitätskontroll-Fensters ausgelösten Warnmeldungen werden im "Well Information"-Bereich angezeigt.

Für einige der Warnmeldungen können die Kriterien für deren Auftreten und Auswirkung auf die Qualitätsbewertung in der "Analysis Parameters"-Registerkarte vom Anwender modifiziert werden; siehe den Abschnitt „Bearbeiten der Analyseparameter“ auf Seite 52.

Hinweis: Wenn ein Fehler bei der Dispensierung auftritt, wird empfohlen, die Reagenzienkartusche auszutauschen.

Qualitätsbewertungen

Die Qualitätsbewertungen der Analyseergebnisse werden angezeigt durch:

- Qualitätsbalken (🇪🇺) in der Platten-Übersichtsdarstellung (siehe Seite 49);
- die Hintergrundfarbe der Analyseergebnisse (die Allelfrequenzen oder die Methylierungs-Prozentsätze im Pyrogramm, z. B. 96%, oder die basenzugeordnete Sequenz); siehe Seite 49;
- die Qualitätskontroll-Fenster (●) in der Platten-Übersichtsdarstellung (siehe Seite 49; nur bei SQA-Assays);
- die Einfärbung der Peaks im kompensierten Pyrogramm entsprechend ihren Qualitätsbewertungen (nur bei SQA-Assays).

Farbcode bei der Qualitätsbewertung

- Blau: "Passed" („Qualitätskontrolle bestanden“)
- Gelb: "Check" („Überprüfen“)
- Rot: "Failed" („Fehlgeschlagen“)
- Weiß: "Not analyzed" („Nicht analysiert“). Die Analyse wird entweder nicht von der Software unterstützt (z. B. SNP-Analyse im CpG-Modus) oder die variable Position wurde vom Anwender deaktiviert (nur bei AQ- und CpG-Assays).

Methylierungs-Prozentsatz

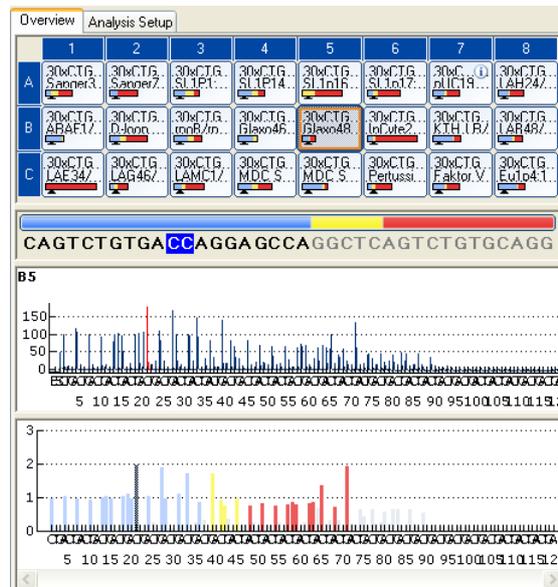
Im CpG-Modus zeigt ein Methylierungsbalken in der "Overview"-Registerkarte das Methylierungs-Prozentsatz für jede CpG-Stelle im Well an (siehe Seite 49).

Farbcode für das Methylierungs-Prozentsatz

- Hellgrün: unter dem erwarteten Wertebereich
- Grün: im erwarteten Wertebereich
- Dunkelgrün: über dem erwarteten Wertebereich

Anzeige und Vergleich des Pyrogramms

Durch Auswählen eines analysierten Wells in der "Overview"-Registerkarte werden das zugehörige Pyrogramm sowie das theoretische Histogramm (bei einem AQ- oder CpG-Assay) oder das kompensierte Pyrogramm (bei einem SQA-Assay) angezeigt.



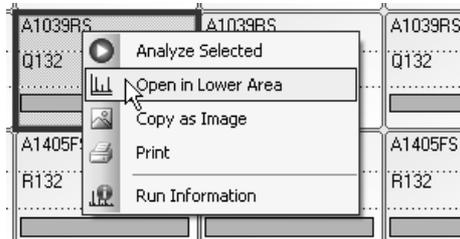
Wenn eine Base in der basenzugeordneten Sequenz ausgewählt wird, wird der zugehörige Peak in beiden Bereichen des Pyrogramms markiert und umgekehrt.

Vergleich der Pyrogramme verschiedener Wells

Um ein Pyrogramm eines bestimmten Wells (angezeigt im oberen Bereich) mit dem Pyrogramm eines oder mehrerer anderer Wells (angezeigt im unteren Bereich) zu vergleichen, gehen Sie wie folgt vor:

1. Wählen Sie in der "Overview"-Registerkarte das oder die Well(s) (siehe den Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19), das bzw. die Sie im unteren Fensterbereich öffnen möchten.

2. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die Auswahl und wählen Sie die Option "Open in Lower Area" („Im unteren Bereich öffnen“) aus dem Kontextmenü.
3. Wählen Sie das Well, das Sie im oberen Bereich öffnen möchten.



Falls die Pyrogramme mehrerer Wells im unteren Bereich angezeigt werden, können Sie mit der Bildlaufleiste zwischen den einzelnen Pyrogrammen der Auswahl wechseln.

Ein Pyrogramm mit derselben zu analysierenden Sequenz kann simultan gezoomt werden (d. h. verknüpftes Zoomen), indem Sie auf das Symbol  in der rechten oberen Ecke des oberen Bereichs klicken.

Um die Liste der Pyrogramme im unteren Bereich zu schließen, klicken Sie auf das Kreuz-Symbol (x) in der rechten oberen Ecke des unteren Bereichs.

Zoomen des Pyrogramms und Anzeige der Bedeutungen der Icons und Farben

Informationen über die Bedeutung der Icons und Farben, die im Pyrogramm-Bereich verwendet werden, und wie Sie ein- und auszoomen können, finden Sie im Abschnitt „Pyrogramm“ auf Seite 17.

Bearbeiten der Analyseparameter

Die voreingestellten Analyseparameter wurden so gewählt, dass sie bei den meisten Assays zu optimalen Analyseergebnissen führen. Falls Sie diese Einstellungen ändern, stellen Sie sicher, dass diese Änderungen validiert werden (siehe Anhang B im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*).

Hinweis: Wenn Sie QIAGEN Kits verwenden, verwenden Sie die im jeweiligen Kit-Handbuch angegebenen Einstellungen.

Hinweis: Bei einem gesperrten Assay () ist es nicht möglich, die Analyseparameter zu bearbeiten.

1. Wählen Sie das oder die Wells (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19), für das bzw. die Sie die Analyseparameter bearbeiten wollen.

Hinweis: Die Änderungen werden nur auf die Wells angewandt, die denselben Assay und dieselbe Dispensier-Reihenfolge aufweisen wie das angezeigte Well. Um die Analyseparameter für alle Wells mit demselben

Assay und derselben Dispensier-Reihenfolge zu bearbeiten, müssen Sie nur eines dieser Wells auswählen.

2. Bearbeiten der Analyseparameter in der "Analysis Setup"-Registerkarte

Wie Sie variable Positionen aktivieren oder deaktivieren und/oder erwartete Methylierungsbereiche ändern (nur bei CpG-Assays), finden Sie im Abschnitt „Konfigurieren der variablen Positionen“ auf Seite 26. Das Bearbeiten weiterer Analyseparameter bei einem AQ- oder CpG-Assay ist auf Seite 28 ff. beschrieben.

Das Bearbeiten der Analyseparameter eines SQA-Assays ist auf Seite 35 beschrieben.

