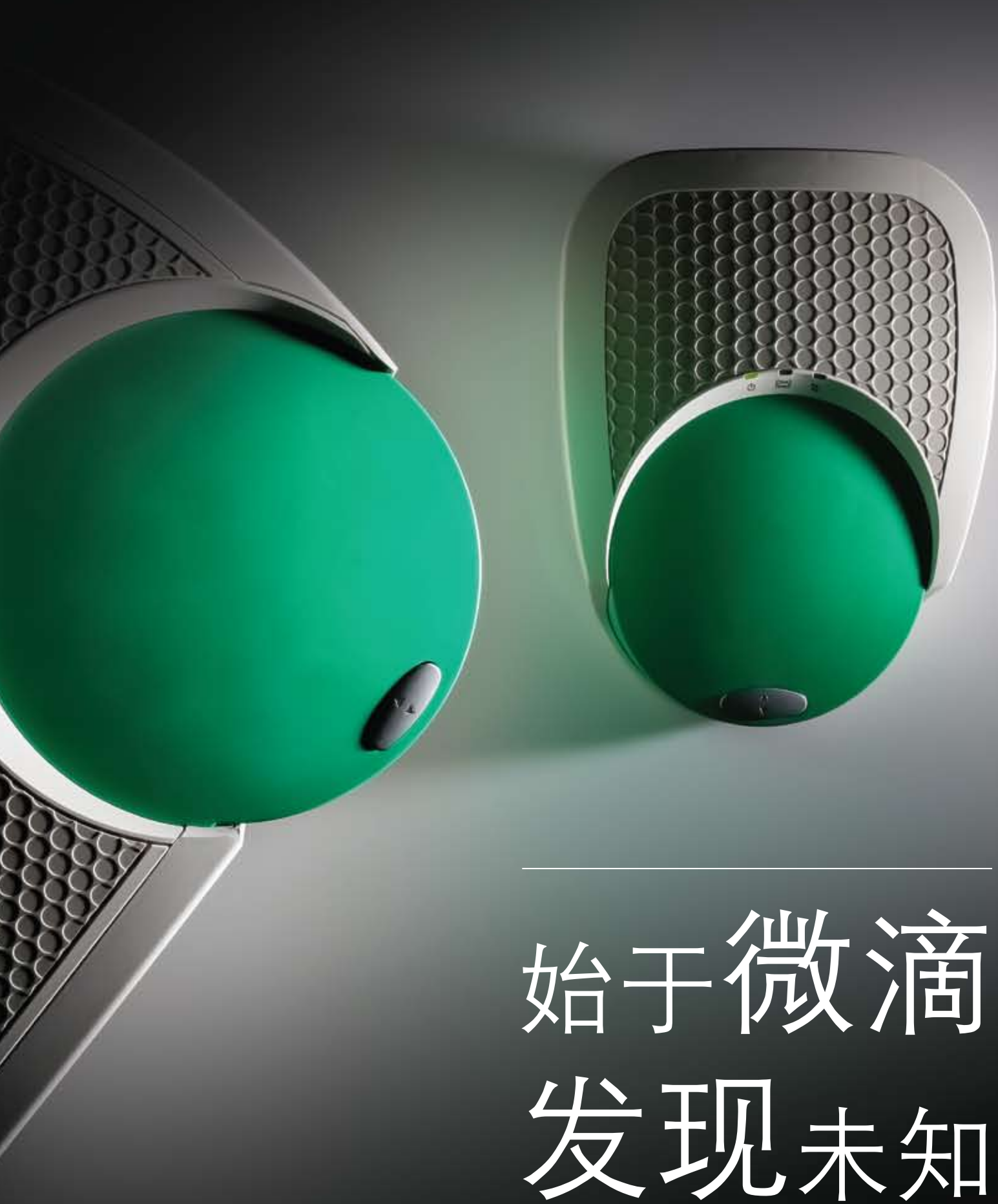


QX200™ 微滴式数字 PCR 系统





始于微滴
发现未知



微滴式数字 PCR (ddPCR™) 是 Bio-Rad 独特的数字 PCR 技术。ddPCR 可对 DNA 或 RNA 分子采用绝对定量的方式进行分析，具有无可比拟的精确性，不再需要标准曲线。ddPCR 大大提升了数字 PCR 技术的可扩展性与实用性。现在，全新的 QX200 微滴式数字 PCR 系统已经面市，与您一起探索未知、以前所未有的角度发现新世界。

PCR 技术通过对样品的随机分布以及后续的统计学分析而迈入“数字化”时代。QX200 系统采用先进的微流体技术，每份样品可生成 20,000 个高度均一的纳升级微滴。并且还可通过反应孔合并对高达数以百万计的微滴进行分析，实现单份样品更高的检测灵敏度，使定量分析达到一个全新的水准。

凭借简便、可靠的特点，微滴式数字 PCR 已经在癌症分子标志物的发现，传染病研究，基因组结构变异分析，基因表达分析等领域展现出了强大的优势。但这仅仅是一个开始，Bio-Rad 希望与您一起踏上微滴式数字 PCR 开启的发现之旅！

WHAT'S IN A DROPLET?