Hinweis: Es ist nicht möglich, die Assay-Bezeichnung, die Dispensier-Reihenfolge oder die Anmerkung zu einem Assay zu ändern.

3. Klicken Sie nach dem Bearbeiten auf "Apply" („Anwenden“).

Hinweis: In der "Overview"-Registerkarte können Sie auch Referenz-Peaks und/oder Bisulfitbehandlungs-Kontrollen (nur bei CpG-Assays) im Pyrogramm aktivieren oder deaktivieren (siehe Anweisungen auf Seite 32). Um Änderungen, die Sie im Pyrogramm vorgenommen haben, anzuwenden, klicken Sie das grüne Häkchen-Icon (☑). Diese Schaltfläche ist aktiviert, sobald eine Änderung vorgenommen wurde.

4. Im Dialogfenster "Apply Analysis Setup" („Analyse-Konfiguration anwenden“) können Sie wie folgt Änderungen auf alle oder die ausgewählten Wells anwenden:

Um die Änderungen auf alle Wells mit demselben Assay und derselben Dispensier-Reihenfolge wie das angezeigte Well (d. h. auf alle weißen Wells im "Apply Analysis Setup"-Dialogfenster) anzuwenden, klicken Sie auf die Option "To All" („Auf alle“).

Um die Änderungen nur auf die ausgewählten Wells (d. h. auf die weißen Wells, die in dem "Apply Analysis Setup"-Dialogfenster ausgewählt wurden) anzuwenden, klicken Sie auf die Option "To Selected" („Auf ausgewählte“).

Während der Analyse wird ein Fortschritts-Dialogfenster angezeigt. Das Dialogfenster enthält einen Fortschrittsbalken und eine "Stop"-Schaltfläche, außerdem wird die Bezeichnung des gerade analysierten Wells angezeigt. Die Analyse kann durch Klicken auf "Stop" abgebrochen werden.

5. Zum Speichern der Änderungen klicken Sie auf das Disketten-Icon .

Hinweis: Falls Analyseparameter, Qualitätsbewertungen oder Analyseergebnisse (nur bei SQA-Assays) vom Anwender bearbeitet wurden, wird das betreffende Well mit einem Warnungs-Icon (⚠) gekennzeichnet.

Hinweis: Alle Änderungen werden protokolliert. Um das Analyse-Protokoll eines ausgewählten Wells anzuzeigen, wählen Sie die Option "Analysis Log" („Analyse-Protokoll“) aus dem Menü "Tools" („Werkzeuge“).

Verwenden eines modifizierten Assays in anderen Läufen

Änderungen, die in der "Analysis Setup"-Registerkarte vorgenommen werden, werden nicht in der ursprünglichen Assay-Datei gespeichert. Um den modifizierten Assay in anderen Läufen verwenden zu können, gehen Sie wie folgt vor:

- 1. Wählen Sie ein Well, in dem der modifizierte Assay angewandt wird und klicken Sie auf "Save Assay" („Assay speichern“). Das "Save Assay As"-Dialogfenster („Assay speichern unter“) öffnet sich.**
- 2. Speichern Sie die Änderungen entweder in der Originaldatei oder speichern Sie den modifizierten Assay wie folgt als neue Datei:**

Wählen Sie das Speicherziel (Ordner) aus dem Pull-down-Menü "Save in" („Speichern in“).

Geben Sie im "File name"-Textfeld den Dateinamen ein und klicken Sie auf "Save" („Speichern“).

Bearbeiten der Qualitätsbewertungen

Um die Qualitätsbewertung einer Allelfrequenz oder eines Methylierungs-Prozentsatzes zu bearbeiten, klicken Sie mit der linken Maustaste auf das Analyseergebnis im Pyrogramm und wählen Sie "Passed" („Bestanden“), "Check" („Überprüfen“) oder "Failed" („Nicht bestanden“) aus dem Kontextmenü.

Zum Bearbeiten der Qualitätsbewertung einer basenzugeordneten Sequenz bewegen Sie den Mauszeiger über das linke oder rechte Ende des "Passed"-, "Check"- oder "Failed"-Bereichs, sodass die Form des Mauszeigers von einem weißen Pfeil zum Symbol \oplus wechselt, und bewegen Sie die Maus mit gedrückt gehaltener linker Maustaste nach links oder rechts.



Falls eine Qualitätsbewertung vom Anwender bearbeitet wurde, wird dies durch ein Warnungs-Icon (⚠) in der Platten-Übersicht auf der "Overview"-Registerkarte oder eine Warnmeldung im "Well Information"-Bereich angezeigt; falls es sich um einen AQ- oder CpG-Assay handelt, erhält das Analyseergebnis im Pyrogramm zusätzlich einen Rahmen (z. B. 44%).

Hinweis: Alle Änderungen werden protokolliert. Um das Analyse-Protokoll eines ausgewählten Wells anzuzeigen, wählen Sie die Option "Analysis Log" („Analyse-Protokoll“) aus dem Menü "Tools" („Werkzeuge“).

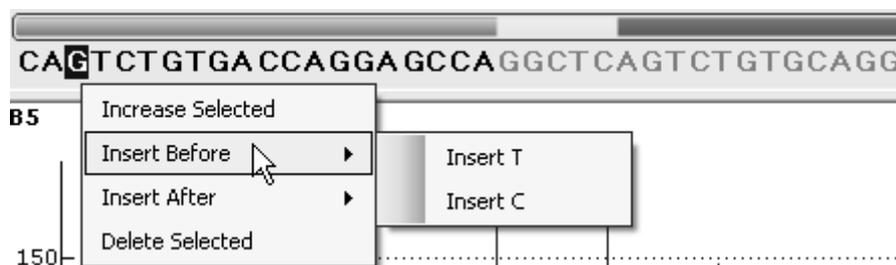
Hinweis: Die von der Software generierten Qualitätsbewertungen basieren auf modernen Analyse-Algorithmen. Es wird nicht empfohlen, die Qualitätsbewertungen zu bearbeiten.

Hinweis: Bei einem gesperrten Assay (🔒) ist es nicht möglich, die Qualitätsbewertungen zu bearbeiten.

Hinweis: Änderungen im AQ-Modus haben keine Auswirkung auf die Qualitätsbewertungen in SNP-Berichten.

Bearbeiten basenzugeordneter Sequenzen

Um eine basenzugeordnete Sequenz zu bearbeiten, klicken Sie sie mit der rechten Maustaste an und wählen Sie die gewünschte Option.



Hinweis: Alle Änderungen werden protokolliert. Um das Analyse-Protokoll eines ausgewählten Wells anzuzeigen, wählen Sie die Option "Analysis Log" („Analyse-Protokoll“) aus dem Menü "Tools" („Werkzeuge“).

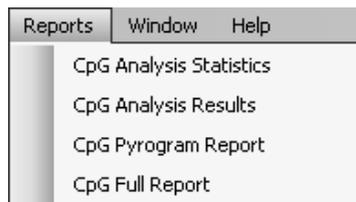
Hinweis: Falls Sie eine basenzugeordnete Sequenz bearbeiten, beachten Sie, dass die Qualitätsbewertungen nach wie vor auf der Originalsequenz (der von der Software zugeordneten Sequenz) basieren. Wie Sie die Qualitätsbewertungen bearbeiten, finden Sie auf Seite 54.

Hinweis: Bei einem gesperrten Assay (🔒) ist es nicht möglich, basenzugeordnete Sequenzen zu bearbeiten.

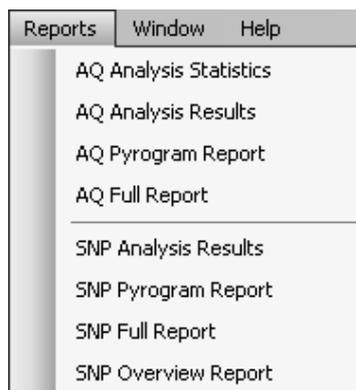
Anzeigen, Drucken und Speichern von Analyseberichten

Die PyroMark Q24 MDx Software bietet die folgenden Analyseberichte für durchgeführte Analyseläufe.

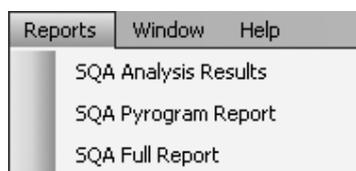
“Reports for CpG runs”
(„Berichte für CpG-Läufe“)



“Reports for AQ runs”
(„Berichte für AQ-Läufe“)



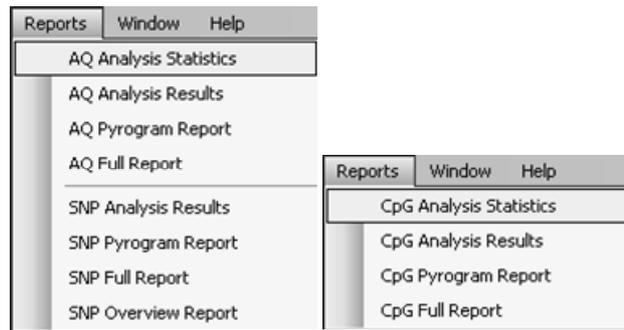
“Reports for SQA runs”
(„Berichte für SQA-Läufe“)



- “Analysis Statistics Report” („Analysestatistik-Bericht“). Dieser Bericht beinhaltet eine Analysestatistik für alle oder eine Auswahl der Wells.
- “Analysis Results Report” („Analyseergebnisse-Bericht“). Dieser Bericht enthält die Well-Informationen und Analyseergebnisse für alle oder eine Auswahl der Wells.
- “Pyrogram Report” („Pyrogramm-Bericht“). Dieser Bericht enthält die Well-Informationen und das Pyrogramm für alle oder eine Auswahl der Wells.
- “Full Report” („Vollständiger Bericht“). Dieser Bericht enthält: Laufparameter, Lauf-Protokoll, Well-Informationen und Analyseergebnisse (inklusive Pyrogramm) für alle oder die ausgewählten Wells.
- “SNP Overview Report” („SNP-Übersichtsbericht“). In diesem Bericht sind die Genotypen und Qualitätsbewertungen für alle SNPs und „InDels“ wiedergegeben. Die Informationen werden in Form der Platten-Übersicht mit einer Platte pro Positionsnummer dargestellt.

Hinweis: Um Berichte, die im PDF-Format erzeugt werden, betrachten zu können, muss ein PDF-Reader auf dem Computer installiert sein. Der Adobe Reader kann unter www.adobe.com heruntergeladen werden.

Analysestatistik-Bericht



Der Analysestatistik-Bericht enthält die folgenden Informationen für die variablen Positionen in allen oder in den ausgewählten Wells (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19):

- mittlere Allelfrequenzen (bei AQ-Bericht) oder mittlerer Methylierungs-Prozentsatz (bei CpG-Bericht)
- höchste und niedrigste Allelfrequenz (bei AQ-Bericht) bzw. höchsten und niedrigsten Methylierungs-Prozentsatz (bei CpG-Bericht)
- Standardabweichung
- Anzahl der Werte und Wells, die jeder Berechnung zugrunde lagen
- Falls Analyseparameter oder Qualitätsbewertungen vom Anwender bearbeitet wurden, sind die betreffenden Wells oben im Bericht aufgeführt.

Der Bericht kann als Textdatei (Format: *.tsv oder *.csv) oder HTML-Datei (*.html) gespeichert werden. Die Berichtdatei (*.tsv oder *.csv) kann in Microsoft® Excel® oder andere Programme importiert werden, die Daten verarbeiten können, die durch Semikolons (;) oder Tabstopps voneinander getrennt sind. Dies kann hilfreich sein, wenn die Daten für weitere Berechnungen/Auswertungen verarbeitet werden sollen.

Bericht-Optionen

In dem “Analysis Statistics Report“-Dialogfenster finden Sie die folgenden Optionen:

- | | |
|----------------------------|--|
| “All wells/Selected wells” | Legt die Wells fest, die in den Bericht mit aufgenommen werden sollen. |
|----------------------------|--|

“Assay/Assay and sample ID”

Bei der statistischen Auswertung können die Analyseergebnisse wie folgt gruppiert werden:

- nach Assay:
Wells mit demselben Assay werden gruppiert.
- nach Assay und Probenkennung:
Wells mit demselben Assay und derselben Probenkennung werden gruppiert. Dies kann nützlich sein, wenn Experimente mit Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden.

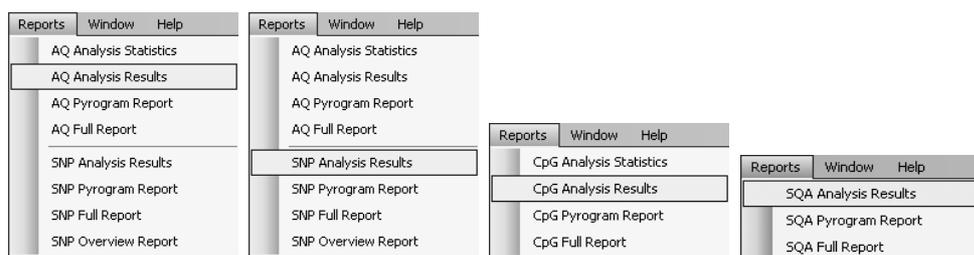
“Passed/Check”

Legt die Analyseergebnisse fest, die mit aufgenommen werden sollen. Die Berechnungen können auf der Grundlage der Ergebnisse mit der Qualitätsbewertung “Passed” („Bestanden“) und/oder “Check” („Überprüfen“) durchgeführt werden.

Hinweis: Wenn alle “Passed“- und “Check“-Ergebnisse in den Bericht aufgenommen werden sollen, können Sie Ergebnisse innerhalb dieser Gruppe ausschließen, indem Sie die “Analyze“-Option für diese Positionen in der “Analysis Setup“-Registerkarte deaktivieren (siehe Abschnitt „Konfigurieren der variablen Positionen“ auf Seite 26).

Um den Bericht vor dem Speichern und/oder Ausdrucken einzusehen, klicken Sie auf “Preview” („Voransicht“).

Analyseergebnisse-Bericht



Der Analyseergebnisse-Bericht enthält die folgenden Informationen für alle oder die ausgewählten Wells (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19):

- Well-Informationen (Bezeichnung des Wells und des Assays sowie die Probenkennung)
- Allelfrequenzen (bei AQ-Bericht), Genotypen (bei SNP-Bericht) und Methylierungs-Prozentsätze (bei CpG-Bericht) oder basenzugeordnete Sequenzen (bei SQA-Bericht) sowie die Qualitätsbewertungen

- mittlerer Methylierungs-Prozentsatz und die Standardabweichung aller CpG-Stellen mit "Passed"-Bewertung in einem Well (nur bei CpG-Bericht)
- höchster und niedrigster Methylierungs-Prozentsatz in einem Well (nur bei CpG-Bericht)
- Informationen, ob Analyseparameter, Qualitätsbewertungen und Analyseergebnisse (nur bei SQA-Bericht) durch den Anwender bearbeitet wurden oder nicht

Optional: Angabe der Analyse-Version, der Anmerkungen zu den Wells und der Warnmeldungen während der Analyse. Im AQ- und CpG-Bericht ist es auch möglich, die Bezeichnungen sowie die ursprünglichen und/oder aktuellen Qualitätsbewertungen der variablen Positionen mit aufzunehmen.