实验流程 快捷 明了



微滴式数字 PCR 的实验流程简单、友好：一次可处理 8 个样品；实验流程扩展性好，可在 5 个小时内完成 96 个样品的分析；一天内更可运行多次实验满足高通量样品实验室的要求。

Bio-Rad QX200 ddPCR 系统结合了油包水乳化微滴技术与微流体技术。QX200 系统由两部分组成 — 微滴发生器和微滴分析仪。微滴发生器可将每个样品生成 20,000 均一的纳升级微滴，目的片段和背景序列在微滴中随机分布，每个微滴都是一个独立的反应器。随后微滴被转移到 96 孔 PCR 板中，在普通 PCR 仪上完成扩增。PCR 扩增后，微滴分析仪对微滴逐个进行荧光检测。相比于阴性微滴，包含至少一个目标 DNA 或 RNA 分子的阳性微滴的荧光信号强度增加。最后根据泊松分布，通过阳性微滴的比例给出目标分子的绝对拷贝数。

QX200 系统兼容 TaqMan 水解探针和 EvaGreen 检测。此外，灵活的设计使得用户既可通过合并反应孔实现超灵敏的核酸检测，也可以通过一个反应孔运行一个样本实现高通量的样品检测。



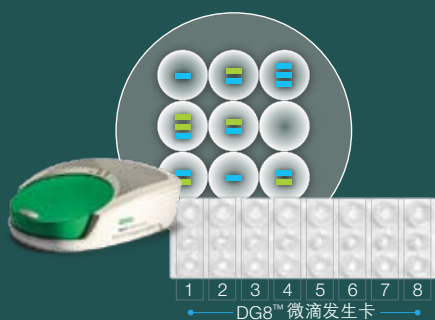
主要优势

- 兼容 TaqMan 探针或 EvaGreen
- 无需标准曲线，实现绝对定量分析
- 实现超高灵敏度或高通量的样品分析



1 制备含有核酸样品的 ddPCR 反应液

- 将核酸样品、引物（探针）、Bio-Rad ddPCR 预混液混合均匀
- 或经过验证的 PrimerPCR ddPCR assay



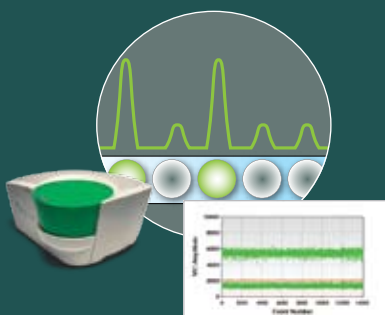
2 制备微滴

- 将 ddPCR 反应混合液转入 DG8 微滴发生卡相应的孔内
- 每次运行可以生成 $8 \times 20,000$ 个微滴
- 目的片段（—）和背景序列（—）随机分布到微滴内



3 使用 EvaGreen 或水解探针进行 PCR 扩增

- 将经过微滴化处理的样品转移到 96 孔 PCR 反应板中，并封膜
- 运行 PCR 程序



4 读取并分析结果

- PCR 结束后，将 PCR 反应板置于 QX200 微滴分析仪内
- 微滴荧光信号的逐个检测、分析
- 使用 QuantaSoft™ 软件进行浓度（copies/ μ l）计算

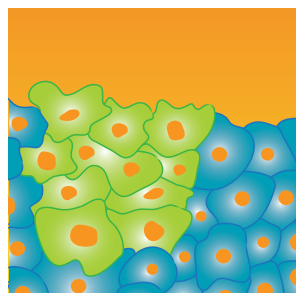
WHAT'S IN A DROPLET?

定量 癌症 分子标志物



Bio-Rad QX200 ddPCR 系统为癌症分子标志物定量分析提供了无与伦比的灵敏度，突破了其他方法的局限性。使用微滴式数字 PCR 技术，研究人员现在能够实现对突变位点更细微的定量分析，更好地明确其在癌症中的相关作用。

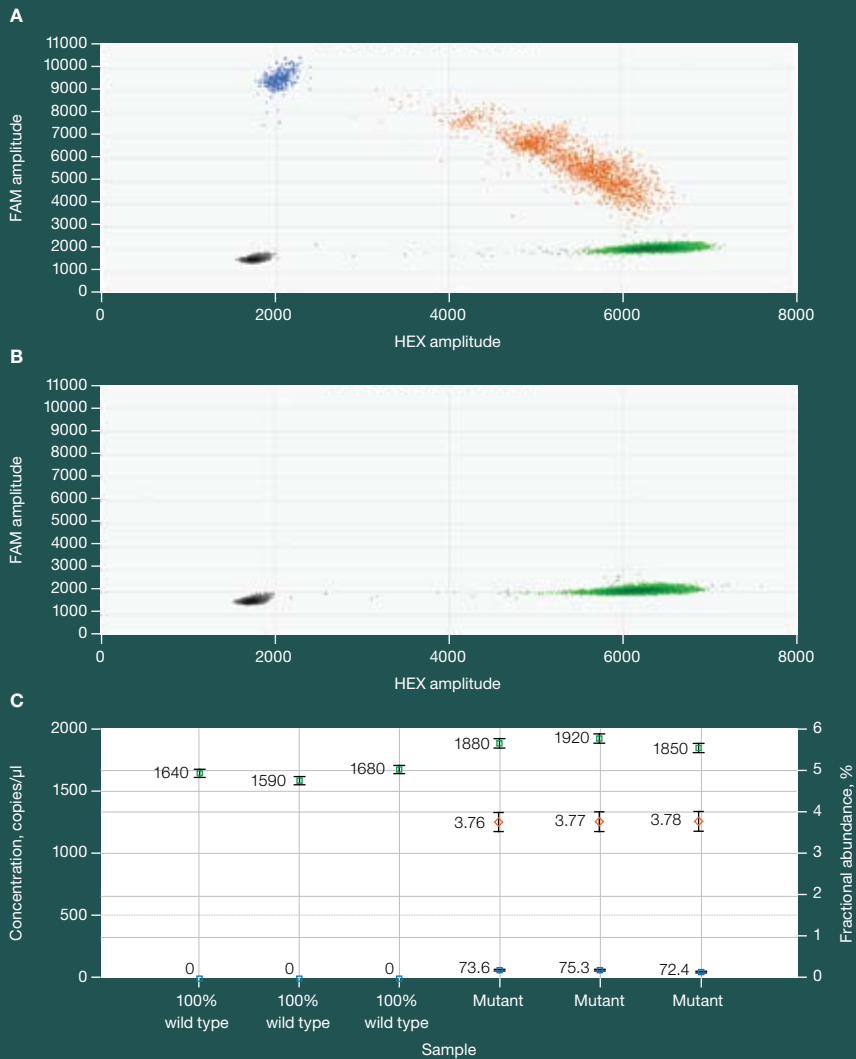
在一份给定的样本中，相比于野生型 DNA，癌症相关的突变序列比例较低，经常无法检测。凭借其超高灵敏度，QX200 系统可以很容易地定量分析低至 1/1,000,000（0.0001%）的突变频率。之前用任何方法都无法实现准确、稳定检测的样本，现在可以使用微滴式数字 PCR 轻松进行定量分析。