Der Bericht kann als Textdatei (Format: *.tsv oder *.csv) oder HTML-Datei (*.html) gespeichert werden. Die Berichtdatei (*.tsv oder *.csv) kann in Microsoft® Excel® oder andere Programme importiert werden, die Daten verarbeiten können, die durch Semikolons (;) oder Tabstopps voneinander getrennt sind. Dies kann hilfreich sein, wenn die Daten für weitere Berechnungen/Auswertungen verarbeitet werden sollen. In der ersten Zeile des Berichts wird der Name des Laufs wiedergegeben. Die folgenden zwei oder drei Zeilen enthalten die Spalten-Überschriften. Im Anschluss an die Spalten-Überschriften folgen die Zeilen mit den detaillierten Well-Informationen und den statistischen Angaben zu den einzelnen Wells.

Bericht-Optionen

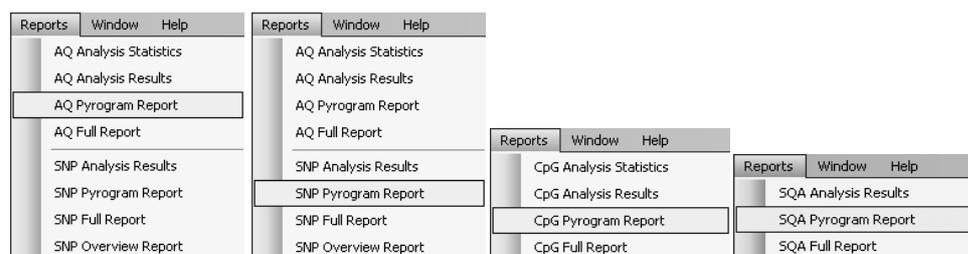
In dem "Analysis Results Report"-Dialogfenster finden Sie die folgenden Optionen:

"All wells/Selected wells"	Legt die Wells fest, die in den Bericht mit aufgenommen werden sollen.
"Sort by row/column"	Legt die Sortier-Reihenfolge der Wells fest.
"All/Passed/Passed + Check/Only Quality Window"	Legt die Basen fest, die bei basenzugeordneten Sequenzen in den Bericht mit aufgenommen werden sollen. Diese Option steht nur für den SQA-Bericht zur Verfügung.
"Note"-Spalte	Wenn Sie diese Option aktivieren, wird eine Spalte mit den Anmerkungen zu den Wells in den Bericht mit aufgenommen.

- “Warnings”-Spalte Wenn diese Option aktiviert ist, wird eine Spalte mit den während der Analyse ausgelösten Warnmeldungen in den Bericht mit aufgenommen.
- “Analysis version”-Spalte Bei Aktivierung dieser Option erscheint eine Spalte mit Angabe der Analyse-Version im Bericht.
- “Position name”-Spalte Wenn Sie diese Option aktivieren, wird eine Spalte mit den Bezeichnungen der variablen Position in den Bericht mit aufgenommen.
Diese Option steht beim SQA-Bericht nicht zur Verfügung.
- “Quality”-Spalte Wenn diese Option aktiviert ist, wird eine Spalte mit den aktuellen Qualitätsbewertungen in den Bericht mit aufgenommen.
- “Original quality”-Spalte Wenn diese Option aktiviert ist, wird eine Spalte mit den ursprünglichen Qualitätsbewertungen in den Bericht mit aufgenommen.
Diese Option steht beim SQA-Bericht nicht zur Verfügung.

Um den Bericht vor dem Speichern und/oder Ausdrucken einzusehen, klicken Sie auf “Preview” („Voransicht“).

Pyrogramm-Bericht



Der Pyrogramm-Bericht enthält neben den Well-Informationen (Bezeichnungen von Well und Assay, Probenkennung und Anmerkung zum Well) das Pyrogramm für alle oder eine Auswahl der Wells (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19). Falls Analyseparameter, Qualitätsbewertungen und/oder Analyseergebnisse (nur bei SQA-Bericht) durch den Anwender bearbeitet wurden, wird dies im Bericht angegeben.

Die folgenden Informationen, Icons und Farben werden in den AQ-, SNP- und CpG-Berichten angegeben bzw. verwendet:

- Bezeichnung des Wells und die zu analysierende Sequenz
- Das Analyseergebnis – Allelfrequenzen (bei AQ-Bericht), Genotypen (bei SNP-Bericht) oder Methylierungs-Prozentsätze (bei CpG-Bericht) – wird über jeder variablen Position angezeigt, zum Beispiel („InDel“) oder . Die Hintergrundfarbe zeigt die Qualitätsbewertung des Analyseergebnisses an; siehe Farblegende auf Seite 50

Hinweis: (in Weiß) = vom Anwender deaktiviert. (in Weiß) = Die Software unterstützt die Analyse nicht, zum Beispiel SNP-Analyse im CpG-Modus. (in Rot) = Analyse wegen fehlender Daten nicht möglich.

- Falls gewünscht, werden die variablen Positionen mit einer blaugrauen Hintergrundfarbe markiert.
- Bisulfitbehandlungs-Kontrollen werden mit einer hellgelben Hintergrundfarbe (nur bei CpG-Bericht) gekennzeichnet.

Die folgenden Informationen und Farben werden im SQA-Bericht angegeben bzw. verwendet:

- Bezeichnung des Wells
- Basenzugeordnete Sequenz. Die Hintergrundfarbe einer Base in der Sequenz entspricht dabei ihrer Qualitätsbewertung; siehe Farblegende auf Seite 50.
- Falls ein kompensiertes Pyrogramm in den Bericht mit aufgenommen wurde, werden darin die Peaks entsprechend ihren Qualitätsbewertungen eingefärbt.

Bericht-Optionen

In dem “Pyrogram Report“-Dialogfenster finden Sie die folgenden Optionen:

“All wells/Selected wells“	Legt die Wells fest, die in den Bericht mit aufgenommen werden sollen.
“Number of rows/columns“	Legt die Anzahl der Spalten und Zeilen eines Pyrogramms auf jeder Seite fest.
“Sort by row/column“	Legt die Sortier-Reihenfolge der Wells fest.
“Portrait/Landscape“	Legt die Orientierung des Papiers (Hoch-/Querformat) fest.

“Highlight variable regions”

Wenn diese Option aktiviert ist, werden die variablen Abschnitte mit einer blaugrauen Hintergrundfarbe unterlegt.

Diese Option steht beim SQA-Bericht nicht zur Verfügung.

“Show peak levels”

Wenn diese Option aktiviert ist, werden die berechneten Peakhöhen im Pyrogramm angezeigt.

Diese Option steht nur für den SQA-Bericht zur Verfügung.

“Raw Pyrogram/
Compensated
Pyrogram”

Legt die Art des Pyrogramms fest, das in dem Bericht erscheinen soll.

Diese Option steht nur für den SQA-Bericht zur Verfügung.

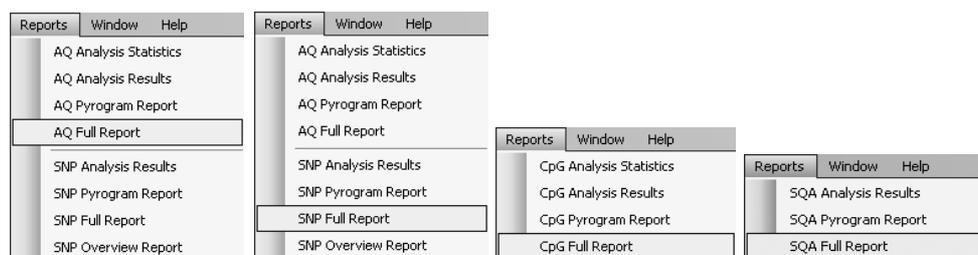
“Paper size”

Legt das Papierformat fest (A4, A3, Brief oder Tabloid).

Um den Bericht vor dem Speichern und/oder Ausdrucken einzusehen, klicken Sie auf “Preview” („Voransicht“).

Hinweis: Um den Bericht betrachten zu können, muss ein PDF-Reader auf dem Computer installiert sein. Der Adobe Reader kann unter www.adobe.com heruntergeladen werden.

Vollständiger Bericht



Der vollständige Bericht enthält die folgenden Informationen für alle oder die ausgewählten Wells (siehe Abschnitt „Auswählen von Wells“ auf Seite 19):

- Laufparameter (Laufname, Datum und Uhrzeit des Laufs, Gerätemethode, Geräte-Bezeichnung, Seriennummer, Bediener, Plattenkennung, Barcode, Reagenzienkennung und Anmerkung zum Lauf) und ein Lauf-Protokoll
- Well-Informationen (Bezeichnung von Well und Assay, Probenkennung und Anmerkung zum Well), Analyse-Version, AQ- oder CpG-Assay und zu analysierende Sequenz

- Pyrogramm; Informationen über die Bedeutung der Icons und Farben, die im Pyrogramm-Bereich verwendet werden, finden Sie im Abschnitt „Pyrogramm-Bericht“ auf Seite 60.
- Allelfrequenzen (bei AQ-Bericht), Genotypen (bei SNP-Bericht) und Methylierungs-Prozentsätze (bei CpG-Bericht) oder basenzugeordnete Sequenzen (bei SQA-Bericht) sowie die Qualitätsbewertungen
- Warnmeldungen während der Analyse
- Falls Analyseparameter oder Qualitätsbewertungen vom Anwender bearbeitet wurden, werden die betreffenden Wells aufgelistet.

Bericht-Optionen

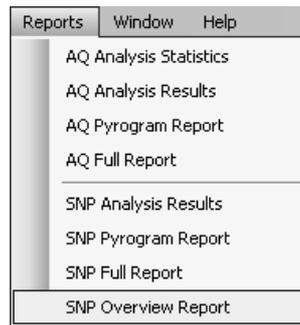
In dem “Full Report“-Dialogfenster finden Sie die folgenden Optionen:

“All wells/Selected wells“	Legt die Wells fest, die in den Bericht mit aufgenommen werden sollen.
“Raw Pyrogram/ Compensated Pyrogram“	Legt die Art des Pyrogramms fest, das in dem Bericht erscheinen soll. Diese Option steht nur für den SQA-Bericht zur Verfügung.

Um den Bericht vor dem Speichern und/oder Ausdrucken einzusehen, klicken Sie auf “Preview“ („Voransicht“).

Hinweis: Um den Bericht betrachten zu können, muss ein PDF-Reader auf dem Computer installiert sein. Der Adobe Reader kann unter www.adobe.com heruntergeladen werden.

SNP-Übersichtsbericht



Im SNP-Übersichtsbericht ("SNP Overview Report") finden Sie die Genotypen und Qualitätsbewertungen aller SNPs und Insertionen/Deletionen („InDels“). Die Informationen werden in Form der Platten-Übersicht mit einer Platte pro Positionsnummer dargestellt. Die Hintergrundfarbe der Wells zeigt die Qualitätsbewertung des SNP an; siehe Farblegende auf Seite 50.

Falls Analyseparameter vom Anwender bearbeitet wurden, sind die betreffenden Wells oben im Bericht aufgeführt.

Um den Bericht vor dem Speichern und/oder Ausdrucken einzusehen, klicken Sie im "SNP Overview Report"-Dialogfenster auf "Preview" („Voransicht“).

Position 1

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

Position 2

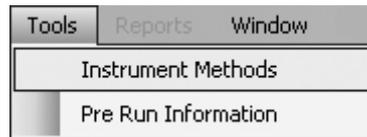
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	-/-	-/-			--	A/A	G/G	G/G
B	-C	-C			A/A	A/A	G/G	G/G
C	-C	-C			A/A	A/A	G/G	G/G

Ausschnitt aus einem Bericht. Die "Analyse"-Option wurde für Position 1 und 2 im Well A5 deaktiviert. Die Wells A3–A4, B3–B4 und C3–C4 weisen keine SNPs oder InDels in Position 2 auf.

Hinweis: Variable Positionen können vom Bericht ausgeschlossen werden, indem Sie die Option "Analyse" („Analysieren“) in der "Analysis Setup"-Registerkarte (siehe Abschnitt „Konfigurieren der variablen Positionen“ auf Seite 26).

Hinweis: Der SNP-Übersichtsbericht steht nur im AQ-Modus zur Verfügung. Um den Bericht betrachten zu können, muss ein PDF-Reader auf dem Computer installiert sein. Der Adobe Reader kann unter www.adobe.com heruntergeladen werden.

Verwalten der Gerätemethoden



Die Gerätemethode sollte gemäß den Reagenzien und der Reagenzienkartusche, die beim Lauf verwendet werden, gewählt werden. Die Methodennummer, die auf der PyroMark Q24 Kartusche aufgedruckt ist, entspricht spezifischen Einstellungen von Methoden-Parametern, die unter www.qiagen.com/Products/PyroMarkQ24MDx.aspx zur Verfügung stehen.

Hinweis: Es wird empfohlen, nur die von QIAGEN bereitgestellten Methoden zu verwenden.

So importieren Sie eine neue Methode:

1. **Laden Sie von der oben angegebenen Webseite die Methoden-Datei herunter, die der Methoden-Nummer auf dem Kartuschenetikett entspricht. Speichern Sie sie auf dem Computer ab, auf dem die PyroMark Q24 MDx Software installiert ist.**
2. **Klicken Sie im "Instrument Methods"-Dialogfenster auf die Funktion "Import". Daraufhin öffnet sich das Dialogfenster "Find Instrument Method" („Gerätemethode suchen“).**
3. **Suchen Sie und wählen Sie die Methode aus, die Sie importieren möchten und klicken Sie auf "Open" („Öffnen“).**

So erstellen Sie eine neue Methode:

1. **Wählen Sie im "Instrument method"-Dialogfenster eine bereits existierende Methode und klicken Sie auf "Save As" („Speichern unter“).**
2. **Geben Sie einen Namen für die neue Methode ein und drücken Sie auf "Enter" („Eingabe“).**
3. **Ändern Sie die Einstellungen der Methoden-Parameter im Dialogfenster so ab, dass sie denen entsprechen, die auf der Webseite www.qiagen.com/Products/PyroMarkQ24MDx.aspx verfügbar sind.**
4. **Klicken Sie auf "Save" („Speichern“).**

Methoden-Parameter

Im "Instrument Methods"-Dialogfenster kann auf die folgenden Parameter zugegriffen werden.