成功案例

实现肺癌相关的表皮生长因子受体（*EGFR*）中 *T790M* 突变的检测，可以更好地评估抗酪氨酸激酶抑制剂的治疗。然而，由于其他技术检测灵敏度有限，无法在高背景 *EGFR* 野生型中可靠地检测到 *T790M* 突变。目前已有研究人员使用 ddPCR 技术开发出精确性很高的检测方法，以准确定量 *T790M* 的浓度。

BRAF V600E 突变检测



QX200 系统的高灵敏度可以确保使用 PrimePCR ddPCR assays 对野生型 DNA 背景下的 *BRAF V600E* 突变进行定量分析。A. QuantaSoft 软件 2-D 荧光强度图显示突变型、野生型混合样本（3 个重复）。图上的黑色簇为阴性微滴，绿色簇为野生型 DNA 阳性微滴，蓝色簇为突变型 DNA 阳性微滴，橙色簇为突变型和野生型 DNA 均为阳性的微滴。B. 2-D 荧光强度图显示野生型样本（3 个重复）。C. 丰度分数图中显示为突变 DNA 在野生型背景 DNA 中的频率百分比（橙色标记）。蓝色标记代表突变型 DNA 的浓度（copies/ μ l）（3 个重复），绿色标记代表野生型 DNA 的浓度（copies/ μ l）（3 个重复）。QuantaSoft 软件所生成的误差线表示 95% 的置信区间。

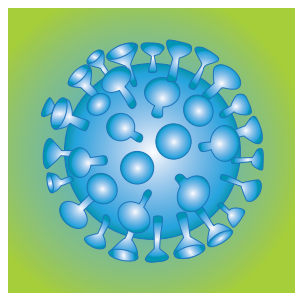
WHAT'S IN A DROPLET?

洞察 病毒 载量



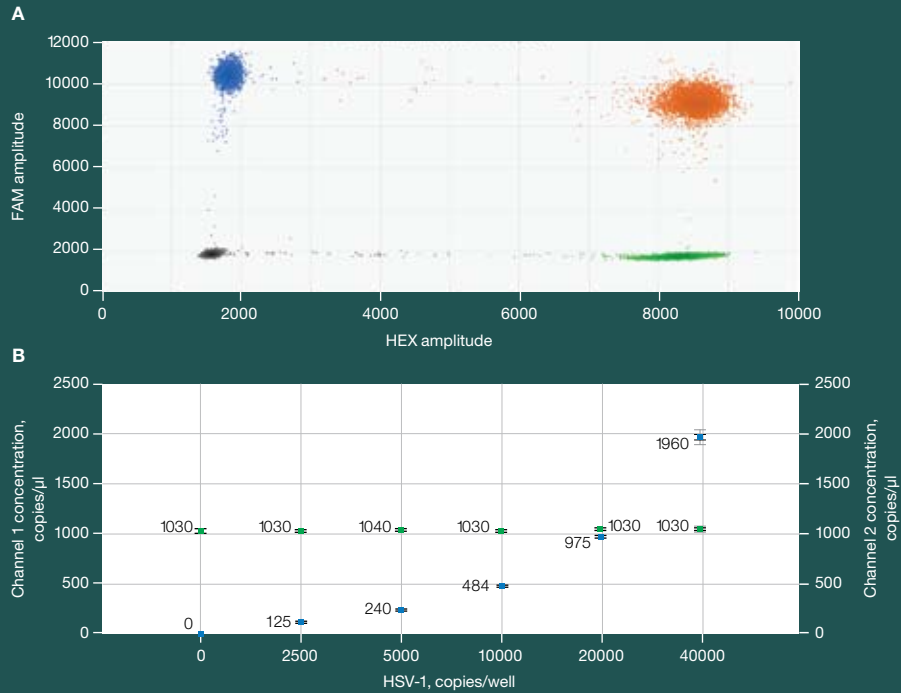
精确的病毒载量分析对于阐释疾病病程、后续治疗及疗效评估是至关重要的。病毒载量的波动，即使只下降了非常低的水平，意义却是显著的。在对病原体的研究中，能否实现准确而可靠的病毒 DNA 或 RNA 定量分析，关系到实验的成败。

QX200 系统的高灵敏度可以确保从复杂样本中准确测定极其微量的病毒核酸分子。除了精确性和可靠性，QX200 系统还可以为用户提供高通量的样本处理流程。



成功案例

研究人员比较了 qPCR 和 ddPCR 方法检测临床样本中残留的人类免疫缺陷病毒 (HIV)，其中包括功能性治愈的 HIV 感染婴儿。研究人员发现，在检测百万个细胞内的 HIV DNA 拷贝数时，相比于 qPCR，ddPCR 的灵敏度提升了 5 倍。在检测病毒长末端重复序列 (2-LTR 环) 时，ddPCR 比 qPCR 灵敏 20 倍。

单纯疱疹病毒和 $\beta 2$ 微球蛋白检测

ddPCR 可使用双重反应精确定量检测单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 和 $\beta 2$ 微球蛋白 (B2M), 且重复性极佳。A, 2-D 荧光强度图显示样本中含有 10,000 个拷贝 / 孔 HSV-1 和 20,000 个拷贝 / 孔的 B2M (3 个重复)。黑色簇为阴性微滴, 绿色簇为 HSV-1 阳性微滴, 蓝色簇为 B2M 阳性微滴, 橙色簇为两个 HSV-1 和 B2M 均为阳性的微滴。B, 浓度图显示在以 20,000 拷贝 B2M (66ng 人类基因组 DNA) 作为背景的条件下, HSV-1 浓度梯度从 0 到 40,000 拷贝的样本浓度 (3 个重复)。蓝色标记表示 HSV-1 copies / μ l, 绿色标记表示 B2M copies / μ l。QuantaSoft 软件所生成的误差线表示 95% 的置信区间。

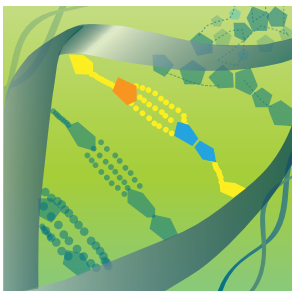
WHAT'S IN A DROPLET?

区分 基因组 变异



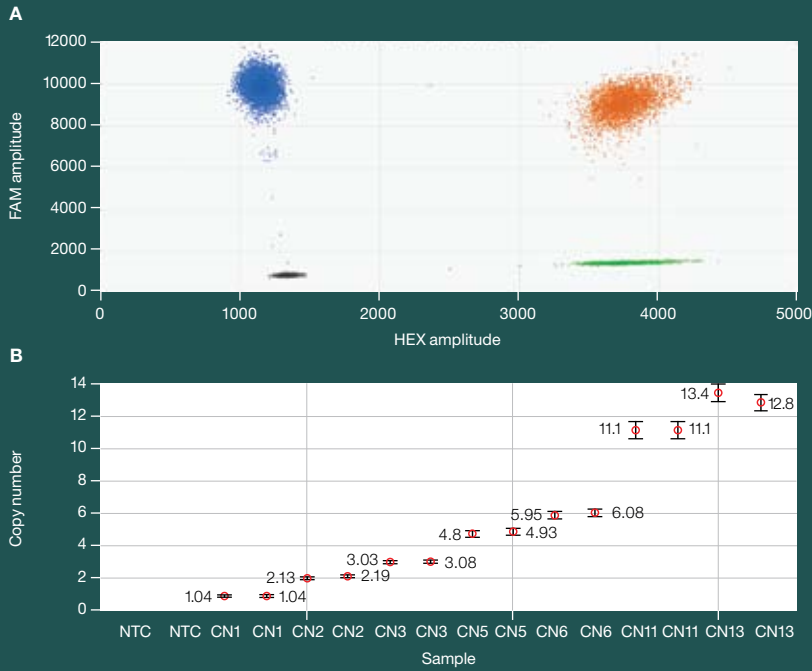
在人类基因组中，拷贝数变异（CNV）是个体差异的一个重要来源。CNV 与癌症，神经系统和自身免疫性疾病，药物不良反应有密切的关系。可靠地识别这类 CNVs 是开创性研究的一项重要手段。

拷贝数（CN）评估的主要技术瓶颈是如何在统计置信度下有效区分连续的 CN。从根本上说，随着 CN 增加，目标遗传物质之间的差异百分比下降，这使得 CNV 的检测更加困难。QX200 系统通过在成千上万个微滴中进行 CNV 特定片段的扩增反应，实现在卓越的统计置信度下，对更高连续拷贝数（例如 5 vs. 6）的区分。



成功案例

研究人员研究一个参与人类大脑尺寸进化的高度重复基因，亟需一种方法来验证待测样品中微小的 CN 变异。实验证明微滴式数字 PCR 比之前使用的方法更有效，更精确地检测到高 CN 状态下的微小差异，且重复性极佳。这些 CNV 定量分析的提升将有助于研究人员对神经源性疾病，如微 / 大头畸形，精神分裂症和自闭症等进行更深入地研究。

骨髓细胞癌基因拷贝数及 β -珠蛋白检测

QX200 系统实现了拷贝数从 CN1 到 CN13 的卓越分辨率。A. 2-D 荧光强度图显示为 CN6 的多重检测骨髓细胞癌基因 (MYC) 和 β -珠蛋白 (HBB) 的复孔分析。黑色簇为阴性微滴, 绿色簇为 MYC 阳性微滴, 蓝色簇为 HBB 阳性微滴, 橙色簇为 MYC 和 HBB 均为阳性的微滴。B. 拷贝数图显示了从 CN1 到 CN13 样本精确的复孔数值。QuantaSoft 软件所生成的误差线表示 95% 的置信区间。NTC, 无模板对照。

WHAT'S IN A DROPLET?