Reagenzien-Druck ("Reagent pressure")	Druck (in Millibar), mit dem Enzymgemisch und Substratgemisch dispensiert werden.
Enzym-Pulsdauer ("Enzyme pulse time")	Dauer der Abgabe (in Millisekunden) des Enzymgemischs.
Substrat-Pulsdauer ("Substrate pulse time")	Dauer der Abgabe (in Millisekunden) des Substratgemischs.
Nukleotid-Druck ("Nucleotide pressure")	Druck (in Millibar), mit dem die Nukleotide dispensiert werden.
Nukleotid-Pulsdauer ("Nucleotide pulse time")	Dauer der Abgabe (in Millisekunden) der Nukleotide.
Anmerkung ("Note")	Anmerkung zur Gerätemethode (optional).

Allgemeine Hinweise und Tipps

Validierung von Assays

Validieren Sie Ihre Assays mit Referenz-DNA-Proben; siehe Anhang B im *PyroMark Q24 MDx Handbuch*.

Analyse-Protokoll

Alle durchgeführten Analysen werden mit den verwendeten Analyse-Einstellungen, dem Analysemodus (AQ, CpG oder SQA), der Analyse-Version und den Ergebnissen (inklusive eventueller Warnmeldungen während der Analyse) sowie der Angabe von Datum, Uhrzeit und der Person, die die Analyse durchgeführt hat, protokolliert. Damit die Information, wer eine Analyse durchgeführt oder eine Assay- oder Laufdatei erstellt hat, korrekt ist, müssen sich die Benutzer jeweils in Windows unter Verwendung ihres eigenen Benutzerkontos einloggen. Weitere Informationen über Benutzerkonten und das Ein- und Ausloggen finden Sie in der Windows Online-Hilfe oder erhalten Sie von Ihrem Systemadministrator.

Um das Analyse-Protokoll eines ausgewählten Wells anzuzeigen, wählen Sie die Option "Analysis Log" („Analyse-Protokoll“) aus dem Menü "Tools" („Werkzeuge“).

Schutz der Dateien

Um eine Datei vor der Bearbeitung durch andere Benutzer zu schützen, speichern Sie sie in einem Ordner, auf den nur Sie selbst zugreifen können. Kontaktieren Sie Ihren Systemadministrator, falls Sie diesbezüglich weitere Informationen benötigen.

Um eine Datei davor zu schützen, dass sie versehentlich von Ihnen oder einem anderen Benutzer überschrieben wird, aktivieren Sie mithilfe des Windows Explorers wie folgt das "Read-only"-Attribut für diese Datei:

- 1. Schließen Sie die Datei in der PyroMark Q24 MDx Software.**
- 2. Öffnen Sie den Windows Explorer und suchen Sie die Datei.**
Sie können dies tun, indem Sie den Ordner, in dem die Datei enthalten ist, im Verknüpfungs-Browser mit der rechten Maustaste anklicken und die Option "Explore" („Durchsuchen“) aus dem Kontextmenü wählen.
- 3. Klicken Sie im Windows Explorer mit der rechten Maustaste auf die Datei und wählen Sie die Option "Properties" („Eigenschaften“) aus dem Kontextmenü.**
- 4. Aktivieren Sie im sich öffnenden "Properties"-Dialogfenster das "Read-only"-Attribut („Schreibgeschützt“) und klicken Sie auf "OK".**

Führen Sie häufiger eine Datensicherung durch.

Schutz der Analyseergebnisse

Bei einem gesperrten Assay (🔒) ist es nicht möglich, die Analyseparameter oder -ergebnisse zu bearbeiten. Um einen Assay zu sperren, öffnen Sie die Assay-Datei und klicken Sie auf die "Lock Assay"-Schaltfläche am unteren Rand der "Assay Setup"-Registerkarte. Sperren Sie den Assay, bevor Sie ihn der Platte zuordnen.

Hilfe zur Fehlersuche

Fehler	Kommentare und Vorschläge
a) Während der Analyse erscheint in der "Overview"-Registerkarte ein rotes Kreuz über den Wells	Kontaktieren Sie den Technischen Service von QIAGEN.
b) "Exception"-Dialogfenster erscheint	Speichern Sie den Fehlerbericht und schicken Sie ihn zur Information an den Technischen Service von QIAGEN. Klicken Sie auf "Continue", um die Analyse fortzusetzen. Falls das Dialogfenster eingeblendet bleibt, klicken Sie auf "Quit" („Beenden“) und starten Sie die Software neu.
c) Aus angegebener Datei der PyroMark Assay Design Software konnte kein Assay erstellt werden	Vergewissern Sie sich, dass ein gültiger Typ der Assay-Datei (AQ, CpG oder SNP) importiert wird.

Bei analysebezogenen Problemen siehe auch den entsprechenden Abschnitt im Kapitel „Hilfe zur Fehlersuche“ des *PyroMark Q24 MDx Handbuchs*.

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

Anhang A: Meldungen der PyroMark Q24 MDx Software

Im Folgenden ist eine Auflistung der Bedienungshinweise sowie Warn- und Fehlermeldungen, die während Assay-Konfiguration, Analyselauf oder Datenauswertung in der PyroMark Q24 MDx Software eventuell erscheinen können, wiedergegeben.

Meldungstext

Erklärung

Allgemeine Meldungen bei der Konfiguration ("Assay Setup")

"The dispensation order is very long"
Die Dispensier-Reihenfolge ist länger als 200 Basen.

Allgemeine Meldungen bei der Analyse

"Not analyzable due to lack of data (overall)"
Unzureichende Anzahl Peaks im Pyrogramm, um die Daten auszuwerten. Diese Warnmeldung hebt alle anderen Warnmeldungen auf.

"High pre-sequencing signal"
Der Substrat-Peak ist im Vergleich zum Rauschsignal und zur Höhe einzelner Peaks sehr hoch.

"Uncertain due to baseline drift."
Es liegt eine unnormale Drift der Basislinie vor, die das Ergebnis negativ beeinflussen könnte.

"Failed due to possible dispensation error at dispensation"
Bei der/den angezeigten Dispensierung(en) besteht möglicherweise ein Fehler. Die Qualität aller Stellen nach dem Fehler ist beeinträchtigt.

"No peaks detected between dispensations"
Es werden keine Peaks detektiert, obwohl alle Nukleotide dispensiert wurden. Dies könnte auf Probleme bei der Dispensier-Einheit hindeuten. Die Qualitätsbewertung (Farbe) aller Stellen nach dem Fehler ist beeinträchtigt.

"Uncertain due to wide peaks"
Die mittlere Peakbreite überschreitet den "Check"-Grenzwert („Überprüfen“). Die Qualität aller Stellen in der Sequenz ist beeinträchtigt.

Meldungen bei der Assay-Konfiguration im AQ-Modus

"Invalid sequence"
Es liegt ein Fehler in der eingegebenen zu analysierenden Sequenz vor.

"Variable positions with common dispensations cannot be analyzed"
Die Nukleotid-Dispensierungen für mehrere Polymorphismen sind nicht in Phase.

Meldungstext

Erklärung

“The generated dispensation order contains less reference peaks than required”

Der Assay enthält weniger als fünf konstante Peaks mit einem erwarteten Wert von größer als 1.

“Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information”

Das letzte Nukleotid in der zu analysierenden Sequenz wurde dispensiert; das bedeutet, dass die erwartete Peakhöhe der letzten Dispensierung unbekannt ist.

Hinweis: Die zu analysierende Sequenz muss um ein Nukleotid länger sein als die Dispensier-Reihenfolge.

“Last variable position not analyzable due to lack of terminal sequence information”

Nach der letzten variablen Position wurden keine weiteren Sequenzinformationen eingegeben; das bedeutet, dass die erwartete Peakhöhe der variablen Position unbekannt ist.