NGS

验证 及文库定量



Bio-Rad 的 ddPCR 平台可以方便地与下一代测序 (NGS) 文库制备流程对接, 精确定量测序文库。除了精确量化, QX200 系统所得到的结果包含测序文库的定性信息, 这是当前其他方法所不具备的。这确保了文库上样量的一致性, 提高 NGS 的使用效率与成功率。NGS 运行结束后, ddPCR 还能对 NGS 的结果进行验证, 诸如单核苷酸多态性, 突变及拷贝数变异在内的基因组变异。

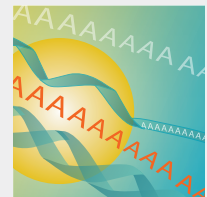
基因 表达研究

QX200 系统的超高灵敏度, 特别适用于鉴定及定量稀有转录产物, 更好地了解 RNA 的功能。QX200 系统的高精确性, 可以用来检测倍比变化很小的基因表达, 深入了解基因的生理意义。对 RNA 分子绝对定量的分析可深化现有的基因表达研究。QX200 ddPCR 系统可以协助研究人员进行此类研究, 且无需设置标准曲线。



成功案例

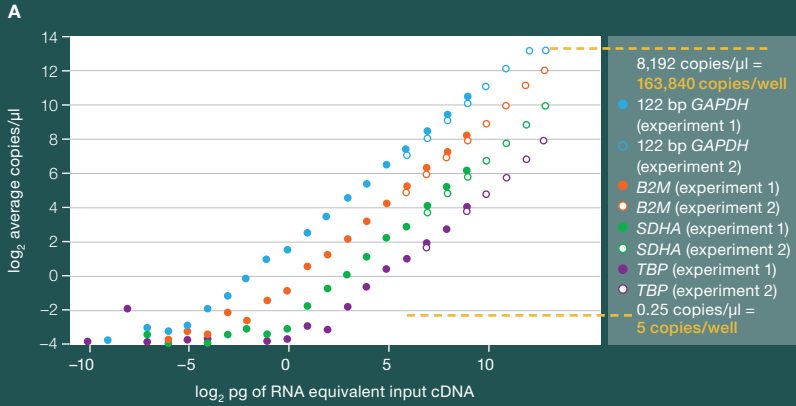
研究小组比较了 ddPCR 和其他方法定量 Illumina 公司 TruSeq 文库的结果。使用 ddPCR 对 5 个不同浓度的文库进行了定量分析后, 研究人员的实验结果能够达到 MiSeq 平台所要求的进行 NGS 实验的最佳集群密度, 约为 800,000 个 / mm²。文库平行实验表明, 文库之间的差异小于 15% (95% 的置信区间)。



成功案例

研究人员使用 ddPCR 研究野生型和突变型亨廷顿基因 (*HTT*) 编码的 mRNA 差异表达。RNA 转录水平差异的定量分析使研究人员更深入地了解细胞功能, 更好地了解疾病机制。

二代测序结果验证



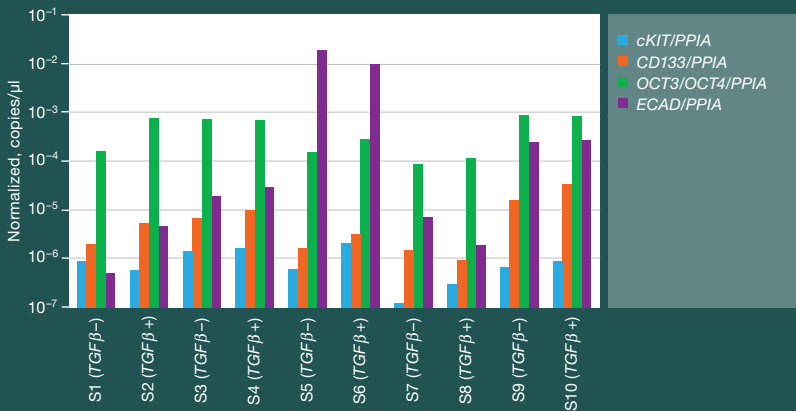
相比于 RNA 测序, ddPCR 在扩增过程无偏差, 且灵敏度提高了 1000 倍以上。A. 浓度图显示了 2 倍稀释的 cDNA 浓度 (使用 Bio-Rad 公司的 iScript™ Advanced cDNA 合成试剂盒进行 RT-qPCR)。两组独立的实验结果: 一个在高浓度范围内, 另一个在浓度较低的范围, 每个浓度四个重复。B. 图表显示 ddPCR 与 MiSeq 实验结果的比较。对于上样量 100 ng 总 RNA 的低丰度转录子 (TBP 和 GUSB 基因), ddPCR 检测的拷贝数为几千个拷贝 / 孔, 这表明 ddPCR 提高了检测灵敏度。而 MiSeq 测序在每千碱基每百万读长 (RPKM) 中只检测到个位数的记录。ddPCR: 微滴式数字 PCR。

B

Gene	ddPCR, copies/well		MiSeq, RPKM			
	100 ng RNA 4 replicates	1,000 ng 4 replicates	100 ng 2 replicates		1,000 ng 2 replicates	
GAPDH	1,671 ± 115*	16,275 ± 479*	974	953	1,077	1,061
B2M	504 ± 46*	3,450 ± 155*	233	251	229	237
SDHA	139 ± 14*	1,131 ± 81*	51	50	59	65
HPRT1	15,781 ± 2,310	140,705 ± 11,059	34	22	25	25
TBP	3,650 ± 178	31,625 ± 1,010	3	3	6	3
GUSB	1,794 ± 53	15,731 ± 1,134	9	12	13	12

* Obtained with cDNA diluted 200-fold because of its high abundance.

干细胞标志因子相关基因表达分析



QX200 系统的高灵敏度和精确度, 可以确保检测到稀有转录子的微小倍数变化, 且重复性极佳。TGFβ 信号通路在卵巢癌细胞调控中起到了重要作用, TGFβ 除了可以增加干细胞数量, 还可以提高干细胞标志因子的表达, 降低终端分化, 如 E-cadherin 蛋白 (ECAD) 的表达。数据显示为 TGFβ 处理或未处理条件下 CKIT, CD133, OCT3/OCT4 和 ECAD 在以 PPIA 为对照归一化后的表达变化 (10 个样品)。cDNA 浓度低至 0.5-1 target / μl (20μl 反应体系, 包含重复)。S: 样品。

WHAT'S IN A DROPLET?

使用 EvaGreen 进行 绝对定量



通过微滴化过程中样品的随机分布及后续的分析，微滴式数字 PCR 可以提供绝对定量分析，无需标准曲线。这为很多需要检测低丰度目标拷贝数或区分微小倍比变化的应用带来了实质性的改进。将 ddPCR 与 EvaGreen 检测技术相结合，可以对低丰度的目标基因进行基因分型和基因表达分析。QX200 ddPCR 系统可以使用 EvaGreen 进行绝对定量分析，是目标 DNA 检测、病毒载量分析以及微生物定量分析的理想工具。

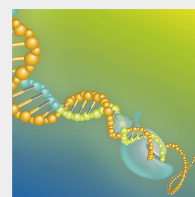
经过严格验证 ddPCR ASSAYS

Bio-Rad Prime PCR ddPCR Assays 是经过严格的实验室验证的，专门为无需标准曲线的单拷贝 PCR 分析而设计开发。研究人员可以根据自己的研究需求（包括突变检测和拷贝数变异分析）将 ddPCR 与这些经过验证的试剂盒结合起来。这些 assays 是唯一经过严格验证的数字 PCR 分析试剂盒。



成功案例

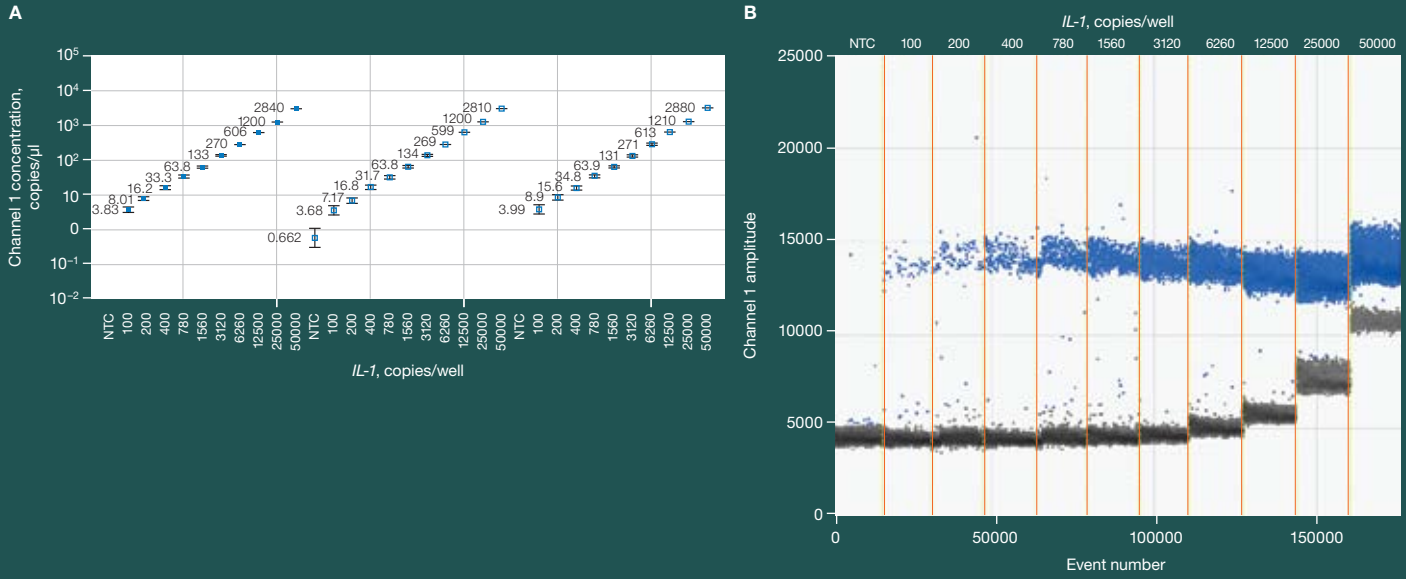
癌症医学需要对癌症基因突变进行快速的评估，通常癌症基因突变具有一定的遗传性错误，可作为一个特定的治疗指标。研究人员由于可能使用了降解的临床样本进行急性髓系白血病 *FLT3* 突变分析而被质疑。但采用 ddPCR 技术后，由于样品中的 DNA 模板会随机分布到微滴中，从而降低 PCR 抑制剂或实验偏差对结果的影响，可以更可靠地对样本中的突变进行定量分析。