Hinweis: Die zu analysierende Sequenz muss um ein Nukleotid länger sein als die Dispensier-Reihenfolge.

“Sequence not in phase at the end of the dispensations”

Nachdem alle Nukleotide dispensiert wurden, ist die Sequenz nicht in Phase; das bedeutet, dass die erwartete Peakhöhe der variablen Position unbekannt ist.

“Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations”

Die Nukleotid-Dispensierungen sind bei einem Polymorphismus um mehr als fünf Dispensierungen nicht in Phase; dies könnte eine negative Auswirkung auf das Ergebnis haben.

“Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 variable dispensations.”

Eine „InDel“-Position erfordert mehr als die fünf zu analysierenden Dispensierungen; dies könnte eine negative Auswirkung auf das Ergebnis haben.

“Quantification may be uncertain: the variable position contains a homopolymer.”

Vor oder nach einer einbasigen „InDel“-Position tritt ein Homopolymer der Höhe ≥ 3 auf. Die Warnmeldung deutet darauf hin, dass diese Stelle sehr schwierig zu analysieren ist.

Meldungstext

Erklärung

Warnmeldungen während der Analyse im AQ-Modus

"Analysis not supported"	Die variable Stelle wird im AQ-Modus nicht unterstützt.
"Deselected by user"	Die variable Stelle wurde vom Anwender von der Analyse ausgeschlossen.
"The sequence contains less reference peaks than required"	Das Pyrogramm enthält weniger als fünf konstante Peaks mit einem erwarteten Wert von größer als 1.
"Not analyzable due to lack of data"	Unzureichende Anzahl Peaks an einer Stelle, um die Daten auszuwerten.
"The variable position contains a homopolymer"	Vor oder nach einer einbasigen „InDel“-Position tritt ein Homopolymer der Höhe ≥ 3 auf. Die Warnmeldung deutet darauf hin, dass diese Stelle sehr schwierig zu analysieren ist.
"Uncertain due to low signal-to-noise ratio"	Der Summenwert der Peaks in der variablen Region unterscheidet sich nicht signifikant von dem Rauschsignal; dies könnte eine negative Auswirkung auf das Ergebnis haben.
"Failed due to low signal-to-noise ratio"	Der Summenwert der Peaks in der variablen Region unterscheidet sich nicht signifikant von dem Rauschsignal; dies könnte eine negative Auswirkung auf das Ergebnis haben.
"Uncertain due to low peak height"	Die Höhe eines Einzelpeaks zu Beginn des Pyrogramms liegt unter der erforderlichen Peakhöhe für die Qualitätsbewertung "Passed" („Bestanden“; wird in der Assay-Konfiguration festgelegt).
"Failed due to low peak height"	Der RLE-(RLU-)Wert des Peaks an der angezeigten Position liegt unter dem vorgegebenen Wert für die Qualitätsbewertung "Failed" („Fehlgeschlagen“).
"Uncertain due to high sum deviation in variable position"	Der Summenwert der Peaks in einer variablen Region weicht so stark von der erwarteten Höhe eines Einzelpeaks an der polymorphen Position ab, dass der "Check"-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.

Meldungstext

Erklärung

“Failed due to high sum deviation in variable position”

Der Summenwert der Peaks in einer variablen Region weicht so stark von der erwarteten Höhe eines Einzelpeaks an der polymorphen Position ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.

“Uncertain due to high pattern deviation in variable position”

Die beste Zuordnung aus möglichen Frequenzmustern weicht so stark vom tatsächlichen Muster ab, dass der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.

“Failed due to high pattern deviation in variable position”

Die beste Zuordnung aus möglichen Frequenzmustern weicht so stark vom tatsächlichen Muster ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.

“Uncertain surrounding reference sequence pattern”

Die gemessenen Peakhöhen im Qualitätskontroll-Fenster weichen so stark von den Erwartungswerten ab, dass der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.

“Failed surrounding reference sequence pattern”

Die gemessenen Peakhöhen im Qualitätskontroll-Fenster weichen so stark von den Erwartungswerten ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.

“Uncertain due to high peak height deviation at dispensation”

Die gemessene Peakhöhe an der angegebenen Dispensierungs-Stelle weicht so stark vom Erwartungswert ab, dass der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.

“Failed due to high peak height deviation at dispensation”

Die gemessene Peakhöhe an der angegebenen Dispensierungs-Stelle weicht so stark vom Erwartungswert ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.

“Uncertain reference sequence pattern at more than 5 dispensations”

Die gemessenen Peakhöhen weichen bei mehr als fünf Dispensierungen so stark von den Erwartungswerten ab, dass der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.

“Failed reference sequence pattern at more than 5 dispensations”

Die gemessenen Peakhöhen weichen bei mehr als fünf Dispensierungen so stark von den Erwartungswerten ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.

Meldungstext

Erklärung

Warnmeldungen während der Analyse im SNP-Modus

“Failed genotype determination”	Der Unterschied zwischen der besten und der zweitbesten Genotyp-Zuordnung ist kleiner als der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“).
“Uncertain genotype determination”	Der Unterschied zwischen der besten und der zweitbesten Genotyp-Zuordnung ist kleiner als der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“).

Meldungen bei der Assay-Konfiguration im CpG-Modus

“Invalid sequence”	Es liegt ein Fehler in der eingegebenen zu analysierenden Sequenz vor.
“Cannot resolve sequence direction”	Die eingegebene zu analysierende Sequenz enthält Nukleotide, die spezifisch sind für entweder bisulfitbehandelte Vorwärts- oder Rückwärtssequenzen.
“A CpG site has to be biallelic”	Diese Meldung erscheint, wenn die angegebene CpG-Stelle einen zusätzlichen Polymorphismus aufweist, z. B. „C/T/AG“.
“Variable positions with common dispensations cannot be analyzed”	<p>Die Nukleotid-Dispensierungen für mehrere Polymorphismen sind nicht in Phase.</p> <p>Eine variable Region, die mit Nukleotid-Dispensierungen ausgewertet werden, die auf mehrere Polymorphismen zutreffen (nicht eindeutige Dispensierung) kann nicht ausgewertet werden. Zum Beispiel wird die zu analysierende Sequenz „A/GC/TCAC“ mit der Dispensier-Reihenfolge „CATCGTCA“ nicht ausgewertet, weil die Dispensierungen nicht in Phase sind.</p>
“The generated dispensation order contains less reference peaks than required”	Der Assay enthält weniger als fünf konstante Peaks mit einem erwarteten Wert von größer als 1.
“Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information”	Das letzte Nukleotid in der zu analysierenden Sequenz wurde dispensiert; das bedeutet, dass die erwartete Peakhöhe der letzten Dispensierung unbekannt ist.

Meldungstext

Erklärung

“Last variable position not analyzable due to lack of terminal sequence information”	Nach der letzten variablen Position wurden keine weiteren Sequenzinformationen eingegeben; das bedeutet, dass die erwartete Peakhöhe der variablen Position unbekannt ist.
“Sequence not in phase at the end of the dispensations”	Nachdem alle Nukleotide dispensiert wurden, ist die Sequenz nicht in Phase; das bedeutet, dass die erwartete Peakhöhe der variablen Position unbekannt ist.
“Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations”	Die Nukleotid-Dispensierungen sind bei einem Polymorphismus um mehr als fünf Dispensierungen nicht in Phase; dies könnte eine negative Auswirkung auf das Ergebnis haben.