成功案例

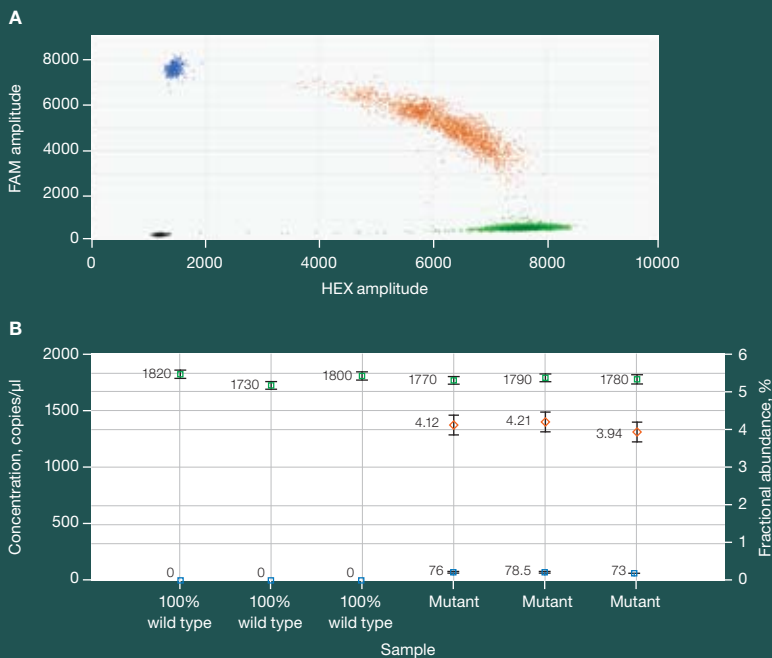
设计并优化一个探针检测试剂盒会延迟实验的进展和数据的获得。一位研究人员曾经花费大量的时间试图设计肺癌相关表皮生长因子受体 *EGFR L858R* 的引物和探针。后来该人员直接使用经过验证的 *EGFR L858R* PrimePCR ddPCR 检测试剂盒就可直接跳过繁琐的体系优化过程，使研究人员更专注于研究本身的生物学意义，而不是探针与引物的设计。

使用 EVAGREEN 进行绝对定量分析



ddPCR 可对不同浓度范围的样品进行精准的检测分析，且重复性极佳。A，浓度图显示合并重复样品孔（实心蓝色标记）和单重复样品（空心蓝色标记）系列梯度稀释的数据。使用 EvaGreen 检测白细胞介素 1（*IL-1*）浓度范围从 0 到 50000 拷贝的样本，使用对数尺度绘制。重复间具有极佳的线性和重复性。B，1-D 荧光强度图显示了使用 EvaGreen 检测 *IL-1* 浓度梯度曲线（QX200 微滴分析仪 FAM / EvaGreen 通道）。数据表明阳性（蓝色）和阴性（黑色）的数据点之间能得到很好的区分。QuantaSoft 软件生成的误差线表示 95% 的置信区间。NTC，无模板对照。

EGFR L858R 突变检测



经过充分验证的 PrimePCR ddPCR assays 检测 *EGFR L858R* 突变。A，2-D 荧光强度图显示突变型：野生型混合样本（3 个重复）。图上的黑色簇为阴性微滴，绿色簇为含野生型 DNA 阳性微滴，蓝色簇为含突变型 DNA 阳性微滴，橙色簇为突变型和野生型 DNA 均为阳性的微滴。B，丰度百分比图中显示突变型 DNA 在野生型背景 DNA 中的频率百分比（橙色标记）。蓝色标记代表突变型 DNA 的浓度（copies/μl）（3 个重复），绿色标记代表野生型 DNA 的浓度（copies/μl）（3 个重复）。QuantaSoft 软件生成的误差线表示 95% 的置信区间。



More Droplet Digital PCR Resources

Visit www.bio-rad.com/QX200 for a wide range of videos, technical reports, published findings, and other resources describing Bio-Rad's unique Droplet Digital PCR technology and the QX200 ddPCR system.

技术参数

QX200 微滴发生器	
样品体积	20 µl
通量	1-8 个样品 / 微滴发生卡
微滴总数 / 样品	20,000
体积大小 (W x D x H)	28 x 36 x 13 cm (11 x 14 x 5")
QX200 微滴分析仪	
精确度	± 10%
线性范围	5 个数量级
通量	1-96 个样品
微滴总数 / 96 孔板	约1,500,000
光源	LED
检测器	硅光子计数器
检测通道	FAM (EvaGreen), HEX (VIC)
体积大小 (W x D x H)	66 x 52 x 29 cm (26 x 20 x 11")