Warnmeldungen während der Analyse im CpG-Modus

“Analysis not supported”	Die variable Stelle wird im CpG-Modus nicht unterstützt.
“Deselected by user”	Die variable Stelle wurde vom Anwender von der Analyse ausgeschlossen.
“Uncertain bisulfite conversion at dispensation”	Der Peak der Bisulfitbehandlungs-Kontrolle bei der/den angezeigten Dispensierung(en) ist höher als der “Check“-Grenzwert („Überprüfen“). Die Qualität aller Stellen in der Sequenz ist beeinträchtigt.
“Failed bisulfite conversion at dispensation”	Der Peak der Bisulfitbehandlungs-Kontrolle bei der angezeigten Dispensierung ist höher als der “Fail“-Grenzwert („Fehlgeschlagen“). Die Qualität aller Stellen in der Sequenz ist beeinträchtigt.
“The sequence contains less reference peaks than required”	Das Pyrogramm enthält weniger als fünf konstante Peaks mit einem erwarteten Wert von größer als 1.
“Not analyzable due to lack of data”	Unzureichende Anzahl Peaks an einer Stelle, um die Daten auszuwerten.
“Uncertain due to low signal-to-noise ratio”	Der Summenwert der Peaks in der variablen Region unterscheidet sich nicht signifikant von dem Rauschsignal (unterhalb des “Check“-Grenzwerts); dies könnte eine negative Auswirkung auf das Ergebnis haben.

Meldungstext

Erklärung

“Failed due to low signal-to-noise ratio”

Der Summenwert der Peaks in der variablen Region unterscheidet sich nicht signifikant von dem Rauschsignal (unterhalb des “Fail”-Grenzwerts); dies könnte eine negative Auswirkung auf das Ergebnis haben.

“Uncertain due to low peak height”

Die Höhe eines Einzelpeaks zu Beginn des Pyrogramms liegt unter der erforderlichen Peakhöhe für die Qualitätsbewertung “Passed” („Bestanden“; wird in der Assay-Konfiguration festgelegt).

“Failed due to low peak height”

Der RLE-(RLU-)Wert des Peaks an der angezeigten Position liegt unter dem vorgegebenen Wert für die Qualitätsbewertung “Failed” („Fehlgeschlagen“).

“Uncertain due to high sum deviation in variable position”

Der Summenwert der Peaks in einer variablen Region weicht so stark von der erwarteten Höhe eines Einzelpeaks an der polymorphen Position ab, dass die Differenz den “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschreitet.

“Failed due to high sum deviation in variable position”

Der Summenwert der Peaks in einer variablen Region weicht so stark von der erwarteten Höhe eines Einzelpeaks an der polymorphen Position ab, dass die Differenz den “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschreitet.

“Uncertain due to high pattern deviation in variable position”

Die beste Zuordnung aus möglichen Frequenzmustern weicht so stark vom tatsächlichen Muster ab, dass der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.

“Failed due to high pattern deviation in variable position”

Die beste Zuordnung aus möglichen Frequenzmustern weicht so stark vom tatsächlichen Muster ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.

“Uncertain surrounding reference sequence pattern”

Die gemessenen Peakhöhen im Qualitätskontroll-Fenster weichen so stark von den Erwartungswerten ab, dass der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.

Meldungstext

Erklärung

“Failed surrounding reference sequence pattern”	Die gemessenen Peakhöhen im Qualitätskontroll-Fenster weichen so stark von den Erwartungswerten ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.
“Uncertain due to high peak height deviation at dispensation”	Die gemessene Peakhöhe an der angegebenen Dispensierungs-Stelle weicht so stark vom Erwartungswert ab, dass der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.
“Failed due to high peak height deviation at dispensation”	Die gemessene Peakhöhe an der angegebenen Dispensierungs-Stelle weicht so stark vom Erwartungswert ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.
“Uncertain reference sequence pattern at more than 5 dispensations”	Die gemessenen Peakhöhen weichen bei mehr als fünf Dispensierungen so stark von den Erwartungswerten ab, dass der “Check”-Grenzwert („Überprüfen“) überschritten wird.
“Failed reference sequence pattern at more than 5 dispensations”	Die gemessenen Peakhöhen weichen bei mehr als fünf Dispensierungen so stark von den Erwartungswerten ab, dass der “Fail”-Grenzwert („Fehlgeschlagen“) überschritten wird.

Meldungen im SQA-Modus

“Base-calling not consistent with entered known bases”	Es wurden vom Anwender definierte Normalisierungs-Peaks eingegeben, die resultierende Basenzuordnung ist jedoch nicht konsistent mit den eingegebenen Informationen.
“Low peak height”	Die Höhe eines Einzelpeaks zu Beginn des Pyrogramms liegt unter der erforderlichen Peakhöhe für die Qualitätsbewertung “Passed” („Bestanden“; wird in der Assay-Konfiguration festgelegt).
“High homopolymer at dispensation”	Bei der/den angegebenen Dispensierung(en) befindet sich ein Homopolymer aus mehr als fünf Nukleotiden.
“Large peak height variation”	Insgesamt zu große Schwankung der Peakhöhe. Führt zu unsicherer/fehlgeschlagener Startqualität, falls dies innerhalb der ersten fünf Dispensierungen auftritt.

Meldungstext**Erklärung**

“Large peak height variation around dispensation”	Große Schwankung der Peakhöhe bei Einzel- und/oder Doppelpeaks. Die Meldung gibt die Dispensierungen an, für die diese Warnung gilt und führt zu unsicherer/fehlgeschlagener Qualitätsbewertung der Sequenz ab dieser Dispensierung.
“Low signal-to-noise ratio (overall)”	Zu niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Führt zu unsicherer/fehlgeschlagener Startqualität, falls dies innerhalb der ersten fünf Dispensierungen auftritt.
“Low signal-to-noise ratio from dispensation”	Zu niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Führt zu unsicherer/fehlgeschlagener Qualitätsbewertung der Sequenz ab dieser Dispensierung.
“Missing peaks in cycle starting at dispensation”	Es fehlen Peaks in einem Zyklus (d. h. alle vier Nukleotide wurden dispensiert, aber es wurde kein Peak in der Sequenz detektiert). Führt zu unsicherer Qualitätsbewertung ab dem letzten detektierten Peak.
“Peak height deviates from the expected peak level at dispensation”	Die gemessene Peakhöhe an der angegebenen Dispensierungs-Stelle weicht übermäßig stark vom Erwartungswert ab. Beeinträchtigt die Qualitätsbewertung (Farbe) der angezeigten Dispensierung.
“Risk for overlaid sequence from dispensation”	In einem bestimmten Bereich wird eine mögliche Hintergrundsequenz detektiert. Beeinträchtigt die Qualitätsbewertung (Farbe) ab dem Beginn dieses Bereichs.
“Spurious peak(s) at dispensation”	Über einem bestimmten Wert werden nicht klassifizierte Peaks detektiert. Beeinträchtigt die Qualitätsbewertung (Farbe) ab der angegebenen Dispensierung.
“Wide peaks from dispensation”	Zu breite Peaks detektiert. Führt ab der betreffenden Dispensierung zu unsicherer Qualitätsbewertung. Führt zu unsicherer Startqualität, falls dies innerhalb der ersten fünf Dispensierungen auftritt.

Literaturhinweis

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

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

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN-Gruppe); Adobe®, Reader® (Adobe Systems Incorporated); Excel®, Microsoft®, Windows® (Microsoft Corporation).

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

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

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

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

© 2010 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

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

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

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

China ■ Bestellungen 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technischer Service 800-988-0325800-988-0327

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