Ordering Information

Catalog #	Description
QX200 Droplet Digital PCR System	
186-4001	QX200 Droplet Digital PCR System , includes droplet generator, droplet reader, laptop computer, software, associated component consumables
186-4002	QX200 Droplet Generator , includes droplet generator, 1 pkg of 24 DG8 cartridges, 1 pkg of 24 DG8 gaskets, 2 cartridge holders, 1 power cord
186-4003	QX200 Droplet Reader , includes droplet reader, ddPCR manual, 2 plate holders, USB cable, power cord
186-4007	Droplet Generator Cartridges and Gaskets , includes 5 pkg of 24 DG8 cartridges, 5 pkg of 24 DG8 gaskets
186-4008	DG8 Cartridges for QX100™/QX200 Droplet Generator , 1 pkg of 24 cartridges
186-3009	DG8 Gaskets for QX100/QX200 Droplet Generator , 1 pkg of 24 gaskets
186-3051	DG8 Cartridge Holder
186-3030	Droplet Generator Oil for Probes , 2 x 7 ml
186-3005	Droplet Generator Oil for Probes , 10 x 7 ml
186-4005	Droplet Generator Oil for EvaGreen , 2 x 7 ml
186-4006	Droplet Generator Oil for EvaGreen , 10 x 7 ml
186-3031	Droplet Reader Oil , 1 x 1 L
186-3004	Droplet Reader Oil , 2 x 1 L
ddPCR Reagents	
186-3026	ddPCR Supermix for Probes , 2 ml (2 x 1 ml), 200 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-3010	ddPCR Supermix for Probes , 5 ml (5 x 1 ml), 500 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-3027	ddPCR Supermix for Probes , 25 ml (5 x 5 ml), 2,500 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-3028	ddPCR Supermix for Probes , 50 ml (10 x 5 ml), 5,000 x 20 µl reactions, 2x supermix

Catalog #	Description
186-3023	Droplet PCR Supermix , 2 ml (2 x 1 ml), 200 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-3024	Droplet PCR Supermix , 5 ml (5 x 1 ml), 500 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-3025	Droplet PCR Supermix , 25 ml (5 x 5 ml), 2,500 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-3021	One-Step RT-ddPCR Kit for Probes , 2 ml (2 x 1 ml), 200 x 20 µl reactions, 2x RT-ddPCR mix, includes 1 manganese acetate tube
186-3022	One-Step RT-ddPCR Kit for Probes , 5 ml (5 x 1 ml), 500 x 20 µl reactions, 2x RT-ddPCR mix, includes 2 manganese acetate tubes
186-4033	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix , 2 ml (2 x 1 ml), 200 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-4034	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix , 5 ml (5 x 1 ml), 500 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-4035	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix , 25 ml (5 x 5 ml), 2,500 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-4036	QX200 ddPCR EvaGreen Supermix , 50 ml (10 x 5 ml), 5,000 x 20 µl reactions, 2x supermix
186-3052	ddPCR Buffer Control Kit for Probes , 9 ml (2 x 4.5 ml), 2x buffer
186-4052	ddPCR Buffer Control Kit for EvaGreen , 9 ml (2 x 4.5 ml), 2x buffer
Thermal Cycler and Plate Sealer	
185-1196	C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Well Fast Reaction Module , includes C1000 Touch thermal cycler chassis, 96-well fast reaction module, USB flash drive
181-4000	PX1™ PCR Plate Sealer , includes heat sealing instrument, plate support block that holds 96-well and 384-well plates, sealing frame, power cord

EvaGreen is a trademark of Biotium, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Biotium, Inc. to sell reagents containing EvaGreen dye for use in real-time PCR, for research purposes only. FAM and VIC are trademarks of Applied Biosystems, Inc. MiSeq, and TruSeq are trademarks of Illumina, Inc. TaqMan is a trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

This product and/or its use is covered by claims of U.S. patents, and/or pending U.S. and non-U.S. patent applications owned by or under license to Bio-Rad Laboratories, Inc. Purchase of the product includes a limited, non-transferable right under such intellectual property for use of the product for internal research purposes only. No rights are granted for diagnostic uses. No rights are granted for use of the product for commercial applications of any kind, including but not limited to manufacturing, quality control, or commercial services, such as contract services or fee for services. Information concerning a license for such uses can be obtained from Bio-Rad Laboratories. It is the responsibility of the purchaser/end user to acquire any additional intellectual property rights that may be required.

Bio-Rad's real-time thermal cyclers are covered by one or more of the following U.S. patents or their foreign counterparts owned by Eppendorf AG: U.S. Patent Numbers 6,767,512 and 7,074,367.

伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司
电话: 021-6169 8500

北京办事处:
电话: 010-5939 0088

广州办事处:
电话: 020-8732 2339

武汉办事处:
电话: 027-8380 6255

伯乐公司中国呼叫中心: 800-820-5567 (国语), 400-820-3630 (手机) 欢迎访问: www.bio-rad.com

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com USA 800 4BIORAD Australia 61 02 9914 2800 Austria 01 877 89 01 Belgium 09 385 55 11 Brazil 55 21 3237 9400
Canada 905 364 3435 China Shanghai 86 21 6169 8500 Beijing 86 10 5939 0088 Toll-free Tech Support 800 820 5567 Czech Republic 420 241 430 532
Denmark 44 52 10 00 Finland 09 804 22 00 France 01 47 95 69 65 Germany 089 318 84 0 Greece 30 210 777 4396 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 36 1 455 8800 India 91 124 4029300 Israel 03 963 6050 Italy 39 02 216091 Japan 03 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Mexico 52 555 488 7670
The Netherlands 0318 540666 New Zealand 0508 805 500 Norway 23 38 41 30 Poland 48 22 331 99 99 Portugal 351 21 472 7700
Russia 7 495 721 14 04 Singapore 65 6415 3188 South Africa 27 861 246 723 Spain 34 91 590 5200 Sweden 08 555 12700 Switzerland 061 717 95 55
Taiwan 886 2 2578 7189 United Kingdom 020 8328 2000